(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103796677 B
(45)授权公告日 2019.08.16

(21)申请号 201280030668.X

(22)申请日 2012.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103796677 A

(43)申请公布日 2014.05.14

(30)优先权数据
PA201100312 2011.04.20 DK
PA201100824 2011.10.27 DK
PCT/EP2011/056388 2011.04.20 EP
PCT/EP2011/058772 2011.05.27 EP
PCT/EP2011/058779 2011.05.27 EP
61/552,286 2011.10.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/057307 2012.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/143524 EN 2012.10.26

(73)专利权人 健玛保
地址 丹麦哥本哈根

(72)发明人 J.J.尼杰森 J.I.米斯特斯
B.德戈伊杰 A.F.拉布里杰恩
P.帕伦 J.舒尔曼

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 钟鸣

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
C07K 16/10(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)

(56)对比文件
CN 2009154651 A1,2009.12.23,说明书第42页第2段-第43页第1段.
CN 2009154651 A1,2009.12.23,说明书第42页第2段-第43页第1段.
Philipp Kiewe等.Phase I Trial of the Trifunctional Anti-HER2 × Anti-CD3 Antibody Ertumaxomab in Metastatic Breast Cancer.《Clin Cancer Res》.American Association for Cancer Research,2006,第12卷(第10期),3085-3091.
Philipp Kiewe等.Phase I Trial of the Trifunctional Anti-HER2 × Anti-CD3 Antibody Ertumaxomab in Metastatic Breast Cancer.《Clin Cancer Res》.American Association for Cancer Research,2006,第12卷(第10期),3085-3091.

审查员 朱晓乐

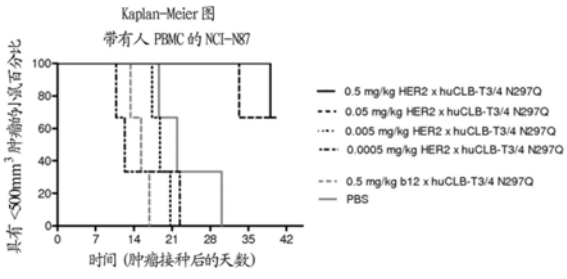
权利要求书4页 说明书122页
序列表88页 附图42页

(54)发明名称

针对HER2和CD3的双特异性抗体

(57)摘要

公开了双特异性抗体,其包含一个结合人表皮生长因子受体2(HER2)的表位的抗原结合区和一个结合人CD3的抗原结合区,以及相关的基于抗体的组合物和分子。还公开了包含所述抗体的药物组合物以及用于制备和使用所述抗体的方法。



CN 103796677 B

1.一种双特异性抗体,其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,其中第二抗原结合区结合人CD3上的表位且第一抗原结合区结合HER2上的表位,其中第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:6、DAS、和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2、和CDR3序列;且

其中所述第二抗原结合区包含选自下组的VH区和VL区:

a)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:234中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:235中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;

b)VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:242、243、和244的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:245、DTS、和SEQ ID NO:246的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;

c)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:238中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:239中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;和

d)VH区和VL区,所述VH包含SEQ ID NO:236中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:237中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列。

2.一种双特异性抗体,其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,其中第二抗原结合区结合人CD3上的表位,且第一抗原结合区结合HER2并包含VH区与VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列;

其中所述第二抗原结合区包含选自下组的VH区和VL区:

a)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:234中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:235中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;

b)VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:242、243、和244的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:245、DTS、和SEQ ID NO:246的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;

c)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:238中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:239中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;和

d)VH区和VL区,所述VH包含SEQ ID NO:236中的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述VL区包含SEQ ID NO:237中的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列。

3.前述任一项权利要求的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合区包含:

a)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:238的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:239的序列;或

b)VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:236的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:237的序列。

4.权利要求1或2的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合区包含分别为SEQ ID NO:242、243、和244的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列;且任选地包含分别为245、DTS、和246的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列。

5.权利要求1或2的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体进一步包含第一Fc区和第二Fc区。

6.权利要求1或2的双特异性抗体,其包含第一Fab臂和第二Fab臂,所述第一Fab臂包含所述第一抗原结合区且所述第二Fab臂包含第二抗原结合区。

7.权利要求1或2的双特异性抗体，其包含第一Fab臂和第二Fab臂，所述第一Fab臂包含所述第二抗原结合区且所述第二Fab臂包含第一抗原结合区。

8.权利要求5的双特异性抗体，其中第一和第二Fc区的同种型独立地选自IgG1和IgG4。

9.权利要求1或2的双特异性抗体，其为效应物功能缺陷型(effector-function deficient)。

10.权利要求6的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第二Fc区的405位为亮氨酸，所述第二Fc区的409位为精氨酸。

11.权利要求7的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第二Fc区的405位为亮氨酸，其中所述第一Fc区在409位为精氨酸。

12.权利要求6的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的350位为异亮氨酸，第370位为苏氨酸，第405位为亮氨酸，并且所述第二Fc区的409位为丙氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，苯丙氨酸，甘氨酸，组氨酸，异亮氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，精氨酸，丝氨酸，苏氨酸，缬氨酸，色氨酸和酪氨酸。

13.权利要求7的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的350位为异亮氨酸，第370位为苏氨酸，第405位为亮氨酸，并且所述第二Fc区的409位为丙氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，苯丙氨酸，甘氨酸，组氨酸，异亮氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，精氨酸，丝氨酸，苏氨酸，缬氨酸，色氨酸和酪氨酸。

14.权利要求6的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的405位为丙氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，组氨酸，异亮氨酸，甲硫氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，苏氨酸，缬氨酸，酪氨酸，亮氨酸，赖氨酸，丝氨酸或色氨酸。

15.权利要求7的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的405位为丙氨酸，天冬氨酸，谷氨酸，组氨酸，异亮氨酸，甲硫氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，苏氨酸，缬氨酸，酪氨酸，亮氨酸，赖氨酸，丝氨酸或色氨酸。

16.权利要求6的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的407位为甘氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸或色氨酸。

17.权利要求7的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的407位为甘氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸或色氨酸。

18.权利要求6的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的368位为丙氨酸，谷氨酸，甘氨酸，组氨酸，异亮氨酸，谷氨酰胺，精氨酸，天冬氨酸，天冬酰胺，丝氨酸，苏氨酸，缬氨酸或色氨酸。

19.权利要求7的双特异性抗体，其包含第一和二Fc区，其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1，所述第一Fc区的409位为精氨酸，并且所述第二Fc区的368位为丙氨酸，谷氨酸，甘氨酸，组氨酸，异亮氨酸，谷氨酰胺，精氨酸，天冬氨酸，天冬酰胺，丝氨酸，苏氨酸，缬氨酸或色氨酸。

20.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的370位为色氨酸。

21.权利要求7的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的370位为色氨酸。

22.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的399位为丙氨酸,苯丙氨酸,精氨酸,酪氨酸,组氨酸或赖氨酸。

23.权利要求7的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的399位为丙氨酸,苯丙氨酸,精氨酸,酪氨酸,组氨酸或赖氨酸。

24.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的366位为丙氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,组氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺或缬氨酸。

25.权利要求7的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和二Fc区的同种型为IgG1,所述第一Fc区的409位为精氨酸,并且所述第二Fc区的366位为丙氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,组氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺或缬氨酸。

26.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和第二Fc区域,除了具体指明的突变之外,包含SEQ ID NO:256的序列。

27.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和所述第二Fc区域在铰链区都不包含Cys-Pro-Ser-Cys序列。

28.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和所述第二Fc区域在铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

29.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和所述第二Fc区是人的抗体Fc区。

30.权利要求6的双特异性抗体,其包含第一和二Fc区,其中所述第一和/或所述第二Fc区包含突变,所述突变去除供天冬酰胺-连接的糖基化的接纳体位点。

31.权利要求1或2的双特异性抗体,其缀合至一种或多种其它部分,所述部分选自药物、放射性同位素、细胞因子或细胞毒性的部分,或含有它们的一个或多个接纳体基团。

32.权利要求31的双特异性抗体,其缀合至选自下组的细胞因子:IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα、IFNβ、IFNγ、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭(ancestim)、和TNFα。

33.一种用于生成双特异性抗体的体外方法,所述方法包括以下步骤:

a)提供结合HER2上的表位的第一抗体,其包含第一抗原结合区且包含第一Fc区,所述第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述的VL区包含分别为SEQ ID NO:6、DAS、和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2、和CDR3序列,所述Fc区包含第一CH3区,

b)提供第二抗体,其结合人CD3上的表位且包含第二Fc区,所述Fc区包含第二CH3区,

c)将所述第一抗体和第二抗体一起在还原性条件下温育,和

d)获得所述双特异性抗体,

其中所述第一和第二CH3的序列是不同的，且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区的分别的同二聚相互作用。

34.权利要求33的方法，其中所述第一抗体阻断抗体与可溶性人表皮生长因子受体2(HER2)的结合，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列。

35.权利要求33和34任一项的方法，其中所述第一和第二Fc区包含根据权利要求10-25任一项的氨基酸取代。

36.通过权利要求33至35任一项的方法可获得的双特异性抗体。

37.一种重组真核生物或原核生物宿主细胞，其产生如在权利要求1-32任一项中所定义的双特异性抗体。

38.一种药物组合物，其包含如权利要求1-32任一项中所定义的双特异性抗体和药学可接受的载体。

39.权利要求1或2的双特异性抗体，其用作药物。

40.权利要求1或2的双特异性抗体，其用在治疗癌症中。

41.权利要求40的双特异性抗体，其中所述癌症选自下组：乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食管癌、头和颈的鳞状细胞癌瘤、子宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑色素瘤、和软组织癌。

42.权利要求40的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体用于与一种或多种其它治疗剂组合治疗癌症。

43.权利要求1-32任一项的双特异性抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途，其可选地包含权利要求41和/或权利要求42的进一步的技术特征。

44.权利要求1-32任一项的双特异性抗体在制备用于抑制一种或多种表达HER2的肿瘤细胞的生长和/或增殖的药物中的用途。

45.用于产生权利要求1-32任一项的双特异性抗体的方法，所述方法包括以下步骤：

a)培养权利要求37的宿主细胞，和

b)从培养基中纯化所述双特异性抗体。

针对HER2和CD3的双特异性抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及针对人表皮生长因子受体2(HER2)和簇集决定子3(cluster determinant3,CD3)的双特异性抗体,和这类抗体的用途,特别是其在治疗癌症中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] HER2是一种185kDa的细胞表面受体酪氨酸激酶(cell surface receptor tyrosine kinase)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)家族的成员,所述家族包括四种不同的受体:EGFR/ErbB-1、HER2/ErbB-2、HER3/ErbB-3、和HER4/ErbB-4。所述EGFR家族的四种成员形成同二聚体和异二聚体,其中HER2是优选的且是其它ErbB受体的最强的二聚配偶体(Graus-Porta等人,Embo J1997;16:1647-1655;Tao等人,J Cell Sci2008;121:3207-3217)。HER2可以通过过表达或通过与其它可以由配体结合而激活的ErbB的异二聚化而激活(Riese和Stern,Bioessays1998;20:41-48)。对于HER2,还没有鉴定出配体。HER2活化导致受体磷酸化,其通过多种信号途径,如MAPK、磷酸肌醇3-激酶/AKT、JAK/STAT、和PKC,而触发下游的信号级联放大,其最终导致多种细胞功能的调节,如生长、存活、和分化(Huang等人,Expert Opin Biol Ther2009;9:97-110)。

[0004] 对HER2在肿瘤方面的关注很多集中在其在乳腺癌(breast cancer)中的作用,其中HER过表达在大约20%的病例中报道,且其与不良的预后有关联(Reese等人,Stem Cells1997;15:1-8;Andrechek等人,Proc Natl Acad Sci U S A2000;97:3444-3449;和Slamon等人,Science1987;235:177-182)。除了乳腺癌以外,HER2表达还与其它人癌瘤种类关联,包括前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、食管癌、和头和颈的鳞状细胞癌(Garcia de Palazzo等人,Int J Biol Markers1993;8:233-239;Ross等人,Oncologist2003;8:307-325;Osman等人,J Urol2005;174:2174-2177;Kapitanovic等人,Gastroenterology1997;112:1103-1113;Turken等人,Neoplasma2003;50:257-261;和Oshima等人,Int J Biol Markers2001;16:250-254)。

[0005] 曲妥珠单抗(trastuzumab)(赫赛汀®(Herceptin®))是一种重组的、人源化单克隆抗体,其针对HER2蛋白质的域IV,由此在高HER2过表达的细胞内阻断配体非依赖性HER2同二聚化,并在较小的程度上还阻断HER2与其它家族成员的异二聚化(Cho等人,Nature2003;421:756-760和Wehrman等人,Proc Natl Acad Sci U S A2006;103:19063-19068)。在具有中等HER2表达水平的细胞中,发现了曲妥珠单抗抑制HER2/EGFR异二聚体的形成(Wehrman等人,(2006),同上;Schmitz等人,Exp Cell Res2009;315:659-670)。曲妥珠单抗介导抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)并阻止胞外域脱落(ectodomain shedding),否则其会导致在HER2过表达细胞中形成截短的组成型活性蛋白质。而且,还对于曲妥珠单抗报道了对高水平表达HER2的肿瘤细胞的体外和体内的增殖(在Nahta和Esteva,Oncogene2007;26:3637-3643中综述)的抑制。赫赛汀®已被批准用于HER2过表达转移性乳腺癌的一线治疗和辅佐治疗,无论是与化学疗法组合还是在一种或多种化学疗法之后的单剂。曲妥珠单抗被发现仅在20-50%的HER2过表达乳腺癌患

者中有效，且许多初始反应者(responder)在几个月后显示了复发(Dinh等人,Clin Adv Hematol Oncol2007;5:707-717)。

[0006] 帕妥珠单抗(Pertuzumab)(Omnitarg™)是另一种人源化单克隆抗体。其针对HER2蛋白质的域II，导致对配体诱导的异二聚化的抑制(即HER2与已结合配体的ErbB家族的另一个成员的二聚化)；其据报道为不严格需要高HER2表达水平的机制(Franklin等人,Cancer Cell2004;5:317-328)。虽然帕妥珠单抗也介导ADCC，帕妥珠单抗的主要作用机制依赖其对二聚化的阻断(Hughes等人,Mol Cancer Ther2009;8:1885-1892)。此外，发现帕妥珠单抗通过抑制EGFR/HER2异二聚体的形成而增强EGFR内化(internalization)和下调，否则所述异二聚体在质膜表面将EGFR拘束(Hughes等人,2009,同上)。这一点与所观察到的EGFR同二聚体比EGFR/HER2二聚体的内化更有效相关联(Pedersen等人,Mol Cancer Res2009;7:275-284)。据报道，当在患者中将两者组合时，帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的互补性机制导致增强的抗肿瘤作用和功效，所述患者是之前的曲妥珠单抗疗法期间有进展的患者(Baselga等人,JClin Oncol2010;28:1138-1144)，且在之前没有治疗过的HER2-阳性转移性乳腺癌中评估该抗体与多烯他塞的组合的三期试验正在进行。

[0007] 改进靶向性的抗体疗法的另一种途径是通过向表达抗原的癌细胞特异性地递送细胞毒性细胞或药物。该使用T-细胞以有效地杀灭肿瘤细胞的概念已经在1985年描述过(Stearz等人,Nature1985,314:628-631)。例如，所谓的三功能抗体(trifunctional antibodies)是双特异性抗体，其以一臂靶向肿瘤细胞上的抗原并以另一臂靶向例如T细胞上的CD3，并由Fc区提供Fc受体结合。在结合后，形成T细胞、肿瘤细胞和结合抗体Fc域的效应细胞的复合物，导致了肿瘤细胞的杀灭(Muller和Kontermann,BioDrugs2010;24:89-98.)。厄妥索单抗(Ertumaxomab)即是一种这样的针对HER2和CD3的三功能抗体，其在具有低HER2表达的细胞系中诱导细胞毒性，且其在转移性乳腺癌中正在进行二期临床开发(clinical development)(Jones等人,Lancet Oncol2009;10:1179-1187和Kiewe等人,Clin Cancer Res2006;12:3085-3091)。

[0008] 或者，通过双靶向性抗体片段(例如，双靶向性单链抗体)，形成T细胞和肿瘤细胞的复合物，导致肿瘤细胞的杀灭(Muller和Kontermann,BioDrugs2010;24:89-98,Baeuerle和Reinhardt2009,Cancer Research96:4941)。Blinatumomab(Bargou等人,Science2008,321:974-976)是称为BiTE的单链抗体构建体，其通过靶向CD19和CD3而诱导细胞毒性。其它基于抗体片段的T-细胞接合双特异性物(T-cell engaging bispecifics)也已经得到描述(Moore等人2011,Blood117:4542-4551,Baeuerle等人Current opinion in Molecular Therapeutics2009,11:22-30)。

[0009] 调节HER2的功能的复杂机制使得有必要针对这一原癌基因的新的和优化的治疗策略进行进一步的研究。相应地，对于治疗HER2相关疾病，如癌症，的有效和安全的产品仍有需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的一个目标是提供新型的有效的双特异性抗体，其包含衍生自HER2抗体的第一抗原结合区和具有对CD3的结合特异性的第二区域，所述双特异性抗体用于医疗。通常，所述第二区域是衍生自CD3抗体，任选地已知的CD3抗体，的抗原结合区。

[0012] 如在本文中所示，该新型双特异性HER2xCD3抗体能够在体外细胞毒性测定法中剂

量依赖性地杀灭表达HER2的细胞、有效地预防肿瘤体内生长、和/或具有其它相对于单特异性HER2或CD3抗体的优势。在一个方面，所述HER2结合区所衍生自的单特异性HER2抗体呈现HER2结合特征或呈现与在本领域中所描述的HER2抗体不同的可变区序列。

[0013] 在优选的实施方案中，本发明的双特异性HER2xCD3抗体是从HER2抗体制备的，所述HER2抗体是完全人的或人源化的、结合至新表位、和/或在人患者中对于治疗用途具有良好的特性。所述双特异性抗体的每个Fab臂可以进一步包含Fc区，任选地包含促进双特异性抗体形成的修饰、影响Fc介导的效应物功能的修饰、和/或本文中所描述的其它特征。

[0014] 本发明的这些方面和其它方面在下面进一步的描述。

[0015] 附图简述

[0016] 图1：HER2HuMab重链可变区(VH)序列与种系(germline)(参考)序列的比对(A-O)。在每个VH序列中，将在具体位置与在种系中的氨基酸不同的氨基酸凸显。显示了共有VH序列，其中“X”指示在该位置可能为另外的氨基酸(选自在每个位置所对准的那些氨基酸)。在每个VH序列中将CDR1、CDR2、和CDR3序列下划显示。共有CDR序列在表4中进一步定义。

[0017] 图2：HuMab轻链可变区(VL)序列与种系(参考)序列的比对(A-H小图)。在每个VL序列中，将在具体位置与在种系中的氨基酸不同的氨基酸凸显。在例如图2A中，所有VL序列都是衍生自相同的V-片段(IgKV1-12-01)，但是最接近的J-片段在不同抗体之间是不同的。显示了共有VL序列，其中“X”指示在该位置可能为另外的氨基酸(选自在指示的位置所对准的那些氨基酸)。在每个VL序列中将CDR1、CDR2、和CDR3序列下划显示。共有CDR序列在表4中进一步定义。

[0018] 图3：HER2抗体与(A、B、E)高(AU565)和(C、D、F)低(A431)HER2表达细胞系的结合曲线，其如在实施例12中所描述而确定。显示的数据是每个细胞系的一个有代表性的实验的平均荧光强度(mean fluorescence intensities，MFI)。EC_{50}值表示表见亲和力(apparent affinity)。

[0019] 图4：HER2抗体与在恒河猴上皮细胞上表达的HER2的结合。显示的数据是在实施例13中描述的一个实验的平均荧光强度(MFI)。

[0020] 图5：HER2的铬释放(Chromium-release)(ADCC)测定法，显示在与HER2抗体温育后^{51}Cr标记的SK-BR-3细胞的PBMC介导的裂解。所描述的值是平均最大百分比^{51}Cr释放±标准偏差，其来自一个有代表性的以SK-BR-3细胞进行的体外ADCC实验。具体内容参见实施例15。

[0021] 图6：HER2抗体对于AU565细胞的增殖的效果，如与未处理的细胞(设为100%)的比较。显示的数据是AU565细胞与未处理的细胞比较的百分比增殖±标准偏差，其是在三个独立的实验中测量的。*显著($P<0.05$)。具体内容参见实施例16。

[0022] 图7：以Heregulin-β1刺激并以指示的HER2抗体处理的可存活的MCF7细胞的百分比，相比于仅以Heregulin-β1刺激的细胞。作为对照，显示了未刺激的细胞的百分比增殖(无)。从三次独立实验获得了数据±标准偏差。*对Heregulin-β1诱导的增殖的显著抑制($P<0.05$)。具体内容参见实施例17。

[0023] 图8：ADC测定法，显示通过抗kappa-ETA’缀合的HER2抗体对AU565细胞(A,B)或A431细胞(C,D)的杀灭。(A,B)显示的数据是以未缀合的和以抗kappa-ETA’缀合的HER2抗体处理的AU565细胞进行的一个有代表性的实验的荧光强度(FI)。(C,D)显示的数据是以未缀

合的和以抗kappa-ETA'缀合的HER2抗体处理的A431细胞进行的一个有代表性的实验的荧光强度(FI)。具体内容参见实施例18。

[0024] 图9:双特异性HER2xCD3抗体与Jurkat细胞的结合。所有生成的双特异性抗体都显示与Jurkat的结合,尽管与单特异性亲本抗体相比具有较低的表见亲和力(命名法=CD3克隆xHER2克隆)。

[0025] 图10:(A)HER2xCD3抗体(HER2169x huCLB-T3/4)与标记的AU565细胞(CFSE-Y-轴)和Jurkat细胞(PKH26-X-轴)的剂量依赖性刺激性结合,由此构建了相互连接的细胞的双联体(doublet),如由FACS散点图(dot plot)中的双阳性细胞所示(Q2)。(B)显示在Q2中的双阳性事件(虚线)的FACS实验的有代表性的实例,其代表细胞通过双特异性HER2xCD抗体同时结合。

[0026] 图11:通过双特异性HER2xCD3抗体的对AU565细胞的剂量依赖性杀灭。双特异性抗体产生自与两种不同HER2抗体(169和153)或对照抗体IgG1b12结合的4种不同CD3抗体。(A)huOKT3、(B)HUM291、(C)YTH12.5、和(D)huCLB-T3/4。具体内容可见实施例21。

[0027] 图12:抗体诱导的HER2的下调。在与10μg/mL抗体温育3日后在AU565细胞裂解物中表达的HER2的相对百分比。HER2的量是使用HER2特异性捕获ELISA定量的并作为相比于未处理的细胞的百分比绘制的。显示的数据是三次实验的平均值±标准偏差。

[0028] 图13:以溶酶体标志物LAMP1(Cy5)对HER2抗体(FITC)的共区域化分析。FITC像素强度对于多个单特异性HER2抗体与Cy5重叠。对于每种抗体,将三个不同图像的LAMP1/Cy5阳性像素中的FITC像素绘制。组3抗体098和153与抗体025和来自组2的帕妥珠单抗和来自组1的169和赫赛汀®相比显示在LAMP1/Cy5阳性区室(compartments)中更高的FITC像素强度。

[0029] 图14:HER2抗体与以不同HER2ECD构建体转染的CHO-S细胞的结合,其通过流式细胞术的平均值分析。Hu-HER2=完全人HER2、Hu-HER2-ch(I)CR1=具有鸡域I的hu-HER2、Hu-HER2-ch(II)=具有鸡域II的hu-HER2、hu-HER2-ch(III)=具有鸡域III的hu-HER2、且Hu-HER2-ch(IV)=具有鸡域IV的hu-HER2。显示的数据是一个具有代表性的抗体TH1014-153的平均荧光强度(MFI)。具体内容见实施例24。

[0030] 图15:在雌性CB.17重度联合免疫缺陷病(severe combined immunodeficiency,SCID)小鼠中的NCI-N87人胃癌瘤异种移植(xenograft)模型中的HER2-HuMab的体内效果。显示的数据是每组的平均肿瘤大小±S.E.M.(每组n=10只小鼠)(A,C)和存活(B,D)。具体内容见实施例25。

[0031] 图16:在Balb/C裸小鼠中的BT-474乳腺肿瘤异种移植物中HER2HuMab的体内效果。所显示的数据是每组的平均肿瘤大小±S.E.M.(每组n=8只小鼠)(A)和存活(B)。具体内容见实施例26。

[0032] 图17:在以PBMC进行的细胞毒性测定法中的非特异性Fc介导的杀灭可以使用具有经修饰的Fc区(LFLEDANQPS)的抗体进一步降低,而单独的经由N297Q的非糖基化不能完全去除该活性。这些突变不危害双特异性HER2xCD3抗体的特异性杀灭活性。具体内容见实施例27。

[0033] 图18:HER2表位的位置对HER2xCD3抗体的功效具有较强的作用,其如与同样的抗CD3抗体(huCLB-T3/4)在细胞毒性测定法中的组合的三种mAb的对比研究所示,其中将T细

胞(A)或PBMC(B)作为效应细胞。

[0034] 图19:T细胞细胞毒性测定法,其使用具有多种HER2表达水平的靶细胞系。所示的是在HER2xCD3双特异性抗体的存在下与T细胞温育三日后的存活细胞的百分比。功效与表达水平正相关,因为具有最高表达水平的细胞在最低抗体浓度被杀灭。

[0035] 图20:在双特异性HER2xCD3抗体和单特异性对照物的存在下与AU565肿瘤细胞共培养的T细胞的CD69表达。

[0036] 图21:在肿瘤细胞的不存在下在以DuoBody HER2169x huCLBT3/4的不同的Fc变体处理的PBMC汇集中的T细胞的CD69表达。

[0037] 图22:将PBMC或T细胞与DuoBody huCLB T3/4-Q x HER2-169-Q(CD3-Q/169Q)抗体和HER2阳性肿瘤细胞温育所导致的细胞因子概貌。

[0038] 图23:GM-CSF产生,其作为通过双特异性HER2x CD3抗体的T细胞活化的量度,和非特异性Fc介导的活化的贡献。

[0039] 图24:在皮下异种移植模型中对HER2x CD3双特异性mAb的体内功效的评估,所述模型具有HER2表达肿瘤细胞系和人PBMC。在(A)中,显示以双特异性HER2x CD3抗体处理的具有NCI-N87S.C.异种移植物和S.C.人PBMC的小鼠中的肿瘤发育(平均数和SEM)。比较了三个剂量日程(dosing schedule),且最低的剂量显示最有效。在(B)中在Kaplan-Meier曲线中显示了存活小鼠(具有小于500mm^3的肿瘤细胞)的百分比。

[0040] 图25:三重突变体(ITL)、二重突变体(IT,IL,TL)、和单突变体(L)人IgG1-2F8在生成双特异性抗体中的比较,所述抗体是通过与人IgG4-7D8进行Fab臂交换而生成的。在人IgG1-2F8三重和二重突变体与具有CPSC铰链(A)的野生型IgG4-7D8、或具有稳定化铰链的突变型IgG4-7D8-CPPC(B)、或具有野生型CPPC或稳定化的CPPC铰链的单突变体IgG1-2F8-F405L和IgG4-7D8(C)之间的2-MEA诱导的Fab臂交换后双特异性抗体的生成通过ELISA确定。对于分别包括双重突变型和单突变型的实验,在ELISA中分析了0-20μg/mL或0-10μg/mL的浓度系列(总抗体)。与双重突变体IgG1-2F8-IL和-TL的组合导致了与三重突变体IgG1-ITL相似的双特异性EGFR/CD20结合。与IgG1-2F8-IT的组合不导致双特异性产物。与单突变体IgG1-2F8-F405L的组合导致双特异性EGFR/CD20结合。

[0041] 图26:IgG1-2F8-ITL和IgG1-7D8-K409X突变体之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。在IgG1-2F8-ITL和指示的IgG1-7D8-K409X突变体之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换后双特异性抗体的生成是通过ELISA确定的。(A)分析了0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)。阳性对照是纯化的双特异性抗体批次,其衍生自IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC。(B)将交换表示为在20μg/mL的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8xIgG4-2F8)之间、阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间、和IgG1-2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-7D8-K409X突变体和IgG1-2F8-ITL之间的Fab臂交换的结果。

[0042] 图27:2-MEA诱导的IgG1-2F8-F405X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换。2-MEA诱导的指示的gG1-2F8-F405X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂交换后双特异性抗体的生成是通过ELISA测定的。(A)将0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)在ELISA中分析。阳性对照是纯化的双特异性抗体批次,衍生自IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R。(B)将交换表示在20μg/mL的抗体浓度的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条

代表IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-2F8-F405X突变体和IgG1-7D8-K409R或对照之间的Fab臂交换的结果。

[0043] 图28:2-MEA诱导的IgG1-2F8-Y407X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换。在2-MEA诱导的指示的IgG1-2F8-Y407X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂交换后生成的双特异性抗体是通过ELISA测定的。(A)将0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)在ELISA中分析。阳性对照是纯化的双特异性抗体批次,衍生自IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R。(B)将交换表示为在20μg/mL抗体浓度的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)之间,和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-2F8-Y407X突变体和IgG1-7D8-K409R或对照之间的Fab臂交换的结果。

[0044] 图29:在2-MEA诱导的指示的IgG1-2F8-L368X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂交换之后双特异性抗体的生成使用0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)通过ELISA确定(A)。阳性对照是纯化的双特异性抗体批次,衍生自IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R。(B)在20μg/mL的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8xIgG4-2F8)之间和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-2F8-L368X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换的结果。

[0045] 图30:2-MEA诱导的指示的IgG1-2F8-K370X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂交换之后双特异性抗体的生成使用0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)通过ELISA确定(A)。阳性对照是纯化的双特异性抗体批次,其衍生自IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R。(B)在20μg/mL的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。肾灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)之间和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表同时进行的指示的IgG1-2F8-D370X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换的结果。

[0046] 图31:2-MEA诱导的指示的IgG1-2F8-D399X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab臂交换后双特异性抗体的生成使用0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)通过ELISA确定(A)。(B)在20μg/mL抗体浓度的相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)之间和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-2F8-D399X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换的结果。

[0047] 图32:2-MEA诱导的指示的IgG1-2F8-T366X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的体外Fab交换之后的双特异性抗体的生成使用0-20μg/mL的浓度系列(总抗体)通过ELISA确定(A)。(B)在20μg/mL抗体浓度相比于阳性对照(黑色条)的双特异性结合。深灰色条代表IgG4对照(IgG4-7D8x IgG4-2F8)之间和阴性对照(IgG1-2F8x IgG1-7D8-K409R)之间的双特异性结合。浅灰色条代表来自同时进行的指示的IgG1-2F8-T366X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换的结果。

[0048] 图33:在以HER2表达肿瘤细胞系和人PBMC进行皮下异种移植模型中对HER2x CD3双特异性mAb的体内功效的评估。在(A)中,显示了在以双特异性HER2x CD3抗体处理的具有

NCI-N87s.c.异种移植和s.c.人PBMC的小鼠中的肿瘤发育(平均和SEM)。比较了不同剂量日程,且0.05mg/kg和0.5mg/kg显示为有效。在(B)中,在Kaplan-Meier曲线中显示了具有肿瘤大小小于500mm^3的小鼠的百分比。

[0049] 发明详述

[0050] 定义

[0051] 当在本文中使用时,术语"HER2"(也称作ErbB-2、NEU、HER-2、和CD340),指人表皮生长因子受体2(SwissProt P04626),且包括HER2的任何变体、同工型、和物种同源物,其由细胞-包括肿瘤细胞-天然地表达,或由以HER2基因或cDNA转染的细胞表达。物种同源物包括恒河猴HER2(macaca mulatta;Genbank登录号GI:109114897)。

[0052] 术语"CD3"指人CD3蛋白质复合体,其由六条不同链构成(一条CD3γ链(SwissProt P09693)、一条CD3δ链(SwissProt P04234)、两条CD3ε链(SwissProt P07766)、和一个CD3zeta链同二聚体)(εγ:εδ:ζζ),且其与T细胞受体α和β链缔合(associate with)。该术语包括任何CD3变体、同工型、和物种同源物,其由细胞-包括T细胞-天然地表达,或在以编码前述的链的基因或cDNA转染的细胞上表达。

[0053] 术语"免疫球蛋白"指一类结构相关的糖蛋白,其由两对多肽链组成,一对轻(L)低分子量的链和一对重(H)链,所有四条链是通过二硫键相互连接的。免疫球蛋白的结构已被充分地表征。参见例如Fundamental Immunology Ch.7(Paul,W.,ed.,2nd ed.Raven Press,N.Y.(1989))。简单来说,每条重链通常包含重链可变区(在本文中简写为V_H或VH)和重链恒定区。重链恒定区通常包含三个域,C_H1、C_H2、和C_H3。每条轻链通常包含轻链可变区(本文中简写为V_L或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区通常包含一个域,C_L。V_H和V_L区可以进一步细分为高变的区域(regions of hypervariability)(也叫高变区,其可以是序列上和/或结构上确定的环的形式上高度可变的),也称为互补决定区(complementarity determining region,CDR),其被更加保守、称为框架区(framework regions,FR)的区域隔开。每个V_H和V_L通常是由三个CDR和四个FR构成的,从氨基端到羧基端以以下的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(亦参见Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。除非另外声明或与上下文冲突,否则本文中的CDR序列是根据IMGT规则鉴定的(Brochet X.,Nucl Acids Res.2008;36:W503-508和Lefranc MP.,Nucleic Acids Research1999;27:209-212;参见互联网http地址imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg)。然而,对抗体序列中的氨基酸残基的编号还可以根据由Kabat等人在Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)中所描述的方法进行(本文中的如"如在Kabat中的可变域残基编号"、"Kabat位置"、和"根据Kabat"的短语指该编号系统)。特别地,对于在恒定区中的氨基酸的编号,可以使用EU index编号系统(Kabat等人,同上)。对于给定的抗体可以如在Kabat等人,同上中所描述确定残基的Kabat编号。

[0054] 除非与上下文矛盾,否则在本发明中对氨基酸位置的指代是根据EU-index的,其如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)所描述的。

[0055] 在本发明的上下文中的术语"抗体"(antibody,Ab)指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段、或其任何一者的衍生物,其具有在通常生理条件下以显著时间期间的半寿

期特异性结合抗原的能力，所述半寿期如至少大约30分钟、至少大约45分钟、至少大约一小时、至少大约两小时、至少大约四小时、至少大约8小时、至少大约12小时、至少大约48小时或更长，大约3、4、5、6、7或更多日，等等，或任何其它相关的功能定义的期间(如足以诱导、促进、增强、和/或调制与抗体结合抗原相关的生理反应的时间和/或足以使抗体募集(recruit)效应物活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体(Ab)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述组织或因子包括多种免疫系统的细胞(如效应细胞)和补体系统的组成成分，如C1q，其为补体活化的经典途径的第一组成成分。HER2抗体还可以是多特异性抗体，如双特异性抗体(bispecific antibody)、双抗体(diabody)、或相似的分子(对双抗体的描述例如见PNASUSA90(14)，6444-8(1993))。的确，除了HER2的部分之外，本发明所提供的双特异性抗体、双抗体等还可以结合任何合适的靶物。如在上面所指示的，本文中所用的术语抗体，除非另外声明或明显与上下文矛盾，包括为抗原结合片段—即保留与抗原特异性结合能力—的抗体的片段。已经显示了抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。术语“抗体”所涵盖的抗原结合片段的实例包括(i)Fab’或Fab片段-由V_L、V_H、C_L、和C_H1域所组成的单价片段，或在WO2007059782(Genmab)中所描述的单价抗体；(ii)$F(ab')_2$片段-包含由铰链区的二硫桥联所连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)基本上由V_H和C_H1域所组成的Fd片段；(iv)基本上由抗体的单个臂的V_L和V_H域所组成的Fv片段；(v)dAb片段(Ward等人，Nature341，544-546(1989))，其基本上由V_H域组成并且也称为域抗体(Holt等人；Trends Biotechnol.2003Nov；21(11)：484-90)；(vi)驼类抗体(camelid)或纳米抗体(nanobody)(Revets等人；Expert Opin Biol Ther.2005Jan；5(1)：111-24)；和(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外，虽然Fv片段的两个域，V_L和V_H是由不同的基因所编码的，可以通过合成接头(synthetic linker)使用重组方法将它们联结，所述合成接头使得可以将它们做成单一的蛋白质链，其中V_L和V_H和区域配对以形成单价分子(称作单链抗体或单链Fv(scFv)，见例如Bird等人.，Science242，423-426(1988)和Huston等人，PNAS USA85，5879-5883(1988))。这类单链抗体是涵盖在术语抗体中的，除非另外注明或由上下文明显地指示。虽然这类片段一般包括在抗体的含义中，但是它们作为总体和作为独立个体都是本发明的独特特征，呈现不同的生物学性质和效用。对在本发明的上下文中的这些和其它有用的抗体片段，以及这类片段的双特异性形式在本文中进一步讨论。还应该理解，术语抗体，除非另外具体指明，还包括多克隆抗体；单克隆抗体(mAb)；抗体样多肽(antibody-like polypeptide)，如嵌合抗体和人源化抗体；和通过任何已知技术所提供的保留特异性结合抗原能力的抗体片段(抗原结合片段)，所述技术如酶切割、肽合成、和重组技术。所生成的抗体抗原具有任何同种型。

[0056] 在本发明的上下文中术语“双特异性抗体”应理解为具有两个不同抗原结合区的抗体，其由不同抗体序列所定义。可以将其理解为不同靶物结合但也包括结合一种靶物上的不同表位。

[0057] 在本发明上下文中的术语“双特异性抗体”应理解为具有两个不同抗原结合区(基于序列信息)的抗体。这可以意指不同的靶物结合，但是也包括与在一种靶物上的不同表位的结合。

[0058] 当在本文中使用时，除非与上下文矛盾，否则术语“Fab臂”或“臂”指一个重链-轻

链对。

[0059] 当在本文中使用时，除非与上下文矛盾，否则术语“Fc区”指抗体区域，其包括至少铰链区、CH2域、和CH3域。

[0060] 如在本文中所使用的，“同种型”指由重链恒定区基因所编码的免疫球蛋白类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM)。

[0061] 术语“单价抗体”在本发明的上下文中意指抗体分子，其能够结合抗原的单个分子，且因此不能够交联抗原。

[0062] “效应物功能上缺陷的抗体(antibody deficient in effector function)”或“效应物功能缺陷抗体(effector-function-deficient antibody)”指抗体，其一种或多种效应物机制显著地降低或其没有能力激活一种或多种效应物机制，所述机制如补体活化或Fc受体结合。因此，效应物功能缺陷抗体具有显著降低的或不具有介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体介导的细胞毒性(CDC)的能力。此种抗体的一个实例是IgG4。另一个实例是在Fc区引入突变，所述突变可以强烈地降低与补体蛋白和Fc受体的相互作用。参见，例如，Bolt S等人,Eur J Immunol1993,23:403-411;Oganesyan,Acta Crys.2008,D64,700-704;和Shields等人,JBC2001,276:6591-6604。

[0063] “HER2抗体”或“抗HER2抗体”是如以上所描述的抗体，其特异性结合抗原HER2。

[0064] “HER2xCD3抗体”或“抗HER2xCD3抗体”是多特异性抗体，任选地是双特异性抗体，其包含两种不同抗原结合区，其一种特异性结合抗原HER2而一种特异性结合CD3。

[0065] 如在本文中所使用的术语“人抗体”意图包括抗体，其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。本发明的人抗体可以包括氨基酸残基，其不由人种系免疫球蛋白序列所编码(例如，通过随机或位点特异性诱变在体外或通过体细胞突变在体内引入的突变)。但是，如在本文中所使用的术语“人抗体”不意图包括抗体，其中衍生自另一种哺乳动物物种-如小鼠-的种系的CDR序列已经被移植至人框架序列上。

[0066] 如在本文中所使用的，如果抗体获得自使用人免疫球蛋白序列的系统，则人抗体“衍生自”特别的种系序列，其例如通过免疫接种携带人免疫球蛋白基因的小鼠或通过筛选人免疫球蛋白基因文库，且其中选择的人抗体的氨基酸序列与由种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列具有至少90%、如至少95%、例如至少96%、如至少97%、例如至少98%、或如至少99%同一性。通常，在重链CDR3以外，衍生自特别的人种系序列的人抗体与由种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列会显示不超过20个氨基酸差异，例如，不超过10个氨基酸差异，如不超过9、8、7、6、或5个氨基酸差异，例如不超过4、3、2、或1个氨基酸差异。

[0067] 当在本文中使用时，术语“重链抗体”(“heavy chain antibody”或“heavy-chain antibody”)指抗体，其仅仅由两条重链组成且缺乏通常见于抗体中的两条轻链。重链抗体，其天然存在于，例如，驼类(camelids)中，可以结合抗原，尽管其缺乏VL域。

[0068] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体是分离的。如在本文中所使用的术语“分离的抗体”意图指抗体，其基本上不含其它具有不同抗原特异性的抗体(例如，特异性结合HER2的分离的抗体基本上不含特异性结合除了HER2之外的抗原的抗体)。然而，特异性结合HER2的表位、同工型或变体的分离的抗体具有与其它相关的抗原的交叉反应性，所述相关抗原例如来自其它物种(如HER2物种同源物)。此外，分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学品。在本发明的一个实施方案中，将两种或更多种具有不同抗原结合特异性

的“分离的”抗体在定义明确的组合物中组合。

[0069] 当在本文中在两种或更多种抗体的上下文中使用时，术语“与…竞争”或“与…交叉竞争(cross-compete)”指示两种或更多种抗体竞争对HER2的结合，例如，在实施例14中描述的测定法中竞争对HER2的结合。如果抗体与所述一种或多种其它抗体竞争，则抗体“阻断”或“交叉阻断”其它抗体与HER2的结合，其中所述竞争是25%或更多，其中25%-74%代表“部分阻断”且75%-100%代表“完全阻断”，优选使用如实施例14的测定法所确定。对于一些抗体对，只有当一种抗体涂覆于板上且另一种用于竞争-而非反过来-时，才能观察到实施例的测定法中的竞争或阻断。除非另外定义或上下文否认，否则当在本文中使用术语“与…交叉竞争”、“阻断”、或“交叉阻断”也意图涵盖这类的抗体对。

[0070] 术语“表位”意指蛋白质决定子(protein determinant)，其能够特异性与抗体结合。表位通常由分子的表面基团如氨基酸或糖侧链组成，且通常具有特定的三维结构特征，以及特定的电荷特征。构象和非构象的表位是这样区分的：与前者，而非后者的结合在变性溶剂的存在下丢失。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基，和不直接参与结合的其它氨基酸残基，如被特异性抗原结合肽覆盖或被有效地阻断的氨基酸残基(换言之，该氨基酸残基在特异性结合肽的足迹(footprint)中)。

[0071] 如在本文中所使用的术语“单克隆抗体”指单一分子组份的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特别的表位的单一结合特异性和亲和力。相应地，术语“人单克隆抗体”指显示单一结合特异性的抗体，其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。人单克隆抗体可以通过杂交瘤生成，其包括将B细胞融合至永生化细胞，所述B细胞获得自转基因或转染色体(transchromosomal)非人动物，如转基因小鼠，其具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0072] 如在本文中所使用的术语“结合”，在抗体与预定的抗原或表位结合的上下文中通常是下述结合，所述结合具有的亲和力，当通过使用例如表面等离振子共振(surface plasmon resonance，SPR)技术在BIAcore3000设备中使用抗原作为配体且抗体作为分析物确定时，对应于大约10^{-7}M或更低、如大约10^{-8}M或更低、如大约10^{-9}M或更低、大约10^{-10}M或更低、或大约10^{-11}M或甚至更低的K_D，且与其结合除了与预定的抗原或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(例如，BSA或酪蛋白)结合的亲和力相比对应于至少低十倍、如至少低100倍、例如至少低1,000倍，如至少低10,000倍，例如至少低100,000倍的K_D的亲和力结合于预定的抗原。亲和力降低的量取决于抗体的K_D，即当抗体的K_D很低时(即，抗体高度特异)，则对于抗原的亲和力比非特异性抗原的亲和力低的量可为至少10,000倍。

[0073] 如在本文中所使用的术语“k_d”(sec^{-1})指特别的抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称作k_{off}值。

[0074] 如在本文中所使用的术语“k_a”($M^{-1}x\ sec^{-1}$)指特别的抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。

[0075] 如在本文中所使用的术语“K_D”(M)指特别的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0076] 如在本文中所使用的术语“K_A”(M^{-1})指特别的抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数，且是通过将k_a除以k_d而获得的。

[0077] 当在本文中使用时，术语“第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用”指在第一CH3/第二CH3异二聚体蛋白质中的第一CH3区和第二CH3区的相互作用。

[0078] 当在本文中使用时，术语“第一和第二CH3区之间的同二聚相互作用”指在第一CH3/第一CH3同二聚体蛋白质中的第一CH3区和另一个第一CH3区之间的相互作用，和在第二CH3/第二CH3同二聚体蛋白质中的第二CH3和另一个CH3区之间的相互作用。

[0079] 术语“还原性条件”或“还原性环境”指条件或环境，其中底物-在这里是抗体的铰链区中的半胱氨酸残基-更可能变成还原的而不是氧化的。

[0080] 如在本文中所使用的术语“抑制增殖”(例如，指细胞，如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时细胞增殖的实质性降低，其是与不与HER2抗体接触的相同细胞的增殖相比的，例如，至少大约10%、至少大约20%、或至少大约30%的对细胞培养物的增殖的抑制，或至少与参考抗体-如曲妥珠单抗-相等的对细胞培养物的增殖的抑制，例如，如根据实施例例如，实施例16中的测定法所确定的。

[0081] 如在本文中所使用的术语“促进增殖”(例如，指细胞，如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时细胞增殖的任何的实质性提高，其是与不与HER2抗体接触的相同细胞的增殖相比的，例如，至少大约10%、至少大约20%、或至少大约30%的对细胞培养物的增殖的促进，或至少与参考抗体-如F5-相等的对细胞培养物的增殖的抑制，例如，如根据实施例中的测定法所测定的。

[0082] 如在本文中所使用的术语“内化(internalization)”，当在HER2抗体的上下文中使用时，包括将抗体从细胞表面和/或从周围培养基-例如，通过胞吞作用-内化进入HER2表达细胞的任何机制。抗体的内化可以使用测量内化的抗体的量的直接测定法(如，例如，在实施例19中描述的fab-CypHer5E测定法)，或测量内化的抗体-毒素缀合物的间接测定法(如，例如，实施例18的抗-kappa-ETA′测定法)而评估。

[0083] 本发明还提供抗体，其包含实施例的抗体的V_L区、V_H区、或一种或多种CDR的功能性变体。在HER2抗体的上下文中使用的V_L区、V_H区、或一种或多种CDR的功能性变体依然允许抗体保留至少实质性比例的(例如，至少大约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)亲本抗体的亲和力/亲合力(affinity/avidity)和/或特异性/选择性，并且在一些情况中此种HER2抗体可以以比亲本抗体更强的亲和力、选择性和/或特异性缔合。

[0084] 这类功能性变体通常保留与亲本抗体的显著的序列同一性。两个序列之间的百分比同一性是序列之间具有的相同的位置的数目的函数(即，%同源性=相同位置的#/位置的总#x100)，要考虑缺口(gap)的数目和每个缺口的长度，所述缺口是为了所述两个序列的最优比对需要而引入的。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性可以，例如，使用E.Meyers和W.Miller,Comput.Appl.Biosci4,11-17(1988)的算法而确定，其已经被并入ALIGN程序(版本2.0)，其使用PAM120权重残基表(PAM120weight residue table)、12的缺口长度罚分(gap length penalty)和4的缺口罚分(gap penalty)。此外，两个氨基酸序列之间的百分比同一性还可以使用Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48,444-453(1970)的算法而确定。

[0085] 例示性的变体包括在一个或多个“变体”氨基酸位置处与在图1和图2中所示的亲本抗体VH和/或VL序列不同的那些，所述位置在对应的共有序列中表示为“X”。优选的变体是其中新氨基酸选自在图1或2中的比对的序列之一的在对应位置的氨基酸的变体(对于CDR序列变体的细节，见表4)。或者或此外，VH、VL或CDR变体的序列可以主要通过保守取代而与亲本抗体序列的VH、VL或CDR的序列不同；例如，变体中的至少10个，如至少9、8、7、6、5、

4、3、2、1个取代是保守氨基酸残基替换。

[0086] 在本发明的上下文中，保守取代可以定义为在下表中反映的氨基酸类别中的取代：

[0087] 对于保守取代的氨基酸残基类别

[0088]

酸性残基	Asp(D)、和Glu(E)
碱性残基	Lys(K)、Arg(R)、和His(H)
疏水不带电荷的残基	Ser(S)、Thr(T)、Asn(N)、和Gln(Q)
脂族的不带电荷的残基	Gly(G)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、和Ile(I)
非极性不带电荷的残基	Cys(C)、Met(M)、和Pro(P)
芳香残基	Phe(F)、Tyr(Y)、和Trp(W)

[0089] 在本发明的上下文中，除非另外指示，否则以下代号用于描述突变：i)在给定位置的氨基酸的取代写作例如K405R，其意指在405位以精氨酸取代赖氨酸；和ii)对于具体变体使用具体的三字母或一字母代码，包括代码Xaa和X，以指示任何氨基酸残基。因此，在405位以精氨酸取代赖氨酸命名为K405R，或在405位用任何氨基酸的取代赖氨酸命名为K405X。在405位的赖氨酸缺失的情况指示为K405*。

[0090] 如在本文中所使用的术语“重组宿主细胞”(或简写为“宿主细胞”)意图指细胞，其中已经向所述细胞中引入了表达载体，例如，编码本发明的抗体的表达载体。重组宿主细胞包括，例如，转染瘤(transfectoma)，如CHO细胞、HEK293细胞、NS/0细胞、和淋巴细胞。

[0091] 术语“转基因非人动物”指具有包含一种或多种人重链和/或轻链转基因或转染色体(transchromosome)(无论是否并入所述动物的天然基因组DNA)的基因组，且能够表达完全人抗体的非人动物。例如，转基因小鼠可以具有人轻链转基因和人重链转基因或人重链转染色体，使得当以HER2抗原和/或表达HER2的细胞免疫接种时，所述小鼠产生人HER2抗体。人重链转基因可以整合入小鼠的染色体DNA，如转基因小鼠的情况，例如HuMAb® 小鼠，如HCo7、HCo12、或HCo17小鼠，或者可将人重链转基因在染色体外维持，如转染色体KM小鼠的情况，其如在WO02/43478中所描述。相似的具有更大的人Ab基因谱(human Ab gene repertoire)的小鼠包括HCo7和HCo20(见例如，WO2009097006)。这类转基因和转染色体小鼠(本文中总称为“转基因小鼠”)通过进行V-D-J重组和同种型转换，能够产生针对给定抗原的人单克隆抗体的多种同种型(如IgG、IgA、IgM、IgD和/或IgE)。转基因、非人动物还可以用于产生针对具体抗原的抗体，即引入编码这种特异性的抗体的基因，例如通过将所述基因可操作地连接于在动物的乳汁中表达的基因。

[0092] “处理/治疗”指将有效量的本发明的治疗活性复合物施用，其目的为减轻(easing)、改善(ameliorating)、阻止(arresting)、或消灭(eradicating)(治愈(curing))疾病状态或症状。

[0093] “有效量”或“治疗有效量”指在所需的剂量和在所需的持续时间达成合意的治疗结果的有效的量。HER2抗体的治疗有效量可以根据下述因素，如个体的疾病状态、年龄、性别、和体重，和HER2抗体在个体中诱导合意的反应的能力而改变。治疗有效的量还是抗体或抗体部分的治疗有益效果超过其有毒或有害效果的量。

[0094] “抗个体基因型”抗体是识别一般与抗体的抗原结合位点关联的独特的决定子的

抗体。

[0095] 本发明的进一步的方面和实施方案

[0096] 如以上描述的，本发明涉及包含两个不同抗原结合区的双特异性抗体，所述抗原结合区一个具有对HER2的结合特异性而一个具有对CD3的结合特异性。

[0097] 在一个方面，本发明涉及双特异性抗体，其包含来自本文中所描述的HER2抗体的第一抗原结合区和本文中所描述的来自CD3抗体的第二抗原结合区。

[0098] 在一个实施方案中，HER2抗原结合区来自HER2抗体，所述HER2抗体与来自如本文中描述的交叉阻断组(cross-block group)1的参考抗体交叉阻断或结合相同的表位。在一个具体的实施方案中，所述双特异性抗体包含来自如本文中所描述的交叉阻断组1的抗体的抗原结合区。

[0099] 在一个实施方案中，HER2抗原结合区来自HER2抗体，所述HER2抗体与来自如在本文中所描述的交叉阻断组2的参考抗体交叉阻断或结合相同的表位。在一个具体的实施方案中，所述双特异性抗体包含来自如本文中所描述的交叉阻断组2的抗体的抗原结合区。

[0100] 在一个实施方案中，HER2抗原结合区来自HER2抗体，所述HER2抗体与来自如在本文中所描述的交叉阻断组3的参考抗体交叉阻断或结合相同的表位。在一个具体实施方案中，所述双特异性抗体包含来自如本文中所描述的交叉阻断组3的抗体的抗原结合区。

[0101] 在一个实施方案中，HER2抗原结合区来自HER2抗体，所述HER2抗体与来自本文中所描述的交叉阻断组4的参考抗体交叉阻断或结合相同的表位。在一个具体实施方案中，所述双特异性抗体包含来自如本文中所描述的交叉阻断组4的抗体的抗原结合区。

[0102] 在一个具体的实施方案中，任一项前述实施方案中的双特异性抗体包含抗原结合区，其与参考CD3抗体交叉阻断或结合相同的表位，所述参考CD3抗体包含CD3抗体YTH12.5、HUM291(也称为visilizumab)、huOKT3-C114S-gLC(与teplizumab相关)的VH和VL区，这些抗体都是领域内所知的，或包含CD3抗体huCLB-T3/4的VH和VL区，所述抗体代表CLB-T3/4的人源化的变体。这些CD3抗体的进一步细节在实施例21中提供。在另一个具体的实施方案中，前述任一个实施方案的双特异性抗体都包含来自选自下组抗体的抗原结合区：YTH12.5、HUM291huOKT3-C114S-gLC、和huCLB-T3/4。

[0103] 因此，本发明的双特异性抗体可以包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区结合人表皮生长因子受体2(HER2)是的表位且其中第二抗原结合区结合人CD3上的表位。

[0104] 抗体和抗原结合区

[0105] 本发明的双特异性抗体包含两个不同的抗原结合区，其分别结合HER2和CD3。此外，如以下所描述的，产生本发明的双特异性抗体的一种方法基于将第一HER2抗体和第二CD3抗体在还原性条件下温育。

[0106] 本发明的结合HER2抗体的抗原结合区可以属于交叉阻断组1、2、3、和4的任一个。接下来给出在这类属于交叉阻断组1、2、3、和4、的与HER2结合的抗原结合区的实例，且“抗原结合区”在该上下文中意图既包括本发明的本发明的双特异性抗体的抗原结合区，例如，第一抗原结合区，也包括第一HER2抗体的的抗原结合区。

[0107] 在本发明的进一步或另外的实施方案中，双特异性抗体包含交叉阻断1、2、3、或4的人抗体的一种或多种的抗原结合区，其阻断与HER2的结合。

[0108] 在本发明的进一步或另外的实施方案中，所述双特异性抗体包含抗原结合区，其与交叉阻断1、2、3、或4的人抗体的一种或多种阻断对可溶性HER2上同样的表位的结合。

[0109] 在本发明的进一步或另外的实施方案中，所述双特异性抗体包含抗原结合区，其与交叉阻断1、2、3、或4的人抗体的一种或多种结合HER2上同样的表位。

[0110] 因此，本发明的双特异性抗体可以包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一和第二抗原结合区结合不同表位，且其中第一抗原结合区结合人表皮生长因子受体2(HER2)上的表位。

[0111] 本发明的双特异性抗体的第一抗原结合区可以是来自交叉阻断组1、2、3、和4任何的抗原结合区。

[0112] 交叉阻断组1

[0113] 在一个方面，本发明的双特异性抗体包含抗原结合区，其阻断与HER2，例如，可溶性HER2的结合，或与本文中所描述的与交叉阻断组1的人抗体的一种或多种结合HER2上的同样的表位。

[0114] 在一个实施方案中，当如在实施例14中所描述而确定时，抗体结合区交叉阻断曲妥珠单抗与可溶性HER2的结合。

[0115] 在一个实施方案中，所述抗原结合域阻断与HER2的结合，例如，可溶性HER2，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列(169)。

[0116] 在一个实施方案中，所述抗原结合区阻断与HER2，例如，可溶性HER2的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:8的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:12的序列(050)。

[0117] 在一个实施方案中，所述抗原结合区阻断与HER2，例如，可溶性HER2，的结合或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:15的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:19的序列(084)。

[0118] 在一个实施方案中，所述抗原结合区阻断与HER2，例如，可溶性HER2，的结合或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，其选自下组：

[0119] a)包含SEQ ID NO:77的序列的VH区和包含SEQ ID NO:78的序列的VL区(049)；

[0120] b)包含SEQ ID NO:79的序列的VH区和包含SEQ ID NO:80的序列的VL区(051)；

[0121] c)包含SEQ ID NO:81的序列的VH区和包含SEQ ID NO:82的序列的VL区(055)；

[0122] d)包含SEQ ID NO:83的序列的VH区和包含SEQ ID NO:84的序列的VL区(123)；

[0123] e)包含SEQ ID NO:85的序列的VH区和包含SEQ ID NO:86的序列的VL区(161)；和

[0124] f)包含SEQ ID NO:87的序列的VH区和包含SEQ ID NO:88的序列的VL区(124)。

[0125] 在本发明的双特异性抗体的另一个其它的或另选的方面，一个抗原结合区结合HER2且包含与本文中所描述的抗体的VH CDR3、VH区、和/或VL区序列类似或相同的这类序列。

[0126] 在一个实施方案中，所述抗原结合区包含VH CDR3区，其具有选自下组的序列：

[0127] SEQ ID NO:11(050,049,051,055)，任选地其中VH区衍生自IgHV3-21-1种系序列；

[0128] SEQ ID No:130，如SEQ ID NO:18的序列(084)，任选地其中VH区衍生自IgHV1-69-04种系序列；

[0129] SEQ ID NO:133(169,123,161,124),如SEQ ID NO:4的序列(169),任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-1种系序列;或

[0130] 在一个实施方案中,所述抗原结合区包含如图1中所示的抗体123、161、或124的一种的VH CDR3区,任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-1种系。

[0131] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含选自下组的VH区

[0132] a)VH区,其包含SEQ ID NO:9、127、和11的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如SEQ ID NO:9、10、和11的CDR1、CDR2、和CDR3序列(050);任选地其中VH区衍生自IgHV3-23-1种系;

[0133] b)VH区,其包含SEQ ID NO:128、129、和130的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:16、17、和18的CDR1、CDR2、和CDR3序列(084);任选地其中VH区衍生自IgHV1-69-04种系;和

[0134] c)VH区,其包含SEQ ID NO:131、132、和133的序列的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169);任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-1种系。

[0135] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含选自前述实施方案(a)或(b)的VH区,以及VL区,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:13、XAS(其中X是A或V)、和SEQ ID No:155的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别选自SEQ ID No:13或20的CDR1序列,为AAS或VAS的CDR2序列,和选自SEQ ID NO:14和21的CDR3序列(050、084);任选地,VL区衍生自IgKV1-12-01种系。

[0136] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含为前述实施方案(c)的VH区,以及VL区,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:6、DXS(其中X=A或T)、和SEQ ID NO:156的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169);任选地,其中V1区衍生自IgKV3-11-01。

[0137] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区,其包含分别为SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列;并且,任选地VL区,所述VL区包含分别为SEQ ID NO:6、DAS、和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169)。

[0138] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区,其包含分别为SEQ ID NO:9、10、和11的CDR1、CDR2、和CDR3序列;和VL区,其包含分别为SEQ ID NO:13、AAS、和SEQ ID NO:14的CDR1、CDR2、和CDR3序列(050)。

[0139] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区,其包含分别为SEQ ID NO:16、17、和18的CDR1、CDR2、和CDR3序列;和VL区,其包含分别为SEQ ID NO:20、VAS、和SEQ ID NO:21的CDR1、CDR2、和CDR3序列(084)。

[0140] 在其它的实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含:

[0141] a)VH区和任选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列(169);

[0142] b)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:8的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:12的序列(050);

[0143] c)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:15的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:19的序列(084);

[0144] d)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:77的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:78的序列(049);

[0145] e)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:79的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:80的序列(051);

[0146] f)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:81的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:82的序列(055);

[0147] g)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:83的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:84的序列(123);

[0148] h)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:85的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:86的序列(161);

[0149] i)VH区和优选地VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:87的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:88的序列(124);和/或

[0150] j)任何所述抗体的变体,其中所述变体优选地具有至多1、2、或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守氨基酸取代和其中新氨基酸是在图1或2中的比对的序列的相同位置,特别是在对应的共同序列中指示为"X"的位置的氨基酸的取代。

[0151] 交叉阻断组2

[0152] 在本发明的抗体的一个方面中,双特异性抗体包含抗原结合区,其阻断与HER2,例如,可溶性HER2的结合,或与和本文中所描述的交叉阻断组2的人抗体的一种或多种结合HER2上相同的表位。

[0153] 在一个实施方案中,当如在实施例14中描述而确定时,抗原结合区交叉阻断帕妥珠单抗与可溶性HER2的结合。

[0154] 在一个实施方案中,所述抗原结合区阻断与HER2,例如可溶性HER2的结合,或与参考抗体结合相同的表位,所述参考抗体包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的序列且VL区包含SEQ ID NO:26的序列(025)。

[0155] 在一个实施方案中,所述抗原结合区阻断与HER2,例如可溶性HER2的结合,或与参考抗体结合相同的表位,所述参考抗体包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:29的序列且VL区包含SEQ ID NO:32的序列(091)。

[0156] 在一个实施方案中,所述抗原结合区阻断与HER2,例如可溶性HER2的结合,或与参考抗体结合相同的表位,所述参考抗体包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:35的序列且VL区包含SEQ ID NO:39的序列(129)。

[0157] 在一个实施方案中,所述抗原结合区阻断与HER2,例如,可溶性HER2的结合,或与参考抗体结合相同的表位,所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区:

[0158] a)包含SEQ ID NO:89的序列的VH区和包含SEQ ID NO:90的序列的VL区(001);

[0159] b)包含SEQ ID NO:91的序列的VH区和包含SEQ ID NO:92的序列的VL区(143);

[0160] c)包含SEQ ID NO:93的序列的VH区和包含SEQ ID NO:94的序列的VL区(019);

[0161] d)包含SEQ ID NO:95的序列的VH区和包含SEQ ID NO:96的序列的VL区(021);

[0162] e)包含SEQ ID NO:97的序列的VH区和包含SEQ ID NO:98的序列的VL区(027);

[0163] f)包含SEQ ID NO:99的序列的VH区和包含SEQ ID NO:100的序列的VL区(032);

[0164] g)包含SEQ ID NO:101的序列的VH区和包含SEQ ID NO:102的序列的VL区(035);

[0165] h)包含SEQ ID NO:103的序列的VH区和包含SEQ ID NO:104的序列的VL区(036);

[0166] i)包含SEQ ID NO:105的序列的VH区和包含SEQ ID NO:106的序列的VL区(054);

和

[0167] j)包含SEQ ID NO:107的序列的VH区和包含SEQ ID NO:108的序列的VL区(094)。

[0168] 在本发明的双特异性抗体的另一个其它的或另选的实施方案中,所述双特异性抗体或第一抗原结合区包含与在本文中所描述的新型抗体的序列相似或相同的VH CDR3、VH区和/或VL区序列。

[0169] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含具有选自下组的序列的VH CDR3区:

[0170] SEQ ID NO:136,如SEQ ID NO:25的序列(025),任选地其中VH区衍生自IgHV4-34-1种系序列;

[0171] SEQ ID NO:139,如SEQ ID NO:31的序列(091),任选地其中VH区衍生自IgHV4-34-01种系序列;和

[0172] SEQ ID NO:142,如SEQ ID NO:38的序列(129),任选地其中VH区衍生自IgHV3-30-01种系序列。

[0173] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含如在图1中所示的抗体001、143、019、021、027、032、035、036、054、或094之一的VHCDR3区,任选地其中VH区衍生自IgHV4-34-1种系。

[0174] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含选自下组的VH区:

[0175] a)VH区,其包含SEQ ID NO:134、135、和136的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如SEQ ID NO:23、24、和25的CDR1、CDR2、和CDR3序列(025);任选地其中所述VH区衍生自IgHV4-34-1种系;

[0176] b)VH区,其包含SEQ ID NO:137、138、和139的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:30、163、和31的CDR1、CDR2、和CDR3序列(091);任选地其中所述VH区衍生自IgHV4-34-01种系;和

[0177] c)VH区,其包含SEQ ID NO:140、141、和142的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:36、37、和38的CDR1、CDR2、和CDR3序列(129);任选地其中所述VH区衍生自IgHV3-30-01种系。

[0178] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:157、AAS、和SEQ ID No:164的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ IDNo:27、AAS、和SEQ ID NO:28的CDR1、CDR2、和CDR3序列(025);任选地其中VL区衍生自IgKV1D-16-01种系。

[0179] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(b)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:33、AX_1X_2(其中X_1是A或T,优选A;且X_2是S或F,优选S)、和SEQ ID No:158的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID No:33、AAS、和SEQ ID NO:34的CDR1、CDR2、和CDR3序列(091);任选地,其中VL区衍生自IgKV1D-16-01种系。

[0180] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(c)且VL区包含分别为SEQ ID NO:40、DAS、和SEQ ID NO:41的CDR1、CDR2、和CDR3序列(129),任选地,其中VL区衍生自IgKV3-11-01。

[0181] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和任选地VL区,其

中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:23、24、和25的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:27、AAS、和SEQ ID NO:28的CDR1、CDR2、和CDR3序列(025)。

[0182] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:30、163、和31的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:33、AAS、和SEQ ID NO:34的CDR1、CDR2、和CDR3序列(091)。

[0183] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:36、37、和38的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:40、DAS、和SEQ ID NO:41的CDR1、CDR2、和CDR3序列(129)。

[0184] 在不同的实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含:

[0185] a)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和,任选地,包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025);

[0186] b)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091);

[0187] c)包含SEQ ID NO:35的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:39的序列的VL区(129);

[0188] d)包含SEQ ID NO:89的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:90的序列的VL区(001);

[0189] e)包含SEQ ID NO:91的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:92的序列的VL区(143);

[0190] f)包含SEQ ID NO:93的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:94的序列的VL区(019);

[0191] g)包含SEQ ID NO:95的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:96的序列的VL区(021);

[0192] h)包含SEQ ID NO:97的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:98的序列的VL区(027);

[0193] i)包含SEQ ID NO:99的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:100的序列的VL区(032);

[0194] j)包含SEQ ID NO:101的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:102的序列的VL区(035);

[0195] k)包含SEQ ID NO:103的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:104的序列的VL区(036);

[0196] l)包含SEQ ID NO:105的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:106的序列的VL区(054);

[0197] m)包含SEQ ID NO:106的序列的VH区和,优选地,包含SEQ ID NO:108的序列的VL区(094);和/或

[0198] n)任何所述抗体的变体,其中所述变体优选地具有至多1、2、或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守氨基酸取代和其中新氨基酸是在图1或2中的比对的序列的相同位置,特别是在对应的共同序列中指示为“X”的位置的氨基酸的取代。

[0199] 交叉阻断组3

[0200] 在本发明的双特异性抗体的一个方面，所述双特异性抗体包含抗原结合区，其阻断与HER2-例如可溶性HER2-结合，或与本文中所描述的交叉阻断组3的人抗体的一种或多种结合HER2上的相同表位。

[0201] 在一个实施方案中，如在实施例14中所描述而确定的，抗原结合区交叉阻断与F5和/或C1与可溶性HER2的结合。

[0202] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:46的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:49的序列(127)。

[0203] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:49的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:53的序列(159)。

[0204] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:56的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:60的序列(098)。

[0205] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:63的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:67的序列(153)。

[0206] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:70的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:6747的序列(132)。

[0207] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断与HER2，例如可溶性HER2，的结合，或与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含选自下组的VH区和VL区：

[0208] a)包含SEQ ID NO:109的序列的VH区和包含SEQ ID NO:110的序列的VL区(105)；

[0209] b)包含SEQ ID NO:111的序列的VH区和包含SEQ ID NO:112的序列的VL区(100)；

[0210] c)包含SEQ ID NO:113的序列的VH区和包含SEQ ID NO:114的序列的VL区(125)；

[0211] d)包含SEQ ID NO:115的序列的VH区和包含SEQ ID NO:116的序列的VL区(162)；

[0212] e)包含SEQ ID NO:117的序列的VH区和包含SEQ ID NO:118的序列的VL区(033)；

[0213] f)包含SEQ ID NO:119的序列的VH区和包含SEQ ID NO:120的序列的VL区(160)；

[0214] g)包含SEQ ID NO:121的序列的VH区和包含SEQ ID NO:122的序列的VL区(166)；

[0215] h)包含SEQ ID NO:123的序列的VH区和包含SEQ ID NO:124的序列的VL区(152)；和

[0216] i)包含SEQ ID NO:125的序列的VH区和包含SEQ ID NO:126的序列的VL区(167)。

[0217] 在本发明的双特异性抗体的另一个其它的或另选的方面，双特异性抗体或第一抗原结合区包含与本文中所描述的新型抗体的序列相似或相同的VHCDR3、VH区、和/或VL区。

[0218] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含具有选自下组的序列的VH CDR3区：

[0219] SEQ ID NO:148，如SEQ ID NO:48的序列(127)，任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-01种系序列；

[0220] SEQ ID NO:52(159)，任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-01种系序列；

[0221] SEQ ID NO:145,如SEQ ID NO:59的序列(098),任选地其中VH区衍生自IgHV3-23-01种系序列;

[0222] SEQ ID NO:154,如SEQ ID NO:66的序列(153),任选地其中VH区衍生自IgHV3-30-03-01种系序列;和

[0223] SEQ ID NO:151,如SEQ ID NO:73的序列(132),任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-01种系序列。

[0224] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含图1中所示的抗体105、100、125、或162之一的VH CDR3区,任选地,其中VH区衍生自IgHV3-23-1种系。

[0225] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含图1中所示的抗体033、160、166、152或167之一的VH CDR3区,任选地,其中VH区衍生自IgHV3-30-3-01种系。

[0226] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含选自下组的VH区:

[0227] a)VH区,其包含SEQ ID NO:146、147、和148的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如SEQ ID NO:43、44、和45的CDR1、CDR2、和CDR3序列(127);任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-01种系;

[0228] b)VH区,其包含SEQ ID NO:149、51、和52的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:50、51、和52的CDR1、CDR2、和CDR3序列(159);任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-01种系;

[0229] c)VH区,其包含SEQ ID NO:143、144、和145的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:57、58、和59的CDR1、CDR2、和CDR3序列(098);任选地其中VH区衍生自IgHV3-23-01种系;

[0230] d)VH区,其包含SEQ ID NO:152、153、和154的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO::64、65、和66的CDR1、CDR2、和CDR3序列(153);任选地其中VH区衍生自IgHV3-30-03-01种系;和

[0231] e)VH区,其包含SEQ ID NO:71、150、和151的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:71、72、和73的CDR1、CDR2、和CDR3序列(132);任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-01种系。

[0232] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:47、AAS、和SEQ ID NO:48的CDR1、CDR2、和CDR3序列(127);任选地,其中所述VL区衍生自IgKV1D-8-01种系。

[0233] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(b)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:54、AAS、和SEQ ID No:55的CDR1、CDR2、和CDR3序列(159);任选地,其中所述VL区衍生自IgKV1D-16-01种系。

[0234] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(c)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:159、AAS、和SEQ ID NO:160的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如为SEQ ID NO:61、AAS、和SEQ ID NO:62的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列(098);任选地,其中所述VL区衍生自IgKV1D-16-01种系。

[0235] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(d)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:161、XAS(其中X=D或A,优选D)、和SEQ ID NO:162的CDR1、CDR2、和CDR3序列(153),如SEQ ID NO:68、DAS、和69的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列;任选地,其中所述VL区衍生自IgKV1D-16-01种系。

[0236] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区是前述实施方案(e)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:75、DAS、和SEQ ID NO:76的CDR1、CDR2、和CDR3序列(132)；任选地，其中所述VL区衍生自IgKV3-11-01种系。

[0237] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:43、44、和45的CDR1、CDR2、和CDR3序列且其中所述VL区包含分别为SEQ ID NO:47、AAS、和SEQ ID NO:48的CDR1、CDR2、和CDR3序列(127)。

[0238] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:50、51、和52的CDR1、CDR2、和CDR3序列且其中所述VL区包含分别为SEQ ID NO:54、AAS、和SEQ ID NO:55的CDR1、CDR2、和CDR3序列(159)。

[0239] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:57、58、和59的CDR1、CDR2、和CDR3序列且其中所述VL区包含分别为SEQ ID NO:60、AAS、和SEQ ID NO:61的CDR1、CDR2、和CDR3序列(098)。

[0240] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:64、65、和66的CDR1、CDR2、和CDR3序列且其中所述VL区包含分别为SEQ ID NO:68、DAS、和SEQ ID NO:69的CDR1、CDR2、和CDR3序列(153)。

[0241] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含分别为SEQ ID NO:71、72、和73的CDR1、CDR2、和CDR3序列且其中所述VL区包含分别为SEQ ID NO:75、DAS、和SEQ ID NO:76的CDR1、CDR2、和CDR3序列(132)。

[0242] 在不同的实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含：

[0243] a)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:46的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:49的序列(127)；

[0244] b)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:49的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:53的序列(159)；

[0245] c)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:56的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:60的序列(098)；

[0246] d)VH区和任选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:67的序列(153)；

[0247] e)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:70的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:74的序列(132)；

[0248] f)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:109的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:110的序列(105)；

[0249] g)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:111的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:112的序列(100)；

[0250] h)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:113的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:114的序列(125)；

[0251] i)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:115的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:116的序列(162)；

[0252] j)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:117的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:118的序列(033)；

[0253] k)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:119的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:120的序列(160)；

[0254] l)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:121的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:122的序列(166)；

[0255] m)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:123的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:124的序列(152)；

[0256] o)VH区和优选的VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:125的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:126的序列(167)；和/或

[0257] p)任何所述抗体的变体，其中所述变体优选具有至多1、2、或3个氨基酸修饰，更优选氨基酸取代，如保守氨基酸取代和其中新氨基酸是在图1或2中的比对的序列的相同位置，特别是在对应的共同序列中指示为“X”的位置的的取代。

[0258] 交叉阻断组4

[0259] 在本发明的双特异性抗体的一个方面，当如在实施例14中所描述而确定时，所述双特异性抗体包含结合HER2但不阻断第二抗体与可溶性HER2结合的抗原结合区，所述第二抗体任选地为固定化的形式，其包含任何曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、F5、和C1的VH和VL序列。

[0260] 在本发明的抗体的其它或另选的方面中，所述抗原结合区阻断或交叉阻断交叉阻断组4的人抗体的一种或多种与HER2的结合。

[0261] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:165的序列且VL区包含SEQ ID NO:169的序列(005)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的(fully blocking)。

[0262] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:172的序列且VL区包含SEQ ID NO:176的序列(006)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的。

[0263] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:179的序列且VL区包含SEQ ID NO:183的序列(059)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的。

[0264] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:186的序列且VL区包含SEQ ID NO:190的序列(060)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的。

[0265] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:193的序列且VL区包含SEQ ID NO:197的序列(106)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的。

[0266] 在一个实施方案中，抗原结合区阻断参考抗体与HER2的结合，所述参考抗体任选地为固定化的，且其中所述参考抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:200的序列

且VL区包含SEQ ID NO:204的序列(111)，优选其中当以实施例14中所描述而确定时，所述抗体是完全阻断的。

[0267] 在不同和具体的实施方案中，抗体结合区阻断前述实施方案的两种、三种、四种、五种、或六种参考抗体的结合，如，例如抗体005和111、抗体005和006；抗体059和106；抗体006和059；抗体059、106、005和060；抗体006、59、060和111；或者抗体059、106、005、060、111和006的结合。

[0268] 在一个实施方案中，所述抗体，当固定化时，与在前述实施方案中定义的所有抗体竞争可溶性HER2的结合，当以如实施例14中描述而确定时所述竞争为25%或更多、优选50%或更多。

[0269] 在本发明的抗体的一个方面，抗体与本文中所描述的新型人抗体的一种或多种结合同样的表位。

[0270] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和任选地VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:165的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:169的序列(005)。

[0271] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:172的序列且所述VL区包含SEQID NO:176的序列(006)。

[0272] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:179的序列且所述VL区包含SEQID NO:183的序列(059)。

[0273] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:186的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:190的序列(060)。

[0274] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:193的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:197的序列(106)。

[0275] 在一个实施方案中，抗原结合区与抗体结合相同的表位，所述抗体包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:200的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:204的序列(111)。

[0276] 在一个实施方案中，抗原结合区与至少一种选自下组的抗体结合相同的表位：

[0277] a)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:207的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:208的序列(041)

[0278] b)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:209的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:210的序列(150)，和

[0279] c)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:211的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:212的序列(067)；

[0280] d)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:213的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:214的序列(072)；

[0281] e)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:215的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:216的序列(163)；

[0282] f)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:217的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:218的序列(093)；

[0283] g)抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:219的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:220的序列(044)。

[0284] 在本发明的双特异性抗体的另一个其它或另选的方面，所述双特异性抗体或第一抗原结合区包含与在本文中所描述的HER2抗体的序列相似或相同的VH CDR3、VH区、和/或VL区序列。

[0285] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH CDR3区，其具有选自下组的氨基酸序列：

[0286] SEQ ID No:223，如SEQ ID No:168、189、196的序列(005、060、106)，任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-1种系；

[0287] SEQ ID No:226，如SEQ ID NO:175的序列(006)，任选地其中VH区衍生自IgHV3-23-1种系序列；

[0288] SEQ ID No:229，如SEQ ID NO:182的序列(059)，任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-1种系序列；或

[0289] SEQ ID No:231，如SEQ ID NO:203的序列(111)，任选地其中VH区衍生自IgHV1-69-4种系序列。

[0290] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH CDR3区，其包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列，其中X1=Q、H、或L；X2=R、A、T、或K；X3=G；X4=D；X5=R或没有；X6=G或没有；X7=Y或F；X8=Y或D；X9=Y、F、或H；X10=Y、D、S、F、或N；X11=M或L；和X12=V或I；优选其中X1=Q、X2=R或A；X5=X6=没有；X7=Y或F；X8=Y；X9=F；X10=Y；和X12=V。在特别的实施方案中，所述抗体包含VH CDR3区，其包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列，其中X1=Q；X2=R或A；X3=G；X4=D；X5=X6=没有；X7=Y或F；X8=Y；X9=F；X10=Y；和X12=V。

[0291] 在一个实施方案中，所述抗体或第一抗原结合区包含VH CDR3区，其包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列，其中X1=Q，X2=K；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=F；X8=Y；X9=X10=F；X11=L；和X12=V；或其中X1=Q，X2=A；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=X8=Y；X9=Y；X10=N；X11=M；和X12=V；或其中X1=Q，X2=K；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=X8=Y；X9=H；X10=Y；X11=L；和X12=V；或其中X1=Q，X2=K；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=Y；X8=Y；X9=F；X10=N；X11=L；和X12=V；或其中X1=Q，X2=R；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=Y；X8=Y；X9=F；X10=N；X11=L；和X12=V；或其中X1=Q，X2=R；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=Y；X8=Y；X9=X10=F；X11=L；和X12=I；或其中X1=Q，X2=A；X3=G；X4=D，X5=X6=没有；X7=X8=Y；X9=Y；X10=N；X11=M；和X12=V。

[0292] 在一个实施方案中，双特异性抗体或第一抗原结合区包含如图1中所示的抗体041、150、067、072、163、或093之一的VH CDR3区，任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-1种系。

[0293] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体或第一抗原结合区包含选自下组的VH区：

[0294] a)VH区，其包含SEQ ID NO:221、222、和223的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如

[0295] a.选自SEQ ID NO:166、187、和194的CDR1序列；选自167、188、和195的CDR2序列；和选自168、189、和196的CDR3序列(005,060,106)，

[0296] b.分别为SEQ ID NO:166、167、和168的CDR1、CDR2、和CDR3序列(005)，

[0297] c.分别为SEQ ID NO:187、188、和189的CDR1、CDR2、和CDR3序列(060)，

[0298] d.分别为SEQ ID NO:196、197、和198的CDR1、CDR2、和CDR3序列(106)，

[0299] 任选地其中VH区衍生自IgHV5-51-1种系；

[0300] b)VH区，其包含SEQ ID NO:224、225、和226的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:173、174、和175的CDR1、CDR2、和CDR3序列(006)，任选地其中VH区衍生自IgHV3-

23-1种系;和

[0301] c)VH区,其包含SEQ ID NO:227、228、和229的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:180、181、和182的CDR1、CDR2、和CDR3序列(059),任选地其中VH区衍生自IgHV1-18-1种系;和

[0302] d)VH区,其包含SEQ ID NO:230、202、和231的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为SEQ ID NO:201、202、和203的CDR1、CDR2、和CDR3序列(111),任选地其中VH区衍生自IgHV1-69-4种系。

[0303] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a)、(c)或(d)且所述VL区包含分别为SEQ IDNO:232、GAS、和SEQ ID No:233的CDR1、CDR2、和CDR3序列,如分别为选自SEQ ID NO170、184、191、198、和205的CDR1序列,为GAS的CDR2,和选自171、85、192、199、和206的CDR3序列(005,059,060,106,111),任选地其中VL区衍生自IgKV3-20-01种系。

[0304] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,其中所述VH区为前述实施方案(b)且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:177、DAS、和SEQ ID NO:178的CDR1、CDR2、和CDR3序列(006),任选地其中VL区衍生自IgKV3-11-01。

[0305] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和任选地VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:166、167、和168的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:170、GAS、和SEQ ID NO:171的CDR1、CDR2、和CDR3序列(005)。

[0306] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:173、174、和175的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:177、DAS、和SEQ ID NO:178的CDR1、CDR2、和CDR3序列(006)。

[0307] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:180、181、和182的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:184、GAS、和SEQ ID NO:185的CDR1、CDR2、和CDR3序列(059)。

[0308] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:187、188、和189的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:191、GAS、和SEQ ID NO:192的CDR1、CDR2、和CDR3序列(060)。

[0309] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:194、195、和196的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:198、GAS、和SEQ ID NO:199的CDR1、CDR2、和CDR3序列(106)。

[0310] 在一个实施方案中,双特异性抗体或第一抗原结合区包含VH区和VL区,所述VH区包含分别为SEQ ID NO:201、202、和203的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:205、GAS、和SEQ ID NO:206的CDR1、CDR2、和CDR3序列(111)。

[0311] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:226的CDR2序列,其中X1=Y和X2=H,以及SEQ ID NO:227的CDR3序列,其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=F;X8=Y;X9=X10=F;X11=L;和X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列,其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列,其中X1=Q,X2=S,X3=X4=没有,和X5=L(041)。

[0312] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=Y和X2=H，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=X8=Y;X9=Y;X10=N;X11=M;且X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=X4=没有，和X5=L(150)。

[0313] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=Y和X2=D，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=X8=Y;X9=H;X10=Y;X11=L;和X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=P,X4=R和X5=L(067)。

[0314] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=Y和X2=D，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=P,X4=R和X5=L(072)。

[0315] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=R;X2=I和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=Y和X2=D，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=X4=没有，和X5=L(163)。

[0316] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=Y和X2=D，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=Y;X8=Y;X9=X10=F;X11=L;和X12=I;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;DR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=X4=没有，和X5=L(093)。

[0317] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体和第一抗原结合区包含VH区和VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:221的CDR1序列，其中X1=R;X2=S和X3=S;SEQ ID NO:222的CDR2序列，其中X1=F和X2=D，和SEQ ID NO:223的CDR3序列，其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=没有;X7=X8=Y;X9=Y;X10=N;X11=M;和X12=V;并且其中所述VL区包含SEQ ID NO:232的CDR1序列，其中X1=X2=S;CDR2序列GAS;和SEQ ID NO:233的CDR3序列，其中X1=Q,X2=S,X3=X4=没有，和X5=L(044)。

[0318] 在不同的实施方案中，所述双特异性抗体或第一抗原结合区包含：

[0319] a)VH区和任选地VL区，其中所述VH区包含SEQ ID NO:165的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:169的序列(005)

[0320] b)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:172的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:176的序列(006)

[0321] c)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:179的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:183的序列(059)

[0322] d)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:186的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:190的序列(060)

[0323] e)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:193的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:197的序列(106)

[0324] f)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:200的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:204的序列(111)

[0325] g)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:297的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:208的序列(041)

[0326] h)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:209的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:210的序列(150),

[0327] i)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:211的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:212的序列(067),

[0328] j)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:213的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:214的序列(072),

[0329] k)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:215的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:216的序列(163),

[0330] l)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:217的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:218的序列(093),

[0331] m)VH区和优选的VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:219的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:220的序列(044),和/或

[0332] n)任何所述抗体的变体,其中所述变体优选具有至多1、2、或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守氨基酸取代和新氨基酸是在图1或2中比对的序列中相同位置,特别是在对应的共同序列中由“X”指示的位置的氨基酸的取代。

[0333] 交叉阻断组1、2、3、和4的抗原结合区或HER2抗体的功能性质

[0334] 在本发明的抗体的另一个方面,所述双特异性抗体包含来自HER2抗体的抗原结合区,其与本文中所描述的新型的组1、2、3、或4抗体的一种或多种结合相同的表位,优选地当如实施例14中所描述而确定时;且由在实施例12、13、15、16、17、18、和19中描述所确定的一种或多种性质所进一步表征。

[0335] 因此本发明的双特异性抗体的第一抗原结合区可以和以下HER2抗体相同。本发明的第一HER2抗体可以具有一种或多种以下的特征。

[0336] 在一个实施方案中,HER2抗体在与A431细胞结合中具有比曲妥珠单抗更低的EC_{50}值(半最大有效浓度),优选当如实施例12中所描述而确定时低于0.80μg/ml、0.50μg/ml、或0.30μg/ml的EC_{50}值,并优选与包含选自下组的VH和VL区的抗体结合相同的表位:

[0337] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169);

[0338] b)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19的序列的VL区(084);

[0339] c)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025)；

[0340] d)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)；

[0341] e)包含SEQ ID NO:46的序列的VH区和包含SEQ ID NO:49的序列的VL区(127)；

[0342] f)包含SEQ ID NO:49的序列的VH区和包含SEQ ID NO:53的序列的VL区(159)；

[0343] g)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098)；

[0344] h)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67序列的VL区(153)；

[0345] i)包含SEQ ID NO:70的序列的VH区和包含SEQ ID NO:74序列的VL区(132)；

[0346] j)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5序列的VL区(005)；

[0347] k)包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:11序列的VL区(006)；和

[0348] l)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19序列的VL区(006)。

[0349] 在一个其它或另选的实施方案中，当如实施例13中所描述而确定时，HER2抗体或第一抗原结合区特异性结合HER2阳性恒河猴上皮细胞，且优选与至少一种参考抗体结合相同的表位，其中所述参考抗体包含VH和VL区，其中所述VH和VL区选自下组：任何抗体169、050、084、025、091、129、127、159、098、153132、005、006、059、060、106和111的VH和VL区。

[0350] 在其它或另选的实施方案中，当如实施例15中所描述而确定时，抗HER2抗体或所述第一抗原结合区有效地诱导ADCC(抗体依赖细胞介导细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity))，优选地达成至少30%、更优选至少40%的特异性^{51}Cr释放，且优选与至少一种参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0351] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169)；

[0352] b)包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:12的序列的VL区(050)；

[0353] c)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19的序列的VL区(084)；

[0354] d)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025)；

[0355] e)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)；

[0356] f)包含SEQ ID NO:35的序列的VH区和包含SEQ ID NO:39的序列的VL区(129)；和

[0357] g)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和优选地，包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)。

[0358] 在一个其它的或另选的实施方案中，所述抗HER2抗体或第一抗原结合区特异性结合表达HER2的AU565细胞，但是当如实施例16中所描述而确定时，比任何F5和C1更少地促进所述细胞的配体非依赖性增殖，且优选与参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0359] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169)；

[0360] b)包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:12的序列的VL区(050)；

[0361] c)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19的序列的VL区(084)；

[0362] d)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025)；

[0363] e)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)；

[0364] f)包含SEQ ID NO:35的序列的VH区和包含SEQ ID NO:39的序列的VL区(129)；

[0365] g)包含SEQ ID NO:46的序列的VH区和包含SEQ ID NO:49的序列的VL区(127)；

[0366] h)包含SEQ ID NO:49的序列的VH区和包含SEQ ID NO:53的序列的VL区(159)；

[0367] i)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098)；

[0368] j)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)；

[0369] k)包含SEQ ID NO:70的序列的VH区和包含SEQ ID NO:74的序列的VL区(132)；

[0370] l)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(005)；和

[0371] m)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(060)。

[0372] 在一个其它或另选的实施方案中，所述抗HER2抗体或第一抗原结合区特异性结合表达HER2的AU565细胞并抑制所述细胞的配体非依赖性增殖，当如实施例16中所描述而确定时，优选抑制至少20%、更优选至少25%的增殖，且优选地与至少一种参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0373] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169)；和

[0374] b)包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:12的序列的VL区(050)。

[0375] 在一个其它或另选的实施方案中，所述抗HER2抗体或第一抗原结合区特异性结合表达HER2的AU565细胞但对于所述细胞的配体诱导的增殖没有显著的效果或不促进所述细胞的配体诱导的增殖，当如实施例17中所描述而确定时，优选抑制不多于20%、更优选不多于15%的增殖，且优选地与至少一种参考抗体结合相同的表位，所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0376] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169)；

[0377] b)包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:12的序列的VL区(050)；

[0378] c)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19的序列的VL区(084)；和

[0379] d)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098)。

[0380] 在一个其它或另选的实施方案中，所述抗HER2抗体或第一抗原结合区特异性结合表达HER2的MCF-7细胞并抑制配体诱导的增殖，例如，当如在实施例17中所描述而确定时，其可以完全抑制所述细胞的配体诱导的作用或抑制总增殖的50%，例如，60%或70%或80%，且与至少一种参考抗体结合相同的表位，其中所述参考抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0381] a)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025)；

[0382] b)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)；

[0383] c)包含SEQ ID NO:35的序列的VH区和包含SEQ ID NO:39的序列的VL区(129)；和

[0384] d)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)。

[0385] 在一个其它或另选的实施方案中，优选当根据实施例18而确定时，所述抗HER2抗体被表达HER2的肿瘤细胞，如AU565细胞所内化，的程度高于曲妥珠单抗和帕妥珠单抗，优选多于内化的曲妥珠单抗的两倍或三倍的量，且与下述抗体结合相同的表位，所述抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0386] a)包含SEQ ID NO:46的序列的VH区和包含SEQ ID NO:49的序列的VL区(127)；

[0387] b)包含SEQ ID NO:49的序列的VH区和包含SEQ ID NO:53的序列的VL区(159)；

[0388] c)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098)；

[0389] d)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)；和

[0390] e)包含SEQ ID NO:70的序列的VH区和包含SEQ ID NO:74的序列的VL区(132)。

[0391] 优选地，所述抗体可以与下述抗体结合相同的表位，该抗体包含选自下组的VH和VL区：

[0392] a)包含SEQ ID NO:46的序列的VH区和包含SEQ ID NO:49的序列的VL区(127)和

[0393] b)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098)。

[0394] 在进一步的实施方案中,抗体与HER2的域II或IV结合,优选地当如在实施例,例如分别为实施例16或19中所描述而确定时,优选其中抗体不显著地促进表达HER2的细胞的增殖,且比曲妥珠单抗或帕妥珠单抗更有效地内化或更高程度的内化进入表达HER2的肿瘤细胞。

[0395] 在一个进一步的实施方案中,所述抗体比曲妥珠单抗更增强HER2的下行性调节(downmodulation),例如当如在实施例22中描述而确定时,所述抗体增强HER2下行性调节多于30%、如多于40%或多于50%,优选其中抗体与本发明的交叉阻断组3的抗体结合相同的表位,例如,与包含选自下组的VH和VL区的抗体结合相同的表位的抗体:

[0396] a)包含SEQ ID NO:56的序列的VH区和包含SEQ ID NO:60的序列的VL区(098);

[0397] b)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)。

[0398] 在另一个或另选的实施方案中,当如在实施例25中所描述而确定时,所述抗体比曲妥珠单抗更大地降低肿瘤生长并改善体内生存,优选其中所述抗体与本发明的交叉阻断组1或交叉阻断组2的抗体结合相同的表位,例如,与包含选自下组的VH和VL的抗体结合相同的表位的抗体:

[0399] a)包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区(169);

[0400] b)包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:19的序列的VL区(084);和

[0401] c)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)。

[0402] 在另一个或另选的实施方案中,当如在实施例26中所描述而确定时,所述抗体比曲妥珠单抗更大地降低肿瘤生长并改善体内生存,优选其中抗体与本发明的交叉阻断组2或交叉阻断组3的抗体结合相同的表位,例如,与包含选自下组的VH和VL的抗体结合相同的表位的抗体:

[0403] a)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025);

[0404] b)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091);

[0405] c)包含SEQ ID NO:35的序列的VH区和包含SEQ ID NO:39的序列的VL区(129);和

[0406] d)包含SEQ ID NO:63的序列的VH区和包含SEQ ID NO:67的序列的VL区(153)。

[0407] 更加具体地,其中所述抗体与包含选自下组的VH和VL区的抗体结合相同的表位:

[0408] a)包含SEQ ID NO:22的序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的序列的VL区(025);和

[0409] b)包含SEQ ID NO:29的序列的VH区和包含SEQ ID NO:32的序列的VL区(091)。

[0410] 在一个实施方案中,当如在实施例18中所描述而确定时,缀合的抗体杀死至少60%,优选至少70%的AU565细胞或A431细胞,并交叉阻断至少一种选自下组的抗体:

[0411] a)抗体,其包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列(005)

[0412] b)抗体,其包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:26的序列(060)

[0413] c)抗体,其包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:15的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:19的序列(059),和

[0414] d)抗体,其包含VH区和VL区,其中所述VH区包含SEQ ID NO:36的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:40的序列(111)。

[0415] 在不同和具体的实施方案中，前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗体005、060、059、111、或其组合，优选与这些抗体结合相同的表位。

[0416] 在一个实施方案中，当如在实施例18中所描述而确定时，前述实施方案的抗体杀灭至少80%的A431细胞，且交叉阻断至少一种选自下组的抗体：

[0417] a)包括VH和VL的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且其中所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列(005)，和

[0418] b)包括VH和VL的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的序列且其中所述VL区包含SEQ ID NO:26的序列(060)。

[0419] 在不同和具体的实施方案中，前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗体005、060、或其组合，优选与抗体005、060、或其组合结合相同的表位。

[0420] 在其它的或另选的实施方案中，优选当根据实施例19而确定时，所述抗体比曲妥珠单抗更多地被表达HER2的肿瘤细胞，如AU565细胞，所内化，优选多于内化的曲妥珠单抗的量的两倍或三倍，且交叉阻断至少一种选自下组的抗体：

[0421] a)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:5的序列(005)

[0422] b)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:8的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:11的序列(006)

[0423] c)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:15的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:19的序列(059)

[0424] d)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:26的序列(060)

[0425] e)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:29的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:33的序列(106)

[0426] f)包含VH区和VL区的抗体，其中所述VH区包含SEQ ID NO:36的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:40的序列(111)。

[0427] 在其他和具体的实施方案中，前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗体005、006、059、060、106、111、或其组合，优选与这些抗体结合相同的表位。

[0428] 双特异性抗体

[0429] 在一个实施方案中，抗体是双特异性抗体，包含(i)如本文中所定义的HER2抗体的第一抗原结合区，例如，交叉阻断组1、2、3、或4的抗体，和(ii)第二抗体，其包含与CD3结合的抗体的抗原结合区。

[0430] 第一抗原结合区

[0431] 在一个实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)。在一个具体的实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含SEQ ID NO:4的CDR3序列(169)。

[0432] 在一个实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169)，或SEQ ID NO:23、24、或25的CDR1、CDR2、和CDR3序列(025)，或SEQ ID

NO:64、65、和66的CDR1、CDR2、和CDR3序列(153)，或SEQ ID NO:166、167、和168的CDR1、CDR2、和CDR3序列(005)。在一个具体的实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169)。

[0433] 在一个进一步或另选的实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:11(050)、或SEQ ID NO:18(084)的交叉阻断组1的抗体的CDR3序列，或SEQ ID NO:31(091)、或SEQ ID NO:38(129)的交叉阻断组2的抗体的CDR3序列，或SEQ ID NO:45(127)、或SEQ ID NO:52(159)、或SEQ ID NO:59(098)、或SEQ ID NO:73(132)的交叉阻断组3的抗体的CDR3序列，或SEQ ID NO:175(006)、SEQ ID NO:182(059)、SEQ ID NO:189(060)、SEQ ID NO:196(106)、或SEQ ID NO:203(111)的交叉阻断组4的抗体的CDR3序列

[0434] 在一个实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、或3的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、和4(169)的CDR1、CDR2、和CDR3序列，或者SEQ ID NO:23、24、和25(025)的CDR1、CDR2、和CDR3序列，或者SEQ ID NO:64、65、和66(153)的CDR1、CDR2、和CDR3序列，或者SEQ ID NO:166、167、和168(005)的CDR1、CDR2、和CDR3序列。

[0435] 在一个实施方案中，第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列。

[0436] 在一个进一步的或另选的实施方案中，第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:9、10、和11(050)或SEQ ID NO:16、17、和18(084)的交叉阻断组1的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列；或者SEQ ID NO:30、163、和31(091)或SEQ ID NO:36、37、和38(129)的交叉阻断组2的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列；或者SEQ ID NO:43、44、和45(127)或SEQ ID NO:50、51、和52(159)或SEQ ID NO:57、58、和59(098)或SEQ ID NO:71、72、和73(132)的交叉阻断组3的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列；或者如SEQ ID NO:173、174、和175(006)，SEQ ID NO:180、181、和182(059)，SEQ ID NO:187、188、和189(060)，SEQ ID NO:194、195、和196(106)，或SEQ ID NO:201、202、和203(111)的交叉阻断组4的抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列

[0437] 在一个实施方案中，第一抗原结合区包含选自下组的VH区和VL区：

[0438] a)包含SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区；和包含分别为SEQ ID:6、DAS、和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VL区(169)；

[0439] b)包含SEQ ID NO:23、24、和25的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区；和包含分别为SEQ ID NO:27、AAS、和SEQ ID NO:28的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VL区(025)；

[0440] c)包含SEQ ID NO:64、65、和66的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区；和包含SEQ ID NO:68、DAS、和SEQ ID NO:69的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VL区(153)；和

[0441] d)包含SEQ ID NO:166、167、和168的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区；和包含为SEQ ID NO:170、GAS、和SEQ ID NO:171的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VL区(005)。

[0442] 在一个具体的实施方案中，所述VH区包含SEQ ID NO:2、3、和4的CDR1、CDR2、和CDR3序列，且所述VL区包含分别为SEQ ID:6、DAS、和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2、和CDR3序列(169)。

[0443] 在一个进一步或另选的实施方案中，第一抗原结合区包含选自下组的VH区和VL区：

[0444] a)VH区，其包含SEQ ID NO:9、127、和11的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:9、10、和11的CDR1、CDR2、和CDR3序列(050)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV3-23-1种系；

[0445] b)VH区，其包含SEQ ID NO:128、129、和130的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:16、17、和18的CDR1、CDR2、和CDR3序列(084)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV1-69-04种系；和

[0446] c)VH区，其包含SEQ ID NO:137、138、和139的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:30、163、和31的CDR1、CDR2、和CDR3序列(091)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV4-34-01种系；和

[0447] d)VH区，其包含SEQ ID NO:140、141、和142的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:36、37、和38的CDR1、CDR2、和CDR3序列(129)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV3-30-01种系；

[0448] e)VH区，其包含SEQ ID NO:146、147、和148的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:43、44、和45的CDR1、CDR2、和CDR3序列(127)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV5-51-01种系；

[0449] f)VH区，其包含SEQ ID NO:149、51、和52的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:50、51、和52的CDR1、CDR2、和CDR3序列(159)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV5-51-01种系；

[0450] g)VH区，其包含SEQ ID NO:143、144、和145的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:57、58、和59的CDR1、CDR2、和CDR3序列(098)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV3-23-01种系；

[0451] h)VH区，其包含SEQ ID NO:71、150、和151的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:71、72、和73的CDR1、CDR2、和CDR3序列(132)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV1-18-01种系；

[0452] i)VH区，其包含SEQ ID NO:221、222、和223的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:187、188、和189的CDR1、CDR2、和CDR3序列(060)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV5-51-1种系；

[0453] j)VH区，其包含分别为SEQ ID NO:194、195、和196的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区(106)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV5-51-1种系；

[0454] k)VH区，其包含SEQ ID NO:224、225、和226的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:173、174、和175的CDR1、CDR2、和CDR3序列(006)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV3-23-1种系；

[0455] l)VH区，其包含SEQ ID NO:227、228、和229的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:180、181、和182的CDR1、CDR2、和CDR3序列(059)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV1-18-1种系；和

[0456] m)VH区，其包含SEQ ID NO:230、202、和231的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如分别为SEQ ID NO:201、202、和203的CDR1、CDR2、和CDR3序列(111)；任选地其中所述VH区衍生自IgHV1-69-4种系。

[0457] 第二抗原结合区

[0458] 在前述任一实施方案中，第二抗原结合区可以衍生自CD3抗体。

[0459] 在一个实施方案中，所述第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含SEQ ID NO:244的VH CDR3序列(huCLB-T3/4)。

[0460] 在一个进一步的实施方案中，所述第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含SEQ ID NO:246的VL CDR3序列(huCLB-T3/4)。

[0461] 在一个进一步的实施方案中，所述第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其为包含选自下组的VH区的抗体：

[0462] a)包含分别为SEQ ID NO:242、243、和244的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区(huCLB-T3/4)；

[0463] b)包含SEQ ID NO:234的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区(YTH12.5)；

[0464] c)包含SEQ ID NO:238的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区(huOKT3-C114S-gLC)；和

[0465] d)包含SEQ ID NO:236的CDR1、CDR2、和CDR3序列的VH区(HUM291)。

[0466] 在一个进一步的实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:234的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含SEQ ID NO:235的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列(YTH12.5)。

[0467] 在一个具体实施方案中，所述第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:234的序列(YTH12.5)且所述VL区包含SEQ ID NO:235的序列(YTH12.5)。

[0468] 在一个实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和任选地VL区，所述VH区包含分别为SEQ ID NO:242、243、和244的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含分别为SEQ ID NO:245、DTS、和246的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列(huCLB-T3/4)。

[0469] 在一个具体实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和任选地VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:240的序列(huCLB-T3/4)且VL区包含SEQ ID NO:241的序列(huCLB-T3/4)。

[0470] 在一个实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:238的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含SEQ ID NO:239的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列(huOKT3-C114S-gLC)。

[0471] 在一个具体的实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:238的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:239的序列(huOKT3-C114S-gLC)。

[0472] 在一个实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:236的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含SEQ ID NO:237的VL CDR1、CDR2、和CDR3序列(HUM291)。

[0473] 在一个具体的实施方案中，第二抗原结合区衍生自CD3抗体，其包含VH区和VL区，所述VH区包含SEQ ID NO:236的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:237的序列(HUM291)。

[0474] 双特异性抗体的具体组合

[0475] 本发明的一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:244的CD3抗体的CDR3

序列(huCLB-T3/4)，且所述第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)。

[0476] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:244的CD3抗体的CDR3序列(huCLB-T3/4)且所述VL区包含根据SEQ ID NO:246的CDR3序列(huCLB-T3/4)，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:7、28、69、或171(169、025、153、或005)。

[0477] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:242、243、和244的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列(huCLB-T3/4)，且所述第一抗原结合区包含VH区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、和4(169)，SEQ ID NO:23、24、和25(025)，SEQ ID NO:64，65，和66(153)，或者SEQ ID NO:166、167、和168(005)。

[0478] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:242、243、和244的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列(huCLB-T3/4)且所述VL区包含根据SEQ ID NO:245、DTS、和246的CDR1、CDR2、和CDR3序列(huCLB-T3/4)，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、4、6、DAS、和7(169)，SEQ ID NO:23、24、25、27、AAS、和28(025)，SEQ ID NO:64、65、66、68、DAS、和69(153)，或SEQ ID NO:166、167、168、170、GAS、和171(005)。

[0479] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:240(huCLB-T3/4)的CD3抗体的VH区，且所述第一抗原结合区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区，如SEQ ID NO:1、22、63、或165(169、025、153、或005)。

[0480] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:240和241(huCLB-T3/4)的CD3抗体的VH区和VL区，且所述第一抗原结合区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区和VL区，如SEQ ID NO:1和5(169)、22和26(025)、63和67(153)、或165和169(005)。

[0481] 本发明的一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:234(YTH12.5)的CD3抗体的VH CDR3序列，且所述第一抗原结合区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)。

[0482] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:234

(YTH12.5)的CD3抗体的CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:235(YTH12.5)的CD3抗体的CD3序列，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)，且所述VL区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:7、28、69、或171(169、025、153、或005)。

[0483] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:234(YTH12.5)的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列，且所述第一抗原结合区是本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:2、3、和4(169)，SEQ ID NO:23、24、和25(025)，SEQ ID NO:64、65、和66(153)，或SEQ ID NO:166、167、和168(005)。

[0484] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:234(YTH12.5)的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:235(YTH12.5)的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、4、6、DAS、和7(169)，SEQ ID NO:23、24、25、27、AAS、和28(025)，SEQ ID NO:64、65、66、68、DAS、和69(153)，或SEQ ID NO:166、167、168、170、GAS、和171(005)。

[0485] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区具有包含根据SEQ ID NO:234(YTH12.5)的CD3抗体的VH区，并且所述第一抗原结合区是交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:1、22、63、或165(169、025、153、或005)。

[0486] 本发明的另一个实施方案涉及双特异性抗体，其具有第二抗原结合区和第一抗原结合区，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:234和235(YTH12.5)的CD3抗体的VH区和VL区，并且所述第一抗原结合区包含本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区和VL区，如SEQ ID NO:1和5(169)，22和26(025)，63和67(153)，或165和169(005)。

[0487] 本发明的一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:236(HUM291)的CD3抗体的VH CDR3序列的VH区，并且所述第一抗原结合区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)。

[0488] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:236(HUM291)的CD3抗体的CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:237(HUM291)的CD3抗体的CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)，且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:7、28、69、或171(169、025、153、或005)。

[0489] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:236(HUM291)的VH

CDR1、CDR2、和CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:2、3、和4(169)，SEQ ID NO:23、24、和25(025)，SEQ ID NO:64、65、和66(153)，或SEQ ID NO:166、167、和168(005)。

[0490] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:236(HUM291)的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:237(HUM2915)的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、4、6、DAS、和7(169)，SEQ ID NO:23、24、25、27、AAS、和28(025)，SEQ ID NO:64、65、66、68、DAS、和69(153)，或SEQ ID NO:166、167、168、170、GAS、和171(005)。

[0491] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:236(HUM291)的CD3抗体的VH区，并且所述第一抗原结合区是交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:1、22、63、或165(169、025、153、或005)。

[0492] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:236和237(HUM291)的CD3抗体的VH区和VL区，且所述第一抗原结合区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区和VL区，如SEQ ID NO:1和5(169)，22和26(025)，63和67(153)，或165和169(005)。

[0493] 本发明的一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:238(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的VH CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH区，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)。

[0494] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:238(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:239(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:4、25、66、或168(169、025、153、或005)，且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR3序列，如SEQ ID NO:7、28、69、或171(169、025、153、或005)。

[0495] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:238(huOKT3-C114S-gLC)的VH CDR1、CDR2、和CDR3序列，并且所述第一抗原结合区是如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:2、3,和4(169)，SEQ ID NO:23、24、和25(025)，SEQ ID NO:64、65、和66(153)，或SEQ ID NO:166、167、和168(005)。

[0496] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含VH区和VL区，所述VH区包含根据SEQ ID NO:238(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列且所述VL区包含根据SEQ ID NO:239(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，并且所述第一抗原结合区包含

VH区和VL区，所述VH区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，且所述VL区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的CDR1、CDR2、和CDR3序列，如SEQ ID NO:2、3、4、6、DAS、和7(169)，SEQ ID NO:23、24、25、27、AAS、和28(025)，SEQ ID NO:64、65、66、68、DAS、和69(153)，或SEQ ID NO:166、167、168、170、GAS、和171(005)。

[0497] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:238(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的VH区，并且所述第一抗原结合区是交叉阻断组1、2、3或4的HER2抗体的抗原结合区，如SEQ ID NO:1、22、63、或165(169、025、153、或005)。

[0498] 本发明的另一个实施方案涉及具有第二抗原结合区和第一抗原结合区的双特异性抗体，所述第二抗原结合区包含根据SEQ ID NO:238和239(huOKT3-C114S-gLC)的CD3抗体的VH区和VL区，并且所述第一抗原结合区包含如本文中所定义的交叉阻断组1、2、3、或4的HER2抗体的VH和VL区，如SEQ ID NO:1和5(169)、22和26(025)、63和67(153)、或165和169(005)。

[0499] 在一个其它或另选的实施方案中所述双特异性抗体是HER2xCD3双特异性抗体，其如实施例21所述诱导AU565的T细胞介导的细胞毒性，且其与在实施例21中所描述的选自下组的双特异性抗体中的至少一种结合相同的表位：huCLB-T3/4x HER2-169、huCLB-T3/4x HER2153、和huCLB-T3/4xHER2005。

[0500] 在一个进一步的实施方案中，根据本发明的双特异性抗体的第一和第二抗原结合区包含人抗体VH序列且可选地包含人抗体VL序列。

[0501] 在一个进一步的实施方案中，根据本发明的双特异性抗体的第一和第二抗原结合区第一和第二抗原结合区来自重链抗体。

[0502] 在一个进一步的实施方案中，根据本发明的双特异性抗体的第一和第二抗原结合区第一和第二抗原结合区包含第一和第二轻链。

[0503] 在一个进一步的实施方案中，根据本发明的双特异性抗体的第一和第二抗原结合区，其中所述第一和第二轻链是不同的。

[0504] Fc区

[0505] 在本发明的一个方面，根据本发明的双特异性HER2xCD3抗体进一步包含第一Fc区和第二Fc区，其可以包含于第一和第二Fab臂中，其进一步分别包含以上描述的第一和第二抗原结合区(或反之亦然)。

[0506] 在本发明的另一个方面，双特异性HER2xCD3抗体包含第一和第二Fab臂，其分别包含第一和第二抗原结合区。通常地，所述第一和第二抗原结合区分别是HER2结合域和CD3结合域。所述双特异性HER2xCD3抗体进一步包含第一和第二Fc区，其通常分别包含第一和第二重链多肽。

[0507] 在本发明的一个方面，双特异性HER2xCD3抗体包含第一Fab臂，其包含第一抗原结合区，和第一Fc区，和第二Fab臂，其包含第二抗原结合区，和第二Fc区。

[0508] 在本发明的另一个方面，双特异性HER2xCD3抗体包含第二Fab臂，其包含第二抗原结合区，和第一Fc区，和第一Fab臂，其包含第一抗原结合区，和第二Fc区。

[0509] 第一和第二Fc区可以各自是任何同种型，包括但不限于，IgG1、IgG2、IgG3、和

IgG4,且可以包括一种或多种突变或修饰。在一个实施方案中,第一和第二Fc区各自是IgG4同种型或从其衍生而来,任选地具有一种或多种突变或修饰。在一个实施方案中,第一和第二Fc区各自是IgG1同种型或从其衍生而来,任选地具有一种或多种突变或修饰。在另一个实施方案中,Fc区的一个是IgG1同种型且另一个是IgG4同种型,或分别衍生自这类同种型,任选地具有一种或多种突变或修饰。

[0510] 在一个实施方案中,Fc区的一个或两个是效应物功能缺陷型。例如,所述Fc区可以是IgG4同种型,或非IgG4同种型,例如,IgG1、IgG2、或IgG3,其已经被突变使得介导效应物功能的能力,例如ADCC,降低或甚至消除。这类突变已经,例如,在Dall'Acqua WF等人,J Immunol.177(2):1129-1138(2006)和Hezareh M,J Virol.;75(24):12161-12168(2001)中描述。其它例示性的修饰在实施例中,例如,在实施例27中描述。

[0511] 在一个实施方案中,Fc区的一个或两者均包含IgG1野生型序列(SEQ ID NO:247,见实施例21)。

[0512] 在一个实施方案中,Fc区的一个或两者均包含去除Asn连接的糖基化(Asn-linked glycosylation)的接纳体位点的突变,或否则经过操控(manipulate)以改变糖基化性质。例如,在IgG1Fc区,N297Q突变可以用于去除Asn连接的糖基化位点。相应地,在一个具体的实施方案中,Fc区的一个或两者均包含带有N297Q突变的IgG1野生型序列(SEQ ID NO:250,见实施例21)。

[0513] 在一个进一步的实施方案中,Fc区的一个或两者均经过糖工程(glyco-engineered)以降低岩藻糖并因此增强ADCC,例如,通过在抗体产生期间向培养基添加化合物,如在US2009317869中所描述的或如在van Berkel等人(2010)Biotechnol.Bioeng.105:3504中所描述的,或通过使用FUT8敲除细胞,例如,如在Yamane-Ohnuki等人(2004)Biotechnol.Bioeng87:61中所描述的。ADCC还可以使用Umaña等人(1999)Nature Biotech17:176所描述的方法而优化。在一个进一步的实施方案中,Fc区的一个或两者均已经经过工程改造以增强补体活化,例如,如在Natsume等人(2009)Cancer Sci.100:2411中所描述的。

[0514] 在本发明的一个实施方案中,第一或第二抗原结合区或其部分,例如,一个或多个CDR,是骆驼科中的物种的抗原结合区或其部分,见WO2010001251,或是软骨鱼的物种,如铰口鲨(nurse shark)中的抗原结合区或其部分。在一个实施方案中,第一和第二抗原结合区或重链来自重链抗体。

[0515] 在一个实施方案中,所述第一和/或第二Fc区缀合至药物、前药、或毒素,或含有它们的接纳体基团。这类接纳体基团可以是,例如,非天然氨基酸。

[0516] 在一个方面,本发明的双特异性抗体包含第一Fc区,其包含第一CH3区,和第二Fc区,其包含第二CH3区,其中第一和第二CH3区的序列是不同的,且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH区各自的同二聚相互作用。这些相互作用的更多细节和它们如何达成在PCT/EP2011/056388-作为WO2011131746公开(Genmab)-中提供,通过全文提述并入本文。

[0517] 如本文中进一步描述和在实施例中描述的,稳定的双特异性HER2xCD3分子可以使用具体方法高产率地获得,所述方法基于在CH3区仅包含少数比较保守、非对称突变的一种同二聚起始CD3抗体和一种同二聚起始HER2抗体。非对称突变意指所述第一和第二CH3区的

序列在不相同的位置含有氨基酸取代。

[0518] 在一个实施方案中，第一Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、399、405、407和409，且第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、399、405、407和409，并且其中第一和第二Fc区不在相同位置取代。

[0519] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在366位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：368、370、399、405、407和409。在一个实施方案中，在366位的氨基酸选自Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、或Gln。

[0520] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在368位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、370、399、405、407和409。

[0521] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在370位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、399、405、407和409。

[0522] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在399位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、405、407和409。

[0523] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在405位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、399、407和409。

[0524] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在407位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、399、405和409。

[0525] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在409位有氨基酸取代，且所述第二Fc区在选自下组的位置有氨基酸取代：366、368、370、399、405和407。

[0526] 相应地，在一个实施方案中，所述第一和第二CH3区的序列包含非对称突变，即在两个CH3区中不同位置的突变，例如，在一个CH3区的405位的突变和在另一个CH3区中409位的突变。

[0527] 在一个实施方案中，第一Fc区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如，Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且在第二Fc区具有在选自下组的位置由氨基酸取代：366、368、370、399、405、和407。在一个这类的实施方案中，所述第一Fc区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如，Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且所述第二Fc区在405位具有除了Phe之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、Cys、Lys、或Leu。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一Fc区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如，Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且所述第二Fc区在405位具有除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Lys、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys。

[0528] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在405位包含Phe且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且所述第二Fc区在405位包含除了Phe之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、Leu、Met、或Cys和在409位包含Lys。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一Fc区在405位包含Phe且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、

Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在405位包含除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Lys、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且在409位包含Lys。

[0529] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在405位包含Phe，且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在405位包含Leu且在409位包含Lys。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一Fc区在405位包含Phe，且在409位包含Arg，并且所述第二Fc区在405位包含除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Met、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，且在409位包含Lys。在另一个实施方案中，所述第一Fc区在405位包含Phe且在409位包含Arg，且所述第二Fc区在405位包含Leu且在409位包含Lys。

[0530] 在一个进一步的实施方案中，所述第一Fc区在409位包含除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如，Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在409位包含Lys，在370位包含Thr，且在405位包含Leu。在一个进一步的实施方案中，所述第一Fc区在409位包含Arg，并且所述第二Fc区在409位包含Lys，在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0531] 在一个甚至进一步的实施方案中，所述第一Fc区在370位包含Lys，在405位包含Phe，且在409位包含Arg，并且所述第二Fc区在409位包含Lys，在340位包含Thr，且在405位包含Leu。

[0532] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区409位包含除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在409位包含Lys且a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0533] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在409位包含Arg并且所述第二HER2抗体在409位包含Lys且a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0534] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在350位包含Thr，在370位包含Lys，在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二HER抗体在409位包含Lys且a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0535] 在另一个实施方案中，所述第一Fc在350位包含Thr，在370位包含Lys，在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二Fc区在350位包含Ile，在370位包含Thr，在405位包含Leu且在409位包含Lys。

[0536] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在409位包含除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407位包含除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸，例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp、或Cys。在另一个实施方案中，所述第一Fc区在409位包含除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407为具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp。

[0537] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407位具有Gly、Leu、Met、Asn或Trp。

[0538] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸，例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp、或Cys且在409位具有Lys。

[0539] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp且在409位具有Lys。

[0540] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区在407位具有Gly、Leu、Met、Asn或Trp且在409位具有Lys。

[0541] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二Fc区在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸，例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp、或Cys且在409位具有Lys。

[0542] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二Fc区在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp且在409位具有Lys。

[0543] 在另一个实施方案中，所述第一Fc区在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二Fc区在407位具有Gly、Leu、Met、Asn或Trp且在409位具有Lys。

[0544] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，并且所述第二Fc区具有

[0545] (i)在368位的除了Phe、Leu和Met之外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、或Cys，或

[0546] (ii)在370位的Trp，或

[0547] (iii)在399位的除了Asp、Cys、Pro、Glu或Gln之外的氨基酸，例如Phe、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asn、Trp、Tyr、或Cys，或

[0548] (iv)在366位的除了Lys、Arg、Ser、Thr、或Trp之外的氨基酸，例如Phe、Leu、Met、Ala、Val、Gly、Ile、Asn、His、Asp、Glu、Gln、Pro、Tyr、或Cys。

[0549] 在一个实施方案中，所述第一Fc区在409位具有Arg、Ala、His、或Gly，且第二同二聚体蛋白质具有

[0550] (i)在368位的Lys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp，或

[0551] (ii)在370位的Trp，或

[0552] (iii)在399位的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg或

Tyr,或

[0553] (iv)在366位的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、Met、或Tyr。

[0554] 在一个实施方案中,所述第一Fc区在409位具有Arg,且所述第二同二聚体蛋白质具有

[0555] (i)在368位的Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp,或

[0556] (ii)在370位的Trp,或

[0557] (iii)在399位的Phe、His、Lys、Arg或Tyr,或

[0558] (iv)在366位的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln。

[0559] 除了以上指明的氨基酸取代之外,所述第一和第二同二聚体蛋白质可以包含相对于野生型Fc序列的其它氨基酸取代、缺失、或插入。

[0560] 在一个进一步的实施方案中,所述第一和第二Fab臂(或重链恒定区)包含第一和第二Fc区,所述第一和第二Fc区除了指明的突变外,还独立地包含选自下面的序列:

[0561] (IgG1m(a)):

[0562] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:256)

[0563] (IgG1m(f)):

[0564] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:257),和

[0565] (IgG1m(ax)):

[0566] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:258)。

[0567] 在一个实施方案中,所述第一和第二Fc区在(核心)铰链区都不包含Cys-Pro-Ser-Cys序列。

[0568] 在一个进一步的实施方案中,所述第一和第二Fc区在(核心)铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0569] 在不同和具体的实施方案中,Fab臂的一个或二者均包含独立地选自SEQ ID NO:247、248、249、250、251、252、253、254、和255的重链恒定区序列(见实施例21)。

[0570] 在一个具体的实例中,所述CD3抗体是具有VH区和VL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:234(VH YTH12.5)的序列,且所述VL区包含SEQ ID NO:235(VL YTH12.5)的序列。另一个实例是具有VH区和VL区的CD3抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:240(VH huCLB-T3/4)的序列且所述VL区包含SEQ ID NO:241(VL huCLB-T3/4)的序列。

[0571] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一Fab臂,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,并且所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列(153),任选地其中所述第一Fab臂包含IgG1,κFc区,其具有在409位的Arg,或在297位的Gln,或在409位的Arg和在297位的Gln;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二Fab臂,其中所述VH区包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列且所述VL区包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列(YTH12.5),任选地其中第二Fab臂包含IgG1,κFc区,其具有在297位的Fln,或在405位的Leu,或在297位的Gln和在405位的Leu。

[0572] 在一个实施方案中,所述双特异性抗体包含(i)具有Fc区和VH和VL序列的的第一

Fab臂，其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，且所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169)，任选地，其中所述第一Fab臂包含IgG1，κFc区，其在409位具有Arg；和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二Fab臂，其中VH区包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列，且所述VL区包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列(YTH12.5)，任选地其中所述第二Fab臂包含IgG1，κFc区，其具有在297位的Gln，或在405位的Leu，或在297位的Gln和在405位的Leu。

[0573] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一Fab臂，其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列，且所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列(153)，任选地，其中所述第一Fab臂包含IgG1，κFc区，其具有在409位的Arg，或在297位的Gln，或在409位的Arg和在297位的Gln；和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二Fab臂，其中所述VH区包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列且所述VL区包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列(huCLB-T3/4)，任选地，其中所述第二Fab臂包含IgG1，κFc区，其具有在297位的Gln，或在405位的Leu，或在297位的Gln和在405位的Leu。

[0574] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一Fab臂，其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，且所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169)，任选地，其中所述第一Fab臂包含IgG1，κFc区，其具有在409位的Arg；和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二Fab臂，其中VH区包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列且所述VL区包含SEQ ID NO:174的序列(huCLB-T3/4)，任选地，其中所述第二Fab臂包含IgG1，κFc区，其具有在297位的Gln，或在405位的Leu，或在297位的Gln和在405位的Leu。

[0575] 在任何上述实施方案中，所述第一和/或第二Fab臂可以进一步包含CH1和/或CL序列。

[0576] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体选自下组：IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L、IgG1-HER2-153-K409R xIgG1-YTH12.5-N297Q-F405L、IgG1-HER2-153-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-F405L、IgG1-HER2-153-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L、IgG1-HER2-153-N297Q-K409R xIgG1-YTH12.5-F405L、IgG1-HER2-153-N297Q-K409R xIgG1-YTH12.5-N297Q-F405L、IgG1-HER2-153-N297Q-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-F405L、IgG1-HER2-153-N297Q-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L、IgG1-HER2-169-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-F405L、IgG1-HER2-169-K409R xIgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L、IgG1-HER2-169-K409R xIgG1-YTH12.5-F405L和IgG1-HER2-169-K409R xIgG1-YTH12.5-N297Q-F405L，其中ITL意指IgG1，κ，其具有在350位的Ile、在370位的Thr、且在405位的Leu，K409R意指IgG1，κ，其具有在409位的Arg，并且F4058L意指IgG1，κ，其具有在405位的Leu，N297Q意指在297位的Gln，并且其中粗体数字指本文中所描述的抗体，其具有包含在表1和实施例21中描述的序列的VH和VL区。

[0577] 在一个其它的实施方案中，当如在实施例29中所描述而确定时，所述双特异抗体诱导对AU565、NIH-3T3、A431和A549细胞的剂量依赖性杀灭，且与双特异性抗体IgG1-HER2-169xIgG1-CLBT3/4结合相同的表位。

[0578] 双特异性抗体形式

[0579] 本发明提供双特异性HER2xCD3抗体，其有效地促进T细胞介导的对表达HER2的肿瘤细胞的杀灭。取决于具体用途的合意的功能性质，具体的抗原结合区可以选自本发明所提供的抗体或抗原结合区的组，或与本发明所提供的抗体或抗原结合区共享例如表位或交

叉阻断区的那些抗体或抗原结合区。本领域已知双特异性抗体的许多不同的形式和用途，且其最近由Chames和Baty(2009)Curr Opin Drug Disc Dev12:276所综述。

[0580] 本发明的例示性双特异性抗体分子包括(i)具有两个臂的单一抗体，所述两个臂包含不同的抗原结合区，一个对HER2表位具特异性且一个对CD3具特异性，(ii)单一抗体，其具有对HER2表位具特异性的一个抗原结合区或臂和对CD3表位具特异性的第二抗原结合区或臂，(iii)单一抗体，其具有对HER2表位的第一特异性和对CD3表位的第二特异性，例如，藉由通过额外的肽接头串联的两个scFv；(iv)双可变域抗体(dual-variable-domain antibody，DVD-Ig)，其中每条轻链和重链包含通过短肽接头串联的两个可变域(Wu等人，Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig™)Molecule，In:Antibody Engineering，Springer Berlin Heidelberg(2010))；(v)化学连接的双特异性$(Fab')_2$片段；(vi)Tandab，其是两个单链双抗体的融合，得到四价的双特异性抗体，其对每个靶抗原具有两个结合位点；(vii)flexibody，其是scFv与双抗体的组合，得到多价分子；(viii)所谓的“对接和锁定(dock and lock)”分子，基于在蛋白激酶A(Protein Kinase A)中的“二聚和对接域”，当其应用于Fab时，可以产生由两个相同Fab片段连接至不同的Fab片段而组成的三价双特异性抗体；(ix)所谓的蝎(Scorpion)分子，包括，例如，融合至人Fab臂两端的两个scFv；和(x)双抗体。

[0581] 在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体是双抗体、交叉抗体(cross-body)、或如本发明中所描述的通过那些受控的Fab臂交换所获得的双特异性抗体。

[0582] 不同种类的双特异性抗体的实例包括但不限于

[0583] ●带有迫使异二聚化的互补性CH3域的IgG样分子；

[0584] ●重组IgG样双靶向性分子，其中所述分子的两面每个都包含至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的部分；

[0585] ●IgG融合分子，其中将全长IgG抗体融合至另外的Fab片段或Fab片段的部分；

[0586] ●Fc融合分子，其中将单链Fv分子或稳定化(stabilized)的双抗体融合至重链恒定域、Fc区或其部分；

[0587] ●Fab融合分子，其中将不同Fab片段融合至一起；

[0588] ●基于scFv和双抗体和重链抗体(例如，域抗体、纳米抗体)，其中将不同的单链Fv分子或不同双抗体或不同重链抗体(例如，域抗体、纳米抗体)彼此融合或融合至另一个蛋白质或载体分子。

[0589] 带有互补性CH3域分子的IgG样分子的实例包括但不限于Triomab/Quadroma(Trion Pharma/Fresenius Biotech)、Knobs-into-Holes(Genentech)、CrossMAbs(Roche)和静电配对的(the electrostatically-matched)(Amgen)、LUZ-Y(Genentech)、Strand Exchange Engineered Domain body(SEEDbody)(EMD Serono)、Biclonic(Merus)、和DuoBody(Genmab A/S)。

[0590] 重组IgG样双靶向性分子的实例包括但不限于Dual Targeting(DT)-Ig(GSK/Domantis)、Two-in-one Antibody(Genentech)、Cross-linked Mabs(Karmanos Cancer Center)、mAb^2(F-Star)、和CovX-body(CovX/Pfizer)。

[0591] IgG融合分子的实例包括但不限于Dual Variable Domain(DVD)-Ig(Abbott)、IgG样Bispecific(ImClone/Eli Lilly)、Ts2Ab(MedImmune/AZ)和BsAb(Zymogenetics)、

HERCULES(Biogen Idec)、和TvAb(Roche)。

[0592] Fc融合分子的实例包括但不限于ScFv/Fc Fusions(Academic Institution)、SCORPION(Emergent BioSolutions/Trubion,Zymogenetics/BMS)、DualAffinity Retargeting Technology(Fc-DART)(MacroGenics)、和Dual(ScFv)$_2$-Fab(抗体药物国家工程研究中心,中国)。

[0593] Fab融合双特异性抗体的实例包括但不限于F(ab)$_2$(Medarex/AMGEN)、Dual-Action or Bis-Fab(Genentech)、Dock-and-Lock(DNL)(ImmunoMedics)、Bivalent Bispecific(Biotecnol)、和Fab-Fv(UCB-Celltech)。

[0594] ScFv-、基于双抗体的、和域抗体的实例包括但不限于Bispecific T Cell Engager(BiTE)(Micromet,Tandem Diabody(Tandab)(Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology(DART)(MacroGenics)、Single-chain Diabody(Academic)、TCR-like Antibodies(AIT,ReceptorLogics)、Human SerumAlbumin ScFv Fusion(Merrimack)和COMBODY(Epigen Biotech)、双靶向性纳米抗体(dual targeting nanobodies)(Ablynx)、双靶向性仅重链域抗体(dualtargeting heavy chain only domain antibodies)。

[0595] 制备双特异性抗体的方法

[0596] 制备本发明的双特异性抗体的方法包括在以下中描述的方法:WO2008119353(Genmab)、WO2011131746(Genmab)和由van der Neut-Kolfschoten等人(Science.2007Sep14;317(5844):1554-7)所报道的。对于制备双特异性抗体有用的其它平台还包括但不限于BiTE(Micromet)、DART(MacroGenics)、Fcab和Mab^2(F-star)、Fc-工程改造的IgG1(Xencor)或DuoBody(基于Fab臂交换,Genmab,本申请,其在以下和例如实施例20中所描述)。

[0597] 还可以使用传统方法,例如杂交的杂交瘤和化学缀合方法(Marvin和Zhu(2005)Acta Pharmacol Sin26:649)。在宿主细胞中共表达两种由不同重链和轻链组成的抗体除了导致合意的双特异性抗体外,还导致可能的抗体产物的混合物,其可以通过例如,亲和性色谱法或类似的方法,而分离。

[0598] 还可以使用当共表达不同抗体构建体时有利于功能性双特异性产物的形成的策略,例如,Lindhofer等人所描述的方法(1995J Immunol155:219)。产生不同的抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合导致有限数目的异二聚体蛋白质,因为优先物种限制的重/轻链配对。另一种促进异二聚体超出同二聚体形成的策略是“旋钮进洞(knob-into-hole)”策略,其中在第一重链多肽上引入突起并在第二重链多肽上引入对应的空腔,使得在这两条重链的界面上所述突起可以安置于所述空腔以促进异二聚体的形成并妨碍同二聚体的形成。“突起”是通过将来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链替换为较大的侧链而构建的。与突起具有相同或相似大小的互补性的“空腔”是在第二多肽的界面上通过将大氨基酸侧链替换为较小侧链而构建的(US专利5,731,168)。EP1870459(Chugai)和WO2009089004(Amgen)描述其它的在宿主细胞中在共表达不同抗体域时有利于异二聚体形成的策略。在这些方法中,将在两个CH3域上构成CH3-CH3界面的一个或多个残基替换为带电荷的氨基酸,使得同二聚体的形成是静电上不利的且异二聚化是静电上有利的。WO2007110205(Merck)描述了仍另一种策略,其中利用IgA和IgG CH3域之间的不同而促进异二聚化。

[0599] 另一种用于产生双特异性抗体的体外方法已经在WO2008119353(Genmab)中描述，其中通过在还原性条件下温育时的两种单特异性IgG4-或IgG4-样抗体的“Fab臂”或“半分子(half-molecule)”交换(重链和所附着的轻链的调换)而形成双特异性抗体。所得产物是具有两种Fab臂的双特异性抗体，所述Fab臂可以包含不同序列。

[0600] 一种制备本发明的双特异性HER2xCD3抗体的优选的方法包括在WO2011131746(Genmab)中描述的方法，其包括以下步骤：

[0601] a)提供包含Fc区的第一抗体，所述Fc区包含第一CH3区；

[0602] b)提供包含第二Fc区的第二抗体，所述Fc区包含第二CH3区，其中所述第一抗体是HER2抗体且所述第二抗体是CH3抗体，或反之亦然；

[0603] 其中所述第一和第二CH3区的序列是不同的且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区各自的同二聚相互作用；

[0604] c)将所述第一抗体与所述第二抗体一同在还原性条件下温育；和

[0605] d)获得所述双特异性HER2xCD3抗体。

[0606] 不拘于理论，在步骤c)中，将亲本抗体的铰链区中的重链二硫键还原，然后生成的半胱氨酸能够与另一种亲本抗体分子(原本具有不同的特异性)的半胱氨酸形成重链间二硫键。在这一方法的一个实施方案中，步骤c)中的还原性条件包括添加还原剂，例如，选自下组的还原剂：2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇，优选选自下组的还原剂：2-巯基乙胺、二硫苏糖醇、和三(2-羧乙基)膦。在一个进一步的实施方案中，步骤c)包括将条件恢复为非还原性或较低还原性的条件，例如，通过去除还原剂，例如，通过脱盐。

[0607] 通常地，在这一方法中，所述第一和第二抗体分别是结合HER2和CD3的表位的HER2和CD3抗体，和/或分别包含HER2和CD3的不同抗原结合序列。

[0608] 对于这一方法，以上描述的任何HER2和CD3抗体都可以使用，分别包括第一和第二HER2和CD3抗体，其包含第一和/或第二Fc区。这类第一和第二Fc区包括这类第一和第二Fc区的组合的实例可以包括任何上面所描述的那些。在一个具体的实施方案中可以分别挑选第一和第二HER2和CD3抗体以获得如本文中所描述的双特异性抗体。

[0609] 在该方法的一个实施方案中，所述第一和/或第二抗体是全长抗体。

[0610] 所述第一和第二抗体的Fc区可以是任何同种型，包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在该方法的一个实施方案中所述第一和第二抗体的Fc区都是IgG1同种型。在另一个实施方案中，所述抗体的一个Fc区是IgG1同种型且另一个是igG4同种型。在后者的实施方案中，所得的双特异性抗体包含IgG1的Fc区和IgG4的Fc区且可以因此具有在激活效应物功能方面具有有趣的中间性质。如果所述第一和/或所述第二抗体包含去除Asn-联结的糖基化的接纳体位点或经操控以改变糖基化性质，可以获得相似的产物。

[0611] 在该方法的一个进一步的实施方案中，所述抗体的一个或两者均经糖工程以降低岩藻糖且因此增强ADCC，例如，通过如在US2009317869中所描述的或如在van Berkel等人(2010)Biotechnol.Bioeng.105:350中所描述的在抗体产生期间向培养基添加化合物或通过使用FUT8敲除细胞，例如，如在Yamane-Ohnuki等人(2004)Biotechnol.Bioeng87:614中所描述的。还可以使用Umaña等人(1999)Nature Biotech17:176所描述的的方法优化ADCC。在一个进一步的实施方案中，抗体的一个或两者均已经经过工程改造以增强补体激

活，例如，如在Natsume et al.(2009)Cancer Sci.100:2411中所描述的。

[0612] 在该方法的一个进一步的实施方案中，抗体的一个或两者均已经经过工程改造以降低或提高与新生期(neonatal)Fc受体(FcRn)的结合以操控异二聚体蛋白质的血清半寿期。在一个进一步的实施方案中，抗体起始蛋白质的一种已经经过工程改造以不结合A蛋白，因此允许通过将产物通过A蛋白柱以将异二聚体蛋白质从所述同二聚体起始蛋白质分离。

[0613] 在该方法的一个具体的实施方案中，所述抗体或其部分，例如，一种或多种CDR是骆驼科的物种的，见WO2010001251，或是软骨鱼的物种的，如铰口鲨，或是重链或域抗体。

[0614] 在一个实施方案中，第一和/或第二HER2抗体是缀合至药物、药物前体、或毒素的，或包含它们的接纳体基团。这类接纳体基团可以，例如，是非天然氨基酸。

[0615] 如以上所描述的，同二聚起始抗体的第一和第二CH3区的序列是不同的且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区各自的同二聚相互作用。这些相互作用的更多的细节和它们如何达成在PCT/EP2011/056388中提供，其以WO2011131746(Genmab)公开，通过全文提述并入本文。

[0616] 具体地，使用本发明的以上的方法基于两种同二聚起始抗体可以获得高产率的稳定的双特异性HER2xCD3分子，所述两种同二聚起始抗体分别结合HER2和CH3，且仅在CH3区中含有少量的，较为保守的非对称突变。非对称突变意指所述第一和第二CH3区的序列在不相同的位置含有氨基酸取代。

[0617] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、405、407、和409，并且第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、405、407、和409，且其中第一和第二抗体不在相同的位置取代。

[0618] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在366位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：368、370、399、405、407、和409。在一个实施方案中，在366位的氨基酸选自Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、或Gln。

[0619] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在368位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、370、399、405、407、和409。

[0620] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在370位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、399、405、407、和409。

[0621] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在399位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、405、407、和409。

[0622] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在405位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、407、和409。

[0623] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在407位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、405、和409。

[0624] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在409位具有氨基酸取代，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、405、和407。

[0625] 相应地，在该方法的一个实施方案中，所述第一和第二CH3区的序列包含非对称突变，即，在两个CH3区的不同位置的突变，例如，在一个CH3区中的405位的突变和在另一个CH3区中的在409位的突变。

[0626] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在选自下组的位置具有氨基酸取代：366、368、370、399、405、和407。在一个这类的实施方案中，所述第一抗体在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸并且所述第二抗体在405位具有除了Phe之外的氨基酸。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一抗体在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸且所述第二抗体在405位具有除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸。

[0627] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在405位包含Phe且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在405位包含除了Phe之外的氨基酸且在409位包含Lys。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一抗体在405位包含Phe且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在405位包含除了Phe、Arg或Gly之外的氨基酸，且在409位包含Lys。

[0628] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在405位包含Phe且在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在405位包含Leu且在409位包含Lys。在本文的一个进一步的实施方案中，所述第一抗体在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二抗体在405位包含除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸且在409位包含Lys。在另一个实施方案中，所述第一抗体在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二抗体在405位包含Leu且在409位包含Lys。

[0629] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二同二聚体蛋白质在409位包含Lys，在370位包含Thr且在405位包含Leu。在一个进一步的实施方案中，所述第一同二聚体蛋白质在409位包含Arg并且所述第二同二聚体蛋白质在409位包含Lys，在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0630] 在该方法的一个甚至另一个实施方案中，所述第一抗体在370位包含Lys、在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二抗体在409位包含Lys、在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0631] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在409位包含除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸且所述第二抗体在409位包含Lys且：a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0632] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在409位包含Arg且所述第二抗体在409位包含Lys且：a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0633] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在350位包含Thr，在370位包含Lys、在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二抗体在409位包含Lys且：a)在350位包含Ile且在405位包含Leu，或b)在370位包含Thr且在405位包含Leu。

[0634] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在350位包含Thr、在370位包含Lys、在405位包含Phe且在409位包含Arg，并且所述第二抗体在350位包含Ile、在370位包含Thr、在405位包含Leu且在409位包含Lys。

[0635] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser、或Thr之外的氨基酸。在另一个实施方案中，所述第一抗体在409位具有除了Lys、Leu或Met之

外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val、或Trp。

[0636] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有Gly、Leu、Met、Asn、或Trp。

[0637] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser、或Thr之外的氨基酸，且在409位具有Lys。

[0638] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val、或Trp且在409位具有Lys。

[0639] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有除了Lys、Leu或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体在407位具有Gly、Leu、Met、Asn或Trp且在409位具有Lys。

[0640] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二抗体在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸，且在409位具有Lys。

[0641] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二抗体在407位具有Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val、或Trp，且在409位具有Lys。

[0642] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一抗体在407位具有Tyr且在409位具有Arg，并且所述第二抗体在407位具有Gly、Leu、Met、Asn、或Trp，且在409位具有Lys。

[0643] 在该方法的一个实施方案中，第一抗体在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二抗体具有

[0644] (i)在368位的除了Phe、Leu、和Met之外的氨基酸，或

[0645] (ii)在370位的Trp，或

[0646] (iii)在399位的除了Asp、Cys、Pro、Glu、或Gln之外的氨基酸，或

[0647] (iv)在366位的除了Lys、Arg、Ser、Thr、或Trp之外的氨基酸。

[0648] 在该方法的一个实施方案中，第一同二聚体蛋白质在409位具有Arg、Ala、His、或Gly，并且第二同二聚体蛋白质具有

[0649] (i)在368位的Lys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp，或

[0650] (ii)在370位的Trp，或

[0651] (iii)在399位的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg、或Tyr，或

[0652] (iv)在366位的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、Met、或Tyr。

[0653] 在该方法的一个实施方案中，第一同二聚体蛋白质具有在409位的Arg，并且第二同二聚体蛋白质具有

[0654] (i)在368位的Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp，或者

[0655] (ii)在370位的Trp，或

[0656] (iii)在399位的Phe、His、Lys、Arg或Tyr，或

[0657] (iv)在366位的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln。

[0658] 除了以上指明的氨基酸取代之外，所述第一和第二同二聚体蛋白质还可以包含相对于野生型Fc序列的其它氨基酸取代、缺失、或插入。

[0659] 在一个进一步的实施方案中，所述第一和第二CH3区，除了指明的突变外，包含IgG1m(a)(SEQ ID NO:256)、IgG1m(f)(SEQ ID NO:257)、或IgG1m(ax)(SEQ ID NO:258)的序列。

[0660] 因此，在一个实施方案中，所述第一和第二抗体在(核心)铰链区都不包含Cys-Pro-Ser-Cys序列。

[0661] 在一个进一步的实施方案中，所述第一和第二抗体在(核心)铰链区都包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0662] 本发明的双特异性抗体还可以通过在单个细胞中共表达编码第一和第二多肽的构建体而获得。因此，在一个进一步的方面，本发明涉及用于产生双特异性抗体的方法，所述方法包含以下步骤：

[0663] a)提供编码第一多肽的第一核酸构建体，所述多肽包含第一抗体重链的第一抗原结合区和第一Fc区，所述第一Fc区包含第一CH3区，

[0664] b)提供编码第二多肽的第二核酸构建体，所述多肽包含第二抗体重链的第二抗原结合区和第二Fc区，所述第二Fc区包含第一CH3区，

[0665] 其中所述第一和第二CH3区的序列是不同的，且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚相互作用强于所述第一和第二CH3区各自的同二聚相互作用，并且

[0666] 其中所述第一同二聚蛋白质在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的其它氨基酸，且所述第二同二聚蛋白质具有在选自下组位置的氨基酸取代：366、368、370、399、405和407，

[0667] 任选地，其中所述第一和第二核酸构建体编码所述第一和第二抗体的轻链序列

[0668] c)在宿主细胞中共表达所述第一和第二核酸构建体，和

[0669] d)从细胞培养物获得所述异二聚蛋白质。

[0670] 因此，本发明还涉及重组真核或原核宿主细胞，其产生本发明的双特异性抗体。

[0671] 在本发明的一个实施方案中，双特异性抗体是通过根据本发明的任何方法而获得的。

[0672] 用于产生抗体的合适的表达载体和合适的宿主细胞是领域内所熟知的，所述载体包括启动子、增强子等等。宿主细胞的实例包括酵母、细菌、和哺乳动物细胞，如CHO或HEK细胞。

[0673] 在该方法的一个实施方案中，所述第一CH3区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二CH3区在405位具有除了Phe之外的氨基酸。

[0674] 在该方法的另一个实施方案中，所述第一CH3区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的其它氨基酸，并且所述第二CH3区具有在405位的除了Phe之外的氨基酸，如在405位的除了Phe、Arg、或Gly之外的氨基酸；或所述第一CH3区在409位具有除了Lys、Leu、或Met之外的氨基酸，并且所述第二CH3区在407位具有除了Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr之外的氨基酸。

[0675] 在一些实施方案中，所述第一和第二多肽是两种抗体的全长重链，其结合不同的

表位(即,所述第一和第二核酸构建体编码两种抗体的全长重链,其结合不同表位),且因此异二聚蛋白质是双特异性抗体。该双特异性抗体可以是重链抗体,或所述宿主细胞可以进一步表达编码轻链的一种或多种核酸构建体。如果仅将一种轻链构建体与重链构建体共表达,则仅在轻链序列使其可与每条重链形成功能性抗原结合域的情况下才形成功能性双特异性抗体。如果将两种或更多种不同轻链构建体与重链共表达,则会形成多种产物。

[0676] 在进一步的实施方案中,根据本发明的共表达方法包括在上面的体外方法部分所述的任何其它特征。

[0677] 在一个进一步的方面,本发明涉及包含本文在上面所指明的第一和第二核酸构建体的表达载体。在一个进一步的实施方案中,表达载体进一步包含核酸序列,其编码抗体-例如人抗体-的轻链、重链、或轻链和重链两者的恒定区。

[0678] 在本发明的上下文中的表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体、和合成核酸载体(包含合适的表达控制元件的组的核酸序列)。这类载体的实例包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒(baculovirus)、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA的组合的载体、和病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方案中,编码HER2抗体的核酸包含于裸露DNA或RNA载体中,其包括,例如,线性表达元件(如在例如Sykes和Johnston,Nat Biotech17,355-59(1997)中所描述的),紧凑核酸载体(compacted nucleic acid vector)(如在例如US6,077,835和/或WO00/70087中所描述的),质粒载体如pBR322、pUC19/18、或pUC118/119,“midge”最小尺寸的核酸载体(如在例如Schakowski等人,Mol Ther3,793-800(2001)中所描述的),或作为沉淀的核酸载体构建体,如CaPO4沉淀的构建体(如在例如WO00/46147,Benvenisty和Reshef,PNAS USA83,9551-55(1986),Wigler等人,Cell14,725(1978),和Coraro和Pearson,Somatic Cell Genetics7,603(1981)中所描述的)。这类核酸载体和其用途是本领域所熟知的(见例如US5,589,466和US5,973,972)。

[0679] 本发明的抗体的例示性的表达载体还在实施例2和3中描述。

[0680] 在一个实施方案中,载体适于在细菌细胞中表达HER2抗体。这类载体的实例包括表达载体,如BlueScript(Stratagene)、pIN载体(Van Heeke和Schuster,J Biol Chem264,5503-5509(1989)、pET载体(Novagen,Madison WI)等。

[0681] 表达载体可以还可以是或者另选地是适于在酵母系统中表达的载体。任何适于在酵母系统中表达的载体都可以使用。合适的载体包括,例如,包含组成型或诱导型启动子的载体,所述启动子如α因子、醇氧化酶、和PGH(在F.Ausubel等人,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987),和Grant等人,Methods in Enzymol153,516-544(1987)中综述)。

[0682] 表达载体可以还可以是或者另选地是适于在哺乳动物细胞中表达的载体,例如,包含作为选择标记的谷氨酰胺合成酶的载体,如在Bebbington(1992)Biotechnology(NY)10:169-175中所描述的载体。

[0683] 核酸和/或载体还可以包含编码分泌/局部化序列的核酸序列,其可以将多肽,如新生的多肽链,靶向至壁膜间隙或至细胞培养基中。这类序列是领域内所知的,且包括分泌前导肽或信号肽。

[0684] 表达载体可以包含或相关于任何合适的启动子、增强子、和其它促进表达的元件。这类元件的实例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3-3、

MMTV、和HIV LTR启动子)，有效的多聚A终止序列、用于在大肠杆菌中的质粒产物的复制起始区、作为选择标志物的抗生素抗性基因、和/或方便的克隆位点(例如，聚合接头)。核酸还可以包含诱导型启动子，而非组成型启动子如CMV IE。

[0685] 在一个实施方案中，编码HER2抗体的表达载体可以位于宿主细胞或宿主动物中和/或经由病毒载体递送至宿主细胞或宿主动物。

[0686] 在一个甚至进一步的方面，本发明涉及包含本文中上面指明的第一和第二核酸构建体的宿主细胞。

[0687] 因此，本发明还涉及重组真核或原核宿主细胞如转染瘤，其产生本发明的双特异性抗体。

[0688] 第一HER2抗体可以在重组真核或原核宿主细胞如转染瘤中表达。

[0689] 宿主细胞的实例包括酵母、细菌、和哺乳动物细胞，如CHO或HEK细胞。例如，在一个实施方案中，宿主细胞可以包含稳定整合进入细胞基因组中的第一和第二核酸构建体。在另一个实施方案中，本发明提供了包含非整合核酸的细胞，如质粒、粘粒(cosmid)、噬菌粒(phagemid)、或线性表达元件，其包含如上所指明的第一和第二核酸构建体。

[0690] 在一个甚至进一步的方面，本发明涉及转基因非人动物或植物，其包含编码一组或两组人重链或人轻链的核酸，其中所述动物或植物产生本发明的本发明的双特异性抗体。

[0691] 在一个进一步的实施方案中，本发明涉及产生如本文中所定义的本发明的抗体的杂交瘤。在一个甚至进一步的方面，本发明涉及转基因非人动物或，其包含编码一组或两组人重链和人轻链的核酸，其中所述动物或植物产生本发明的双特异性抗体。

[0692] 在一个进一步的方面，本发明涉及用于产生本发明的HER2xCD3抗体的方法，所述方法包括以下步骤：

[0693] a)培养如本文中所描述的宿主细胞，和

[0694] b)从培养基纯化本发明的抗体。

[0695] 制备HER2和CD3抗体

[0696] 取决于用于产生根据本发明的双特异性抗体的方法，首先产生二价，单特异性抗体可能是适宜的(relevant)。例如，如果双特异性抗体是如以上所描述的基于在还原性条件下混合两种二价单特异性抗体而产生的，则这是适宜的。

[0697] 供用于本发明，例如提供与交叉阻断组1、2、3、或4的抗体共享表位或交叉阻断区的抗原结合区的单克隆抗体，如HER2抗体，可以例如通过由Kohler et al.,Nature256,495(1975)首先描述的杂交瘤方法或通过重组DNA方法而产生。单克隆抗体还可以使用在例如Clackson等人,Nature352,624-628(1991)and Marks et al.,J.Mol.Biol.222,581-597(1991)中所描述的技术从噬菌体抗体文库而分离。单克隆抗体可以从任何合适的来源获得。因此，例如，单克隆抗体可以从杂交瘤获得，所述杂交瘤从以目标抗原所免疫化的小鼠获得的鼠类脾B细胞制备，所述目标抗原例如为在表面上表达抗原的细胞的形式或编码目的抗原的核酸的形式。单克隆抗体还可以从衍生自免疫化的人或非人动物如大鼠、狗、灵长类等的抗体表达细胞的杂交瘤获得。

[0698] 在一个实施方案中，抗体是人抗体。直接针对HER2或CD3的人单克隆抗体可以使用携带人免疫系统而非小鼠免疫系统的部分的转基因或转染色体小鼠而生成。这类转基因和

转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb®小鼠和KM小鼠的小鼠，且在本文中统称为“转基因小鼠”。

[0699] HuMAb®小鼠含有编码未重排的(unrearranged)人重链(μ和γ)和κ轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座(miniloci)，连同灭活内源μ和κ链基因座的靶向突变(Lonberg,N.等人,Nature368,856-859(1994))。相应地，所述小鼠呈现降低的小鼠IgM或κ的表达和免疫化的响应，引入的人重链和轻链转基因，经历同族型转换(class switching)和体细胞突变以生成高亲和力人IgG,κ单克隆抗体(Lonberg,N.等人(1994)，同上;在Lonberg,N.Handbook of Experimental Pharmacology113,49-101(1994)，Lonberg,N.and Huszar,D.,Intern.Rev.Immunol.Vol.1365-93(1995)和Harding,F.and Lonberg,N.Ann.N.Y.Acad.Sci764536-546(1995)中综述)。HuMAb小鼠的制备在Taylor,L.等人,Nucleic Acids Research20,6287-6295(1992)，Chen,J.等人,International Immunology5,647-656(1993)，Tuaillon等人,J.Immunol.152,2912-2920(1994)，Taylor,L.等人,International Immunology6,579-591(1994)，Fishwild,D.等人,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中详细描述。还参见US5,545,806,US5,569,825,US5,625,126,US5,633,425,US5,789,650,US5,877,397,US5,661,016,US5,814,318,US5,874,299,US5,770,429,US5,545,807,WO98/24884,WO94/25585,WO93/1227,WO92/22645,WO92/03918和WO01/09187。

[0700] HCo7、HCo12、HCo17、和HCo20小鼠在它们的内源轻链(κ)基因中具有JKD破坏(如在Chen等人,EMBO J.12,821-830(1993)中所描述的)，在它们的内源重链基因中的CMD破坏(如在WO01/14424的实施例1中所描述的)，和KCo5人κ轻链转基因(如在Fishwild等人,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中所描述的)。另外，Hco7小鼠具有HCo7人重链转基因(如在US5,770,429中所描述的)，HCo12小鼠具有HCo12人重链转基因(如在WO01/14424的实施例2中所描述的)，HCo17小鼠具有HCo17人重链转基因(如在WO01/09187的实施例2中所描述的)，且HCo20小鼠具有HCo20人重链转基因。所得的小鼠在对于内源小鼠重链和kappa轻链基因座的破坏为纯合的背景中表达人免疫球蛋白重链和kappa轻链转基因。

[0701] 在KM小鼠品系中，内源小鼠kappa轻链基因已被纯合地破坏，如在Chen等人,EMBO J.12,811-820(1993)中所描述的，且内源小鼠重链基因已被纯合地破坏，如在WO01/09187的实施例1中所描述的。该小鼠品系携带人kappa轻链转基因，KCo5，如在Fishwild等人,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中所描述的。该小鼠品系还携带人重链转染色体，其构成为(composed of)染色体14片段hCF(SC20)，如在WO02/43478中所描述的。HCo12-Balb/C小鼠可以通过将HCo12与KCo5[J/K](Balb)杂交来生成，如在WO/2009/097006中所描述的。

[0702] 来自这些转基因小鼠的脾细胞可以用于根据熟知的技术生成分泌人单克隆抗体的杂交瘤。

[0703] 此外，HER2抗原结合区可以使用本领域熟知的技术，通过展示类型的技术(display-type technologies)而从人抗体或来自其它物种的抗体获得，所述展示类型的技术包括且不限于噬菌体展示(phage display)、逆转录病毒展示(retroviral display)、核糖体展示(ribosomal display)、和其它技术，且所得分子可以进行其它的成熟化，如亲

和力成熟化，这类技术是本领域熟知的(见例如Hoogenboom等人.,J.Mol.Biol.227,381(1991)(噬菌体展示),Vaughan等人,Nature Biotech14,309(1996)(噬菌体展示),Hanes和Plucthau,PNAS USA94,4937-4942(1997)(核糖体展示),Parmley和Smith,Gene73,305-318(1988)(噬菌体展示),Scott TIBS17,241-245(1992),Cwirla et al.,PNAS USA87,6378-6382(1990),Russel等人,Nucl.Acids Research21,1081-1085(1993),Hogenboom等人,Immunol.Reviews130,43-68(1992),Chiswell和McCaffertyTIBTECH10,80-84(1992),和US5,733,743)。如果展示技术是用于产生非人的抗体，则可以将这类抗体人源化。

[0704] 本发明的双特异性抗体可以是任何同种型。对同种型的选择通常是由合意的效应物功能如ADCC诱导所指引的。例示性的同种型为IgG1,IgG2,IgG3,和IgG4。任何人轻链恒定区，kappa或lambda都可以使用。本发明的抗体的效应物功能可以通过同种型转换(isotype swithcing)为例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM抗体而改变以用于多种治疗用途。在一个实施方案中，本发明的抗体的两个Fc区都是IgG1同种型，例如IgG1,κ。在一个实施方案中，双特异性抗体的两个Fc区分别是是IgG1和IgG4同种型。任选地，Fc区可以在铰链区和/或CH3区中修饰，如在本文中它处所描述的。

[0705] 在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体是全长抗体，优选IgG1抗体，特别是IgG1,κ抗体或其变体。在另一个实施方案中，本发明的双特异性抗体包含抗体片段或单链抗体。抗体片段可以，例如，使用常规技术通过片段化获得，且片段以与本文中所描述的用于整个抗体的相同的方法而筛选其效用。例如，可以通过将抗体以胃蛋白酶处理而生成$F(ab')_2$片段。可以还原剂，如二硫苏糖醇，处理所得的$F(ab')_2$片段以还原二硫键以产生Fab'片段。可以通过以木瓜蛋白酶处理抗体以获得Fab片段。也可以经由硫醚键或二硫键通过结合Fab'片段而产生$F(ab')_2$片段。抗体片段还可以通过在重组细胞中表达编码这类片段的核酸而生成(例如见Evans等人,J.Immunol.Meth.184,123-38(1995))。例如，编码部分的$F(ab')_2$片段的的嵌合型基因可以包括编码H链的C_H1域和铰链区的DNA序列，其后为翻译终止子，从而产生这类的截短的抗体片段分子。

[0706] 本发明的双特异性HER2xCD3抗体还可以从单链抗体制备。单链抗体是肽，其中重链和轻链Fv区是连接的。在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体包含单链Fv(scFv)，其中本发明的HER2抗体的Fv中的重链和轻链是以柔性肽接头(通常大约10、12、15或更多氨基酸残基)连接在单个肽链中的。产生这类抗体的方法在例如US4,946,778,Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994),Bird等人,Science242,423-426(1988),Huston等人,PNAS USA85,5879-5883(1988)和McCafferty等人,Nature348,552-554(1990)中描述。然后双特异性抗体可以从来自单链HER2抗体和单链CD3抗体的两种V_H和V_L形成，或多价抗体从多于两种V_H和V_L链形成。

[0707] 在一个实施方案中，用于产生本发明的双特异性抗体的HER2和CD3mAb的Fc区的一种或两者均是效应物缺陷的。在一个实施方案中，效应物功能缺陷抗体是人稳定化IgG4抗体，其已经过修饰以预防Fab臂交换(van der Neut Kolfschoten等人(2007)Science317(5844):1554-7)。合适的人稳定化IgG4抗体的实例是抗体，其中在人IgG4的重链恒定区中的409位的精氨酸，其是根据在Kabat等人中所描述的EU指数(EU index)而指示的，以赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、或亮氨酸，优选赖氨酸取代(在WO2006033386(Kirin)中描述)和/或

其中铰链区已经过修饰以包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0708] 在一个实施方案中，稳定化IgG4抗体是包含重链和轻链的IgG4抗体，其中所述重链包含人IgG4恒定区，其在对应于409位的位置具有选自下组的残基：Lys、Ala、Thr、Met、和Leu，和/或在对应于405位的位置具有选自下组的残基：Ala、Val、Gly、Ile、和Leu，并且其中所述抗体任选地包含一种或多种进一步的取代、缺失和/或插入，但在铰链区不包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。优选地，所述抗体在对应于409位的位置包含Lys或Ala残基，或抗体的CH3区已被人IgG1的、人IgG2的、或人IgG3的CH3区所替换。还参见WO2008145142(Genmab)和WO211131746(Genmab)。

[0709] 在一个甚至进一步的实施方案中，稳定化IgG4抗体是包含重链和轻链的IgG4抗体，其中所述重链包含人IgG4恒定区，其在对应于409位的位置具有选自下组的残基：Lys、Ala、Thr、Met、和Leu，和/或在对应于405位的位置具有选自下组的残基：Ala、Val、Gly、Ile、和Leu，并且其中所述抗体任选地包含一种或多种进一步的取代、缺失和/或插入，且其中所述抗体在铰链区包含Cys-Pro-Pro-Cys。优选地，所述抗体在对应于409位的位置包含Lys或Ala残基，或抗体的CH3已经被人IgG1的、人IgG2、或人IgG4的CH3替代。

[0710] 在一个进一步的实施方案中，效应物功能缺陷型抗体是非IgG4种类例如IgG1、IgG2、或IgG3的抗体，其已经过突变使得介导效应物功能，如ADCC的能力被降低或甚至消除。这类突变已经在Dall'Acqua WF等人，J Immunol.177(2):1129-1138(2006)and Hezareh M,J Virol.;75(24):12161-12168(2001)中描述。

[0711] 缀合物

[0712] 在一个进一步的方面，本发明提供连接或缀合至一种或多种治疗部分(therapeutic moieties)如细胞毒素、化学疗法药物、细胞因子、免疫抑制剂、和/或放射性同位素的双特异性HER2xCD3抗体。这类缀合物在本文中称作“免疫缀合物(immunoconjugates)”或“药物缀合物(conjugates)”。包含一种或多种细胞毒素的免疫缀合物称为“免疫毒素”。

[0713] 组合物

[0714] 在一个进一步的主要方面，本发明涉及包含以下的药物组合物：

[0715] -如在本文中所定义的双特异性HER2xCD3抗体，和

[0716] -药学可接受的载体。

[0717] 本发明的药物组合物可以包含本发明的一种双特异性抗体或本发明的不同双特异性抗体的组合。

[0718] 药物组合物可以根据如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995所公开的常规技术而配制。本发明的药物组合物可以，例如，包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去污剂(例如，非离子去污剂，如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如，糖或无蛋白质的氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂、和/或其它适于在药物组合物中包含的材料。

[0719] 药学可接受的载体包括任何和所有与本发明的双特异性抗体生理学相容的合适的溶剂、分散剂、包衣、抗细菌和抗真菌制剂、等渗剂、抗氧化剂、和吸收延缓等。可以用于本发明的药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油、羧甲基纤维

素胶体溶液、黄蓍胶(tragacanth gum)和可注射的有机酯如油酸乙酯(ethyl oleate)、和/或多种缓冲剂。药学可接受的载体包括无菌水性溶液或分散物和用于临时制备(extemporaneous preparation)无菌可注射溶液或分散物的无菌粉末。适当的流动性可以,例如,通过使用包衣材料(coating materials),如卵磷脂而维持,在分散物的情况中通过维持所需颗粒大小而维持,和通过使用表面活性剂而维持。

[0720] 本发明的药物双特异性抗体还可以包含药学可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠(sodium bisulfate)、偏二亚硫酸钠(sodium metabisulfite)、亚硫酸钠(sodium sulfite)等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸盐(ascorbyl palmitate)、丁羟茴醚(butylated hydroxyanisole)、丁羟甲苯(butylated hydroxytoluene)、卵磷脂(lecithin)、没食子酸丙酯(propyl gallate)、α-生育酚(alpha-tocopherol)等;(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸(tartaric acid)、磷酸等。

[0721] 本发明的药物双特异性抗体还可以在组合物中包括等渗剂,如糖,多元醇如甘露醇、山梨醇、甘油,或氯化钠。

[0722] 本发明的药物双特异性抗体还可以含有适于所选施用途径的一种或多种佐剂,如防腐剂、湿润剂(wetting agent)、乳化剂、分散剂、防腐剂、或缓冲剂,其可以增强药物组合物的储藏期限(shelf life)或效果。本发明的双特异性抗体还可以与保护双特异性抗体防止快速释放的载体一起制备,如受控释放配制物(controlled release formulation),包括植入物(implants)、透皮贴剂(transdermal patches)、和微囊递送系统(microencapsulated delivery systems)。这类载体可以包括明胶(gelatin)、甘油单硬脂酸酯(glyceryl monostearate)、甘油二硬脂酸酯(glyceryl distearate),生物可降解、生物相容的聚合物如乙烯醋酸乙烯(ethylene vinyl acetate)、聚酐(polyanhydrides)、聚乙醇酸(polyglycolic acid)、胶原(collagen)、聚原酸酯(polyorthoesters)、和单独的聚乳酸或聚乳酸与蜡、或其它本领域熟知的材料。用于制备这类配制物的方法是对本领域技术人员通常是已知的。

[0723] 无菌可注射溶液可以通过将在合适溶剂中的所需量的活性复合物视需要组入一种或多种例如如上所列举的成分的组合,之后无菌微滤而制备。一般地,分散物是通过将活性复合物组入含有基本分散介质和所需的其它成分(例如来自以上所列举的那些)的无菌媒介物而制备的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备的方法的实例为真空干燥和冷冻干燥(freeze-drying)(冻干(lyophilization)),其从之前经灭菌过滤的活性成分加上其它合意的成分的溶液产生其粉末。

[0724] 药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变动以获得活性成分的量,其对于具体的患者、组合物、和施用的模式而有效地达成合意的治疗响应,而对患者没有毒性。所选择的剂量水平取决于多种药动学因素,包括所用的本发明的具体的组合物、或其酰胺,施用途径,施用时间,所用的具体复合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所用的具体组合物组合使用的其它药物、化合物、和/或材料,正在接受治疗的患者的年龄、性别、体重、病况、大致健康、和之前的医疗历史,和医学领域的已知的类似因素。

[0725] 药物组合物可以通过任何合适的途径和模式而施用。在一个实施方案中,本发明的药物组合物是肠胃外施用的。如本文中使用的“肠胃外使用”意指除了肠内和局部施用之

外的施用模式，其通常通过注射，且包括表皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内的、腱内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、颅内、胸腔内、硬膜外和胸骨内的注射和灌注。

[0726] 在一个实施方案中，该药物组合物是通过静脉内或皮下的注射或灌注。

[0727] 用途

[0728] 在一个进一步的主要方面，本发明涉及本发明的双特异性HER2xCD3抗体供用作药物。

[0729] 本发明的双特异性抗体可以用于多种目的。具体地，本发明的抗体可以用于治疗多种形式的癌症，包括转移癌和顽固癌(refractory cancer)。

[0730] 在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体用于治疗乳腺癌、包括原发性、转移性、和顽固癌。

[0731] 在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体用于治疗选自下组的癌的形式：前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食管癌、头和颈的鳞状细胞癌瘤、子宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑色素瘤和软组织肿瘤(例如滑膜肉瘤)。

[0732] 相似地，本发明涉及用于杀灭表达HER2的肿瘤细胞的方法，其包括向有其需要的个体施用有效量的本发明的抗体，如抗体药物缀合物(antibody drug-conjugate，ADC)。

[0733] 本发明还涉及用于抑制一种或多种表达HER2的肿瘤细胞的生长和/或增殖的方法，其包括向有其需要的个体施用本发明的双特异性抗体。

[0734] 本发明还涉及用于治疗癌症的方法，其包括

[0735] a)选择患有癌症的受试者，所述癌症包含共表达HER2的肿瘤细胞，和

[0736] b)向受试者施用本发明的抗体或本发明的药物组合物。

[0737] 在一个实施方案中，所述肿瘤细胞涉及选自下组的癌症的形式：乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食管癌和头和颈的鳞状细胞癌瘤、子宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑色素瘤和软组织肿瘤(例如滑膜肉瘤)。

[0738] 在一个实施方案中，肿瘤细胞是共表达HER2的肿瘤细胞，且是涉及乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌/子宫颈癌、肺癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、睾丸癌、软组织肿瘤(例如滑膜肉瘤)、或膀胱癌的肿瘤细胞。

[0739] 在一个方面，本发明涉及用于在受试者中治疗癌症的方法，其包括选择患有包含表达HER2的肿瘤细胞的癌症的受试者，和向受试者施用本发明的双特异性抗体。在一个实施方案中，受试者患有选自下组的癌症：乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌/子宫颈癌、肺癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、睾丸癌、软组织肿瘤(例如滑膜肉瘤)、或膀胱癌。

[0740] 同样，本发明涉及结合人HER2和人CD3的双特异性抗体在制备用于治疗癌症如以上提到的具体的癌症适应证之一的药物中用途。

[0741] 本发明进一步涉及双特异性抗体，其供用于治疗癌症，如以上所提到的癌症适应证之一。

[0742] 在本发明的治疗的方法的一个进一步的实施方案中，治疗的功效在治疗期间受监控，例如，在预定的时间点，通过测定肿瘤负荷(tumor burden)或相关的肿瘤细胞上的HER2表达水平来监控。

[0743] 在以上治疗的方法和用途中的剂量方案(dosage regimens)经调节以提供最优的

合意的响应(例如,治疗响应)。例如,,可以施用单次推注(bolus),可以随时间施用几个分开的剂量,或根据治疗情况的紧急性所指示可以成比例地降低或提高剂量。肠胃外的组合物可以以剂量单位形式(dosage unit form)配制以供施用的简易性和剂量的一致性。

[0744] 对于双特异性抗体的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病况,且可以由本领域技术人员确定。本发明的复合物的例示性、非限制性的治疗有效量的范围是大约0.001-10mg/kg,如大约0.001-5mg/kg、例如大约0.001-2mg/kg、如大约0.001-1mg/kg、例如大约0.001、大约0.01、大约0.1、大约1或大约10mg/kg。

[0745] 具有本领域一般技术的医师或兽医可方便地确定所需的药物组合物的有效量并开出相应处方。例如,医师或兽医可以低于为了达成合意的治疗效果所需的水平起始用在药物组合物中所用的双特异性抗体的剂量,并逐渐提高剂量直至达成合意的效果。一般而言,本发明的双特异性抗体的合适的每日剂量会是为有效地产生治疗效果的最小剂量的复合物的量。施用可以例如是肠胃外的,如静脉内、肌内、或皮下。在一个实施方案中,双特异性抗体可以通过以通过mg/m^2所计算的周剂量灌注而施用。这类剂量可以例如根据以下而基于上面提供的mg/kg剂量:剂量(mg/kg)x70:1.8。这类施用可以重复,例如,1至8次,如3至5次。施用可以通过从2到24小时,如从2到12小时的持续时间期间的连续灌注而进行。在一个实施方案中,双特异性抗体可以通过在长的持续时间,如多于24小时期间的缓慢连续灌注而施用,以降低毒性副作用。

[0746] 在一个实施方案中,双特异性抗体可以以作为固定剂量而计算的周剂量而使用多至8次,如当每周给药一次时从4次到6次。这类方案可以根据需要例如,在6个月或12个月后,重复一次或多次。这类固定剂量可以例如,基于以上提供的mg/kg剂量,其中将体重估计为70kg。剂量可以通过在施用时测量血液中的本发明的双特异性抗体的量来确定或调整,所述测量通过例如取出生物学样品并使用靶向本发明的双特异性抗体的HER2抗原结合区的抗个体基因型抗体(anti-idiotypic antibodies)进行。

[0747] 在一个实施方案中,双特异性抗体可以通过维持疗法而施用,例如,每周一次为期6个月或更久。

[0748] 双特异性抗体还可以预防地施用以降低发生癌症的风险、延迟癌症演进中事件发生的进行、和/或当癌症缓解时降低复发的风险。

[0749] 本发明的双特异性抗体还可以在组合疗法中施用,即,与待治疗的疾病或病况相关的其它治疗剂组合。相应地,在一个实施方案中,含有抗体的药物与一种或多种其它治疗剂,如细胞毒性剂、化学治疗剂或抗血管生成剂(anti-angiogenic agent)相组合。

[0750] 这类组合施用可以是同时的、分开的、或依次的。对于同时施用,药剂可以合适地作为一种组合物或作为不同的组合物而使用。因此,本发明还提供用于治疗如上文所述的涉及表达HER2的细胞的病症的方法,所述方法包括施用本发明的双特异性抗体与如下描述的一种或多种其它的治疗剂的组合。

[0751] 在一个实施方案中,本发明提供用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者施用治疗有效量的本发明的双特异性抗体,和任选地至少一种其它的治疗剂,或与所述抗体结合不同的HER2表位的抗体。

[0752] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者施用治疗有效量的本发明的双特异性抗体和至少一种其它的治疗剂。

[0753] 在一个实施方案中,这类其它的治疗剂可以选自:抗代谢药(antimetabolite),如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、氨烯咪胺(decarbazine)、羟基脲(hydroxyurea、门冬酰胺酶(asparaginase)、吉西他滨(gemcitabine)、或克拉屈滨(cladribine)。

[0754] 在另一个实施方案中,这类其它的治疗剂可以选自烷化剂(alkylating agent),氮芥(mechlorethamine)、thioepa、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、苯丙氨酸氮芥(melphalan)、卡氮芥(carmustine,BSNU)、环己亚硝脲(lomustine,CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲菌素(streptozotocin)、达卡巴嗪(dacarbazine(DTIC))、丙卡巴肼(procarbazine)、丝裂霉素C(mitomycin C)、顺铂(cisplatin)和其它铂衍生物,如卡铂(carboplatin)

[0755] 在另一个实施方案中,这类其它治疗剂可以选自抗有丝分裂剂(anti-mitotic agent),如紫杉烷类(taxanes),例如多西他奇(docetaxel)、和紫杉醇(paclitaxel),和长春花碱类(vinca alkaloids),例如长春地辛(vindesine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、和长春瑞滨(vinorelbine)。

[0756] 在另一个实施方案中,这类其它治疗剂可以选自拓扑异构酶抑制剂(topoisomerase inhibitor),如托泊替康(topotecan)或伊立替康(irinotecan),或细胞稳定药(cytostatic drug),如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide)。

[0757] 在另一个实施方案中,这类其它治疗剂可以选自生长因子抑制剂,如ErbB1(EGFR)的抑制剂(如EGFR抗体,例如zalutumumab、西妥昔单抗(cetuximab)、panitumuma、或nimotuzumab,或者其它EGFR抑制剂,如gefitinib或erlotinib),ErbB2(HER2/neu)的另一种抑制剂(如HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗(pertuzumab))或EGFR和HER2两者的抑制剂,如lapatinib。

[0758] 在另一个实施方案中,这类其它治疗剂可以选自酪氨酸激酶抑制剂,如伊马替尼(imatinib)(Glivec,Gleevec STI571)或lapatinib、PTK787/ZK222584。

[0759] 在另一个实施方案中,本发明提供用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者使用治疗有效量的本发明的双特异性抗体和至少一种血管发生(angiogenesis)、新血管形成(neovascularization)、和/或其它血管化(vascularization)的抑制剂。

[0760] 这类血管发生抑制剂的实例有尿激酶抑制剂(urokinase inhibitors)、基质金属蛋白酶抑制剂(matrix metalloprotease inhibitors)(如马立马司他(marimastat)、新伐司他(neovastat)、BAY12-9566、AG3340、BMS-275291、和类似药剂),内皮细胞迁移和增殖的抑制剂(如TNP-470、角鲨胺(squalamine)、2-甲氧雌二醇(2-methoxyestradiol)、考布他汀(combretastatins)、内皮他丁(endostatin)、血管他丁(angiostatin)、青霉胺(penicillamine)、SCH66336(Schering-Plough Corp,Madison,NJ)、R115777(Janssen Pharmaceutica,Inc,Titusville,NJ)和类似的药剂),血管原性生长因子的拮抗剂(antagonists of angiogenic growth factors)(如ZD6474、SU6668、针对生血管剂(angiogenic agent)和/或它们的受体的抗体(如VEGF(例如bevacizumab)、bFGF、和血管生成素-1(angiopoietin-1))、沙利度胺(thalidomide)、沙利度胺类似物(如CC-5013)、

Sugen5416、SU5402、抗血管原性核酶(antiangiogenic ribozyme)(如angiozyme)、干扰素α(interferonα)(如干扰素α2a)、苏拉明(suramin)和类似的药剂)、VEGF-R激酶抑制剂和其它抗血管原性酪氨酸激酶抑制剂(如SU011248),内皮特异性整联蛋白/生存信号的抑制剂(inhibitors of endothelial-specific integrin/survival signaling)(如vitaxin和类似的药剂),铜拮抗剂/螯合剂(copper antagonists/chelators)(如四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate)、卡托普利(captopril)和类似的药剂)、羧胺三唑(carboxyamido-triazole,CAI)、ABT-627、CM101、白介素-12(interleukin-12,IL-12)、IM862、PNU145156E,以及抑制血管发生的核苷酸分子(如反义VEGF-cDNA、编码血管他丁(angiostatin)的cDNA、编码p53的cDNA、和编码缺陷型VEGF受体-2(VEGFreceptor-2)的cDNA).

[0761] 这类血管发生、新血管形成、和/或其它血管化的抑制剂的其它实例还有抗血管原性肝素衍生物(anti-angiogenic heparin derivatives)(例如,heperinase III)、替莫唑胺(temozolomide)、NK4、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor)、环氧合酶-2抑制剂(cyclooxygenase-2inhibitors)、缺氧诱导因子1的抑制剂(inhibitors of hypoxia-inducible factor1)、抗血管原性大豆异黄酮(anti-angiogenic soy isoflavones)、奥替普拉(oltipraz)、烟曲霉素(fumagillin)和其类似物、促生长素抑制素类似物(somatostatin analogues)、戊聚糖多聚硫酸酯(pentosan polysulfate)、替可加兰钠(tecogalan sodium)、达肝素(dalteparin)、tumstatin、凝血酶敏感素(thrombospondin)、NM-3、combrestatin、canstatin、伊伐他汀(avastatin)、针对其它靶物的抗体,如抗alpha-v/beta-3整联蛋白(anti-alpha-v/beta-3integrin)和抗kininostatin抗体。

[0762] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是抗癌免疫原(anti-cancer immunogen),如癌抗原/肿瘤相关抗原(例如,上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule,EpCAM/TACSTD1))、粘蛋白1(mucin1,MUC1)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、肿瘤相关糖蛋白72(tumor-associated glycoprotein72,TAG-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌相关病毒疫苗(cancer-associated viral vaccines)(例如,人乳头状瘤病毒疫苗(human papillomavirus vaccines))或肿瘤衍生的热激蛋白(tumor-derived heat shock proteins)。

[0763] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是抗癌细胞因子、趋化因子、或其组合。合适的细胞因子和生长因子的实例包括IFNγ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα(例如INFα2b)、IFNβ、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子(stem cell factor)、安西司亭(ancestim)、和TNFα。合适的趋化因子可以包括Glu-Leu-Arg(ELR)阴性趋化因子(Glu-Leu-Arg(ELR)-negative chemokines)如IP-10、MCP-3、MIG、和来自人CXC和C-C趋化因子家族的SDF-1α(SDF-1αfrom the human CXC and C-C chemokine families)。合适的细胞因子包括细胞因子衍生物、细胞因子变体、细胞因子片段、和细胞因子融合蛋白。

[0764] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是细胞周期控制/细胞凋亡调节物(或“调节剂”)((cell cycle control/

apoptosis regulator)(or"regulating agent"))。细胞周期控制/细胞凋亡调节物可以包括靶向和调制(modulate)细胞周期控制/细胞凋亡调节物的分子,如(i)cdc-25(如NSC663284),(ii)过刺激细胞周期的周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases)(如flavopiridol(L868275、HMR1275)、7-羟基十字孢碱(7-hydroxystaurosporine)(UCN-01、KW-2401)、和roscovitine(R-roscovitine、CYC202)),和(iii)端粒酶调制物(telomerase modulators)(如BIBR1532、SOT-095、GRN163、和在例如US6,440,735和US6,713,05中所描述的组合物)。干扰细胞凋亡途径的分子的非限制性实例包括与TNF相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand,TRAIL)/细胞凋亡-2配体(apoptosis-2ligand,Apo-2L)、激活TRAIL受体的抗体(antibodies that activate TRAIL receptors)、IFN、和反义Bcl-2。

[0765] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是激素调节剂,如对于抗雄激素和抗雌激素疗法有用的药剂。这类激素调节剂的实例有他莫昔芬(tamoxifen)、艾多昔芬(idoxifene)、氟维司群(fulvestrant)、屈洛昔芬(droloxifene)、托瑞米芬(toremifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、乙炔雌二醇/炔雌醇(ethinyl estradiol/estinyl)、抗雄激素(an antiandrogene)(如氟他胺(flutaminde/eulexin))、黄体酮(a progestin)(如如己酸羟孕酮(hydroxyprogesterone caproate)、甲羟孕酮/普维拉(medroxyprogesterone/provera)、甲地孕酮/梅格施(megestrol acepate/-megace))、肾上腺皮质类固醇(an adrenocorticosteroid)(如氢化可的松(hydrocortisone)、泼尼松(prednisone))、促黄体激素释放激素(luteinizing hormone-releasing hormone)(和其类似物和其它LHRH激动剂如布舍瑞林(buserelin)和戈舍瑞林(goserelin))、芳香酶抑制剂(an aromatase inhibitor)(如瑞宁得(anastrazole/arimidex)、氨鲁米特(aminoglutethimide/cytraden)、依西美坦(exemestane))或激素抑制剂(a hormone inhibitor)(如奥曲肽/善得定(octreotide/sandostatin))。

[0766] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是抗无反应性剂(anti-anergic agent),如阻断CTLA-4活性的分子,例如ipilimumab。

[0767] 在一个实施方案中,与如上所描述的用于治疗所述病症的双特异性抗体组合使用的治疗剂可以是抗癌核酸或抗癌抑制性RNA分子。

[0768] 其它抗癌剂-其可以作为治疗剂而涉及与供治疗如上文所描述的病症的根据本发明的双特异性抗体组合使用-的实例为分化诱导剂(differentiation inducing agents)、视黄酸类似物(retinoic acid analogues)(如全反视黄酸(all trans retinoic acid)、13-顺视黄酸(13-cis retinoic acid)和类似的药剂)、维生素D类似物(如西奥骨化醇(seocalcitol)和类似的药剂),ErbB3、ErbB4、IGF-IR、胰岛素受体、PDGFRa、PDGFRbeta、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON(如抗RON抗体)、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7的抑制剂,和类似的制剂。

[0769] 其它抗癌药剂-其可以作为治疗剂而涉及与供治疗如上文所描述的病症的根据本发明的双特异性抗体组合使用-的实例有雌莫司汀(estramustine)和表柔比星(epirubicin)。

[0770] 其它抗癌药剂-其可以作为治疗剂而涉及与供治疗如上文所描述的病症的根据本发明的双特异性抗体组合使用-的实例有HSP90抑制剂,如17-烯丙基氨基格尔德霉素(17-allyl amino geld-anamycin)、直接针对肿瘤抗原,如PSA、CA125、KSA、整联蛋白例如整联蛋白β1的抗体,或VCAM抑制剂。其它抗癌制剂-其可以作为治疗剂而涉及与供治疗如上文所描述的病症的根据本发明的双特异性抗体组合使用-的实例有神经钙蛋白抑制剂(calcineurin-inhibitors)(如伐司朴达(valspodar)、PSC833、和其它MDR-1或p-糖蛋白(p-glycoprotein)抑制剂)、TOR抑制剂(如西罗莫司(sirolimus)、依维莫司(everolimus)和雷帕霉素(rapamcyin))、和"淋巴细胞归巢(lymphocyte homing)"机制的抑制剂(如FTY720)、和对细胞信号具有效果的药剂,如粘附分子抑制剂(如抗LFA)。

[0771] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体用于与一种或多种其它治疗抗体,如ofatumumab、zanolimumab、daratumumab、ranibizumab、nimotuzumab、panitumumab、hu806、达克珠单抗(daclizumab)(赛尼哌(Zenapax))、巴利昔单抗(basiliximab)(Simulect)、英夫利昔单抗(infliximab)(Remicade)、阿达木单抗(adalimumab)(Humira)、那他珠单抗(natalizumab)(Tysabri)、omalizumab(Xolair)、efalizumab(Raptiva)和/或利妥昔单抗(rituximab)组合使用。

[0772] 在另一个实施方案中,将如本文中所描述的本发明两种或更多种不同抗体组合使用以供治疗疾病。特别有兴趣的组合包括两种或更多种非阻断抗体。这类组合疗法可以导致每个细胞的提高的抗体数目的结合,其可以给出提高的功效,例如经由激活补体介导的裂解。

[0773] 除了上述之外,本发明的组合疗法的其它实施方案还包括以下:

[0774] 对于治疗乳腺癌,将双特异性抗体或其治疗缀合物与以下组合:甲氨蝶呤(methotrexate)、紫杉醇(paclitaxel)、多柔比星(doxorubicin)、卡铂(carboplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、ixabepilone、丝裂霉素(mutamycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、长春瑞滨(vinorelbine)、多西紫杉醇(docetaxel)、thiotepa、长春新碱(vincristine)、卡培他滨(capecitabine)、EGFR抗体(例如zalutumumab、西妥昔单抗(cetuximab)、panitumumab或nimotuzumab)或其它EGFR抑制剂(如gefitinib或erlotinib)、另一种HER2抗体或缀合物(如,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)、EGFR和HER2两者的抑制剂(如lapatinib),和/或与HER3抑制剂组合。

[0775] 对于治疗非小细胞肺癌,将本发明的双特异性抗体与下述组合:EGFR抑制剂,如EGFR抗体,例如zalutumumab、西妥昔单抗(cetuximab)、panitumumab或nimotuzumab,或其它EGFR抑制剂(如gefitinib或erlotinib),或与另一种HER2药剂(如HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)组合,或与EGFR和HER2两者的抑制剂,如lapatinib组合,或与HER3抑制剂组合。

[0776] 对于治疗结肠直肠癌,将本发明的双特异性抗体与选自下组的一种或多种化合物组合:吉西他滨(gemcitabine)、贝伐单抗(bevacizumab)、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、奥沙利铂(oxaliplatin)、伊立替康(irinotecan)、5-FU/LV、卡培他滨(Capecitabine)、UFT、EGFR靶向剂如cetuximab、panitumumab、zalutumumab;VEGF抑制剂、或酪氨酸激酶抑制剂如sunitinib。

[0777] 对于治疗前列腺癌,将双特异性抗体与一种或多种选自以下的化合物组合:激素/抗激素疗法;如抗雄激素物质(antiandrogens),促黄体激素释放激素(Luteinizing hormone releasing hormone,LHRH)激动剂,和化学治疗剂如紫杉烷类(taxanes)、米托蒽醌(mitoxantrone)、雌莫司汀(estramustine)、5FU、长春碱(vinblastine)、和ixabepilone。

[0778] 放射疗法-外科手术

[0779] 在一个实施方案中,本发明提供用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者施用治疗有效量的双特异抗体,如本发明的HER2xCD3抗体,和对其进行放射疗法。

[0780] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者施用治疗有效量的双特异性抗体,如本发明的HER2xCD3抗体,和对其进行放射疗法。

[0781] 在一个实施方案中,本发明提供本发明的双特异性抗体用于制备治疗药物组合物的用途,所述药物组合物用于治疗癌症,其待与放射疗法组合而施用。

[0782] 放射疗法可以包括向患者提供辐射或相关地施用放射性药品(radiopharmaceuticals)。辐射的来源可以是接受治疗的患者的外部或内部(辐射治疗可以,例如,是以外部束放射疗法(external beam radiation therapy,EBRT)或近程放射治疗(brachytherapy,BT))。可以用在进行这类方法中的放射性元素包括,例如,镭、铯-137、铱-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、锝-99、碘-123、和铟-111。

[0783] 在一个进一步的实施方案中,本发明提供用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有其需要的受试者施用治疗有效量的本发明的双特异性抗体,与外科手术组合。

[0784] 诊断用途

[0785] 本发明的双特异性抗体还可以用于诊断目的。因此,在一个进一步的方面,本发明涉及包含如本文中所定义的双特异性HER2xCD3抗体的诊断组合物,及其用途。在一个实施方案中,本发明提供用于诊断癌症的试剂盒,其包含容器,所述容器包含双特异性HER2xCD3抗体,和一种或多种用于检测抗体与HER2结合的试剂。试剂可以包括,例如,荧光标记、酶标记、或其它可检测标记。所述试剂还可以包括二抗或三抗或用于酶反应的试剂,其中所述酶反应产生可显影的产物。

[0786] 本发明由以下的实施例所进一步例示,其不应被理解为对本发明的范围的限制。

实施例

[0787] 实施例1-HER2和HER2变体的表达构建体

[0788] 生成了用于表达全长HER2(1255aa,Swissprot P04626)的完全密码子优化的构建体、HER2的胞外域(ECD)(Her2-ECDHis,aa1-653带有C端His6标记)、天然存在的HER2的剪切变体(Her2-delex16,得自外显子16缺失且缺乏aa633-648)、以及HER2受体的截短形式(Her2-stumpy,aa648-1256)。所述构建体含有用于克隆的合适的限制性位点和最优的Kozak序列(Kozak,M.,Gene1999;234(2):187-208)。将该构建体克隆入哺乳动物表达载体pEE13.4(Lonza Biologics;Bebbington,C.R.,et al.,Biotechnology(N Y)1992;10(2):169-75)中,并完整测序以确认该构建体的正确性。

[0789] 实施例2-帕妥珠单抗、C1、和F5的表达构建体

[0790] 生成了用于在HEK细胞中表达IgG1抗体帕妥珠单抗，C1和F5的重链(HC)和轻链(LC)的完整密码子优化的构建体。这些构建体所编码的可变区是与那些在美国专利号6,949,245中为帕妥珠单抗重链和轻链而描述和在美国专利号7,244,826中为C1和F5重链和轻链而描述的那些是相同的。对于C1和F5，使用了分别含有人IgG1重链(同种异型f)、人kappa轻链或人lambda轻链的完全密码子优化的恒定区的哺乳动物载体p33G1f和p33K或p33L(pcDNA3.3(Invitrogen))。对于帕妥珠单抗，分别使用了含有完整密码子优化的人IgG1重链(同种异型f)和人kappa轻链的恒定区的哺乳动物表达载体pG1f(pEE12.4(Lonza Biologics)和pKappa(pEE6.4(Lonza Biologics)。

[0791] 曲妥珠单抗(Herceptin®)可以以相同的方式产生，使用在例如美国专利号7,632,924中描述的重链和轻链序列。

[0792] 将美国专利号6,949,245;7,244,826;和7,632,924的序列公开通过全文提述并入本文。

[0793] 实施例3-在HEK-293或CHO细胞中的瞬时表达

[0794] Freestyle™293-F(适应了悬浮生长和化学限定的Freestyle培养基的HEK-293的亚克隆，(HEK-293F))细胞是从Invitrogen获得的且使用293fectin(Invitrogen)根据生产商的指示以合适的质粒DNA转染。在抗体表达的情况中，将合适的重链和轻链表达载体共表达。

[0795] pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、和pEE13.4Her2-stumpy是使用Freestyle MAX转染试剂(Invitrogen)而转染进入Freestyle™ CHO-S(Invitrogen)细胞系中的。HER2和Her2-delex16的表达是通过如下所描述的FACS分析的方法而测试的。

[0796] 实施例4-在NSO中的稳定多克隆汇集表达

[0797] 通过nucleofection(Amaxa)将pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、和pEE13.4Her2-stumpy稳定转染进NSO细胞中。在谷氨酰胺依赖性生长上选择后，确立了稳定转染的细胞的汇集，所述选择基于整合的谷氨酰胺合成酶选择标志物(Barnes,L.M.等人，Cytotechnology2000;32(2):109-123)

[0798] 实施例5-带His标记的HER2的纯化

[0799] 将Her2ECDHis在HEK-293F细胞中表达。Her2ECDHis中的His标记使得能够用固定的金属亲和性层析进行纯化，因为带His标记的蛋白质强烈地结合树脂珠，而其它存在于培养物上清中的蛋白质不会强烈地结合。

[0800] 在这一过程中，将固定于所述层析珠上的螯合剂负载以Co^{2+}阳离子。将含有Her2ECDHis的上清在分批模式(即，溶液)中与树脂温育。在温育后，将珠从上清回收并装填进柱中。清洗柱以去除弱结合的蛋白质。然后将强烈结合的Her2ECDHis蛋白质以含有咪唑的缓冲液洗脱，所述咪唑与His对Co^{2+}的结合竞争。在脱盐柱上通过缓冲液交换将洗脱剂从蛋白质去除。

[0801] 实施例6-转基因小鼠的免疫接种步骤

[0802] 抗体001、019、021、025、027、032、033、035、036、049、050、051、054、055、084、091、094、098、100、105、123、和124源自以下的免疫接种：将三只雌性HCo12小鼠、一只雄性和两只雌性HCo12-Balb/C小鼠、一只雄性HCo17小鼠、和一只雄性HCo20小鼠(Medarex,San Jos

é,CA,美国)交替在腹膜内(intraperitoneal,IP)用5x10^{6}个稳定转染了Her2ECD的NS0细胞,和在尾基处皮下(subcutaneous,SC)用20μg与半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)偶联的Her2ECDHis蛋白质进行免疫接种,其中时间间隔为十四日。对每只小鼠进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次以细胞的免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中完成的。对于其它免疫接种,细胞是在PBS中IP注射,且KLH偶联的Her2ECDHis是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)SC注射的。

[0803] 抗体125、127、129、132、152、153和159源自以下免疫接种:将一只雄性和两只雌性HCo12-Balb/C小鼠、一只雌性HCo20小鼠、和一只雌性HCo12小鼠(Medarex)交替以IP用5x10^{6}个稳定转染了Her2delex16的NS0细胞,和在尾基处SC用20μg与半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)偶联的Her2ECDHis蛋白质进行免疫接种,其中时间间隔为十四日。对每只小鼠进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次以细胞的免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中完成的。对于所有其它免疫接种,细胞是在PBS中IP注射的,且KLH偶联的Her2ECD是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)SC注射的。

[0804] 抗体143、160、161、162、166、和169源自以下免疫接种:将一只雌性和一只雄性Hco12小鼠、一只雌性Hco12-Balb/C小鼠、一只雄性HCo17小鼠、和一只雄性HCo20小鼠(Medarex)用20μg偶联至半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)的Her2ECDHis蛋白质,交替地以IP和在尾基处SC进行交替免疫接种,其中时间间隔为十四日。对每只小鼠进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次以细胞的免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中IP完成的。其它免疫接种是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)注射的。

[0805] 抗体005、006、041、044、059、060、067、072、093、106、和111源自以下免疫接种步骤:将两只雌性HCo12小鼠、一只雌性和一只雄性HCo12-Balb/C小鼠、一只雌性和一只雄性HCo17小鼠、和两只雄性HCo20小鼠(Medarex,San José,CA,USA)在腹膜内(IP)用5x10^{6}个以Her2ECDHis稳定转染的NS0细胞,和在尾基处皮下(SC)的20μg偶联至半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)的Her2ECDHis蛋白质每两周进行免疫接种。对每只小鼠进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次以细胞的免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中完成的。对于所有其它免疫接种,细胞是在PBS中IP注射的,且KLH偶联的Her2ECD是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)SC注射的。

[0806] 抗体150源自对一只雌性HCo17小鼠(Medarex)的交替的免疫接种,所述免疫接种是以IP用Her2delex16稳定转染的5x10^{6}NS0细胞和在尾基处SC用20μg的偶联至半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)的Her2ECDHis蛋白质进行的,其时间间隔为十四日。进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次以细胞的免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中完成的。对于所有其它免疫接种,细胞是在PBS中IP注射的,且KLH偶联的Her2ECD是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)SC注射的。

[0807] 抗体163源自对一只雄性HCo20(Medarex)小鼠的免疫接种,所述免疫接种是用20μ

g偶联至半抗原Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH)的Her2ECDHis蛋白质交替地IP和在尾基处SC进行的,其中时间间隔为十四日。进行了最多八次免疫接种(四次IP和四次SC免疫接种)。第一次免疫接种是在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中IP完成的。其它免疫接种是使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)注射的。

[0808] 在抗原特异性的FMAT筛选测定法(如在实施例7中所描述)中具有针对TC1014-Her2、TC1014-Her2delex16、或TC1014-Her2stumpy的至少两个连续效价(sequential titers)的小鼠认为是阳性和融合的(fused)。

[0809] 实施例7-均质抗原特异性筛选测定法(Homogeneous antigen specific screening assay)

[0810] 通过均质抗原特异性筛选测定法(四象限(four quadrant))使用Fluorometric Micro volume Assay Technology(FMAT;Applied Biosystems,Foster City,CA,美国)测定了HER2抗体在免疫接种小鼠的血清中或在HuMab(人单克隆抗体)杂交瘤或转染瘤培养上清中的存在。对此,使用了4种基于细胞的测定法的组合。确定了与TC1014-Her2(瞬时表达HER2受体的CHO-S细胞,其如上所描述而产生)、TC1014-Her2delex16(瞬时表达Her2-delex(HER2受体的16氨基酸缺失的突变体)的胞外域的CHO-S细胞,其如上所描述而产生)、和TC1014-Her2stumpy(瞬时表达HER2受体胞外stumpy域的CHO-S细胞,其如上所描述而产生)以及CHO-S野生型细胞(不表达HER2的阴性对照)的结合。将样品添加至细胞以允许与HER2的结合。然后使用荧光缀合物(山羊抗人IgG-Cy5,Jackson ImmunoResearch)检测HuMab的结合。将TH1014-帕妥珠单抗(在HEK-293F细胞中产生)用作阳性对照,并将HuMab®小鼠汇集的血清和HuMab-KLH用作阴性对照。使用Applied Biosystems8200Cellular Detection System(8200CDS)扫描了样品,并将“计数x荧光(counts x fluorescence')”用作读取。当计数高于50且计数x荧光高至阴性对照至少三倍,则将样品认为是阳性。

[0811] 实施例8-生成HuMab杂交瘤

[0812] 将具有充足的抗原特异性效价发展的HuMab小鼠(如上所定义)处死,并收集脾以及腹部主动脉(abdominal aorta)和腔静脉(vena cava)侧翼的淋巴结。使用CEEF50Electrofusion System(Cyto Pulse Sciences,Glen Burnie,MD,美国)通过电融合(electrofusion)基本上根据生产商的指示完成脾细胞和淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞系的融合。接着,使用ClonePix系统(Genetix,Hampshire,UK)将原代孔(primary wells)亚克隆。为了这一目的,将特异性的原代孔杂交瘤接种在半固体培养基中,其是以40% CloneMedia(Genetix,Hampshire,英国)和60%HyQ2x Complete Media(Hyclone,Waltham,美国)制成的。在如实施例7所描述的抗原特异性结合测定法中重新测试亚克隆,并使用Octet(Fortebio,Menlo Park,美国)测量IgG水平以选择每个原代孔中的最具特异性和生产性最好的克隆以进一步扩展。进一步扩展和对所得的HuMab杂交瘤的培养是基于标准规程(例如,如在Coligan J.E.,Bierer,B.E.,Margulies,D.H.,Shevach,E.M.和Strober,W.,eds.Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,2006中所描述的)而完成的。将源自该过程的克隆命名为PC1014。

[0813] 实施例9-对纯化的抗体的质谱测定

[0814] 将来自6孔或Hyperflask阶段的含有抗体的上清的0.8mL的小等分试样在

Sciclone ALH3000workstation(Caliper Lifesciences,Hopkinton,美国)上使用含有蛋白G树脂(PhyNexus Inc.,San Jose,美国)的PhyTip柱纯化。根据生产商的指示使用PhyTip柱,但是将缓冲液替换为:结合缓冲液PBS(B.Braun,Medical B.V.,Oss,荷兰)、和洗脱缓冲液0.1M甘氨酸-HCl pH2.7(Fluka Riedel-de Haën,Buchs,德国)。在纯化之后,将样品以2M Tris-HCl,pH9.0(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,荷兰)中和。或者,在一些情况中,使用MabSelect SuRe柱(GE Health Care)纯化较大体积的培养物上清。

[0815] 在纯化后,将样品置于384孔板(Waters,100μl方孔板,part#186002631)中。将样品在37℃以N-糖苷酶F(Roche cat no11365177001)去糖基化过夜。添加(1μL/孔)DTT(15mg/mL)并在37℃温育1h。将样品(5或6μL)在60℃在具有BEH300C18,1.7μm,2.1x50mm柱的Acquity UPLC™(Waters,Milford,美国)上脱盐。将具有0.1%甲酸的MQ水和LC-MS等级的乙腈(Biosolve,cat no01204101,Valkenswaard,荷兰)分别用作Eluens A和B。飞行时间电喷射离子化质谱(Time-of-flight electrospray ionization mass spectra)在以正离子模式操作micrOTOF™质谱仪上(Bruker,Bremen,Germany)在线纪录。在分析之前,以ES调适混合物(tuning mix)(Agilent Technologies,Santa Clara,美国)校正了900-3000m/z范围。以DataAnalysis™软件v.3.4(Bruker)使用Maximal Entropy算法将质谱去卷积(deconvoluted)以搜索5和80kDa之间的分子量。

[0816] 在去卷积之后,将所得的所有样品的重链和轻链质量进行比较以寻找重复的抗体(duplicate antibodies)。有时这是由于存在额外的轻链,但是在比较重链时,也考虑了存在C端赖氨酸变体的可能性。这导致了一组独特的抗体,即,特定重链和轻链的独特的组合。在找到重复抗体的情况中,基于其它测试的结果选择一种独特的抗体。

[0817] 实施例10-对HER2抗体可变域的序列分析和将其克隆入表达载体中

[0818] 从5x10^{6}杂交瘤细胞制备HER2HuMab的总RNA,并使用SMART RACE cDNA Amplification kit(Clontech)根据生产商的指示从100ng总RNA制备5'-RACE互补DNA(5'-RACE-Complementary DNA)(cDNA)。通过PCR扩增VH和VL编码区,并将其通过连接不依赖性克隆(Aslanidis,C.and P.J.de Jong,Nucleic Acids Res1990;18(20):6069-74)直接地框内(in frame)克隆进pG1f和pKappa表达载体。将合适的重链和轻链载体使用293fectin在Freestyle™293-F细胞中瞬时共表达。将源自该过程的克隆命名为TH1014(TH代表瞬时HEK细胞(Transient HEK cells))。对于每种抗体,测序了16个VL克隆和8个VH克隆。选择具有与相同抗体的杂交瘤衍生材料的质量相符(如质谱法所确定的)的预测的重链和轻链质量的克隆以进一步研究和表达。

[0819] 将所得的序列示于图1和2,以及在序列表。还将选择的序列更详细地在下面描述。CDR序列是根据IMGT(Lefranc MP.等人,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999and Brochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508(2008))所定义的。表1、表2、和表3给出抗体序列信息或种系序列的概况,且表4显示共同序列。

[0820] 表1A和1B:HuMabs169、050、084、025、091、129、127、159、098、153、和132(表1A)以及HuMabs005、006、059、060、106、和111(表1B)的重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)和CDR序列。

[0821] 1A

[0822]

SEQ ID No:1	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIY AQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:2	VH 169, CDR1	GYTFTNYG
SEQ ID No:3	VH 169, CDR2	LSAYSGNT
SEQ ID No:4	VH 169, CDR3	ARDRIVVRPDYFDY

[0823]

SEQ ID No:5	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPR TFGQGTKVEIK
SEQ ID No:6	VL 169, CDR1	QSVSSY
	VL 169, CDR2	DAS
SEQ ID No:7	VL 169, CDR3	QQRSNWPRT
SEQ ID No:8	VH 050	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMNWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:9	VH 050, CDR1	GFTFSSYA
SEQ ID No:10	VH 050, CDR2	ISGRGGTT
SEQ ID No:11	VH 050, CDR3	AKARANWDYFDY
SEQ ID No:12	VL 050	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPIT FGQGTRLEIK
SEQ ID No:13	VL 050, CDR1	QGISSW
	VL 050, CDR2	AAS
SEQ ID No:14	VL 050, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No:15	VH 084	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRT YAINWVRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHA QKFQGRVTITADKSTNTAYMELNSLRSEDTA VYYCAREKGVDYYYGIEVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No:16	VH 084, CDR1	GGTFRTYA
SEQ ID No:17	VH 084, CDR2	INTVLGIV
SEQ ID No:18	VH 084, CDR3	AREKGVDYYYGIEV
SEQ ID No:19	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPL TFGGGTKVEIK
SEQ ID No:20	VL 084, CDR1	QGISSW
	VL 084, CDR2	VAS
SEQ ID No:21	VL 084, CDR3	QQANSFPLT

[0824]

SEQ ID No:22	VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSD YYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
SEQ ID No:23	VH 025, CDR1	GGSFSDYY
SEQ ID No:24	VH 025, CDR2	IHHSGST
SEQ ID No:25	VH 025, CDR3	ARGYYDSGVYYFDY
SEQ ID No:26	VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRW LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPIT FGQGTRLEIK
SEQ ID No:27	VL 025, CDR1	QGISRW
	VL 025, CDR2	AAS
SEQ ID No:28	VL 025, CDR3	QQYNSYPIT
SEQ ID No:29	VH 091	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSG YYWTWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLYSVTAADTAVY YCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:30	VH 091, CDR1	GGSFSGYY
SEQ ID No:163	VH 091, CDR2	IYHSGDT
SEQ ID No:31	VH 091, CDR3	ARLYFGSGIYYLDY
SEQ ID No:32	VL 091	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL VWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTF GQGTKVEIK
SEQ ID No:33	VL 091, CDR1	QGISSW
	VL 091, CDR2	AAS
SEQ ID No:34	VL 091, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID No:35	VH 129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTF AIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCARGLGVWGAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:36	VH 129, CDR1	GFTFSTFA
SEQ ID No:37	VH 129, CDR2	ISYDGGHK
SEQ ID No:38	VH 129, CDR3	ARGLGVWGAFDY

[0825]

SEQ ID No:39	VL 129	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWWT FGQGTKVEIK
SEQ ID No:40	VL 129, CDR1	QSVSSY
	VL 129, CDR2	DAS
SEQ ID No:41	VL 129, CDR3	QQRSNWWT
SEQ ID No:42	VH 127	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARQPGDWSPRHWYFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID No:43	VH 127, CDR1	GYSFSIYW
SEQ ID No:44	VH 127, CDR2	IFPGDSDI
SEQ ID No:45	VH 127, CDR3	ARQPGDWSPRHWYFDL
SEQ ID No:46	VL 127	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSY LAWYQQKPGKAPELLIYAASTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISYLQSEDFATYYCQQYYSFP LTFGGGTKVEIK
SEQ ID No:47	VL 127, CDR1	QGISSY
	VL 127, CDR2	AAS
SEQ ID No:48	VL 127, CDR3	QQYYSFPLT
SEQ ID No:49	VH 159	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARWGTYYDILTGYFNWFDPWGQGTLVTV SS
SEQ ID No:50	VH 159, CDR1	GYNFTSYW
SEQ ID No:51	VH 159, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No:52	VH 159, CDR3	ARWGTYYDILTGYFN
SEQ ID No:53	VL 159	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPWT FGQGTKVEIK
SEQ ID No:54	VL 159, CDR1	QGISSW
	VL 159, CDR2	AAS

[0826]

SEQ ID No:55	VL 159, CDR3	QQYYIYPWT
SEQ ID No:56	VH 098	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY GMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLWLQMNSLRAEDTAV YYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVS S
SEQ ID No:57	VH 098, CDR1	GFTFSNYG
SEQ ID No:58	VH 098, CDR2	ISGSAYST
SEQ ID No:59	VH 098, CDR3	AKAHYHGSGSYYTLFDY
SEQ ID No:60	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYT FGQGTKLEIK
SEQ ID No:61	VL 098, CDR1	QGISSW
	VL 098, CDR2	AAS
SEQ ID No:62	VL 098, CDR3	QQYNSYPYT
SEQ ID No:63	VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSD YVIHWVRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTA MYYCARGGITGTTGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:64	VH 153, CDR1	GFTFSDYV
SEQ ID No:65	VH 153, CDR2	ISYDGSNK
SEQ ID No:66	VH 153, CDR3	ARGGITGTTGVFDY
SEQ ID No:67	VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGS GYGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPITF GQGTRLEIK
SEQ ID No:68	VL 153, CDR1	QGISSW
	VL 153, CDR2	DAS
SEQ ID No:69	VL 153, CDR3	QQYKSYPIT
SEQ ID No:70	VH 132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNSNYV QKFQGRVTMTTDTTTSTAYMELRSLTSDDTA VYYCAREYSYDSGTYFYYGMDVWGQGTTV TVSS

[0827]

SEQ ID No:71	VH 132, CDR1	GYTFTSYG
SEQ ID No:72	VH 132, CDR2	ISAYNGNS
SEQ ID No:73	VH 132, CDR3	AREYSYDSGTYFYYGMDV
SEQ ID No:74	VL 132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPM YTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:75	VL 132, CDR1	QSVSSY
	VL 132, CDR2	DAS
SEQ ID No:76	VL 132, CDR3	QQRSNWPMYT

[0828] 1B：

[0829]

SEQ ID No: 165	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFY WIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDTRYRP SFQGQVTISADKSISTAYLQWTSLKASDTAIY YCARQRGDYYYFYGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 166	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID No: 167	VH 005, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No: 168	VH 005, CDR3	ARQRGDYYYFYGMDV
SEQ ID No: 169	VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LT FGGGTKVEIK
SEQ ID No: 170	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID No: 171	VL 005, CDR3	QQYGSSLT
SEQ ID No: 172	VH 006	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY ALIWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKARIWGPLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 173	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID No: 174	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID No: 175	VH 006, CDR3	AKARIWGPLFDY

[0830]

SEQ ID No: 176	VL 006	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP LTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 177	VL 006, CDR1	QSVSSY
	VL 006, CDR2	DAS
SEQ ID No: 178	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT
SEQ ID No: 179	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTR YGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 180	VH 059, CDR1	GYTFTRYG
SEQ ID No: 181	VH 059, CDR2	ISAYNGKT
SEQ ID No: 182	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY
SEQ ID No: 183	VL 059	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSLF TFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 184	VL 059, CDR1	QSVSSTY
	VL 059, CDR2	GAS
SEQ ID No: 185	VL 059, CDR3	QQYGTSLFT
SEQ ID No: 186	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSP SFQGQVTISADKSIATAYLQWNSLKASDTAM YYCARHAGDFYYFDGLDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 187	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW
SEQ ID No: 188	VH 060, CDR2	IYPGDSYT
SEQ ID No: 189	VH 060, CDR3	ARHAGDFYYFDGLDV
SEQ ID No: 190	VL 060	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPI TFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 191	VL 060, CDR1	QSVSSSY
	VL 060, CDR2	GAS
SEQ ID No: 192	VL 060, CDR3	QQYGSSPPIT

[0831]

SEQ ID No: 193	VH 106	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARLTGDRGFDYYSGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 194	VH 106, CDR1	GYSFTRYW
SEQ ID No: 195	VH 106, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No: 196	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFDYYSGMDV
SEQ ID No: 197	VL 106	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-FT FGPGTKVDIK
SEQ ID No: 198	VL 106, CDR1	QSVSSSY
	VL 106, CDR2	GAS
SEQ ID No: 199	VL 106, CDR3	QQYGSSFT
SEQ ID No: 200	VH 111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YGISWVRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQK FQGRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVY YCARDQEYSSNWYYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 201	VH 111, CDR1	GGTFSSYG
SEQ ID No: 202	VH 111, CDR2	IIPILGIA
SEQ ID No: 203	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWYY
SEQ ID No: 204	VL 111	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTF GPGTKVDIK
SEQ ID No: 205	VL 111, CDR1	QSVRSSY
	VL 111, CDR2	GAS
SEQ ID No: 206	VL 111, CDR3	QLYGSSPT

[0832] 表2:选择的HuMab的小鼠来源以及重链和轻链序列同源性

[0833]

HuMab:	小鼠:	品系:	种系VH:	种系VL:
169	361494	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
050	350633	HCo12	IgHV3-23-01	IgKV1-12-01
084	350615	HCo12-BalbC	IgHV1-69-04	IgKV1-12-01
025	350631	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01

[0834]

091	350630	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01

129	359783	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV3-11-01
127	359783	HCo12-BalbC	IgHV5-51-01	IgKV1D-8-01
159	363503	HCo12	IgHV5-51-01	IgKV1D-16-01
098	350659	HCo17	IgHV3-23-01	IgKV1D-16-01
153	359785	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV1D-16-01
132	361487	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
005	350611	HCo12-BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12-BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

[0835] 表3A和3B:HuMabs049、051、055、123、161、124、001、143、019、021、027、032、035、036、054、094(3A)以及HuMabs041、150、067、072、163、093、和044(3B)的重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)序列。对于VH和VL序列,相应的CDR分别对应于在图1和2中以下划线标示的那些。

[0836] 3A:

[0837]

SEQ ID No: 77	VH 049	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRDN SKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 78	VL 049	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ HKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 79	VH 051	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRDN SKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 80	VL 051	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ HKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK

[0838]

SEQ ID No: 81	VH 055	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRD NSKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 82	VL 055	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ HKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 83	VH 123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISW VRQAPGQALEWMGWITTYSSNTIYAQKLQGRVTMTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 84	VL 123	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSHWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 85	VH 161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISW VRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMT TDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 86	VL 161	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 87	VH 124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISW VRQAPGQGLEWMGWIITYNGNTIYAQRFQDRVTMTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFD YWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 88	VL 124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 89	VH 001	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWN WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGSGYYYFDL WGRGTQVTVSS
SEQ ID No: 90	VL 001	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYISFPITFGQGTRLEIK

[0839]

SEQ ID No: 91	VH 143	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWN WIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSANYNPSLMSRVTISVDT SKNQFSLQLSSVTAADTAVYYCARGYYGSGYYYFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 92	VL 143	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 93	VH 019	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWN WIRQPPGKGLEWIGEIHHVGSTNYNPSLKSRVTISVDT SKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDY WAQGTLVTVSS
SEQ ID No: 94	VL 019	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 95	VH 021	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWN WIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYASGVYYFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 96	VL 021	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 97	VH 027	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNW IRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLNLSSVTAADTAVYYCARGLIGSGYYYFDYWD QGTLVTVSS
SEQ ID No: 98	VL 027	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 99	VH 032	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWG QGTLVTVSS
SEQ ID No: 100	VL 032	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK

[0840]

SEQ ID No: 101	VH 035	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWI RQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWG QGTLVTVSS
SEQ ID No: 102	VL 035	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 103	VH 036	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYYGSGTYYFDYWG QGTLVTVSS
SEQ ID No: 104	VL 036	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 105	VH 054	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLWYGSGSYYFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 106	VL 054	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 107	VH 094	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTW IRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 108	VL 094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 109	VH 105	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYY TLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 110	VL 105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK

[0841]

SEQ ID No: 111	VH 100	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMNW VRQAPGKGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYYT LFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 112	VL 100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 113	VH 125	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNW VRQAPGKGLEWVSTISGSGYATYYADSVKGRFTISRD NSKTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYYT LFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 114	VL 125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 115	VH 162	EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSW VRQAPGKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYYHGSGSYY TSFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 116	VL 162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 117	VH 033	QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHW VRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYISSSGVF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 118	VL 033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 119	VH 160	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHW VRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTMYLQMNSLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 120	VL 160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK

[0842]

SEQ ID No: 121	VH 166	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNEYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 122	VL 166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQ QKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 123	VH 152	QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 124	VL 152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPENFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 125	VH 167	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWV RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFD YWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 126	VL 167	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQ QKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK

[0843] 3B：

[0844]

SEQ ID No: 207	VH 041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGDFYYFFGLD VWGQGTAITVSS
SEQ ID No: 208	VL 041	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 209	VH 150	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGDYYYYNGM DVWGQGTTVTVSS

[0845]

SEQ ID No: 210	VL 150	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 211	VH 067	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISVDK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGDYYYHYGLD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 212	VL 067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 213	VH 072	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGDYYYFNGLD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 214	VL 072	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 215	VH 163	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSGYRFISYWIGWV RQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISVDK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQRGDYYYFNGLD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 216	VL 163	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 217	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SITTAYLQWSSLRASDTAMYYCARQRGDYYYFFGLDI WGQGTTVTVSL
SEQ ID No: 218	VL 093	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 219	VH 044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWV RQMPGKGLEWMGSIFPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGDYYYYNGM DVWGQGTTVTVSS

[0846]

SEQ ID No: 220	VL 044	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK

[0847] 表4:基于在表1和2中所示的序列比对的共同CDR

[0848]

SEQ ID No: 9 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSSYA	
SEQ ID No: 127 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR2	ISGX1GGX2T	其中X1=R或S,和X2=T或S;优选地,其中X1=R和X2=T
SEQ ID No: 11 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKARANWD YFDY	
SEQ ID No: 128 084	IgHV1-69-04	VH CDR1	GGTFX1X2YA	其中X1=R或S,和X2=T或S;优选地,其中X1=R和X2=T
SEQ ID No: 129 084	IgHV1-69-04	VH CDR2	IX1X2X3LGIX 4	其中X1=N或I, X2=T或P, X3=V或I,和X4=V或A,优选地,其中X1=N, X2=T, X3=V,和X4=V
SEQ ID No: 130 084	IgHV1-69-04	VH CDR3	AREKGVDYY YGX1X2	其中X1=I或M, X2=E或D;优选地,其中X1=I, X2=E
SEQ ID No: 131 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	其中X=N或S,优选地 N
SEQ ID No: 132 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR2	IX1X2YX3GN T	其中X1=S, T或I; X2=A或T; X3=S或N;优选地,其中X1=S, X2=A,和X3=S
SEQ ID No: 133 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARDRX1X2V RPDYFDY	其中X1=I或V, X2=V或I;优选地,其中X1=I和X2=V
SEQ ID No: 134 025-001-143-019 -021-027	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSFSX1YX2	其中X1=D或G和X2=Y或F;优选地,其中X1=D和X2=Y
SEQ ID No: 135 025-001-143-019 -021-027	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HX2GSX3	其中X1=H或N, X2=S或V,和X3=T或A;优选地,其中X1=H, X2=S,和X3=T

[0849]

SEQ ID No:136 025-001-143-019 -021-027	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARGX1X2X3S GX4YYFDX5	其中X1=Y, N或L; X2=Y或I, X3=D, G或A; X4=V或Y;和X5=Y或L; 优选地, 其中X1=Y, X2=Y, X3=D, X4=V, 和X5=Y
SEQ ID No:137 091-032-035-036 -054-094	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSFSX1YY	其中X1=G或D, 优选地 G
SEQ ID No:138 091-032-035-036 -054-094	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HSGX2T	其中X1=Y, N或H;和X2=D或S; 优选地, 其中X1=Y和X2=D
SEQ ID No:139 091-032-035-036 -054-094	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARLX1X2GSG X3YYX4DY	其中X1=Y, F或W; X2=F或Y; X3=I, T或S;和X4=L或F; 优选地, 其中X1=Y, X2=F, X3=I,和X4=L
SEQ ID No:140 129	IgHV3-30-01	VH CDR1	GFTFSX1X2A	其中X1=T或F, X2=F或Y; 优选地, 其中X1=T和X2=F
SEQ ID No:141 129	IgHV3-30-01	VH CDR2	ISYDGX1X2K	其中X1=G或S, X2=H或N; 优选地, 其中X1=G和X2=H
SEQ ID No:142 129	IgHV3-30-01	VH CDR3	ARGLGVWGX 1FDY	其中X1=A或Y, 优选地 A
SEQ ID No:143 098-105-100-125 -162	IgHV3-23-01	VH CDR1	GFTFX1X2YX 3	其中X1=S, N或T; X2=N, D或S;和X3=G或A; 优选地, 其中X1=S, X2=N和X3=G
SEQ ID No:144 098-105-100-125 -162	IgHV3-23-01	VH CDR2	ISGX1X2X3X4 T	其中X1=S或T, X2=A或G, X3=Y或G, X4=S或A; 优选地, 其中X1=S, X2=A, X3=Y, X4=S
SEQ ID No:145 098-105-100-125 -162	IgHV3-23-01	VH CDR3	AKX1X2X3X4 GSGSYYTX5F DY	其中X1=A或G; X2=H或Y; X3=Y或T; X4=H, F或L; X5=L或S; 优选地, 其中X1=A; X2=H; X3=Y; X4=H; X5=L
SEQ ID No:146 127	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYSFX1X2Y W	其中X1=S或T, X2=I或S; 优选地, 其中X1=S, X2=I

[0850]

SEQ ID No:147 127	IgHV5-51-01	VH CDR2	IX1PGDSDX2	其中X1=F或Y, X2=I或T; 优选地, 其中X1=F, X2=I
SEQ ID No:148 127	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARQPGDWSP RHWYFDL	
SEQ ID No:149 159	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYXFTSYW	其中X=N或S, 优选地 N
SEQ ID No:51 159	IgHV5-51-01	VH CDR2	IYPGDSDT	
SEQ ID No:52 159	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARWGTYYDI LTGYFN	
SEQ ID No:71 132	IgHV1-18-01	VH CDR1	GYTFTSYG	
SEQ ID No:150 132	IgHV1-18-01	VH CDR2	ISAYNGNX	其中X=S或T, 优选地 S
SEQ ID No:151 132	IgHV1-18-01	VH CDR3	AREYSYDSG TYFYYGMDV	
SEQ ID No:152 153-033-160-166 -152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR1	GFTFSX1X2X 3	其中X1=D或S, X2=Y或H, X3=V或A; 优选地, 其中X1=D, X2=Y, X3=V
SEQ ID No:153 153-033-160-166 -152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR2	ISYDGSX1X2	其中X1=N或Y, X2=K或E, 优选地其中X1=N和X2=K
SEQ ID No:154 153-033-160-166 -152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR3	ARGX1X2X3X 4X5X6GX7FD Y	其中X1=G, D或S; X2=I或Y; X3=T或I; X4=G或S; X5=T或S; X6=T或S; X7=Y或V; 优选地, 其中X1=G; X2=I; X3=T; X4=G; X5=T; X6=T;和X7=V
SEQ ID No:13 050-084-049-051 -055	IgKV1-12-01	VL CDR1	QGISSW	
050-084-049-051 -055	IgKV1-12-01	VL CDR2	XAS	其中X=A或V
SEQ ID No:155 050-084-049-051 -055	IgKV1-12-01	VL CDR3	QQANSFPXT	其中X=I或L

[0851]

SEQ ID No:6 169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR2	DXS	其中X=A或T，优选地 A
SEQ ID No:156 169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSXWPRT	其中X=N或H，优选地 N
SEQ ID No:157 025-001-019-143 -021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGISXW	其中X=R或S，优选地 R
025-001-019-143 -021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:164 025-001-019-143 -021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSXPIT	其中X=Y或F，优选地 Y
SEQ ID No:33 091-032-035-036 -054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGISSW	
091-032-035-036 -054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AX1X2	其中X1=A或T,和X2=S或F;优选地，其中X1=A和X2=S
SEQ ID No:158 091-032-035-036 -054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSFPPT	
SEQ ID No:159 098-100-105-125 -162	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIXSW	其中X=S或N，优选地 S
098-100-105-125 -162	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:160 098-100-105-125 -162	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSYPXT	其中X=Y或L，优选地 Y
SEQ ID No:161 153-152-166-167 -160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIX1X2W	其中X1=S或N；X2=S或N；优选地，其中X1=X2=S
153-152-166-167 -160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR2	XAS	其中X=D或A，优选地 D

[0852]

SEQ ID No:162 153-152-166-167 -160-033	IgKV1D-16-0 1	VL CDR3	QQYXSYPIT	其中X=K或N, 优选地 K
SEQ ID No: 221 005-060-106-041 -150-067-072-16 3-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR1	GYX1FX2X3Y W	其中X1=S或R; X2=S, T, H或I;和X3=S, R或F; 优选地, 其中X2=H或T
SEQ ID No: 222 005-060-106-041 -150-067-072-16 3-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR2	IX1PGDSX2T	其中X1=Y或F; X2=D, Y或H 优选地, 其中X2=D或Y
SEQ ID No: 223 005-060-106-041 -150-067-072-16 3-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR3	ARX1X2X3X4 X5X6X7X8YX 9X10GX11DX 12	其中X1=Q, H或L; X2= R, A, T或K; X3=G; X4=D; X5=R或没有; X6=G或没有; X7=Y或F; X8=Y或D; X9=Y, F或H; X10=Y, D, S, F或N; X11=M或L;和X12=V或I; 优选地, 其中X1=Q, X2= R或A; X5=X6=没有; X7=Y或F; X8=Y; X9=F; X10=Y; 和X12=V
SEQ ID No: 224 006	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSXYA	其中X=N或S, 优选地 N
SEQ ID No: 225 006	IgHV3-23-1	VH CDR2	IX1GX2X3GS T	其中X1=R或S; X2=G或S;和X3=A 或 G, 优选地 其中X1=R; X2=G;和X3=A
SEQ ID No: 226 006	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKRIWGPXF DY	其中X=L或Y, 优选地 L
SEQ ID No: 227 059	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	其中X=R或S, 优选地 R
SEQ ID No: 228 059	IgHV1-18-1	VH CDR2	ISAYNGXT	其中X=K或N, 优选地 K
SEQ ID No: 229 059	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARSPLLWFEE LYFDY	

[0853]

SEQ ID No:230 111	IgHV1-69-4	VH CDR1	GGTFSSYX	其中X=G或A，优选地 G
SEQ ID No: 202 111	IgHV1-69-4	VH CDR2	IIPILGIA	
SEQ ID No: 231 111	IgHV1-69-4	VH CDR3	ARDQEYSSX1X2X3	其中X1=N或Y; X2=W或F;和X3=Y 或 D，优选地 其中X1=N; X2=W;和X3=Y
SEQ ID No: 232 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR1	QSVX1SX2Y	其中X1=S或R和X2=S或T
005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR2	GAS	
SEQ ID No: 233 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR3	QX1YGX2SX3X4X5T	其中X1=Q或L; X2=S或T; X3=P或没有; X4=P, L, R或没有;和X5=L, F, I或没有; 优选地，其中X4=P, L或没有
SEQ ID No: 177 006	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
006	IgKV3-11-01	VL CDR2	DAS	
SEQ ID No: 178 006	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSNWPPLT	

[0854] 实施例11-纯化抗体

[0855] 将培养物上清经过0.2μm死端式滤器(dead-end filters)过滤，加载于5mL MabSelect SuRe柱(GE Health Care)，并以0.1M柠檬酸钠-NaOH,pH3洗脱。立即将洗脱物以2M Tris-HCl,pH9中和，并过夜透析至12.6mM NaH_2PO_4,140mM NaCl,pH7.4(B.Braun)。或者，在纯化后，将洗脱物加载至HiPrep Desalting柱并将抗体交换入12.6mM NaH_2PO_4,140mM NaCl,pH7.4(B.Braun)缓冲液。在透析或缓冲液交换后，将样品通过0.2μm死端式滤器灭菌过滤。通过SDS-PAGE确定纯度，并通过浊度法(nephelometry)和在280nm处的吸光度测量浓度。将纯化的抗体储藏在4℃。进行了质谱法以鉴定由如实施例9所描述的杂交瘤所表达的抗体重链和轻链的分子量。

[0856] 实施例12-通过FACS分析手段测量HER2克隆与表达膜结合HER2的肿瘤细胞的结合

[0857] HER2抗体与AU565细胞(购买于ATCC,CRL-2351)和A431细胞(购买于ATCC,CRL-1555)的结合是使用流式细胞计量术(FACS Canto II,BD Biosciences)而测试的。Qifi分析(Dako,Glostrup,Denmark)揭示了AU565细胞平均每细胞表达1,000,000个拷贝的HER2蛋白质,而A431细胞平均每细胞表达15,000个拷贝。使用藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG抗体(Jackson)检测了HER2抗体的结合。使用了曲妥珠单抗(临床等级的Herceptin®)作为阳性对照抗体,并使用了同种型对照抗体作为阴性对照抗体。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software,San Diego,CA,美国)通过非线性回归的手段(具有可变斜率的S形剂量响应)测定了EC_{50}值。

[0858] 所有测试的HER2抗体都以剂量依赖性的方式结合表达在AU565和A431细胞两者上的HER2。对于交叉阻断组1、2、和3的抗体,结合的EC_{50}值在对AU565细胞0.336-2.290μg/mL,而对A431细胞为0.068-1.135μg/mL之间变化(图3A-D)。对于交叉阻断组4的抗体,结合的EC_{50}值对于AU565细胞在0.304-2.678μg/mL之间变化且对于A431细胞在0.106-1.982μg/mL之间变化(图3E和F)。尤其是对A431,观察到了测试抗体之间的较大的EC_{50}值的差别。然而,抗体098具有最好的(即,最低的)对于两种类型的细胞的EC_{50}值。而且,对于AU565和A431细胞两者,也观察到了不同抗体之间的最大结合水平的一些差别。在测试的交叉阻断组1-3抗体中,抗体098还具有对AU565细胞的最高的最大结合水平,而抗体025则对A431细胞具有最高的最大结合水平。对于交叉阻断组4的抗体,抗体005和006展示了相比于其它HER2抗体的更高的对A431的最大结合水平。

[0859] 实施例12-通过FACS分析手段测量HER2抗体与在恒河猴上皮细胞上表达的膜结合HER2的结合

[0860] 为确定与恒河猴HER2的交叉反应性,使用流式细胞计量术(FACS Canto II,BD Biosciences)检测HER2与HER2阳性恒河猴上皮细胞(4MBr-5,购买于ATCC)的结合。使用了藻红蛋白缀合的山羊抗人IgG抗体(Jackson)作为第二缀合物。使用了同种型对照抗体作为阴性对照抗体。

[0861] 所有测试的HER2抗体都与恒河猴HER2交叉反应(图4A和B)。在两个测试浓度(1μg/mL和10μg/mL),HER2抗体都能够特异性地与恒河猴HER2结合。抗体127在1μg/mL浓度展示了较差的结合,但是在10μg/mL浓度显示了较好的结合。抗体098在两种浓度均具有最高的结合水平。没有观察到与同种型对照抗体的结合。

[0862] 实施例14-在夹心ELISA中测量的HER2抗体对与可溶性Her2ECDHis结合的竞争

[0863] 所测试的HER2抗体的最优涂覆浓度和最优Her2ECDHis浓度是用以下的方式确定的:将ELISA孔在4℃以在PBS中系列稀释的HER2HuMab(以2倍稀释的0.125-8μg/mL)涂覆过夜。接着,将ELISA孔以PBST(补充以0.05%Tween-20[Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,荷兰]的PBS)清洗,并在室温(RT)以PBSTC(补充以2%[v/v]鸡血清[Gibco,Paisley,Scotland]的PBST)封闭一小时。然后将ELISA孔以PBST清洗并在RT与以PBSTC系列稀释的Her2ECDHis(以2倍稀释的0.25-2μg/mL)温育一小时。将未结合的Her2ECDHis以PBST洗去,并将结合的Her2ECDHis在RT与生物素化(biotinylated)的兔抗6xhis-biot(Abcam,Cambridge,英国)温育一小时。其后将板以PBST清洗并以在PBST中稀释的0.1μg/mL Streptavidin-poly-HRP(Sanquin,Amsterdam,荷兰)温育一小时。在清洗后,通过在室温避光与2,2'-联氮-二(3-乙

基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))(ABTS:将一片ABTS稀释于50mLABTS缓冲液中(Roche Diagnostics,Almere,荷兰))温育15分钟而显影反应。通过添加相同体积的草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,荷兰)而停止颜色产生。在Mmicrotiter Plate Reader(Biotek Instruments,Winooski,美国)上测量在405nm处的荧光。确定导致每种抗体的亚适结合(sub-optimal binding)的抗体浓度并用于之后的交叉阻断实验。

[0864] 将每种HER2抗体以如上面所描述而确定的亚适剂量涂覆于ELISA孔。在封闭ELISA孔后,在存在或不存在过量的第二(竞争者)HER2抗体的情况下将孔与预定浓度的1μg/mL的生物素化的Her2ECDHis温育。然后如以上所描述的进行ELISA。Her2ECDHis与涂覆抗体的残留结合表示为相对于在不存在竞争者抗体时观察到的结合的百分数。然后将百分数竞争决定为100减去抑制的百分数。75%竞争视为完全交叉阻断,而25-74%竞争视为部分交叉阻断,且0-24%竞争视为不阻断。

[0865] 交叉阻断组1、2、和3:

[0866] 如在表5A中所示,所有这些组中的HER2抗体都被发现能够至少部分地阻断自身与Her2ECDHis的结合。在将抗体分为3个主要交叉阻断组后,测试所有抗体与来自每个组的至少一种有代表性的抗体的竞争。

[0867] 第一组包括曲妥珠单抗和抗体169、050、和084,其相互阻断与Her2ECDHis的结合,但是不交叉阻断来自其它组的抗体。

[0868] 第二组包括帕妥珠单抗和抗体025、091、和129,其相互阻断与Her2ECDHis的结合,但抗体129和091例外,它们都交叉阻断帕妥珠单抗和025,但不相互交叉阻断。组2的抗体都不阻断来自其它组的抗体。

[0869] 第三组包括抗体C1、F5、127、098、132、153、和159,其不交叉阻断来自其它组的任何抗体。在该组3中观察到了一些差异。抗体127是唯一能够交叉阻断该组中其它所有抗体与Her2ECDHis结合的抗体;抗体159交叉阻断该组中所有其它的抗体,除了132;克隆098交叉阻断所有组3的抗体,除了132和153;抗体153交叉阻断127、132、和159与Her2ECDHis的结合,但不阻断098、C1、或F5;克隆132交叉阻断127、132、和153。当作为竞争者抗体添加时,F5和C1仅显出对彼此的交叉阻断。然而,反向反应还揭示了与抗体127、098、和159,但非153、132的竞争。这些差异可能是抗体C1和F5与Her2ECDHis较低的亲和力所导致的。

[0870] 高于100%的值可以解释为亲合效应(avidity effects)和含有两种非竞争性抗体的抗体-Her2ECDHis复合体的形成。

[0871] 交叉阻断组4:

[0872] 如在表5中所示,该组的所有HER2抗体都至少部分地竞争自身与Her2ECDHis的结合。曲妥珠单抗(临床等级Herceptin®)和帕妥珠单抗(TH1014-pert,在HEK-293细胞中瞬时产生)仅可以与自身竞争,而不与任何其它交叉阻断组4所列出的HER2抗体竞争。C1和F5(两者都是在HEK-293细胞中瞬时产生)彼此竞争与Her2ECDHis的结合,但不与交叉阻断组4的其它HER2抗体竞争。

[0873] 抗体005、006、059、060、106、和111都与彼此竞争与Her2ECDHis的结合,但不与曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、C1、或F5交叉阻断。克隆005、059、060、和106仅当006为竞争者抗体时才阻断006。在将006固定的反向反应中,没有发现005、059、060、和106的阻断。这可能是

克隆006相比005,059,060,106和111更高的表见亲和力的结果,如在图3A和3B中所示。高于100%的值可以解释为亲合效应以及含有两种非阻断抗体的抗体-Her2ECDHis复合体的形成。

[0874] 图5:HER2抗体与Her2ECDHis结合的竞争和交叉阻断

[0875] 5A:

[0876]

固定的 mAb ↓	竞争mAb →														
	曲妥	**169**	**050**	**084**	**pert**	**025**	**091**	**129**	**C1**	**F5**	**127**	**159**	**098**	**153**	**132**
曲妥珠单抗	6	15	6	51	100	107	100	85	103	99	115	90	101	101	101
TH1014-169	19	45	21	73	101	98	105	106	ND	ND	ND	ND	105	102	ND
TH1014-050	13	30	12	74	95	104	98	110	ND	ND	ND	ND	102	104	ND
TH1014-084	74	73	76	20	101	106	104	104	ND	ND	ND	ND	109	98	ND
TH1014- 帕妥珠	104	100	94	95	9	20	19	39	106	125	116	81	103	100	109
TH1014-025	98	98	100	104	8	18	21	15	ND	ND	ND	ND	102	99	ND
TH1014-091	99	99	95	100	5	13	15	78	ND	ND	ND	ND	98	98	ND
TH1014-129	93	99	97	92	22	55	76	12	ND	ND	ND	ND	106	98	ND
TH1014-C1	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	58	73	53	58	77	90
TH1014-F5	197	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	21	62	15	16	80	125
TH1014-127	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	112	88	11	8	58	21	44
TH1014-159	111	ND	ND	ND	112	ND	ND	ND	96	86	15	6	11	40	79
TH1014-098	107	102	100	103	104	108	104	107	125	96	21	9	17	110	142
TH1014-153	134	111	103	107	121	97	102	106	257	96	27	23	115	28	33
TH1014-132	353	ND	ND	ND	288	ND	ND	ND	422	379	30	131	309	41	32
交叉阻断组	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**2**	**2b**	**3a**	**3a**	**3a**	**3a**	**3a**	**3b**	**3b**

[0877] 5B:

[0878]

	竞争mAb: →									
固定的mAb ↓	**曲妥**	**帕妥珠**	**C1**	**F5**	**106**	**111**	**005**	**006**	**059**	**060**
曲妥珠单抗	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-帕妥珠	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	30	6	14	19
交叉阻断组	**1**	**2**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**

[0879]

75 – >100%竞争

25 – 74%竞争

0 – 24%竞争

[0880] 所描绘的值是两组独立的实验的平均结合百分数，其为相对于在不存在竞争者抗体的情况下所观察到的结合。进行了一次以HEK产生的TH1014-C1和TH1014-F5的竞争实验。还测试了曲妥珠单抗(临床等级的Herceptin®)和HEK产生的帕妥珠单抗(TH1014-帕妥珠(TH1014-pert))。

[0881] 实施例15-抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0882] 将SK-BR-3细胞(购买于ATCC，HTB-30)收获($5x10^6$细胞)，清洗(在PBS中两次，1500rpm，5min)并收集在补充以10%Cosmic Calf Serum(CCS)(HyClone，Logan，UT，美国)的1mL RPMI1640培养基中，并向其添加200μCi ^{51}Cr(铬-51；Amersham Biosciences Europe GmbH，Roosendaal，荷兰)。将混合物在37℃振荡水浴中温育1.5小时。在清洗细胞(在PBS中两次，5min)之后，将细胞重悬于补充以10%CCS的RPMI1640培养基中，通过台盼蓝排除法(trypan blue exclusion)计数并稀释至$1x10^5$细胞/mL的浓度。

[0883] 同时，将外周血单核细胞(PBMC)从新鲜血液棕黄层(buffy coat)(Sanquin，Amsterdam，荷兰)使用标准Ficoll密度离心(Ficoll density centrifugation)根据生产商的指示(淋巴细胞分离培养基(lymphocyte separation medium)；Lonza，Verviers，法国)分离。在将细胞重悬于补充以10%CCS的RPMI1640培养基之后，通过台盼蓝排除法计数并稀释至$1x10^7$细胞/mL的浓度。

[0884] 将曲妥珠单抗在CHO细胞中产生，其导致了(提高的)12.4%的非核心岩藻糖基化等级，而其它HER2抗体是在HEK细胞中产生的，导致了平均为4%的非核心岩藻糖基化。

[0885] 对于ADCC实验，将50μL ^{51}Cr-标记的SK-BR-3细胞(5,000细胞)与15μg/mL HER2抗体

(IgG1,κ)在96孔板中在总体积为100μL的补充了10%CCS的RPMI培养基中预温育。在RT15分钟后,添加了50μL PBMC(500,000细胞),导致了100:1的效应物与靶物的比值。通过将50μL^{51}Cr-标记的SK-BR-3细胞(5,000细胞)与100μL5%Triton-X100温育而确定了细胞裂解的最大量。通过将5000^{51}Cr-标记的SK-BR-3细胞在没有任何抗体或效应物细胞的150μL培养基中温育而确定了自发裂解的量。通过将5,000SK-BR-3细胞与没有抗体的500,000PBMC温育而确定了抗体非依赖性细胞裂解的水平。接下来,将细胞在37℃,5%CO_2温育4小时。为了确定细胞裂解的量,将细胞离心(1,200rpm,3min)并将75μ上清转移至micronic试管,之后使用gamma计数器对释放的^{51}Cr计数。将测量的每分钟计数(counts per minute,cpm)用于如下所述计算抗体介导的裂解的百分数:

[0886] (cpm样品-cpm抗体非依赖性裂解)/(cpm最大裂解-cpm自发裂解)x100%

[0887] 来自交叉阻断组1和2的HER2抗体通过ADCC诱导了有效的SK-BR-3细胞裂解(图5A)。在来自组3的抗体中,抗体153是唯一诱导有效的ADCC的抗体,抗体132诱导了大约10%ADCC,而克隆098、159、和127不诱导ADCC。见图5。所有来自交叉阻断组4的HER2抗体都通过ADCC诱导了有效的SK-BR-3细胞裂解(图5B)。交叉阻断组4的不同抗体的平均百分数裂解在15%和28%之间变动,这与曲妥珠单抗(Herceptin®)形成了对比,其显示了平均41%的裂解。不拘于理论,曲妥珠单抗所致的更高的百分数裂解可能来自由于CHO产生所造成提高的非核心岩藻糖基化等级(12.4%)(相比于其它HEK产生的HER2抗体的～4%非核心岩藻糖基化),或是通过识别诱导更少HER2受体-抗体复合体的内化的表位。

[0888] 实施例16-对AU565细胞的配体非依赖性增殖的抑制

[0889] 测试了HER2抗体体外抑制AU565细胞增殖的能力。由于在AU565细胞上较高的HER2表达水平(如在实施例12中所描述的每细胞～1,000,000个拷贝),HER2在这些细胞中是组成性活性的,且因此不依赖配体诱导的异二聚化。

[0890] 在96孔组织培养板(Greiner bio-one,Frickenhausen,德国)中,在存在10μg/mL HER2抗体的情况下,将每孔9,000个AU565细胞接种在无血清细胞培养基中。作为对照,将细胞接种在没有抗体的无血清培养基中。在3日后,根据生产商的指示用Alamarblue(BioSource International,San Francisco,美国)将存活细胞的量计数。以标准Alamarblue设置使用EnVision2101Multilabel Reader(PerkinElmer,Turku,芬兰)监测荧光。将抗体处理的细胞的Alamarblue信号作为相对于未处理细胞的百分数而绘制。应用了Dunnett校验进行统计分析。

[0891] 将HER2抗体处理后的AU565细胞的百分数增殖与未处理细胞比较,其中将未处理细胞设为100%。在所测试的组1抗体中,曲妥珠单抗、050和169展示了对AU565细胞增殖的显著抑制($P<0.05$),而084则没有效果。来自组2的测试抗体(帕妥珠单抗、025、092、和129)无一能够抑制AU565细胞增殖。来自组3的测试抗体(098、153)不抑制AU565增殖。与之相对,两种抗体都诱导了AU565细胞相比于未处理细胞的增强的增殖(098多于153)。见图6。对于曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,这与Juntilla等人(Cancer Cell2009;15(5):353-355)所描述的结果相符合。

[0892] 来自交叉阻断组4的TH1014-F5显著地增强了AU565细胞的增殖,指示了其为激动性抗体(agonistic antibody),而其它所测试的交叉阻断组4的抗体(005、060、和帕妥珠单抗)无一对AU565增殖有实质的效果(数据不显示)。增强增殖在ADC-缀合物的一些治疗应用

中可以是有利的，例如，当药物的细胞毒性作用依赖于细胞增殖或是被其增强时。

[0893] 实施例17-对MCF-7细胞的配体诱导的增殖的抑制

[0894] 因为HER2是孤儿受体(orphan receptor)，其信号传导主要依赖于其它ErbB家族成员，如EGFR和Her3的激活。在配体结合后，这两种受体可以结合并激活HER2受体，而导致例如增殖。多份公开文献描述帕妥珠单抗有效地抑制Heregulin-β1诱导的增殖(Franklin MC.Cancer Cell2004/Landgraf R.BCR2007)。对于曲妥珠单抗，已经描述了其对Heregulin-β1诱导的HER2/HER3异二聚化和增殖几乎无效果(Larsen SS.等人.,Breast Cancer Res Treat2000;58:41-56;Agus DB.等人,Cancer Cell2002;2:127-137;Wehrman等人(2006),同上)。

[0895] 为了调查本发明的人HER2抗体干扰Heregulin-β1诱导的HER2/HER3异二聚体的能力，进行了Heregulin-β1诱导的增殖测定法。因而，将每细胞表达～20,000HER2分子的MCF7细胞(购买于ATCC,HTB-22)接种在96孔组织培养板(Greiner bio-one)中(2,500细胞/孔)的完整细胞培养基中。4小时后，将细胞培养基替换为饥饿培养基，其含有1%Cosmic Calf Serum(CCS)和10μg/mLHER2抗体。接下来，将在含有1%CCS的饥饿培养基中稀释的Heregulin-β1(PeproTech,Princeton Business Park,美国)添加至孔直至1.5ng/mL终浓度。4日温育之后，根据生产商的指示以Alamarblue(BioSource International)将存活细胞的量定量。使用以标准Alamarblue设置的EnVision2101Multilabel Reader(PerkinElmer)监控荧光。将HER2抗体处理的配体诱导的细胞的Alamarblue信号作为相比没有HER2抗体而温育的配体诱导的细胞的百分数信号而绘制。应用了Dunnett校验进行统计分析。

[0896] 计算了以Heregulin-β1刺激和以所指示的HER2抗体处理的存活MCF7细胞相比于在不存在HER2抗体的情况下以Heregulin-β1刺激后的存活细胞的百分数。在Heregulin-β1和抗体二者都不存在的情况下没有MCF-7增殖。抗体025、091、129、153和帕妥珠单抗(TH1014-pert)展示了对Heregulin-β1诱导的MCF-7增殖的显著的抑制($P<0.05$)。曲妥珠单抗也显示了一些对Heregulin-β1诱导的增殖的抑制，虽然不如其它测试的HER2抗体有效。已经报道了HER2的域IV涉及EGFR/HER2异二聚体的稳定化，但没有其对HER2/HER3异二聚体的贡献的细节(Wehrman等人,同上)。抗体050、084、169和098对Heregulin-β1诱导的MCF-7细胞的增殖没有统计上显著的效果。见图7。不拘于理论，这表明这些抗体不抑制配体诱导的HER2/HER3异二聚化。

[0897] 实施例18-抗-kappa-ETA'测定法

[0898] 为了调查HER2抗体对于抗体-药物缀合物方法的适用性，开发了一种一般性的体外基于细胞的杀灭测定法，其使用针对kappa的假单胞菌属外毒素A(kappa-directed pseudomonas-exotoxin A)(抗-kappa-ETA')。该测定法使用缀合至假单胞菌属外毒素A的截短形式的高亲和力抗-kappa域抗体。在内化后，该抗-kappa-ETA'域抗体经历蛋白分解和二硫键还原，将催化域从结合域分离。催化域经由KDEL保留基序(retention motif)从高尔基体转运至内质网，并接着易位至胞质溶胶，在该处其抑制蛋白质合成并诱导细胞凋亡(参考Kreitman RJ.BioDrugs2009;23(1):1-13)。在该测定法中，为鉴定使得能够内化和通过所述毒素杀灭的HER2抗体，将HER2抗体在与HER2阳性细胞温育前与抗-kappa-ETA'预缀合。

[0899] 首先，确定了对于每种细胞系抗-kappa-ETA'的最优浓度，即不造成诱导非特异性

细胞死亡的最大耐受剂量。将AU565细胞(7,500细胞/孔)和A431细胞(2500细胞/孔)接种在96孔组织培养板(Greiner bio-one)中的普通细胞培养基中,并允许其粘附至少4小时。接下来,将细胞在普通细胞培养基中与100、10、1、0.1、0.01、0.001和0μg/mL的抗-kappa-ETA'稀释物温育。3日后,根据生产商的指示以Alamarblue(BioSource International,San Francisco,美国)定量存活细胞的量。使用以标准Alamarblue设置的EnVision2101Multilabel Reader(PerkinElmer,Turku,芬兰)监测荧光。将自身不杀灭细胞的最高浓度抗-kappa-ETA'用于下述实验(对于AU565为0.5μg/mL,而对于A431为1μg/mL)。

[0900] 接下来,对不同HER2抗体测试了通抗体介导的内化和过毒素的杀灭。如上文所描述而接种细胞。在将HER2抗体的稀释系列添加至细胞之前,将其与预定浓度的抗-kappa-ETA'预温育30分钟。3日温育后,如上文所描述而定量存活细胞的量。将以抗-kappa-ETA'缀合的抗体处理的细胞的Alamarblue信号相比于仅以抗体处理的细胞进行作图。将23.4μg/mL Staurosporin用作细胞杀灭的阳性对照。将同种型对照抗体用作阴性对照。

[0901] 交叉阻断组1、2、和3:

[0902] 如在图8A/B和表6A中所示,所有抗-kappa-ETA'缀合的HER2抗体都能够以剂量依赖性的方式杀灭AU565细胞。所有测试的抗-kappa-ETA'缀合的HER2抗体都展示了相比于抗-kappa-ETA'缀合的曲妥珠单抗(31.9%)和抗-kappa-ETA'缀合的帕妥珠单抗(47.51%)二者更好的对AU565细胞的杀灭(70.3-49.9%),并且EC_{50}提高。其为12.12-46.49ng/mL,相比于抗-kappa-ETA'缀合的曲妥珠单抗的78.49ng/mL和抗-kappa-ETA'缀合的帕妥珠单抗的117.8ng/mL。抗体159具有最高百分数的细胞杀灭,且098具有最低的EC_{50}。

[0903] 如在图8C、D和表7A中所示,抗体025、091、098、129、和153能够诱导对A431细胞的有效的杀灭(≥75%)。抗体098显示了最高百分数的细胞杀灭和最低的EC_{50}。当缀合至抗-kappa-ETA'时,曲妥珠单抗和同种型对照抗体不诱导对A431细胞的杀灭。抗体169、084和帕妥珠单抗诱导不多于大约50%的对细胞的杀灭。对未缀合的HER2抗体没有观察到细胞杀灭。

[0904] 交叉阻断组4:

[0905] 如在表6B中所示,所有抗-kappa-ETA'缀合的交叉阻断组4的HER2抗体都能够以剂量依赖的方式杀灭AU565细胞(50-72%细胞杀灭)。抗体005和111展示了相比于曲妥珠单抗(78.49ng/mL)改善了多于三倍的EC_{50}值(分别为15.13和24.20ng/mL)。交叉阻断组4的未缀合的HER2抗体在所测试的浓度没有诱导对AU565细胞的杀灭。

[0906] 如在表7B中所示,当缀合至抗-kappa-ETA'时抗体005和060能够诱导对A431细胞的有效的杀灭(≥85%)。抗体005和111在低抗体浓度(10ng/mL)已经展示了对A431细胞的杀灭,其EC_{50}为～10ng/mL。对未缀合的交叉阻断组4的HER2抗体没有观察到细胞杀灭。

[0907] 表6:所示数据是以抗-kappa-ETA'缀合的HER2抗体处理的AU565细胞的EC_{50}值和最大百分数细胞杀灭(A,交叉阻断组1、2、和3;B,交叉阻断组4),其是在一个具有代表性的实验中测量的。将Staurosporin所诱导的细胞杀灭设定为100%且将未处理的细胞的MFI设定为0%。Ndet=未检出。

[0908] A:

[0909]

抗体	% 细胞杀灭	EC50 ng/mL
PC1014-159	70.3	34.93
PC1014-127	69.0	34.46
PC1014-132	61.6	39.35
PC1014-129	60.8	30.85

[0910]

PC1014-153	60.3	32.26
PC1014-025	60.0	16.71
PC1014-098	58.7	12.12
PC1014-084	58.1	26.97
PC1014-050	52.4	12.71
PC1014-091	50.6	46.49
PC1014-169	49.9	35.62
TH1014-pert	47.5	117.8
曲妥珠单抗	31.9	78.49
同种型对照	Ndet	Ndet

[0911] B：

[0912]

抗体	%细胞杀灭	EC50ng/mL
PC1014-111	72.0	24.2
PC1014-005	69.7	15.13
PC1014-059	67.0	67.65
PC1014-060	64.3	79.38
PC1014-106	59.1	107.9
PC1014-006	50.4	45.14
曲妥珠单抗	31.9	78.49
同种型对照	Ndet	Ndet

[0913] 表7:所示数据是以抗-kappa-ETA'缀合的HER2抗体处理的A431细胞的EC_{50}值和最大百分数细胞杀灭(A,交叉阻断组1、2、和3;B,交叉阻断组4),其是在一个具有代表性的实验中测量的。将Staurosporin所诱导的细胞杀灭设定为100%且将未处理的细胞的MFI设定为0%。"Ndet"意为未检出。

[0914] A：

[0915]

抗体	% 细胞杀灭	EC50 ng/mL
PC1014-025	86.7	~9.77
PC1014-084	50.5	ND
PC1014-091	83.3	~9.86
PC1014-098	87.2	1.65
PC1014-129	75.9	~10.60
PC1014-153	82.4	~10.11

[0916]

PC1014-169	34.0	ND
TH1014-pert	37.0	61.58
曲妥珠单抗	Ndet	Ndet
同种型对照	NDet	NDet

[0917] B：

[0918]

抗体	%细胞杀灭	EC50ng/mL
PC1014-005	88.5	～10.07
PC1014-060	85.0	～10.03
曲妥珠单抗	NDet	NDet
同种型对照	NDet	NDet

[0919] 实施例19-以基于FMAT的fab-CypHer5E测定法测量的HER2抗体的内化

[0920] 为调查描述的HER2抗体相比于曲妥珠单抗(Herceptin®)和帕妥珠单抗在前面的实施例中描述的kappa-毒素-ETA'测定法中的增强的对AU565细胞的杀灭是否与增强的HER2抗体的内化相关，进行了基于fab-CypHer5E的内化测定法。CypHer5E是一种pH敏感性染料，其在碱性pH(胞外：培养基)不发荧光，且在酸性pH(胞内：溶酶体)发荧光，其具有7.3的酸解离常数(pKa)。

[0921] 将AU565细胞接种在384孔组织培养板(Greiner bio-one)中，其以密度3,000细胞/孔接种在补充以240ng/mL fab-CypHer5E(根据生产商的指示进行了山羊-fab-抗人IgG[Jackson]与CypHer5E[GE Healthcare,Eindhoven,荷兰]的缀合)的普通细胞培养基中。接下来，将HER2抗体在普通细胞培养基中系列稀释，添加至细胞并在室温放置9小时。使用8200FMAT(Applied Biosystems,Nieuwerkerk A/D IJssel,荷兰)测量了胞内CypHer5E的平均荧光强度(MFI)，并将"计数x荧光"用作读取。将同种型对照抗体用作阴性对照抗体。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software,San Diego,CA,美国)通过非线性回归(带有可变斜率的S型剂量响应)的手段确定了EC_{50}值和最大MFI。

[0922] 交叉阻断组1、2、和3：

[0923] 结果在表8A中显示，其描绘了在用AU565细胞的CypHer5E内化测定法中所有测试的交叉阻断组1、2、和3的HER2抗体的EC_{50}和最大MFI值。最大MFI值指示有多少HER2受体在抗体结合后被内化。所有的HER2抗体都显示了相比于曲妥珠单抗(35,000)和帕妥珠单抗

(TH1014-pert)(32,366)更高的最大MFI值(137,904-38,801)，指示了所测试的HER2抗体诱导了增强的受体内化。值得注意的是，不与曲妥珠单抗(Herceptin®)或TH1014-pert竞争HER2结合的抗体诱导了比与曲妥珠单抗或TH1014-pert竞争的抗体更多的受体内化，其中最高MFI是由抗体098和127所达到的。不拘于理论，这可能是由于不能抑制HER2异二聚化。

[0924] 交叉阻断组4：

[0925] 结果在表8B中显示，其描绘了在用AU565细胞的CypHer5E内化测定法中测所有试的交叉阻断组4的HER2抗体的EC_{50}和最大MFI值。最大MFI值反映有多少HER2抗体在抗体结合后被内化。所有测试的交叉阻断组4的人HER2抗体都显示了比曲妥珠单抗(Herceptin®)(35,000)和TH1014-pert(35,323)更高的最大MFI值(130,529-57,428)，指示这些抗体诱导了增强的受体内化。增强的TH1014-F5内化可能是由于其激动性活性(agonistic activity)和诱导HER2-HER2二聚化(见实施例16)。

[0926] 表8:HER2抗体的基于Cypher-5的内化测定法。显示的数据是对以fab-CypHer5E-标记的HER2抗体处理的AU565细胞的两组实验的一组有代表性的实验的MFI和EC_{50}值。一些EC_{50}值无法计算(ND)。

[0927] A：

[0928]

Cypher 5			
抗体	**EC_{50} ng/mL**	**最大MFI**	
PC1014-025	30.05	63428	与Herceptin竞争的mAb
PC1014-091	32.99	50711	
PC1014-129	7.15	60302	
TH1014-pert	530	32366	
PC1014-169	ND	38801	与 TH1014-pert 竞 争 的 mAb
PC1014-084	30.51	71059	
曲妥珠单抗	21.70	35000	
PC1014-098	13.77	134575	与TH1014-F5竞争的mAb
PC1014-127	~9.68	137904	
PC1014-159	ND	92427	
TH1014-F5	22.65	113116	
PC1014-132	11.42	112270	非竞争mAb
PC1014-153	~14.91	87531	

[0929] B:

[0930]

Cypher 5		
抗体	EC_{50} ng/mL	最大MFI
PC1014-006	23.08	130829
PC1014-005	21.37	95117
PC1014-111	35.22	81680
PC1014-059	14.77	77123
PC1014-060	36.16	68184
PC1014-106	68.60	57428
TH1014-F5	22.65	113116
TH1014-pert	~1041	35323
曲妥珠单抗	21.70	35000

[0931] 实施例20-通过2-MEA诱导的Fab臂交换所致的双特异性抗体生成

[0932] 用于产生双特异性抗体的体外方法在WO2008119353(Genmab)中描述并由van der Neut-Kolfschoten等人(Science.2007Sep14;317(5844):1554-7)所报道。在本文中,双特异性抗体是在温和的还原性条件下温育时通过两种单特异性IgG4-或IgG4样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”交换(对重链和所附的轻链的交换)而形成的。不拘于理论,该Fab臂交换反应是二硫键异构化反应所造成的,其中单特异性抗体的铰链区中的重链间二硫键被还原,且所得的自由半胱氨酸与具有不同特异性的另一个抗体分子的半胱氨酸残基形成新的重链间二硫键。所得的产物是具有两种具有不同序列的Fab臂的双特异性抗体。

[0933] 采用该天然IgG4 Fab臂交换的知识以生成产生稳定的基于IgG1的双特异性抗体(WO2011131746(Genmab))的方法。由下文描述的该方法生成的双特异性抗体产物不会再参与IgG4Fab臂交换。该方法的基础是使用互补性CH3域,其在具体的测定条件下促进异二聚体的形成。为了使得能够通过该方法产生双特异性抗体,生成了在CH3域中携带某些突变的IgG1分子:在一种亲本IgG1抗体中是T350I、K370T、和F405L突变(或至少F405L),在另一种亲本IgG1抗体中是K409R突变。

[0934] 为了生成双特异性抗体,将这两种亲本抗体-每种抗体终浓度都为0.5mg/mL(等摩尔浓度)-在总体积为100μL的具有25mM2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)的TE中在37℃温育90min。当根据生产商的规程通过使用旋转柱Microcon centrifugal filters,30k,Millipore)将还原剂2-MEA去除时,还原反应停止。

[0935] 实施例21-在体外细胞毒性测定法中测试的HER2xCD3双特异性抗体

[0936] CD3是与在成熟T细胞上表达的T细胞受体α和β链关联的蛋白质复合体。将CD3特异性抗体Fab臂与肿瘤抗原特异性抗体Fab臂组合在双特异性抗体中会造成将T细胞特异性地靶向肿瘤细胞,导致T细胞介导的肿瘤细胞裂解。类似地,可以将CD3阳性T细胞靶向至其它身体中不正常的细胞(derailed cells)、靶向至被感染的细胞、或直接靶向病原体。

[0937] 生成了多种HER2xCD3双特异性抗体，其组合不同的HER2和公共域(public domain)CD3抗体序列。此外，将b12，一种gp120特异性抗体(Barbas，CF.J Mol Biol.1993Apr5;230(3):812-23.)用作阴性对照。对于抗体153，HER2特异性Fab臂的重链和轻链可变区序列分别是SEQ ID NO:63和67，且抗体169的HER2特异性Fab臂的VH和VL序列分别为SEQ ID NO:1和5。使用了以下的CD3特异性Fab臂的重链和轻链可变区序列：

[0938] YTH12.5(Routledge等人，Eur J Immunol.1991，21(11):2717-25，通过全文提述并入本文，包括其公开的序列)。

[0939]

SEQ ID NO: 234	VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SFP**MA WVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRTYYRDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK*FRQYSGG FDY*WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 235	VL YTH12.5	DIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLS**SGNIE**NNYVHW YQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVPDRFSGSIDRSSN SAFLTIHNVAIEDEAIYFC*HSYVSSFNV*FGGGTKLTVL

[0940] 粗体凸显的序列代表CDR1域，下划线凸显的序列代表CDR2域，且斜体凸显的序列代表CDR3域。

[0941] HUM291(人源化抗体visilizumab，序列获得自NCBI protein database，其GenBank登录号为:AAC28464.1，通过全文提述并入本文)。

[0942]

SEQ ID NO: 236	VH HUM291	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFI**SYT**MH WVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKA TLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR*SAYYDY DGFAY*WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 237	VL HUM291	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS**SSVSY**MNWYQ QKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC*QQWSSNPPT*FGGGTKVEIK

[0943] 粗体凸显的序列代表CDR1域，下划线凸显的序列代表CDR2域，且斜体凸显的序列代表CDR3域。

[0944] huOKT3-C114S-gLC(用于teplizumab中，具有在VH中的额外的C114S突变;Adair，J.等人.1994.Hum Antibodies Hybridomas5:41-47，通过全文提述并入本文，包括其公开序列)。

[0945]

SEQ ID NO:238	VH huOKT3-C114S-gLC	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT**RYT** MHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKD RFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCAR*YYD DHYSLDY*WGQGTPVTVSS
SEQ ID NO:239	VL huOKT3-C114S-gLC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS**SSVSY**MNWY QQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYC*QQWSSNPFT*FGQGTKLQI T

[0946] 粗体凸显的序列代表CDR1域，下划线凸显的序列代表CDR2域，且斜体凸显的序列代表CDR3域。

[0947] huCLB-T3/4是鼠类抗体CLB-T3/4(Parren等人,Res Immunol.1991,142(9):749-63,通过全文提述并入本文，包括其公开序列)的人源化型式。简而言之，将如在Parren等人(1991)中公开的CLB-T3/4鼠类VH和VL序列使用IMGT的V-QUEST与人VH和VL汇集进行序列比对。发现最接近的人种系对于VH基因是IGHV3-21*01而对于VL基因是IGKV3-11*01(+IGKJ4*02)。将鼠类VH和VL序列中所有不同的氨基酸残基都替代为人的等同物，但在CLB-T3/4的CDR区中的那些例外。因为没有找到VH序列的相关的J区，对于重链的FR4区使用了常见的(common)WGQGTLVTVSS序列。将两个序列都克隆进入相关的表达载体并通过共转染至HEK293F细胞中而表达。

[0948]

SEQ ID NO:240	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM FWVRQAPGKGLEWVATISRYSRYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:241	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWY QQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPLTFGSGTKLEMR
SEQ ID NO:242	VH CDR1	GFTFSSYG
SEQ ID NO:243	VH CDR2	ISRYSRYI
SEQ ID NO:244	VH CDR3	ARRPLYGSSPDY
SEQ ID NO:245	VL CDR1	SSVTY
	VL CDR2	DTS
SEQ ID NO:246	VL CDR3	FQGSGYPLT

[0949] 将所有的抗体表达为IgG1,κ,其Fc区中做如下修饰:IgG1-HER2-153-K409R、IgG1-HER2-169-K409R、IgG1-b12-K409R、IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L、IgG1-YTH12.5-F405L、IgG1-HUM291-F405L、和IgG1-huOKT3-F405L。

[0950] 还有，为了接下来的实验，生成了相同抗体N297Q突变体以使得抗体的Fc域惰性(inert)。惰性Fc域阻止抗体与在单核细胞上存在的Fc受体相互作用，因为其去除了糖基化位点；在该位点的糖基化对于IgG-Fcgamma受体相互作用是至关重要的(Bolt S等人，Eur J Immunol1993，23:403-411)。作为N297Q突变的另选，将残余的Fc活性进一步通过将来自公共域的三组突变组合于一个抗体Fc域中来去除。将突变L234F、L235E、P331S(Oganesyan，Acta Cryst.(2008).D64，700-704)，D265A(Shields JBC(2001)276(9)6591-6604)，和N297Q引入K409R和F405L IgG1骨架(backbone)。还将这五种突变的组合-称作LFLEDANQPS(SEQ ID NO:251)-用于一些实施例中。使用了以下不同Fc变体的Fc序列(将突变通过下划线字母凸显)：

[0951] IgG1重链恒定区-WT(SEQ ID NO:247)

[0952] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0953] IgG1重链恒定区-F405L(SEQ ID NO:248)

[0954] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0955] IgG1重链恒定区-K409R(SEQ ID NO:249)

[0956] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0957] IgG1重链恒定区-N297Q(SEQ ID NO:250)

[0958] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0959] IgG1重链恒定区-LFLEDANQPS mut(SEQ ID NO:251)

[0960] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0961] IgG1重链恒定区-F405L N297Q(SEQ ID NO:252)

[0962] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0963] IgG1重链恒定区-K409R N297Q(SEQ ID NO:253)

[0964] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0965] IgG1重链恒定区-F405L LFLEDANQPS(SEQ ID NO:254)

[0966] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0967] IgG1重链恒定区-K409R LFLEDANQPS(SEQ ID NO:255)

[0968] >ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0969] 使用了以下b12,HIV gp120特异性Fab臂的重链和轻链可变区序列(序列由Barbas,CF.J Mol Biol.1993Apr5;230(3):812-23所描述)

[0970] VH b12(SEQ ID NO:256)

[0971] >QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDR VTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS

[0972] VL b12(SEQ ID NO:257)

[0973] >EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSG SGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK

[0974] 如在实施例20中所描述的而生成了来自这些HER2和CD3特异性抗体的双特异性抗体。

[0975] 使用流式细胞计量术通过双特异性HER2xCD3抗体与Jurkat(表达CD3的T细胞系)细胞系的结合验证了对人CD3的特异性。将亲本IgG1抗CD3抗体的二价结合与通过单特异性亲本抗体的结合比较。所有生成的双特异性批次都显示了良好的与两种Jurkat细胞的结合,尽管其亲和力比单特异性二价CD3抗体更低(图9A-D)。

[0976] 通过在存在双特异性抗体或对照抗体的情况下将两种以不同荧光染料标记的细

胞群体共温育而显示了双特异性抗体huCLB-T3/4-N297Q-F405L xHER2-169-N297Q-K409R的同时结合。根据生产商的指示，将HER2阳性的AU565细胞以CFSE(FITC/FL-1)标记和将表达CD3的Jurkat细胞以PKH26(PE/FL-2)标记。然后将两种细胞类型在存在双特异性HER2xCD3抗体的情况下在4℃共温育30min。通过在FACS CantoII上的流式细胞计量术而分析了样品。进行了象限分析(quadrant analysis)以检测CSFE/PKH26双重阳性细胞。

[0977] 只有在存在双特异性抗体的情况下才观察到了双重阳性细胞(双联体)的群体，指示这些抗体可以同时结合两种细胞类型。将数据在表10A中总结，并将以双特异性HER2xCD3(169xCLB-T3/4)和单特异性对照抗体处理的细胞的有代表性的实例在图10B中显示。

[0978] 然后在以分离的T细胞自身或PBMC作为效应物细胞的使用AU565细胞的体外细胞毒性测定法中测试了HER2xCD3抗体。将AU565细胞培养至接近汇合。将细胞以PBS清洗两次，并37℃胰蛋白酶消化5分钟。添加12mL的培养基以将胰蛋白酶灭活，并将细胞在800rpm离心5min。然后将细胞在10mL培养基中重悬并通过使细胞穿过细胞筛网(cellstrainer)而制成了单个细胞悬液。将100μL的$5x10^5$细胞/mL悬液添加至96孔培养板的每个孔，并将细胞在37℃，5%CO_2温育至少3hr以使其粘附至板上。

[0979] 使用Leucosep30mL管根据生产商的规程(Greiner Bio-one)从来自健康志愿者的血液分离外周血单核细胞(PBMC)。使用Untouched Human T-cells Dynabead Kit(Dynal)通过阴性选择将T细胞从PBMC制备物分离。将分离的细胞重悬在培养基中至终浓度达$7x10^6$细胞/mL。

[0980] 将培养基从粘附的AU565细胞去除，并替换为50μL/孔的2x浓缩的抗体稀释物和50μL/孔的$7x10^6$T细胞/mL(效应物:靶物的比例=7:1)。将板在37℃，5%CO_2温育3日。将上清去除并将板以PBS清洗两次。向每孔添加150μL培养基和15μL Alamar blue。将板在37℃，5%CO_2温育4小时，并测量了吸光度(Envision,Perkin Elmer)。

[0981] 图11显示所有双特异性HER2xCD3抗体在以分离的T细胞进行的体外细胞毒性测定法中诱导的对AU565细胞的剂量依赖性杀灭。杀灭至关重要地依赖于肿瘤靶向性Fab臂(克隆169和153二者)的存在，而对照抗体(CD3单特异性抗体IgG1-YTH12.5、IgG1-huCLB-T3/4、IgG1-Hum291、和IgG1-OKT3以及不相关的抗原特异性IgG1-b12、和CD3xb12)不诱导T细胞的细胞毒性。含有HER2-169的双特异性抗体比含有HER2-153的双特异性抗体更加强力。

[0982] 如在实施例27的图17中所示，N297Q突变和由此带来的HER2xCD3双特异性抗体huCLB-T3/4xHER2-169的Fc糖基化的缺乏不影响诱导以PBMC进行的对AU565的剂量依赖性细胞毒性的潜力。

[0983] 实施例22-HER2下行性调节

[0984] 为了调查是否由组3抗体098和153以及组4抗体005所诱导的增强的HER2内化也导致增强的受体下行性调节，将AU565细胞与HER2抗体温育3日，并分析HER2的存在。将AU565细胞接种在24孔组织培养板中(100,000细胞/孔)的普通细胞培养基中，并在存在10μg/mL HER2抗体的情况下在37℃培养3日。在以PBS清洗后，通过在室温以25μL Surefire Lysis Buffer(Perkin Elmer,Turku,芬兰)温育30min将细胞裂解。根据生产商的规程使用二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白质测定法试剂(Pierce)定量了总蛋白质水平。使用HER2特异性夹心ELISA分析了裂解物中的HER2蛋白质水平。将兔抗人HER2胞内域抗体(Cell Signaling)用于捕获HER2，并用生物素化的山羊抗人HER2单克隆抗体(R&D)，继以抗生物素

蛋白链菌素-poly-HRP(streptavidin-poly-HRP)检测结合的HER2。使用2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS:将一个ABTS片剂稀释于ABTS缓冲液[Roche Diagnostics,Almere,荷兰]中)显影反应并以草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,荷兰)停止反应。在Microtiter Plate Reader(Biotek Instruments,Winooski,美国)上测量了在405nm处的荧光,并将HER2的量表示为相比于未处理细胞的百分数。

[0985] 在图12和表10中显示的结果展示了两种测试的组3抗体(098和153)都诱导了多于50%的HER2下行性调节。与之相对,抗体025、169和曲妥珠单抗(Herceptin®)仅少量诱导下行性调节(约为未处理细胞的20%),而抗体005诱导了中等程度的下行性调节(约为未处理细胞的30%)。这与对抗体098、153、和005所观察到的增强的内化符合。

[0986] 表10:抗体诱导的HER2的下行性调节,描绘为相比于未处理的细胞的HER2百分数

[0987]

抗体	相比于未处理细胞的%HER2
Herceptin	80
IgG1-1014-169	82
IgG1-1014-025	85
IgG1-1014-098	44
IgG1-1014-153	50
IgG1-1014-005	70
同种型对照	108

[0988] 实施例23-通过共聚焦显微术分析的HER2抗体与溶酶体标志物LAMP1的共定位(colocolization)

[0989] 如在实施例21中所描述的HER2下行性调节测定法和如在实施例19中描述的基于CypHer-5E的内化测定法指示了来自组3和4的HER2抗体相比于来自组1和2的抗体被更有效的内化和靶向至溶酶体。为了确认来自组3和4的抗体的增强的溶酶体转运,将AU565细胞在玻璃盖玻片上培养并以指示的抗体处理了18小时。将细胞固定、透化、并以FITC缀合的山羊抗人IgG1染色以显影抗体,并以小鼠抗人-CD107a(LAMP1)继以山羊抗小鼠IgG-Cy5鉴定溶酶体。

[0990] 然而,在这些实验中,共焦聚成像是以允许辨别单特异性和双特异性抗体而非辨别不同单特异性抗体的设置而完成的,实际上,以这些设置几乎检测不到单特异性抗体。为了能够比较不同的单特异性抗体,以提高的增益设置再一次测量了共焦聚载玻片,以增强荧光强度。所述过程的其它所有步骤与如在实施例23中所描述的相同。

[0991] 结果在图13和表11中描绘,且显示对于多种单特异性HER2抗体FITC像素强度与Cy5重叠。对于每个载玻片,分析了含有～1、3或>5个细胞的三个不同的图像。在各个载玻片中的不同图像之间观察到了显著的差异。然而,明显相比于025、帕妥珠单抗、169、和曲妥珠单抗(Herceptin®),抗体005、098、和153被更有效地靶向至溶酶体区室(lysosomal compartments)。这与由这些抗体所诱导的受体降解和增强的内化具有良好相关性。

[0992] 表11:以任意单位(arbitrary unit)描绘的与Cy5重叠的平均FITC像素强度。

[0993]

抗体	溶酶体中的FITC像素强度[任意单位]

TH1014-005	0.619
TH1014-098	0.522
TH1014-153	0.409
TH1014-025	0.248
TH1014-pert	0.214
TH1014-169	0.255
Herceptin	0.236

[0994] 实施例24-HER2胞外域改组(HER2extracellular domain shuffle),人至鸡

[0995] 为进一步限定在实施例14中描述的来自四个不同交叉竞争组的抗体所识别的HER2结合区,进行了HER2胞外域改组试验。为了该目的,生成了具有五个构建体的小型基因合成文库,其将人HER2的胞外域的域I、II、III、或IV的序列与鸡HER2的对应的序列(原鸡(Gallus gallus)同工型B,NCBI:NP_001038126.1)互换:1)完全人HER2(Uniprot P04626),后文将其命名为hu-HER2;2)具有鸡域I的hu-HER2(将人HER2的氨基酸(aa)1-203以对应的鸡HER2区替换),后文将其命名为hu-HER2-ch(I);3)具有鸡域II的hu-HER2(将人HER2的氨基酸(aa)204-330以对应的鸡HER2区替换),后文将其命名为hu-HER2-ch(II);4)具有鸡域III的hu-HER2(将人HER2的氨基酸(aa)331-507以对应的鸡HER2区替换),此后将其命名为hu-HER2-ch(III);以及5)具有鸡域IV的hu-HER2(将人HER2的氨基酸(aa)508-651以对应的鸡HER2区替换),此后将其命名为hu-HER2-ch(IV)。人和鸡HER2直向同源物(ortholog)在其胞外域显示67%的同源性,其中在域I中为62%,在域II中为72%,在域III中为63%且在域IV中为68%。根据生产商的指示使用Freestyle MAX转染试剂(Invitrogen)将构建体瞬时转染至Freestyle™ CHO-S(Invitrogen)细胞系中,并将转染的细胞培养20小时。通过流式细胞计量术的手段分析了HER2抗体对转染的细胞的结合:将转染的CHO-S细胞收获,以FACS缓冲液清洗并与10μg/mL HER2抗体温育(在冰上30分钟)。使用藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG抗体(Jackson)检测HER2抗体的结合。为检测不同批次之间的表达是否相同,使用Cytofix/Cytoperm溶液(BD)根据生产商的指示将细胞固定并透化,并且以兔抗人胞内HER2抗体(DAKO)与第二PE-缀合的山羊抗兔抗体(Jackson)组合来染色。将同种型对照抗体用作阴性对照。在FACSCanto-II(BD)上测量荧光,并使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software,San Diego,CA,美国)通过非线性回归(带有可变斜率的S型剂量响应)的手段制作结合曲线。将结合的丧失用作鉴定哪一个HER2域被不同抗体所结合的读取。

[0996] 将抗体153的例示性的结合曲线在图14中显示。将所有结合结果在表12中显示。组1HER2抗体050,084,169和曲妥珠单抗(Herceptin®)显示了对Hu-HER2-ch(IV)结合的丧失,但对于具有其余域之一改组的蛋白质并非如此,这说明组1mAb的表位位于HER2域IV中。组2抗体025,091,129和帕妥珠单抗仅显示了对Hu-HER2-ch(II)结合的丧失,指示了其表位位于HER2域II中。抗体098和153二者在交叉竞争测定法(不显示)中都被定义至组3,但在改组实验中显示了一些差异。抗体098明显地显示了对Hu-HER2-ch(I)结合的丧失,以及对Hu-HER2-ch(II)的结合的较小降低,而153仅显示了对Hu-HER2-ch(II)结合的丧失。这些数据表明组3mAb098和153也可以至少部分地与HER2域II结合,其表位可能延伸至HER2域II中,如098中的情况。抗体005、006、060、和111在取代HER2域III后显示了结合的丧失,这说明其表位位于HER2域III中。有意思的是,抗体059和106展示了对hu-HER2-ch(III)和hu-HER2-

ch(I)二者结合的丧失,暗示抗体059和106识别这两个域之内的构象表位。

[0997] 表12:对HER2抗体与不同HER2ECD受体构建体的结合的总结。FL;hu-HER2,I;hu-HER2-ch(I),II;hu-HER2-ch(II),III;hu-HER2-ch(III),IV;hu-HER2-ch(IV)。+++指示正常结合,++指示降低的EC_{50}但和所观察到的与hu-HER2的结合相比相似的最大结合,+指示降低的EC_{50}以及相比于与hu-HER2的结合降低的最大结合,-指示无结合。

[0998]

		改组的HER2域				
抗体	组	FL	I	II	III	IV
Herceptin®	1	+++	+++	+++	+++	-
050	1	+++	+++	+++	+++	-
084	1	+++	+++	+++	+++	-
169	1	+++	+++	+++	+++	+
帕妥珠单抗	2	+++	+++	+	+++	+++
025	2	+++	+++	-	+++	+++
091	2	+++	+++	-	+++	+++
129	2	+++	+++	-	+++	+++
153	3	+++	+++	-	+++	+++
098	3	+++	-	++	+++	+++
005	4	+++	+++	+++	-	+++
006	4	+++	+++	+++	-	+++
059	4	+++	-	+++	-	+++
060	4	+++	+++	+++	-	+++
106	4	+++	-	+++	-	+++
111	4	+++	+++	+++	-	+++

[0999] 实施例25-HER2HuMab005、091、084、和169在SCID小鼠中的NCI-N87人胃癌瘤异种移植中的体内功效

[1000] 在雌性CB.17重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency,SCID)小鼠的NCI-N87人胃癌瘤异种移植模型中确定了HER2HuMab091(交叉竞争组2)、084和169(二者都是交叉竞争组1)、和005(交叉竞争组4)对于肿瘤生长和存活的体内效果。将在50%基质胶(matrigel)中的$10x10^6$NCI-N87肿瘤细胞s.c.注射进雌性SCID小鼠,每组10只小鼠。在肿瘤接种八日后,开始了以HER2-HuMab005、091、084、和169或对照抗体HuMab-HepC的静脉处理。在图15(A)和(C)中,将其指示为第1日,治疗起始之日。第一剂为40mg/kg,之后为在治疗起始后的第4,8,11,15,18,22,和25日的10mg/kg。每周至少确定2次肿瘤体积。体积(mm^3)从测径器(caliper)(PLEXX)测量值以(宽度^{2}x长度)/2计算。

[1001] 将结果在图15A,15B,15C,和15D中描绘,其显示了施用以HuMab005,084,169和091的小鼠展示了比接受阴性对照抗体HuMab-HepC的小鼠更慢的肿瘤生长(A)和更好的存活(B)。所有处理均被良好地耐受。

[1002] 实施例26-在Balb/C裸小鼠中对BT-474乳腺癌异种移植的治疗处理

[1003] 在Balb/C裸小鼠中确定了五种不同的HER2HuMab对人皮下BT-474乳腺癌肿瘤异种移植的治疗处理的效果。在以γ源(1.8Gy,Co60,BioMep,法国)的全身辐照后24至72小时后注射BT-474肿瘤细胞。将在200μl的含有基质胶的RPMI1640(50:50,v:v;BD Biosciences)中的$2x10^7$BT-474细胞皮下注射进雌性Balb/C裸小鼠的右侧翼。每周记录两次小鼠的体重和肿瘤体积。肿瘤体积(mm^3)是从测径器(caliper)(PLEXX)测量值以(宽度^{2}x长度)/2计算的。

[1004] 当肿瘤达到100-200mm^3的平均体积时开始以HER2HuMab进行的治疗。将携带肿瘤的小鼠随机分至8只小鼠的组中。一个组接受每周两次的静脉(i.v.)注射的对照mAb HuMab-HepC。四个其它组接搜每周两次的i.v.注射的HER2HuMab025,129,153和091,其中第一剂为20mg/kg且之后9剂为5mg/kg。

[1005] 将结果在图16A和16B中描绘,其显示以HuMab129和HuMab153处理部分地抑制了BT-474肿瘤生长(相比于HuMab-HepC对照处理抑制大约30和50%)。HuMab-025和HuMab-091强烈地抑制了BT-474肿瘤生长,且这些抗体显著地延缓了达到800mm^3的肿瘤体积的时间。在接受HER2HuMab的小鼠中存活也改善了。

[1006] 实施例27-通过Fc突变的手段去除Fc介导的T细胞活化

[1007] 单核细胞,其存在于PBMC中,表达Fc受体,其可以与IgG单特异性和双特异性抗体中的Fc域相互作用。如果使用了单特异性CD3抗体,已知这种活性Fc域可以造成T细胞的活化。重要地,如果将纯化的T细胞用作效应物细胞,由于没有单核细胞,该Fc介导的效果即丧失。

[1008] 为了去除该活性,设定了构建没有这种Fc介导的活性的抗体的策略。已经描述了抗体的去糖基化,无论是翻译后经由N-糖酰胺酶(N-glycanase)或遗传地经由N297Q突变,都会导致惰性的抗体形式(Tao M H等人.,Immunol1989,143;2595-2601)。生成了这些Fc修饰的抗体以确定对T细胞的Fc介导的T细胞活化的贡献。在以PBMC(E:T比例为5:1)进行的细胞毒性测定法中将一组具有在Fc域的N297Q突变或化学地去糖基化的(双特异性)抗体与具有WTFc区的抗体相比较。如在实施例21中所描述进行细胞毒性测定法,然而使用人PBMC替代纯化的T细胞。在细胞毒性测定法中去糖基化不危害HER2xCD3双特异性抗体的活性,而在测试条件下单特异性huCLB-T3/4的Fc介导的活性被强烈地但不是完全地去除(图17)。

[1009] 为了完全去除残留的Fc活性,将来自公共域的三组突变组合在一种突变体中。将突变L234F、L235E、P331S(Oganesyan Acta Cryst.(2008).D64,700-704),D265A(Shields JBC(2001)276(9)6591-6604),和N297Q引入K409R和F405L IgG1骨架中。在以PBMC进行的细胞毒性测定法中该突变体,称为LFLEDANQPS,不显示任何残留的Fc介导的T细胞的活化(图17)。

[1010] 实施例28-HER2表位对HER2xCD3功效的效果

[1011] 通过生成三种识别不同HER2表位的抗体,并与被证明在双特异性形式中有效的CD3抗体(实施例21和27)组合而确定肿瘤靶物(表位)上的结合位点的效果。如在实施例24中所示,HER2克隆005、153、和169是识别HER2的空间上分开的部分的三种非交叉阻断抗体。将这三种HER2克隆与CD3抗体克隆huCLB-T3/4组合,其作为双特异性分子识别人CD3,并在以人PBMC或纯化的人T细胞进行的细胞毒性测定法中测试。测定法如在实施例21中所描述

进行。对于T细胞测定法使用了1:1的E:T比例，而对于PBMC测定法使用了2:1的比例。

[1012] 如在图18中所示，所有三种双特异性抗体都能够诱导对AU565靶细胞的杀灭，尽管其功效不同。这些数据显示靶物表位的位置对于HER2xCD3双特异性抗体的细胞毒性潜力的重要作用。

[1013] 实施例29-T细胞介导的杀灭取的功效决于HER2表达水平

[1014] 使用了具有不同HER2表达水平的细胞系以研究靶物密度对于双特异性HER2xCD3抗体的功效的作用。使用A549,A431,3T3和AU565细胞在细胞毒性测定法中测试了双特异性抗体169xhuCLB-T3/4-N297Q。使用浓度为10μg/mL的小鼠抗人HER2(R&D Systems,Cat.MAB1129,Lot IBD0207061)和同种型对照抗体(BD,Cat.555740Lot3280)，使用QIFIKIT®分析法确定了HER2表达。表达水平在表13中总结。

[1015] 对于细胞毒性测定法，使用在实施例21中描述的规程，将不同的表达HER2的细胞系与新鲜分离的人T细胞以10:1的E:T比例共培养。

[1016] 169xCLB-T3/4的细胞毒性功效与靶物细胞系的HER2表达相关(图19)。AU565细胞在非已经常低的抗体浓度被杀灭，而具有最低表达的细胞(A549)在该实验设定中几乎不被杀灭。

[1017] 表13:在细胞毒性测定法中使用的细胞系的HER2表达水平

[1018]

细胞系	HER2表达(分子数每细胞)
AU565	4x10e5
NIH-3T3	7x10e4
A431	1.4x10e4
A549	1x10e4

[1019] 实施例30-对HER2xCD3双特异性抗体诱导的T细胞活化的表征

[1020] 如在之前的实施例中所示的，使用双特异性HER2xCD3抗体伴随着对多种表达HER2的肿瘤细胞系的有效杀灭。在37℃监测了在存在双特异性HER2xCD3抗体的情况下的与AU565肿瘤细胞共培养的T细胞中的CD69的表达16小时，所述CD69是良好表征的细胞毒性T细胞的活化标志物。通过测量CD69表达观察到了T细胞的剂量依赖性活化(图20)，其与在实施例21中所示的观察到的细胞毒性数据相关联。

[1021] 与在实施例27中显示的细胞毒性数据相符，T细胞应答的体外表征揭示了，当将PBMC细胞用作效应物细胞时，在没有肿瘤细胞的情况下，Fc介导的T细胞活化也可以观察到(图21)。当使用了具有DuoBody HER2169xhuCLBT3/4的未修饰的Fc时这一效果是最突出的，且其可以通过引入N297Q突变而降低。Fc介导的通过单特异性CD3抗体的活化可以通过使用LFLEDANQPS Fc突变体而进一步降低(图21)。

[1022] 如在实施例21中所描述进行了体外细胞毒性测定法。通过收集细胞毒性测定法的上清样品进行了不同孔的培养基中的Th1/Th2细胞因子检测以测量细胞因子释放。使用人Human Th1/Th2Cytokine Detection Kit(BD Biosciences,cat#551809)根据生产商的指示在FACS上测定了未稀释的样品。基于IL-2,IL-4,IL-6,IL-10,IFN-γ和TNF-α的标准曲线计算了这些细胞因子在样品中的细胞因子浓度。使用Graphpad Prism5.0和Excel2003软件分析了数据。分析了三组细胞因子:(1)促炎细胞因子TNF-α,INF-γ和IL-2,(2)促炎和抗炎

细胞因子IL6,以及(3)抗炎细胞因子IL4和IL10。以DuoBody huCLB-T3/4xHER2-169N297Q和所有合适的对照进行的体外细胞毒性测定法中由T细胞或PBMC生成的细胞因子概貌在表14中总结。

[1023] 当肿瘤细胞和T细胞与DuoBody huCLB-T3/4x HER2-169N297Q一起温育时细胞因子上调,其与对照抗体和对照处理(仅培养基和T细胞)形成对比。

[1024] 当与对照抗体IgG1-1014-169N297Q和IgG1-Herceptin®以及对照情况(仅培养基和T细胞)相比较时,肿瘤细胞和PBMC与DuoBody huCLB-T3/4xHER2-169N297Q的温育还造成了测量的细胞因子的上调。然而,相比于对照情况(仅培养基和T细胞),将靶细胞和PBMC与对照抗体DuoBodyhuCLB-T3/4-N297Qxb12-N297Q和单特异性huCLB-T3/4-N297Q温育也导致多数细胞因子的上调。

[1025] 还随时间跟踪了细胞因子的表达。在以DuoBody™huCLB-T3/4-N297QxHER2-169-N297Q进行的体外细胞毒性测定法中由T细胞或PBMC生成的第1、2、和3日的细胞因子概貌在图22中描绘。一般而言,在使用了更低抗体浓度(3ng/mL)的实验中,认为促炎细胞因子TNF-α,INF-γ和IL-2存在。在抗体浓度以300的因子提高的实验中,多数促炎细胞因子都以较低浓度存在。在与肿瘤细胞和DuoBody huCLB-T3/4x HER2-169N297Q温育后,T细胞几乎不分泌IL-6,但是PBMC高度分泌IL-6,所述IL-6是具有促炎和抗炎活性的细胞因子。一些细胞因子在第1和/或第2日在较高水平分泌,且在第3日降低,而其它则在第1日在较低水平分泌且在第2和/或第3日显示提高的表达。

[1026] 此外,测量的GM-CSF的释放作为T细胞活化的量度。该细胞因子在T细胞活化的过程中不被消耗,因此更适用于在长期实验中测量细胞因子水平。为了调查在如上所描述的在对照样品中观察到的细胞因子释放,将Fc突变体与WT抗体比较。有关于此将来自PBMC与AU565肿瘤细胞在双特异性抗体存在下的共培养物的T细胞样品在GM-CSF ELISA中分析。

[1027] 使用了以下规程:将涂覆以100μL/孔的2.0μg/mL在PBS中的涂覆抗体(anti-GM-CSF9.1Sanquin)的ELISA板在室温(RT)温育过夜。然后使用Elisa-洗涤器(Elisa-washer)将板以补充了0.05%Tween的PBS(PBST)清洗3次。将样品在PBST/0.2%BSA中稀释并制备了标准曲线样品(标准曲线:第一点1000pg/mL,两倍稀释曲线,10步和两个空白(标准GM-CSF=rec GM-CSFSandoz))。将100μL/孔样品添加至板并将10μL/板的单克隆生物素化的抗GM-CSF(单克隆抗-GM-CSF16.3Sanquin)(1μg/mL)稀释于PBST/0.2%BSA中并在摇床上在RT温育2hr。在以PBS-T清洗3次后,添加100μL/孔的稀释于PBST/0.2%BSA的Strep-poly-HRP(0.1μg/mL)并在摇床上在室温温育20分钟。为了检测将1片ABTS底物溶解于50ml ABTS缓冲液(Roche)中并将100μL/孔ABTS溶液添加至孔并在黑暗中在RT温育15-30分钟。以100μL/孔的2%草酸停止反应并在黑暗中温育10分钟。使用EL808-Elisa-Reader读取了在405nm处的吸光度。

[1028] DuoBody HER2169x huCLB-T3/4(两种Fc变体,N297Q和LFLEDANQPS)诱导了对T细胞的剂量依赖性活化,如通过GM-CSF产生所示(图23)。如预期,单克隆抗体IgG1-HER2-169-N297Q和不相关的抗体IgG1-b12N297Q不诱导T细胞活化。如在TH1/TH2细胞因子概貌测定法中观察到的,单特异性IgG1-huCLB-T3/4N297Q和DuoBody huCLB-T3/4x b12N297Q确实诱导对T细胞的活化。IgG1-CLB-T3/4的$(Fab')_2$对照和不具活性的Fc突变体LFLEDANQPS不诱导T细胞活化,表明发生了通过N297Q突变体的Fc介导的T细胞活化。

[1029] 表13:以A.T细胞或B.PBMC进行的体外细胞毒性测定法所在第3天测量的细胞因子概貌(与1000ng/mL抗体温育)。

[1030]

A	细胞因子 T 细胞 (浓度 pg/mL)					
	INFγ	TNFα	IL2	IL6	IL4	IL10
DuoBody huCLB-T3/4-Q x HER2-169-Q	4268.0	1005.1	2371.3	45.3	32.6	2010.1
DuoBody huCLB-T3/4-Q x B12-Q	0.5	0.3	9.3	0.1	0.1	1.7
IgG1-hCLB-T3/4-Q	1.6	1.7	20.5	0.2	0.3	2.6
IgG1-HER2-169-Q	4.8	0.7	5.1	0.3	0.2	0.5
仅 T 细胞	0.1	0.4	0.2	0.1	0.0	0.3
T 细胞培养基	3.8	1.0	7.9	0.2	0.1	0.3
B	细胞因子 PBMC (浓度 pg/mL)					

[1031]

	INFγ	TNFα	IL2	IL6	IL4	IL10
DuoBody huCLB-T3/4-Q x HER2-169-Q *	4082.6	1073.3	585.6	4191.9	13.2	2018.2
DuoBody huCLB-T3/4-Q x B12-Q *	1760.2	115.0	10.1	569.4	1.4	592.4
IgG1-hCLB-T3/4-Q	1474.2	92.7	345.2	116.5	1.7	1295.4
IgG1-HER2-169-Q	1.3	1.0	15.5	2.2	0.2	2.8
仅 T 细胞	0.4	0.7	0.3	0.2	0.4	0.4
T 细胞培养基	1.5	1.0	8.8	0.2	0.3	2.2

[1032] *抗体浓度=1000ng/mL

[1033] 实施例31-对概念的体内证明

[1034] 在皮下NCI-N87异种移植模型中评估了双特异性HER2xCD3抗体的体内抗肿瘤功效,其中将人T细胞以未刺激的PBMC的形式与肿瘤细胞共接种,这与Brischwein等人,(Mol.Immunol.43(2006),1129-1143)所描述的模型类似。使用了六到十一周龄的雌性NOD-SCID(NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl)小鼠。如在实施例21中所描述将来自健康供体的PBMC从血液棕黄层分离。在第0日,将含有$5x10^6$PBMC和NCI-N87细胞的混合物以200μL皮下接种在每只小鼠的右侧翼(平行使用了来自两个供体的PBMC以排除供体特异性的假象(artefact))。在注射一小时内,将小鼠分选至五个组(n=7),且向每组腹膜内(i.p.)注射单剂(双特异性)抗体。将处理组在表15中显示。向所有抗体样品补充不相关的mAb IgG1-b12以获得每样品的4mg/kg的总抗体浓度。

[1035] 使用测径器(PLEXX)每周两次测量肿瘤直至1500mm^{3}的终点肿瘤体积、肿瘤显示了溃疡、或直至研究结束(第50日)。图24A显示在第42日双特异性HER2xCD3抗体有效地在0.05mg/kg的剂量最优地抑制了肿瘤过度生长(tumor outgrowth)。

[1036] 在图24B中,将存活百分数(具有小于500mm^{3}的肿瘤大小)在Kaplan-Meier图形中显示。相比于以b12x CD3对照抗体处理的对照组,在以HER2x CD3抗体(0.05mg/kg)处理的小鼠中肿瘤形成显著延缓($p<0.05$,LogRank(Mantel-Cox))。

[1037] 表15:处理组和剂量

[1038]

组	抗体	剂量
1	DuoBody HER2169x CLB-T3/4-N297Q	1μg(=0.05mg/kg)
2	DuoBody b12x CLB-T3/4-N297Q	80μg(=4mg/kg)
3	Neg对照mAb IgG1-b12	80μg(=4mg/kg)

[1039] 实施例32:阐明人IgG1的参与Fab臂交换对T350I,K370T和F405L取代的需要

[1040] 为了进一步鉴定在IgG1CH3域中使得IgG1参与Fab臂交换所需的决定因素,将含有三重突变T350I-K370T-F405L(ITL)的IgG1与双重突变体T350I-K370T(IT)、T350I-F405L(IL)、和K370T-F405L(TL)相比较,研究使用抗体2F8和7D8进行,其分别在WO02/100348和WO04/035607中描述。还测试了单突变体F405L(L)。使用了2-MEA作为还原剂以诱导体外Fab臂交换(对每一种抗体都是在100μL PBS/25mM2-MEA中50μg抗体,在37℃进行90min)。对于单特异性F405L抗体,在使用Amicon Ultra离心装置(30k,Millipore,cat.no.UFC803096)缓冲液交换至PBS后,使用了来自瞬时转染的上清的未纯化的抗体。为了停止还原反应,使用旋转柱通过脱盐将还原剂2-MEA去除。通过在ELISA中测量的双特异性结合确定了双特异性抗体的生成。

[1041] 将三重(ITL),双重突变体(IT、IL、和TL)和单突变体(L)引入IgG1-2F8。将这些突变体与含有CPSC铰链(野生型)或稳定化的铰链(IgG4-7D8-CPPC)的IgG4-7D8组合,以供使用25mM2MEA在37℃进行Fab臂交换90min。图25A-B显示IgG1-2F8-IL和-TL突变体显示了与三重突变体ITL相同水平的Fab臂交换,无论所组合的IgG4-7D8(CPSC或CPPC铰链)是什么。与之相对,对于与IgG1-2F8-IT突变体的组合,没有发现双特异性结合。图25C显示IgG1-2F8-F405L突变体也显示了Fab臂交换,无论所组合的IgG4-7D8(CPSC或CPPC铰链)是什么。这些数据指示了F405L突变足以使得人IgG1在以上提到的条件下参与Fab臂交换。

[1042] 实施例33:对于参与和IgG1-ITL组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG409位的决定因素

[1043] 2-MEA可以诱导人IgG1-ITL和IgG4-CPPC之间的Fab臂交换。人IgG1和IgG4的CH3界面残基仅在409位不同:在IgG1中为赖氨酸(K)而在IgG4中为精氨酸。因此,测试了是否将在409位的赖氨酸替换为精氨酸或任何其它氨基酸(K409X)会使得IgG1能够参与2-MEA诱导的与IgG1-ITL的Fab臂交换。将在20μl PBS/25mM2-MEA中的10μg人IgG1-2F8-ITL和10μg IgG1-7D8-K409X的组合(对于每种抗体终浓度都为0.5mg/mL)在37℃温育90min。在使用Amicon Ultra离心装置(30k,Millipore,cat.no.UFC803096)缓冲液交换至PBS后使用了来自瞬时转染的上清的未纯化的抗体。在Fab臂交换反应后,将20μL PBS添加至每个样品并通过使用旋转脱盐板(spin desalting plate)的脱盐去除了还原剂。将抗体样品的系列稀释

物(总抗体浓度0-20μg/mL,以3倍稀释)用于ELISA中以测量双特异性结合。

[1044] 图26A显示在2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X之间的Fab臂交换之后的双特异性结合的结果。在图26B中,将交换表示为相对于衍生自2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL和IgG4-7D8-CPPC之间的Fab臂交换的双特异性抗体的纯化的批次(将其设为100%)的双特异性结合。还将数据评分为(-)无Fab臂交换,(+/-)低,(+)中等,或(++)高Fab臂交换,如在表1中所呈现的。当IgG1-7D8中的409位是K(=野生型IgG1)、L或M时,没有发现Fab臂交换(-)。当IgG1-7D8中的409位为F、I、N、或Y时,发现Fab臂交换为中等(+);且当IgG1-7D8中的409位为A、D、E、G、H、Q、R、S、T、V、或W时为高(++)。

[1045] 表16:2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL和IgG1-7D8-K409X突变体之间的Fab臂交换。在2-MEA诱导的IgG1-2F8-ITL和IgG1-7D8-K409X突变体之间的体外Fab臂交换后双特异性抗体的生成是通过夹心ELISA确定的。(-)无,(+/-)低,(+)中等,(++)高Fab臂交换。

[1046]

	Fab臂交换
IgG1-7D8-K409X	x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-

[1047]

L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

[1048] 实施例34:对于参与和IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1405位的决定因素

[1049] 在实施例32中,描述了当与IgG4-7D8组合时,F405L突变足以使得人IgG1能够参与Fab臂交换。为了进一步测试参与和人IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1405位的决定因素,将所有可能的IgG1-2F8-F405X突变体(除了C和P之外)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是如实施例32中描述以纯化的抗体而进行的。

[1050] 图27显示了在2-MEA诱导的IgG1-2F8-F405X x IgG1-7D8-K409R之间的Fab臂交换之后的双特异性结合的结果。如在表18中所呈现的，这些数据也是以(-)无Fab臂交换，(+/-)低，(+)中等，或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的405位为F(=野生型IgG1)时没有发现Fab臂交换(-)。当IgG1-2F8中的405位为G或R时，发现Fab臂交换为低(+/-)。当IgG1-2F8中的405位为A、D、E、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V、W、或Y时，发现Fab臂交换为高(++)。这些数据指示在IgG1405位的具体的突变允许IgG1参与当和IgG1-K409R组合时的2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1051] 表17：IgG1-2F8-F405X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。IgG1-2F8-F405X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换后双特异性抗体的生成是通过夹心ELISA而确定的。(-)无，(+/-)低，(+)中等，(++)高Fab臂交换。

[1052]

	Fab臂交换
IgG1-2F8-F405X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

[1053]

[1054] 实施例35：对于参与和IgG1-K409R的组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1407位处的决定因素

[1055] 在前面的实施例中，描述了在F405位处的某些单突变足以使得当与IgG1-K409R组合时人IgG1能够参与Fab臂交换。为了测试是否其它CH3域中的蕴含在Fc:Fc界面位置中的决定因素也会介导Fab臂交换机制，进行了IgG140位7的诱变并对于当与人IgG1-K409R组合

时参与2-MEA诱导的Fab臂交换测试了突变体。将所有可能的IgG1-2F8-Y407X突变体(除了C和P)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是以纯化的抗体进行的。

[1056] 图28显示在IgG1-2F8-Y407X x IgG1-7D8-K409R之间2-MEA诱导的的Fab臂交换后的双特异性结合的结果。如在表19中所呈现的,这些数据也是以(-)无Fab臂交换,(+/-)低,(+)中等,或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的407位是Y(=野生型IgG1)、E、K、Q、或R时,没有发现Fab臂交换。当IgG1-2F8中的407位是D、F、I、S、或T时发现Fab臂交换为低(+/-),且当IgG1-2F8中的407位为A、H、N、或V时为中(+),且当IgG1-2F8中的407位为G、L、M、或W时为高(++)。这些数据指示在IgG1407位处的特定单突变允许IgG1当和IgG1-K409R组合时参与2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1057] 表18:IgG1-2F8-Y407X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。在IgG1-2F8-Y407X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换之后的双特异性抗体的生成通过夹心ELISA确定。(-)无,(+/-)低,(+)中等,(++)高Fab臂交换。

[1058]

IgG1-2F8-Y407X	Fab臂交换 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

[1059] 实施例36:对于参与和IgG1-K409R的组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1368位处的决定因素

[1060] 实施例34和35显示在F405位和Y407位处的某些单突变足以使得当与IgG1-K409R

组合时人IgG1能够参与Fab臂交换。如在该实施例中阐释的，CH3域中的蕴涵在Fc:Fc界面位置中的其它决定因素也可以介导Fab臂交换机制。为此效果，进行了IgG1368位的诱变并对于参与和人IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换测试了突变体。将所有可能的IgG1-2F8-L368X突变体(除了C和P)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是以纯化的抗体进行的。

[1061] 图29显示在IgG1-2F8-L368X x IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换后的双特异性结合的结果。如在表20中所呈现的，这些数据也是以(-)无Fab臂交换，(+/-)低，(+)中等，或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的368位是L(=野生型IgG1)、F、或M时，没有发现Fab臂交换。当IgG1-2F8中的368位是Y时发现Fab臂交换为低(+/-)。当IgG1-2F8中的368位为K时为中(+)，且当IgG1-2F8中的368位为A、D、E、G、H、I、N、Q、R、S、T、V、或W时为高(++)。这些数据指示在IgG1368位处的特定单突变允许IgG1当和IgG1-K409R组合时参与2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1062] 表19：IgG1-2F8-L368X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。在IgG1-2F8-L368X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换之后的双特异性抗体的生成通过夹心ELISA确定。(-)无，(+/-)低，(+)中等，(++)高Fab臂交换。

[1063]

	Fab臂交换 Fab臂交换
IgG1-2F8-L368X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++

[1064]

S	++
T	++
V	++
W	++

[1065] 实施例37：对于参与和IgG1-K409R的组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1370

位处的决定因素

[1066] 之前的实施例显示在F405位、Y407位、或L368位处的某些单突变足以使得当与IgG1-K409R组合时人IgG1能够参与Fab臂交换。如在该实施例中所阐明的，CH3域中的蕴涵在Fc:Fc界面位置中的其它决定因素也可以介导Fab臂交换机制。为此效果，进行了IgG1370位的诱变并对于参与和人IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换测试了突变体。将所有可能的IgG1-2F8-K370X突变体(除了C和P例外)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是以纯化的抗体进行的。

[1067] 图30显示在IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换后的双特异性结合的结果。如在表21中呈现的，这些数据也是以(-)无Fab臂交换，(+/-)低，(+)中等，或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的370位是K(=野生型IgG1)、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、V、或Y时，没有发现Fab臂交换。只有将K370取代为W造成了中等Fab臂交换(+)。这些数据指示在IgG1368位处只有一种单突变(K370W)允许IgG1当和IgG1-K409R组合时参与2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1068] 表20:IgG1-2F8-K370X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。在IgG1-2F8-K370X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换之后的双特异性抗体的生成通过夹心ELISA确定。(-)无,(+/-)低,(+)中等,(++)高Fab臂交换。

[1069]

	Fab臂交换
IgG1-2F8-K370X	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-

[1070]

G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

[1071] 实施例38:对于参与和IgG1-K409R的组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1399

位处的决定因素

[1072] 之前的实施例显示在F405位、Y407位、L368位、或K370位处的某些单突变足以使得当与IgG1-K409R组合时人IgG1能够参与Fab臂交换。如在该实施例中所阐明的，CH3域中的蕴涵在Fc:Fc界面位置中的其它决定因素也可以介导Fab臂交换机制。为此效果，进行了IgG1399位的诱变，并对于参与和人IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换测试了突变体。将所有可能的IgG1-2F8-D399X突变体(除了C和P例外)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是以纯化的抗体进行的，如在实施例33中所描述的。

[1073] 图31显示在IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换后的双特异性结合的结果。如在表10中所呈现的，这些数据也是以(-)无Fab臂交换，(+/-)低，(+)中等，或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的399位是D(=野生型IgG1)、E、或Q时，没有发现Fab臂交换。当IgG1-2F8中的399位是V时发现Fab臂交换为低(+/-)。当IgG1-2F8中的399位为G、I、L、M、N、S、T、或W时为中(+)。当IgG1-2F8中的399位为A、F、H、K、R、或Y时为高(++)。这些数据指示在IgG1399位处的特定单突变允许IgG1当和IgG1-K409R组合时参与2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1074] 表21:IgG1-2F8-D399X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。在IgG1-2F8-D399X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换之后的双特异性抗体的生成通过夹心ELISA确定。(-)无，(+/-)低，(+)中等，(++)高Fab臂交换。

[1075]

IgG1-2F8-D399X	Fab臂交换 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

[1076] 实施例39:对于参与和IgG1-K409R的组合的2-MEA诱导的Fab臂交换的在IgG1366位处的决定因素

[1077] 实施例32至38显示在F405位、Y407位、L368位、K370位、或D399位处的某些单突变足以使得当与IgG1-K409R组合时人IgG1能够参与Fab臂交换。如在本实施例中所阐明的，CH3域中的蕴涵在Fc:Fc界面位置中的其它决定因素也可以介导Fab臂交换机制。为此效果，进行了IgG1366位的诱变，并对于参与和人IgG1-K409R组合的2-MEA诱导的Fab臂交换测试了突变体。将所有可能的IgG1-2F8-T366X突变体(除了C和P例外)与IgG1-7D8-K409R组合。所述步骤是以纯化的抗体进行的，如在实施例33中所描述的。

[1078] 图32显示在IgG1-2F8-T366X x IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换后的双特异性结合的结果。如在表X中所呈现的，这些数据也是以(-)无Fab臂交换，(+/-)低，(+)中等，或(++)高Fab臂交换而评分的。当IgG1-2F8中的366位是T(=野生型IgG1)、K、R、S、或W时，没有发现Fab臂交换。当IgG1-2F8中的366位是F、G、I、L、M、或Y时发现Fab臂交换为低(+/-)，当IgG1-2F8中的366位为A、D、E、H、N、V、或Q时为中(+)。这些数据指示在IgG1366位处的特定单突变允许IgG1当和IgG1-K409R组合时参与2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1079] 表22:IgG1-2F8-T366X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的Fab臂交换。

[1080] IgG1-2F8-D399X突变体和IgG1-7D8-K409R之间的2-MEA诱导的体外Fab臂交换之后的双特异性抗体的生成通过夹心ELISA确定。(-)无,(+/-)低,(+)中等,(++)高Fab臂交换。

[1081]

IgG1-2F8-T366X	Fab臂交换 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+
E	+
F	+/-
G	+/-
H	+
I	+/-
K	-
L	+/-
M	+/-
N	+
Q	+
R	-
S	-
T	-

[1082]

V	+
W	-
Y	+/-

[1083] 实施例40-对概念的体内证明:剂量滴定

[1084] 为了进一步测试双特异性HER2xCD3的生长抑制效果,在NOD-SCID小鼠中使用皮下NCI-N87异种移植模型测试了不同抗体剂量,所述小鼠皮下(s.c.)共注射未刺激的PBMC(每组7只小鼠),如在实施例31中所描述的。这一次,在肿瘤接种后1小时将单剂抗体静脉内(i.v.)施用。将治疗组在表23中显示。

[1085] 在没有治疗抗体的情况下,对照组对来自两个供体之一的PBMC显示了供体特异性肿瘤生长抑制(同种异体反应(alloreaction))(数据不显示)。因此,将从该具体供体的PBMC所获得的数据从分析中排除。

[1086] 表23:治疗组和剂量

[1087]

组	抗体	剂量
1	DuoBody HER2169x CLB-T3/4-N297Q	0.01μg(=0.0005mg/kg)

2	DuoBody HER2169x CLB-T3/4-N297Q	0.1μg(=0.005mg/kg)
3	DuoBody HER2169x CLB-T3/4-N297Q	1μg(=0.05mg/kg)
4	DuoBody HER2169x CLB-T3/4-N297Q	10μg(=0.5mg/kg)
5	DuoBody b12x CLB-T3/4-N297Q	10μg(=0.5mg/kg)
6	PBS	

[1088] 图33A显示0.05mg/kg和0.5mg/kg HER2x CD3N297Q抑制了肿瘤生长。

[1089] 图33B显示展示具有<500mm^{3}的肿瘤的小鼠的百分数的Kaplan-Meier图表。在以0.05mg/kg和0.5mg/kg HER2xCD3-N297Q双特异性抗体处理的小鼠中肿瘤形成相比于在以PBS或b12x CD3对照抗体处理的对照小鼠延缓了。

序列表

<110> 根马布股份公司(Genmab A/S)

<120> 针对 HER2 和 CD3 的双特异性抗体

<130> P/73.WO

<140> PCT/EP2012/057307
<141> 2012-04-20

<160> 257

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 1

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

[0001]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

[0002]

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

[0003] <400> 10

Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 15
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

[0004]

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 Arg Thr Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val Asn His Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Gly Gly Thr Phe Arg Thr Tyr Ala

1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val
1 5

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val
1 5 10

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

[0005]

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0006]

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Ile His His Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
                85                  90                  95

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

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 27

```
Gln Gly Ile Ser Arg Trp
1               5
```

[0007]

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 28

```
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile Thr
1               5
```

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 29

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

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

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Tyr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
```

Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 30

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

Ala Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 32

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

[0008]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 34
<211> 9

<212> PRT
<213> 人

<400> 34

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 35

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

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0009]

Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Ala
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 37

Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys
1 5

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 38

Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<400> 39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Trp Thr
85 90 95

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

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

[0010]

<400> 40

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 41

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Trp Thr
1 5

<210> 42
<211> 123
<212> PRT
<213> 人

<400> 42

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

Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 43

Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Tyr Trp
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 44

Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Ile
1 5

[0011]

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 45

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 47

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 48

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 126
<212> PRT
<213> 人

<400> 49

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

[0012]

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Phe Asn Trp
100 105 110

Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 50

Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 52

Ala Arg Trp Gly Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Phe Asn
1 5 10 15

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0013]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 54

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 55

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 56

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 Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Tyr 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 Trp
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 Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

[0014] <400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 58

Ile Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Thr
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 59

Ala Lys Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 61

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

[0015]

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 62

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 63
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 63

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

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

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Ser Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val
1 5

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 65

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 66

Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr
1 5 10

[0016]

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 67

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 68

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 69

Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 70
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 70

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Ser Asn Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

[0017]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Thr Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 72

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Ser
1 5

<210> 73

<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<400> 73

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

Asp Val

<210> 74
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<400> 74

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

[0018]

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 75

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 76

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr 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 Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys
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 Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 78

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0019]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 79
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 79

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr 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 Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys
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 Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

[0020] Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 81

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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys
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 Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0021]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 83

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Thr Thr Tyr Ser Ser Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Val Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 84
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 84

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

[0022] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser His Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 85

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 86

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

[0023]

<210> 87
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 87

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ile Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ile Ile Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 88
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 88

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 89
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

[0024]

<400> 89

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 91
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 91

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

[0025] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Met
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 93
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 93

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

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

[0026] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His His Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 94

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 95
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 95

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

[0027] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Ala Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 96

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 97
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 97

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

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

Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

[0028] Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Leu Ile Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Asp Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 98

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 99
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 99

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

[0029] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Phe Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 101

<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 101

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0030]

<210> 102
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Phe Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 103

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 104

[0031]

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 105
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 105

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

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

```
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Leu Trp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  106
<211>  107
<212>  PRT
<213>  人

<400>  106

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30
```

[0032]

```
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
                85                  90                  95

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


<210>  107
<211>  120
<212>  PRT
<213>  人

<400>  107

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

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

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
```

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Tyr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 108

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

[0033] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 109
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 109

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 Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Tyr 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 Trp
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 Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 110

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0034]

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 111
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 111

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 Asn Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Thr Gly Tyr 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 Ala His Tyr Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 112

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

[0035] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 113
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 113

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 Thr Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr 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 His Thr Leu Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 114

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 115
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

[0036]

<400> 115

Glu Val Gln Leu Trp Glu Ser Gly Gly Gly Ser 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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Tyr 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 Tyr Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Ser Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 116

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 117
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 117

[0037]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Thr Gly Arg
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 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Gly Asp Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 118

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 119
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 119

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

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

[0038] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Cys Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 120

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 121
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 121

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
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 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0039]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu 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 Gly Ser Ile Ile Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 123

Gln Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
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 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys 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

[0040] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 124

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 125
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 125

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

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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

[0041] Ala Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 126

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 127
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Arg 或 Ser, 优选 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ser, 优选 Thr

<400> 127

Ile Ser Gly Xaa Gly Gly Xaa Thr
1 5

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Arg 或 Ser, 优选 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ser, 优选 Thr

<400> 128

[0042]

Gly Gly Thr Phe Xaa Xaa Tyr Ala
1 5

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Ile, 优选 Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Pro, 优选 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Ile, 优选 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Ala, 优选 Val

<400> 129

Ile Xaa Xaa Xaa Leu Gly Ile Xaa
1 5

<210> 130
<211> 13
<212> PRT

<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Met, 优选 Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 其中 Xaa=Glu 或 Asp, 优选 Glu

<400> 130

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Xaa Xaa
1 5 10

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Ser, 优选 Ser

<400> 131

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly
1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

[0043]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Ser, Thr, 或 Ile, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Ala 或 Thr, 优选 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Asn, 优选 Ser

<400> 132

Ile Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Asn Thr
1 5

<210> 133
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Val, 优选 Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Ile, 优选 Val

<400> 133

Ala Arg Asp Arg Xaa Xaa Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asp 或 Gly, 优选 Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Phe, 优选 Tyr

<400> 134

Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=His 或 Asn, 优选 His

<220>
[0044] <221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Val, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ala, 优选 Thr

<400> 135

Ile Xaa His Xaa Gly Ser Xaa
1 5

<210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Tyr, Asn 或 Leu, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Ile, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asp, Gly, 或 Ala, 优选 Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Tyr, 优选 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Leu, 优选 Tyr

<400> 136

Ala Arg Gly Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Tyr Tyr Phe Asp Xaa
1 5 10

<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Asp, 优选 Gly

<400> 137

Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Tyr
1 5

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Tyr, Asn 或 His, 优选 Tyr

[0045]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asp 或 Ser, 优选 Asp

<400> 138

Ile Xaa His Ser Gly Xaa Thr
1 5

<210> 139
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Tyr, Phe 或 Trp, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Phe 或 Tyr, 优选 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Ile, Thr 或 Ser, 优选 Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 其中 Xaa=Leu 或 Phe, 优选 Leu

<400> 139

Ala Arg Leu Xaa Xaa Gly Ser Gly Xaa Tyr Tyr Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Phe, 优选 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Phe 或 Tyr, 优选 Phe

<400> 140

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Ala
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Ser, 优选 Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=His 或 Asn, 优选 His

[0046]

<400> 141

Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Xaa Lys
1 5

<210> 142
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Ala 或 Tyr, 优选 Ala

<400> 142

Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 143
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser, Asn 或 Thr, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asn, Asp 或 Ser, 优选 Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Ala, 优选 Gly

<400> 143

Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Thr, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ala 或 Gly, 优选 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Gly, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Ala, 优选 Ser

<400> 144

Ile Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
1 5

[0047]

<210> 145
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Ala 或 Gly, 优选 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=His 或 Tyr, 优选 His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Thr, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=His, Phe 或 Leu, 优选 His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 其中 Xaa=Leu 或 Ser, 优选 Leu

<400> 145

Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Xaa Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Thr, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Ser, 优选 Ile

<400> 146

Gly Tyr Ser Phe Xaa Xaa Tyr Trp
1 5

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Phe 或 Tyr, 优选 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Thr, 优选 Ile

[0048]

<400> 147

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Asp Xaa
1 5

<210> 148
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 148

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Ser, 优选 Asn

<400> 149

Gly Tyr Xaa Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 150
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Thr, 优选 Ser

<400> 150

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Xaa
1 5

<210> 151
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<400> 151

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

Asp Val

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asp 或 Ser, 优选 Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0049] <222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 His, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Ala, 优选 Val

<400> 152

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 153
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Tyr, 优选 Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Lys 或 Glu, 优选 Lys

<400> 153

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 154
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Gly, Asp 或 Ser, 优选 Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Tyr, 优选 Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ile, 优选 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Ser, 优选 Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ser, 优选 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Thr 或 Ser, 优选 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Val, 优选 Val

<400> 154

Ala Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

[0050]

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Ile 或 Leu

<400> 155

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Xaa Thr
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 His, 优选 Asn

<400> 156

Gln Gln Arg Ser Xaa Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 157
<211> 6
<212> PRT

<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Arg 或 Ser, 优选 Arg

<400> 157

Gln Gly Ile Ser Xaa Trp
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 158

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 159
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Asn, 优选 Ser

<400> 159

Gln Gly Ile Xaa Ser Trp
[0051] 1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Leu, 优选 Tyr

<400> 160

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr
1 5

<210> 161
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Asn, 优选 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Asn, 优选 Ser

<400> 161

Gln Gly Ile Xaa Xaa Trp
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Lys 或 Asn, 优选 Lys

<400> 162

Gln Gln Tyr Xaa Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 163

Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Phe, 优选 Tyr

[0052]

<400> 164

Gln Gln Tyr Asn Ser Xaa Pro Ile Thr
1 5

<210> 165
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 165

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 166

Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr Trp
1 5

<210> 167
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 167

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 168

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

[0053]

<210> 169
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 169

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 Val 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 Leu
85 90 95

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

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 170

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 171
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 171

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 172
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 172

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 Asn Tyr
20 25 30

Ala Leu Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ile Ile Arg Gly Gly Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0054]

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 Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 173
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 173

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 174
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 174

Ile Arg Gly Gly Ala Gly Ser Thr
1 5

<210> 175
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 175

Ala Lys Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 176
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<400> 176

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

[0055]

<210> 177
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 177

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 178

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 179
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 179

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 180

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Gly
1 5

<210> 181
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

[0056]

<400> 181

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr
1 5

<210> 182
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 182

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 183
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<400> 183

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 Thr
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 Thr Ser Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 184
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 184

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 185

Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Thr
1 5

<210> 186
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 186

[0057]

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Asn Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 187

Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 188
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 188

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 189
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 189

Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 190
<211> 109
<212> PRT
<213> 人

<400> 190

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

[0058]

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

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 191
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 191

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 192

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 193
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 193

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0059]

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 194

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp
1 5

<210> 195
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 195

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 196
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 196

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 197
<211> 107

<212> PRT
<213> 人

<400> 197

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 Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 198

[0060]

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 199
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 199

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
1 5

<210> 200
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 200

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Pro Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Asn Trp Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 201
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 201

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 202
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 202

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

<210> 203
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

[0061]

<400> 203

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Asn Trp Tyr Tyr
1 5 10

<210> 204
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 204

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg 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 Leu Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 205
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 205

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
1 5

<210> 206
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 206

Gln Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 207
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 207

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

[0062]

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Phe Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ala Ile Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 208
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 208

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 Leu
85 90 95

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

<210> 209
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 209

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

[0063]

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 210
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 210

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 Thr 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 Leu
85 90 95

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

<210> 211
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 211

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0064] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Tyr Tyr Tyr His Tyr Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 212
<211> 109
<212> PRT
<213> 人

<400> 212

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

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


<210>  213
<211>  122
<212>  PRT
<213>  人

<400>  213

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


Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30


Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45


Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60


Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Arg Gln Lys Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asn Gly Leu Asp Val Trp
            100                 105                 110
```

[0065]

```
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  214
<211>  109
<212>  PRT
<213>  人

<400>  214

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


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

<210> 215
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 215

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asn Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0066]

<210> 216
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 216

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 Leu
85 90 95

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

<210> 217
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 217

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Phe Gly Leu Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Leu
115 120

<210> 218
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 218

[0067] 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 Leu
85 90 95

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

<210> 219
<211> 122
<212> PRT
<213> 人

<400> 219

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 220
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 220

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

[0068]

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 Leu
85 90 95

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

<210> 221
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser, Thr, His 或 Ile, 优选 His 或 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Ser, Arg 或 Phe

<400> 221

Gly Tyr Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Trp
1 5

<210> 222
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Asp, Tyr 或 His, 优选 Asp 或 Tyr

<400> 222

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Xaa Thr
1 5

<210> 223
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

[0069]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 其中 Xaa=Gln, His 或 leu, 优选 Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Arg, Ala, Thr 或 Lys, 优选 Arg 或 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Arg 或没有, 优选没有

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Gly 或没有, 优选没有

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Asp, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)

<223> 其中 Xaa=Tyr, Phe 或 His, 优选 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 其中 Xaa=Tyr, Asp, Ser, Phe 或 Asn, 优选 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 其中 Xaa=Met 或 Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 其中 Xaa=Val 或 Ile, 优选 Val

<400> 223

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Asp
1 5 10 15

Xaa

<210> 224
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Ser, 优选 Asn

<400> 224

[0070]

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Ala
1 5

<210> 225
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Arg 或 Ser, 优选 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Ser, 优选 Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ala 或 Gly, 优选 Ala

<400> 225

Ile Xaa Gly Xaa Xaa Gly Ser Thr
1 5

<210> 226
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)

<223> 其中 Xaa=Leu 或 Tyr, 优选 Leu

<400> 226

Ala Lys Arg Ile Trp Gly Pro Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Arg 或 Ser, 优选 Arg

<400> 227

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly
1 5

<210> 228
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Lys 或 Asn, 优选 Lys

<400> 228

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Xaa Thr
[0071] 1 5

<210> 229
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 229

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 230
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Gly 或 Ala, 优选 Gly

<400> 230

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Xaa
1 5

<210> 231
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Asn 或 Tyr, 优选 Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 其中 Xaa=Trp 或 Phe, 优选 Trp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> 其中 Xaa=Tyr 或 Asp, 优选 Tyr

<400> 231

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 232
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Thr

<400> 232

Gln Ser Val Xaa Ser Xaa Tyr
1 5

[0072]

<210> 233
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 其中 Xaa=Gln 或 Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 其中 Xaa=Ser 或 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中 Xaa=Pro 或没有

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 其中 Xaa=Pro, Leu, Arg 或没有, 优选 Pro, Leu 或没有

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 其中 Xaa=Leu, Phe, Ile 或没有

<400> 233

Gln Xaa Tyr Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 234
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 234

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 Phe
20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg 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 Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 235
<211> 110
<212> PRT
<213> 人

[0073]

<400> 235

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly Arg Ser Pro Thr Thr Met
35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Phe Leu Thr Ile His Asn
65 70 75 80

Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys His Ser Tyr Val Ser
85 90 95

Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 236
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 236

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala 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 Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 237
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<400> 237

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

[0074] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 238
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 238

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 239
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<400> 239

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

[0075] Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
100 105

<210> 240
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 240

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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

Gly Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 241
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<400> 241

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

[0076] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg
100 105

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 242

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 243
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 243

Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile
1 5

<210> 244
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 244

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 245
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 245

Ser Ser Val Thr Tyr
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 246

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 247
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 247

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

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

[0077]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

```
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

[0078]

```
<210>  248
<211>  330
<212>  PRT
<213>  人

<400>  248

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
```

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
```

[0079]

```
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330

<210>  249
<211>  330
<212>  PRT
<213>  人

<400>  249

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
```

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

[0080]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 250
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 250

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

```
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
```

[0081]

```
    Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330

<210>  251
<211>  330
<212>  PRT
<213>  人

<400>  251

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

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
```

[0082]

```
Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 252
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 252

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

[0083]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 253
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 253

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

[0084]

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 254
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 254

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

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

[0085] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

```
          195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330


<210>  255
<211>  330
<212>  PRT
<213>  人
```

[0086]

```
<400>  255

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
```

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

[0087]

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 256
<211> 127
<212> PRT
<213> 人

<400> 256

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 257
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<400> 257

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

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
20 25 30

[0088]

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
100 105

IgHV3-23-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 1)

```
IgHV1-23-01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-050  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014-049  EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014-051  EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014-055  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
共同        EVQLLESGGXLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMXWVRQAPGKGLEWVSAISGXGGXTYYADSVKG

IgHV1-23-01 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-050  RFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-049  RFTISRDNSKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-051  RFTISRDNSKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-055  RFTISRDNSKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
共同        RFTISRDNSKXTLXLQMXSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
```

图1A

IgHV1-69-04 / IGHJ6-02 – VH 比对 (组 1)

```
IgHV1-69-04 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-084  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRTYAINWVRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHAQKFQG
共同        QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFXXYAISWVRQAPGQGLEWMGRIXXXLGIXNXAQKFQG

IgHV1-69-04 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR--------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-084  RVTITADKSTNTAYMELNSLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYGIEVWGQGTTVTVSS
共同        RVTITADKSTXTAYMELXSLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYGXXVWGQGTTVTVSS
```

图1B

IgHV1-18-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 1)

```
IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-169  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQG
VH1014-123  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPGQALEWMGWITTYSSNTIYAQKLQG
VH1014-161  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQG
VH1014-124  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWIITYNGNTIYAQRFQD
共同        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTXYGISWVRQAPGQXLEWMGWIXXYXGNTXYAQXXQG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-169  RVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-123  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-161  RVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-124  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
共同        RVTMTTDTSTXTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRXXVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
```

图1C

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 2, No. 1)

```
IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-025  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-001  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-143  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSANYNPSLMSR
VH1014-019  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHVGSTNYNPSLKSR
VH1014-021  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-027  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
共同        QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSXYXWXWIRQPPGKGLEWIGEIXHXGSXNYNPSLXSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-025  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
VH1014-001  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGSGYYYFDLWGRGTQVTVSS
VH1014-143  VTISVDTSKNQFSLQLSSVTAADTAVYYCARGYYGSGYYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-019  VTISVDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
VH1014-021  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYASGVYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-027  VTISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARGLIGSGYYYFDYWDQGTLVTVSS
共同        VTISVDTSKXQFSLXLSSVTAADTAVYYCARGXXXSGXYYFDXWXXGTXVTVSS
```

图1D

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 2, No. 2)

```
IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-091  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSR
VH1014-032  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSR
VH1014-035  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSR
VH1014-036  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-054  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-094  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSR
共同        QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAXXGGSFSXYYWXWIRQPPGKGLEWIGEIXHSGXTNYNPSLXSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-091  VTISVDTSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
VH1014-032  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-035  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-036  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYYGSGTYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-054  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLWYGSGSYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-094  VTISVDTSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
共同        VTISVDTSKNQFSLKLXSVTAADTAVYYCARLXXGSGXYYXDYWGQGTLVTVSS
```

图1E

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 2)

```
IgHV1-30-…  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR
TH1014-129  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTFAIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGR
共同        QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSXXAXHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGXXKXYADSVKGR

IgHV3-30-…  FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-129  FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGVWGAFDYWGQGTLVTVSS
共同        FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAXYYCARGLGVWGXFDYWGQGTLVTVSS
```

图1F

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 3a)

```
IgHV3-23-1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-098  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKG
VH1014-105  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKG
VH1014-100  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMNWVRQAPGKGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKG
VH1014-125  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGYATYYADSVKG
VH1014-162  EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKG
共同        EVQLXESGGGXVQPGGSLRLSCAASGFTFXXYXMXWVRQAPGKGLEWVSXISGXXXXTYYADSVKG

IgHV3-23-1  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-098  RFTISRDNSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-105  RFTISRDNSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-100  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-125  RFTISRDNSKTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-162  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYYHGSGSYYTSFDYWGQGTLVTVSS
共同        RFTISRDNSKXTLXLQMNSLRAEDTAVYYCAKXXXXGSGSYYTXFDYWGQGTLVTVSS
```

图1G

IgHV5-51-01 / IGHJ2-01 – VH 比对 (组 3a, No. 1)

```
IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
TH1014-127  EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPSFQG
共同        EVQLVQSGAEVKKPGESLXISCKGSGYSFXXYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIXPGDSDXRYSPSFQG

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR----------YFDLWGRGTLVTVSS
TH1014-127  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRHWYFDLWGRGTLVTVSS
共同        QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRHWYFDLWGRGTLVTVSS
```

图1H

IgHV5-51-01-01 / IGHJ5-02 – VH 比对 (组 3a, No. 2)

```
IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
TH1014-159  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
共同        EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYXFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR----------NWFDPWGQGTLVTVSS
TH1014-159  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNWFDPWGQGTLVTVSS
共同        QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNWFDPWGQGTLVTVSS
```

图1I

IgHV1-18-01 / IGHJ6-02 – VH 比对 (组 3b)

```
IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-132  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNSNYVQKFQG
  共同      QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNXNYXQKXQG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR----------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-132  RVTMTTDTTTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAREYSYDSGTYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
  共同      RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSYDSGTYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
```

图1J

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组 3b)

```
IgHV3-30…   QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
TH1014-153  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYADSVKG
VH1014-033  QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKG
VH1014-160  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKG
VH1014-166  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNEYYADSVKG
VH1014-152  QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKG
VH1014-167  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
  共同      QVQLVESGGGVVQXGRSLRLSCAASGFTFSXXXXHWVRQAPGKGLEWVXXISYDGSXXYYADSVKG

IgHV3-30…   RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-153  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-033  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYISSSGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-160  RFTISRDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-166  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-152  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-167  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
  共同      RFTISRDNSKNTXYLQMNSLXAEDTAXXYCARGXXXXXGXFDYWGQGTLVTVSS
```

图1K

IgHV5-51-1 / IGHJ6-02 – VH 比对

```
IgHV5-51-1   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
TH1014-005   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDTRYRPSFQ
TH1014-060   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQ
TH1014-106   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-041   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQ
VH1014-150   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQ
VH1014-067   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-072   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-163   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSGYRFISYWIGWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-093   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-044   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIFPGDSDTRYSPSFQ
  共同       EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCXXSGYXFXXYWIGWVRQMPGKGLEWMGXIXPGDSXTRXXPSFQ

IgHV5-51-1   GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-005   GQVTISADKSISTAYLQWTSLKASDTAIYYCARQRGD--YYYFYGMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-060   GQVTISADKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGD--FYYFDGLDVWGQGTTVTVSS
TH1014-106   GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYYSGMDVWGQGTTVTVSS
VH1014-041   GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFFGLDVWGQGTAITVSS
VH1014-150   GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
VH1014-067   GQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYHYGLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-072   GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYFNGLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-163   GQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQRGD--YYYFNGLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-093   GQVTISADKSITTAYLQWSSLRASDTAMYYCARQRGD--YYYFFGLDIWGQGTTVTVSL
VH1014-044   GQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
  共同       GQVTISXDKSIXTAYLQWXSLXASDTAXYYCARXXXXXXXXYXXGXDXWGQGTXXTVSX
```

图1L

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 – VH 比对

```
IgHV3-23-1   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-006   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALIWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKG
  共同       EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXYAXXWVRQAPGKGLEWVSXIXGXXGSTYYADSVKG

IgHV3-23-1   RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-006   RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPLFDYWGQGTLVTVSS
  共同       RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPXFDYWGQGTLVTVSS
```

图1M

IgHV1-18-1 / IGHJ4-02 – VH 比对

```
IgHV1-18-1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-059   QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYYAQKLQG
  共同       QVQLVQSGAEVKKPGASVXVXCKASGYTFTXYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGXTXYAQKLQG

IgHV1-18-1   RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR---------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-059   RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGTLVTVSS
  共同       RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGTLVTVSS
```

图1N

IgHV1-69-4 / IGHJ4-02 – VH 比对

```
IgHV1-69-4   QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-111   QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
  共同       QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYXISWVRQAPGXGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG

IgHV1-69-4   RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-111   RVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYWGQGTLVTVSS
  共同       RVTITADKSTXTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSXXXYWGQGTLVTVSS
```

图10

IgKV1-12-01 / IGKJ5-01 – VL 比对 (组 1)

```
IgKV1-12-01  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-050   DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-084   DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSG
VL1014-049   DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-051   DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-055   DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
  共同       DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQXKPGKAPKLLIYXASXLQSGVPSRFSGSG

IgKV1-12-01  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-050   SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-084   SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
VL1014-049   SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-051   SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-055   SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
  共同       SGTDFTLTISSLXPEDFATYYCQQANSFPXTFGXGTRXEIK
```

图2A

IgKV3-11-01 / IGKJ1-01 – VL 比对 (组 1)

```
IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-169  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-124  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-161  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-123  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDISNRATGIPARFSGSG
  共同      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDXSNRATGIPARFSGSG

IgKV3-11-01 SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIK
VL1014-169  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-124  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-161  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-123  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSHWPRTFGQGTKVEIK
  共同      SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSXWPRTFGQGTKVEIK
```

图2B

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01– VL 比对 (组 2, No. 1)

```
IgKV1D-16 … DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-025  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSG
VL1014-001  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-019  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSG
VL1014-143  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-021  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-027  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
  共同      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISXWLAWYQQKPEKAPKSLIXAASXLXSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 … SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-025  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-001  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYISFPITFGQGTRLEIK
VL1014-019  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-143  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-021  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-027  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
  共同      SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSXPITFGQGTRLEIK
```

图2C

IgKV1D-16-01 / IGKJ1-01– VL 比对 (组 2, No. 2)

```
IgKV1D-16 … DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-091  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-032  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-035  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-036  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQKPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-054  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-094  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
  共同      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLXWYQQKPEKAPKSLIYAXXXLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 … SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK
VL1014-091  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-032  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-035  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-036  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-054  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGGGTKVEIK
VL1014-094  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
  共同      SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGXGTKVEIK
```

图2D

IgKV1D-16-01 / IGKJ2-01 – VL 比对 (组 3a)

```
IgKV1D-16 … DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-098  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-100  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-105  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-125  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-162  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
  共同      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIXSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 … SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-098  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-100  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-105  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-125  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-162  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
  共同      SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPXTFGXGTKXEIK
```

图2E

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 – VL 比对 (组 3b)

```
IgKV1D-16 … DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-153  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-152  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-166  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-167  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-160  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-033  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
  共同      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIXXWLAWYQQKPEKAPKSLIYXASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 … SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-153  YGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-152  SGTDFTLTISSLQPENFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-166  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-167  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-160  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-033  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
  共同      XGTDFXLTISSLQPEXFAXYYCQQYXSYPITFGQGTRLEIK
```

图2F

IgKV3-20-01 / IGKJ4-01 – VL 比对

```
IgKV3-20-01 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-005  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-059  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-060  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-106  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-111  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-041  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-150  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-067  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-072  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-163  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-093  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-044  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
  共同      EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVXSXYLXWYQQKPGQXPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

IgKV3-20-01 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-005  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-059  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTS-LFTFGPGTKVDIK
VL1014-060  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGTRLEIK
VL1014-106  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--FTFGPGTKVDIK
VL1014-111  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQLYGSSP--TFGPGTKVDIK
VL1014-041  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-150  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-067  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
VL1014-072  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
VL1014-163  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-093  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-044  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
  共同      GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQXYGXSXXXTFGXGTXXXIK
```

图2G

IgKV3-11-01 / IGKJ4-01 – VL 比对

```
IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
VL1014-006  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
  共同      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

IgKV3-11-01 GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
VL1014-006  GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
  共同      GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
```

图2H

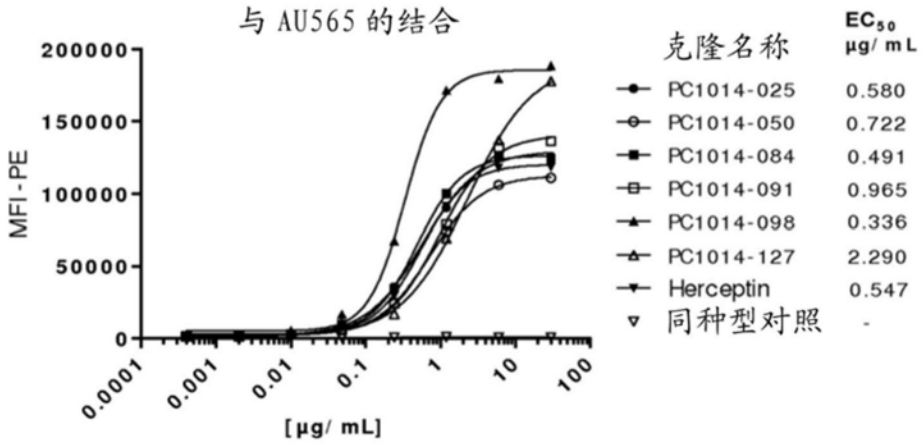

与 AU565 的结合
MFI-PE
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-025 0.580
PC1014-050 0.722
PC1014-084 0.491
PC1014-091 0.965
PC1014-098 0.336
PC1014-127 2.290
Herceptin 0.547
同种型对照 -

图3A

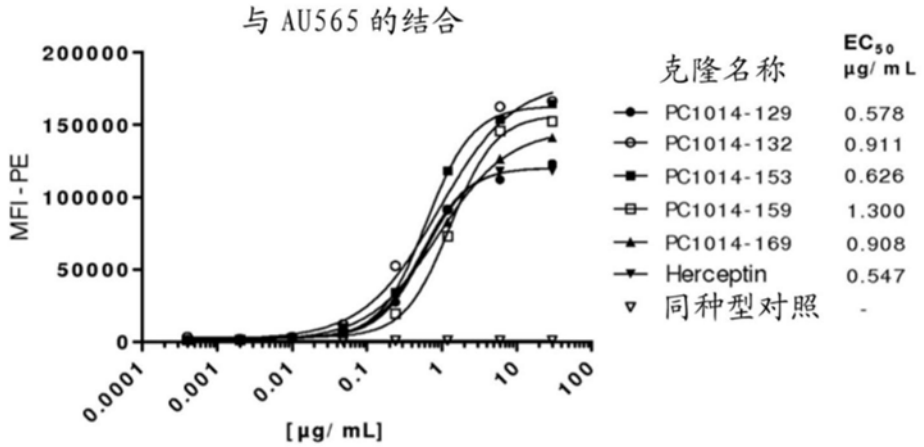

与 AU565 的结合
MFI-PE
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-129 0.578
PC1014-132 0.911
PC1014-153 0.626
PC1014-159 1.300
PC1014-169 0.908
Herceptin 0.547
同种型对照 -

图3B

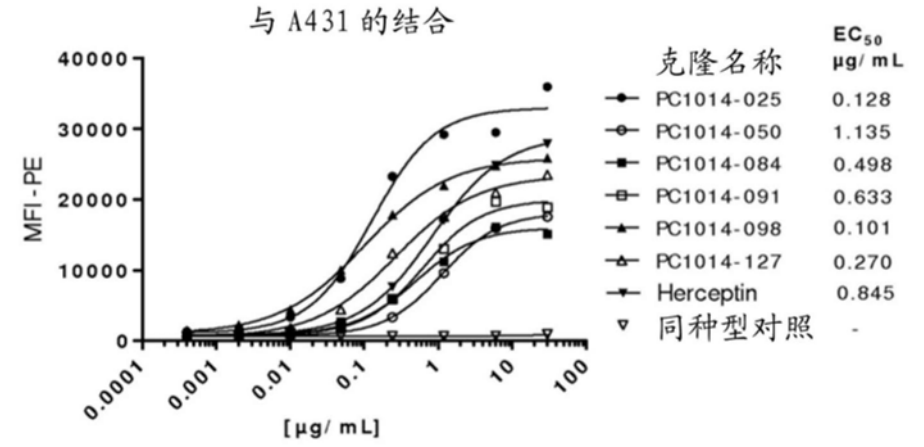

与 A431 的结合
MFI-PE
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-025 0.128
PC1014-050 1.135
PC1014-084 0.498
PC1014-091 0.633
PC1014-098 0.101
PC1014-127 0.270
Herceptin 0.845
同种型对照 -

图3C

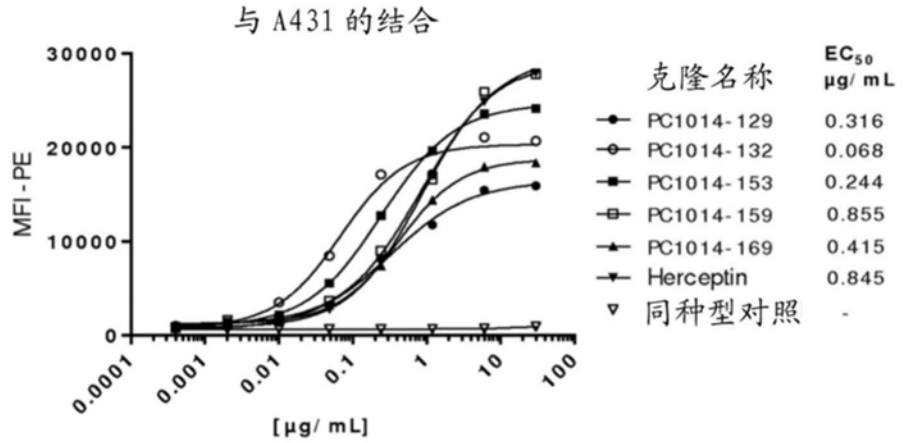

与 A431 的结合
MFI-PE
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-129 0.316
PC1014-132 0.068
PC1014-153 0.244
PC1014-159 0.855
PC1014-169 0.415
Herceptin 0.845
同种型对照 -

图3D

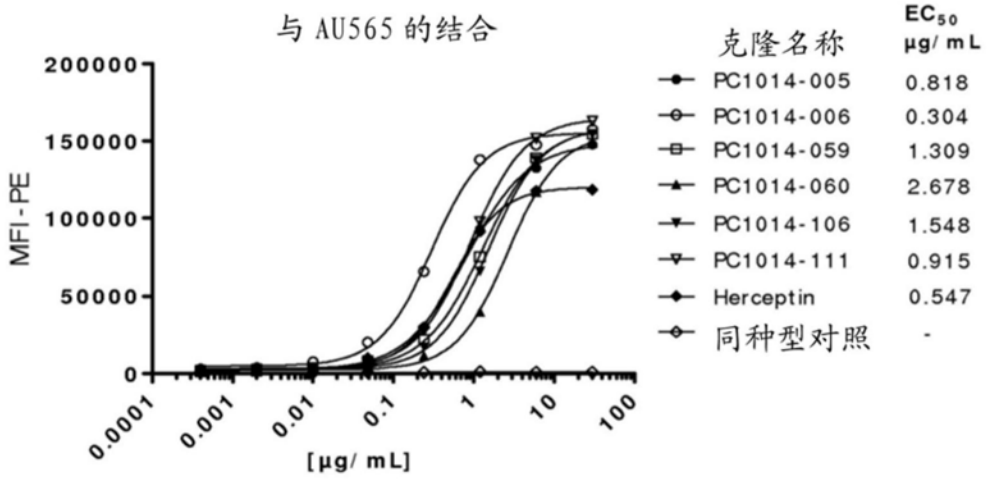

与 AU565 的结合
MFI-PE
200000
150000
100000
50000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-005 0.818
PC1014-006 0.304
PC1014-059 1.309
PC1014-060 2.678
PC1014-106 1.548
PC1014-111 0.915
Herceptin 0.547
同种型对照 -

图3E

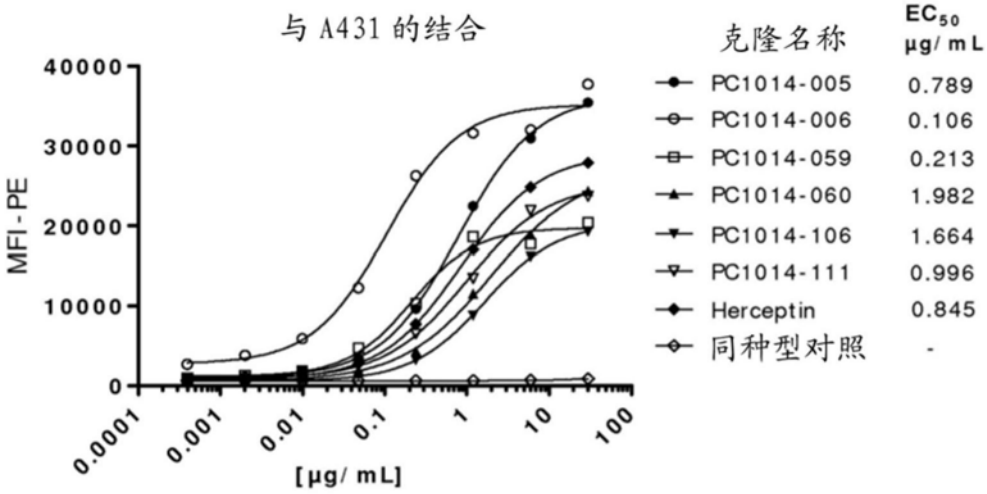

与 A431 的结合
MFI-PE
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[μg/ mL]
克隆名称
EC50 μg/ mL
PC1014-005 0.789
PC1014-006 0.106
PC1014-059 0.213
PC1014-060 1.982
PC1014-106 1.664
PC1014-111 0.996
Herceptin 0.845
同种型对照 -

图3F

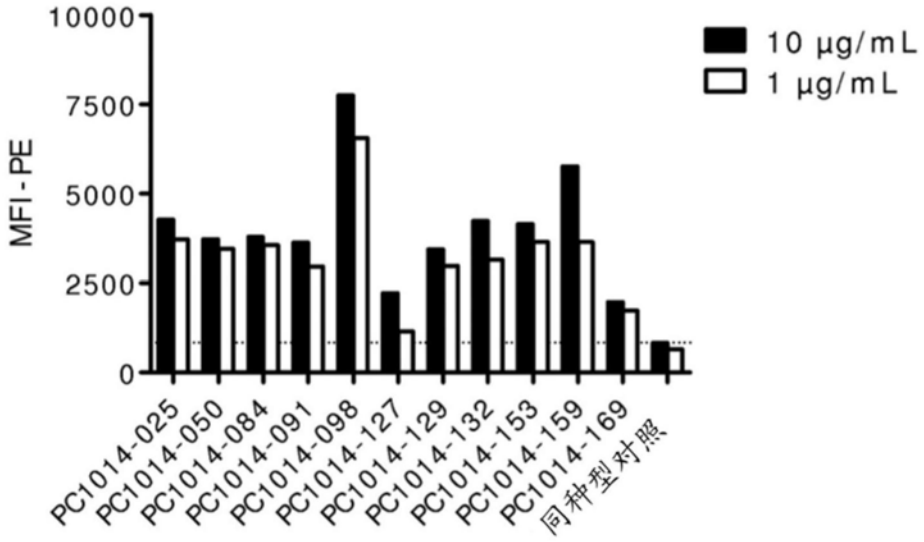

10000
7500
5000
2500
0
MFI-PE
10 μg/mL
1 μg/mL
PC1014-025
PC1014-050
PC1014-084
PC1014-091
PC1014-098
PC1014-127
PC1014-129
PC1014-132
PC1014-153
PC1014-159
PC1014-169
同种型对照

图4A

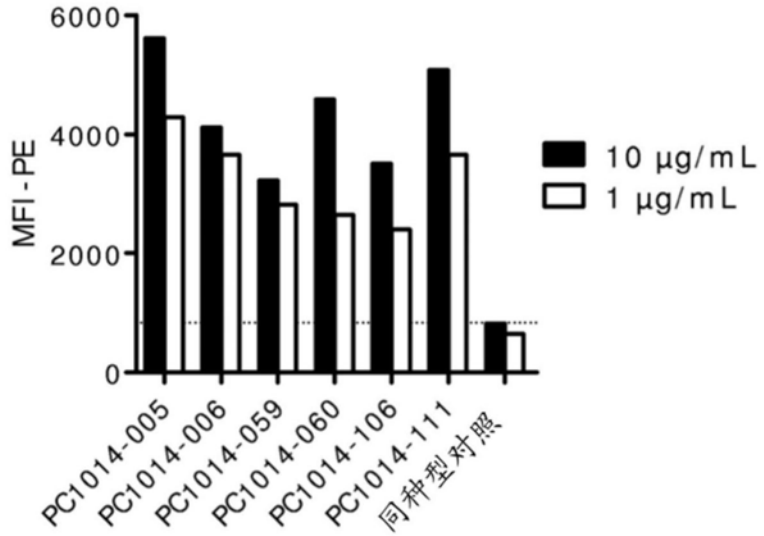

6000
4000
2000
0
MFI-PE
10 μg/mL
1 μg/mL
PC1014-005
PC1014-006
PC1014-059
PC1014-060
PC1014-106
PC1014-111
同种型对照

图4B

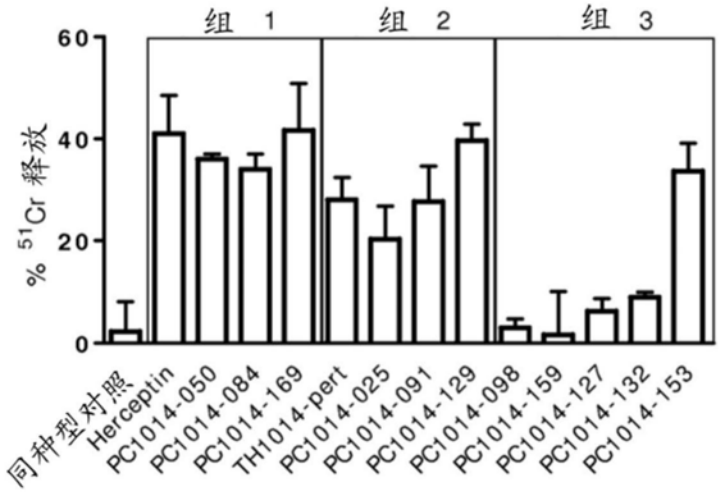

组 1
组 2
组 3
60
40
20
0
% 51Cr 释放
同种型对照
Herceptin
PC1014-050
PC1014-084
PC1014-169
TH1014-pert
PC1014-025
PC1014-091
PC1014-129
PC1014-098
PC1014-159
PC1014-127
PC1014-132
PC1014-153

图5A

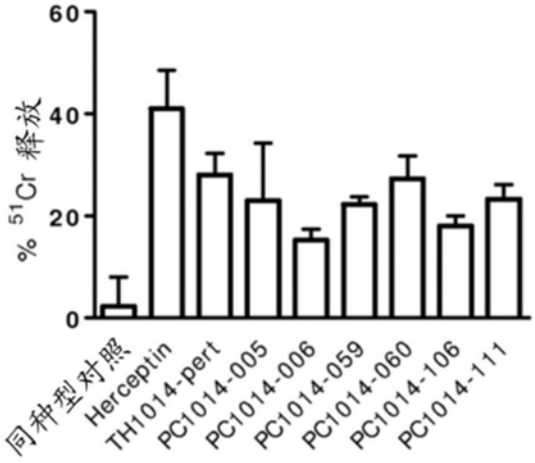

60
40
20
0
% 51Cr 释放
同种型对照
Herceptin
TH1014-pert
PC1014-005
PC1014-006
PC1014-059
PC1014-060
PC1014-106
PC1014-111

图5B

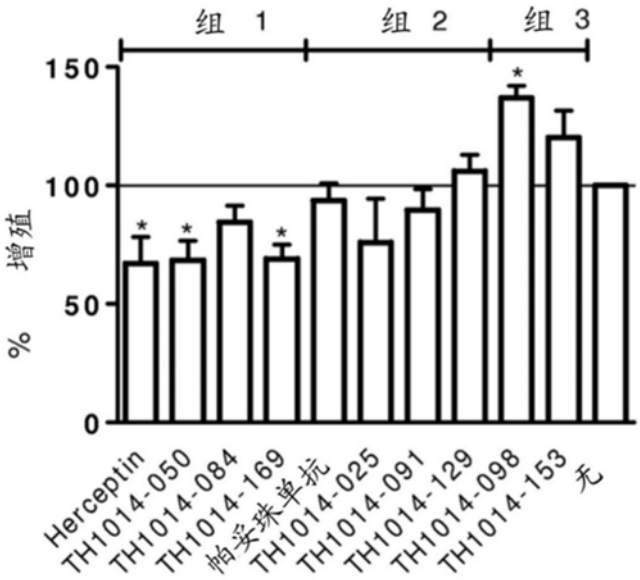

组 1
组 2
组 3
150
100
50
0
% 增殖
Herceptin
TH1014-050
TH1014-084
TH1014-169
帕妥珠单抗
TH1014-025
TH1014-091
TH1014-129
TH1014-098
TH1014-153
无

图6

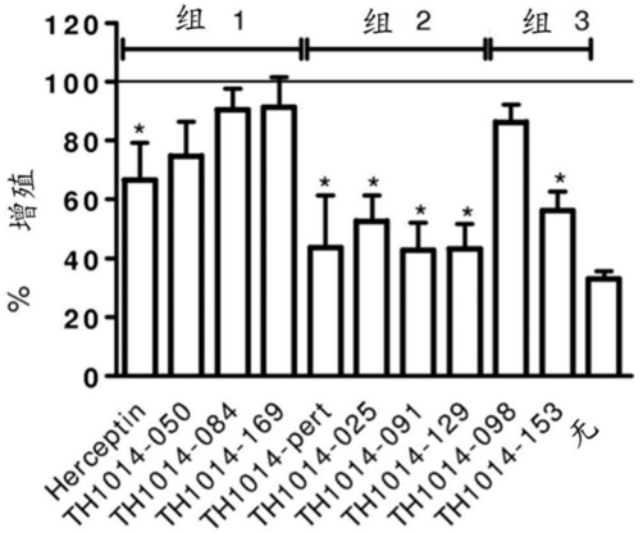

组 1
组 2
组 3
120
100
80
60
40
20
0
% 增殖
Herceptin
TH1014-050
TH1014-084
TH1014-169
TH1014-pert
TH1014-025
TH1014-091
TH1014-129
TH1014-098
TH1014-153
无

图7

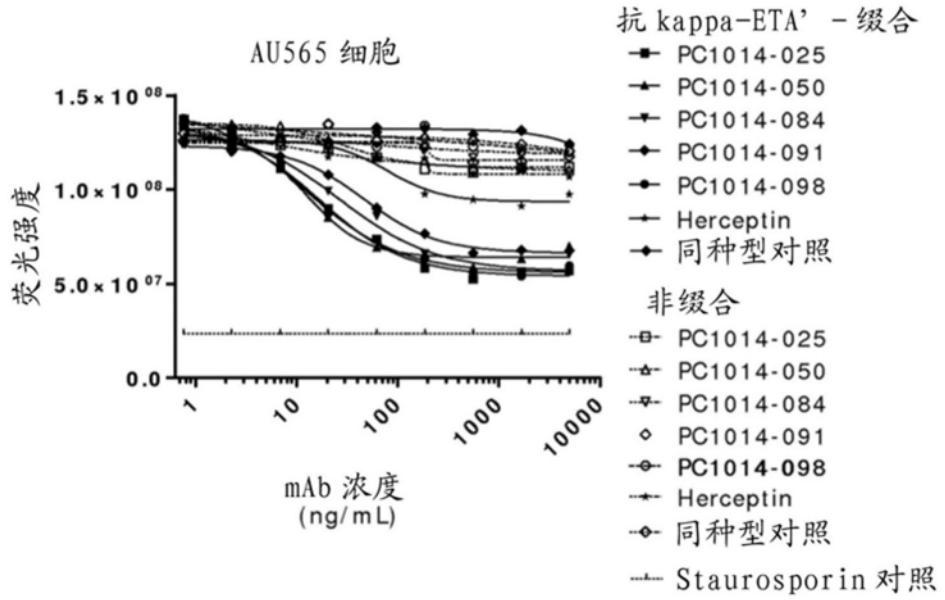

AU565 细胞
荧光强度
1.5×10 08
1.0×10 08
5.0×10 07
0.0
1
10
100
1000
10000
mAb 浓度
(ng/mL)
抗 kappa-ETA' - 缀合
PC1014-025
PC1014-050
PC1014-084
PC1014-091
PC1014-098
Herceptin
同种型对照
非缀合
PC1014-025
PC1014-050
PC1014-084
PC1014-091
PC1014-098
Herceptin
同种型对照
Staurosporin 对照

图8A

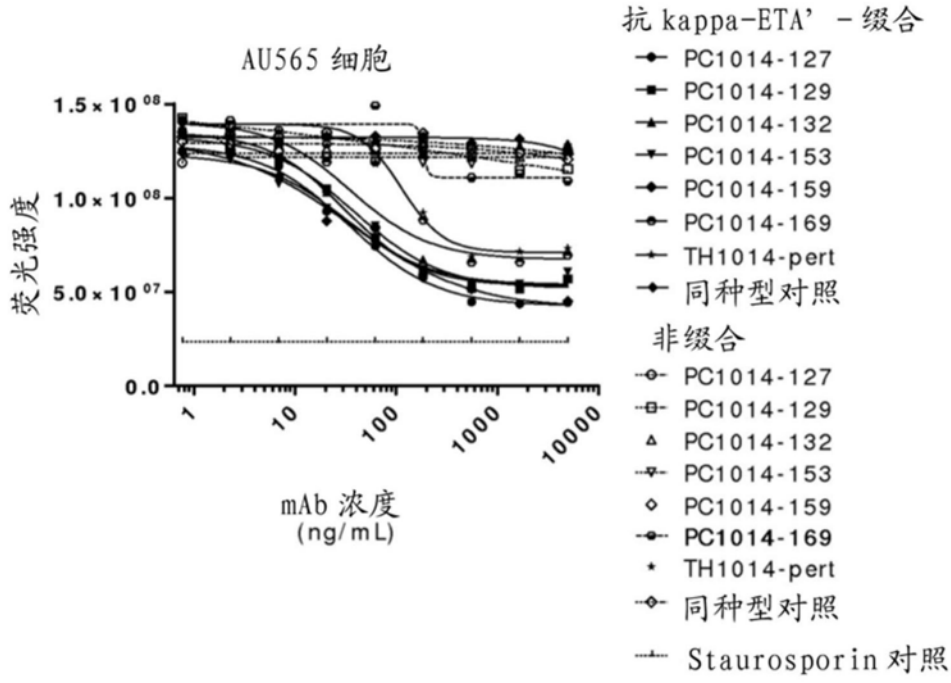

AU565 细胞
荧光强度
1.5×10 08
1.0×10 08
5.0×10 07
0.0
1
10
100
1000
10000
mAb 浓度
(ng/mL)
抗 kappa-ETA' - 缀合
PC1014-127
PC1014-129
PC1014-132
PC1014-153
PC1014-159
PC1014-169
TH1014-pert
同种型对照
非缀合
PC1014-127
PC1014-129
PC1014-132
PC1014-153
PC1014-159
PC1014-169
TH1014-pert
同种型对照
Staurosporin 对照

图8B

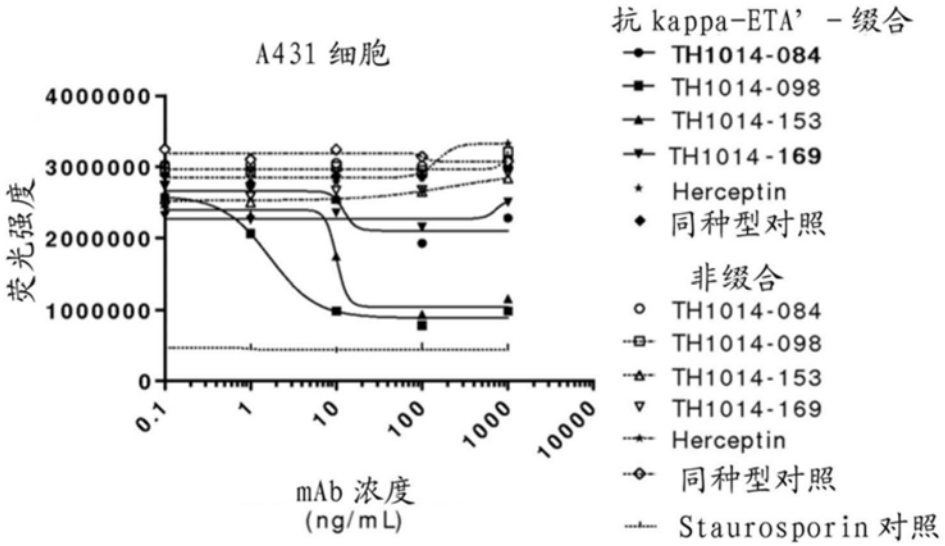

A431 细胞
荧光强度
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
mAb 浓度
(ng/mL)
抗 kappa-ETA' -缀合
TH1014-084
TH1014-098
TH1014-153
TH1014-169
Herceptin
同种型对照
非缀合
TH1014-084
TH1014-098
TH1014-153
TH1014-169
Herceptin
同种型对照
Staurosporin 对照

图8C

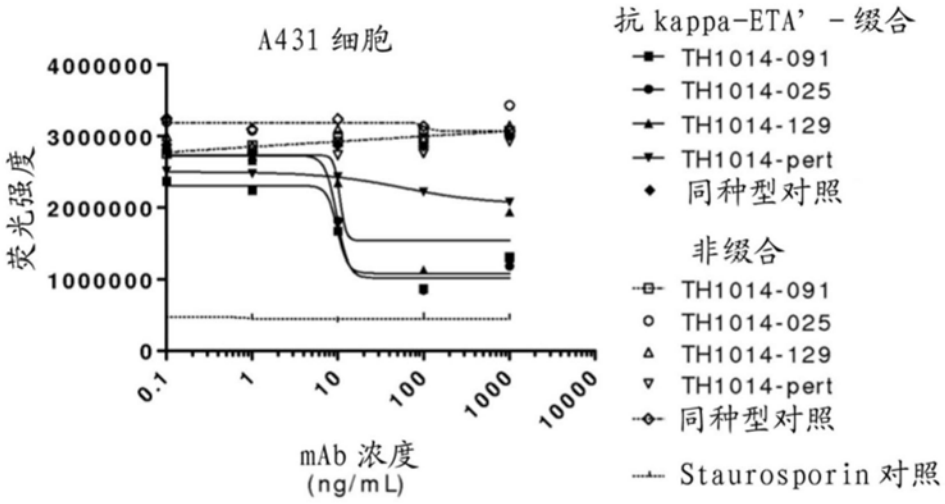

A431 细胞
荧光强度
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
mAb 浓度
(ng/mL)
抗 kappa-ETA' -缀合
TH1014-091
TH1014-025
TH1014-129
TH1014-pert
同种型对照
非缀合
TH1014-091
TH1014-025
TH1014-129
TH1014-pert
同种型对照
Staurosporin 对照

图8D

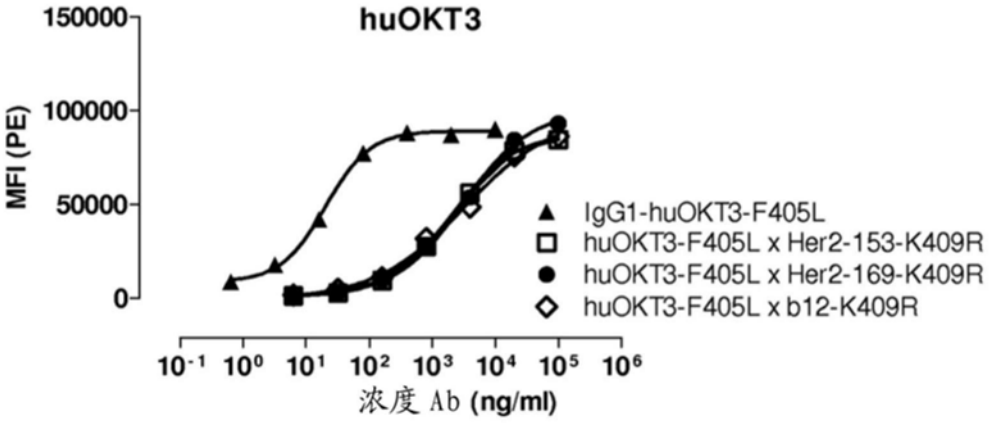

huOKT3
150000
100000
50000
0
MFI (PE)
IgG1-huOKT3-F405L
huOKT3-F405L x Her2-153-K409R
huOKT3-F405L x Her2-169-K409R
huOKT3-F405L x b12-K409R
10-1 100 101 102 103 104 105 106
浓度 Ab (ng/ml)

图9A

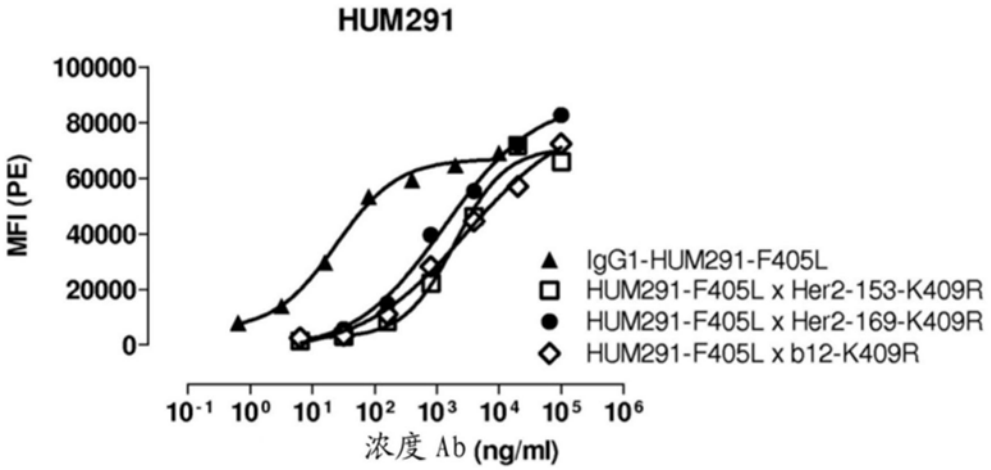

HUM291
100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI (PE)
IgG1-HUM291-F405L
HUM291-F405L x Her2-153-K409R
HUM291-F405L x Her2-169-K409R
HUM291-F405L x b12-K409R
10-1 100 101 102 103 104 105 106
浓度 Ab (ng/ml)

图9B

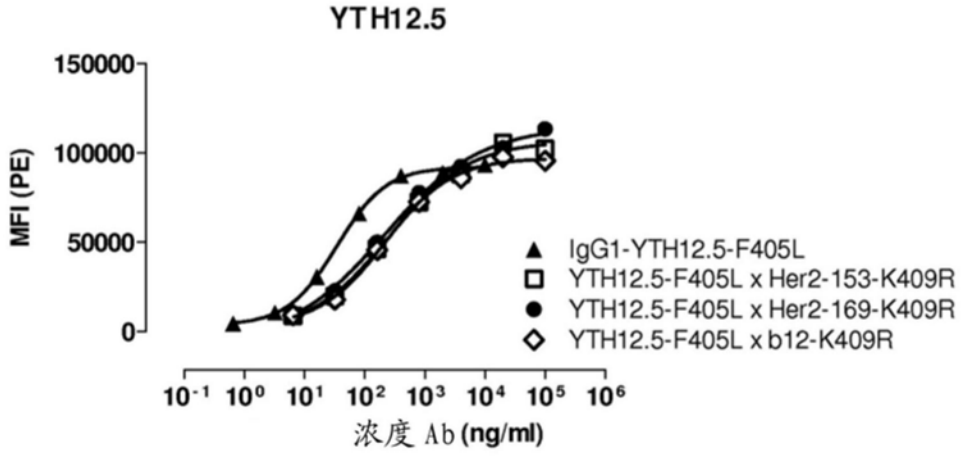

YTH12.5
150000
100000
50000
0
MFI (PE)
IgG1-YTH12.5-F405L
YTH12.5-F405L x Her2-153-K409R
YTH12.5-F405L x Her2-169-K409R
YTH12.5-F405L x b12-K409R
10-1 100 101 102 103 104 105 106
浓度 Ab (ng/ml)

图9C

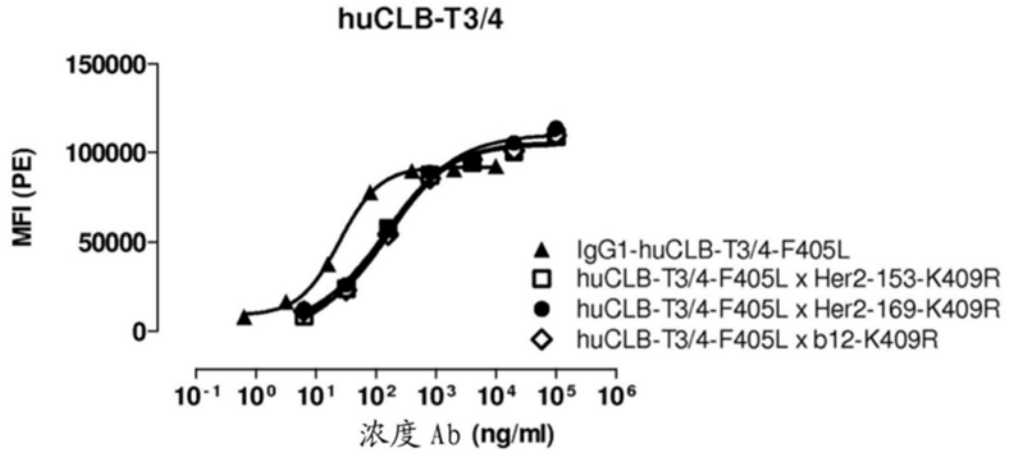


图9D

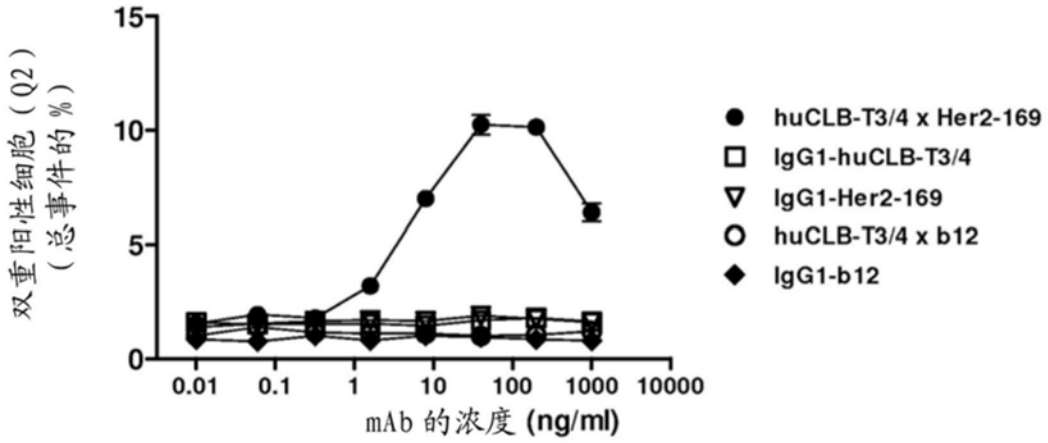


图10A

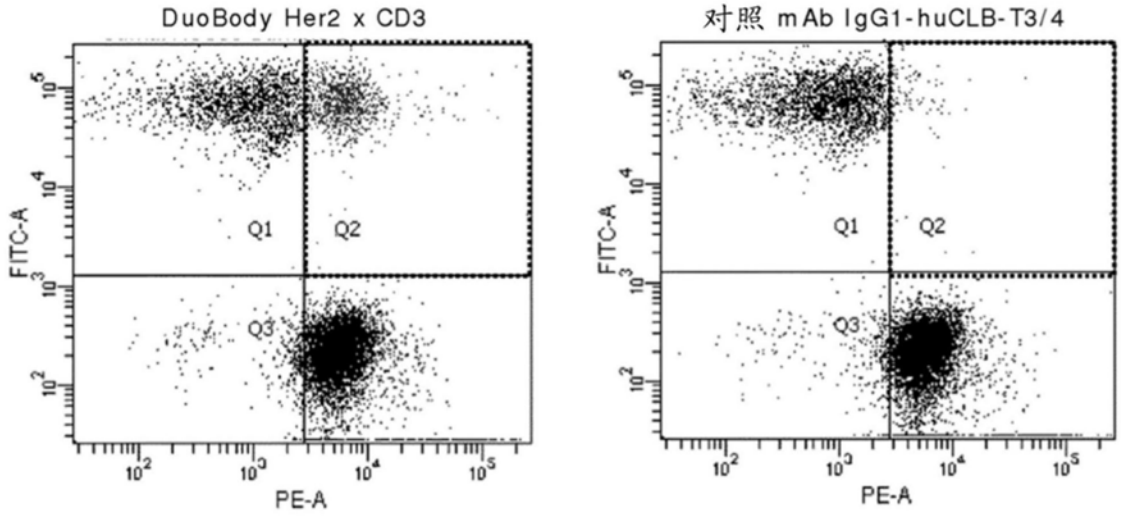


图10B

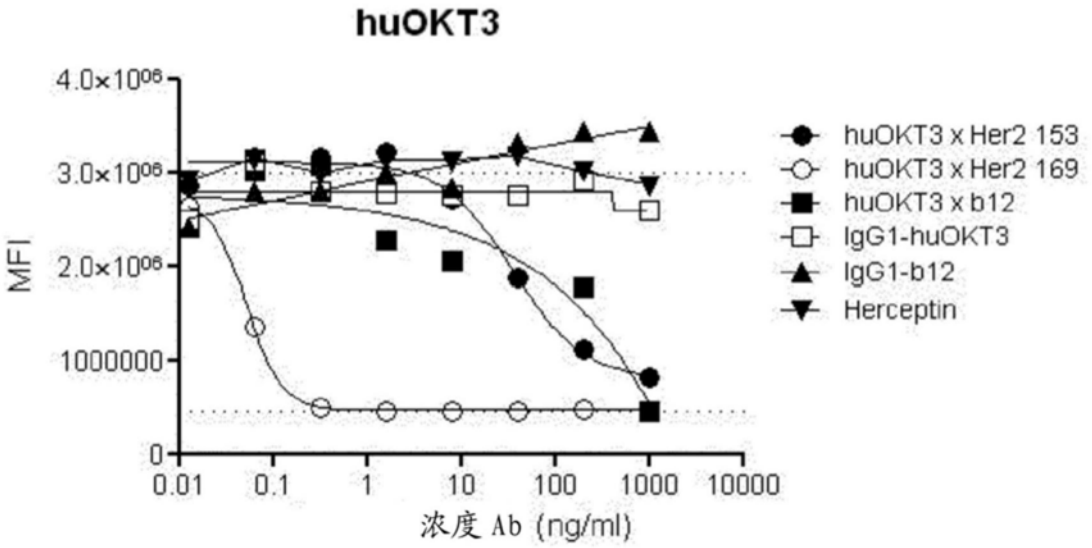

huOKT3
4.0×10^06
3.0×10^06
2.0×10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
huOKT3 x Her2 153
huOKT3 x Her2 169
huOKT3 x b12
IgG1-huOKT3
IgG1-b12
Herceptin

图11A

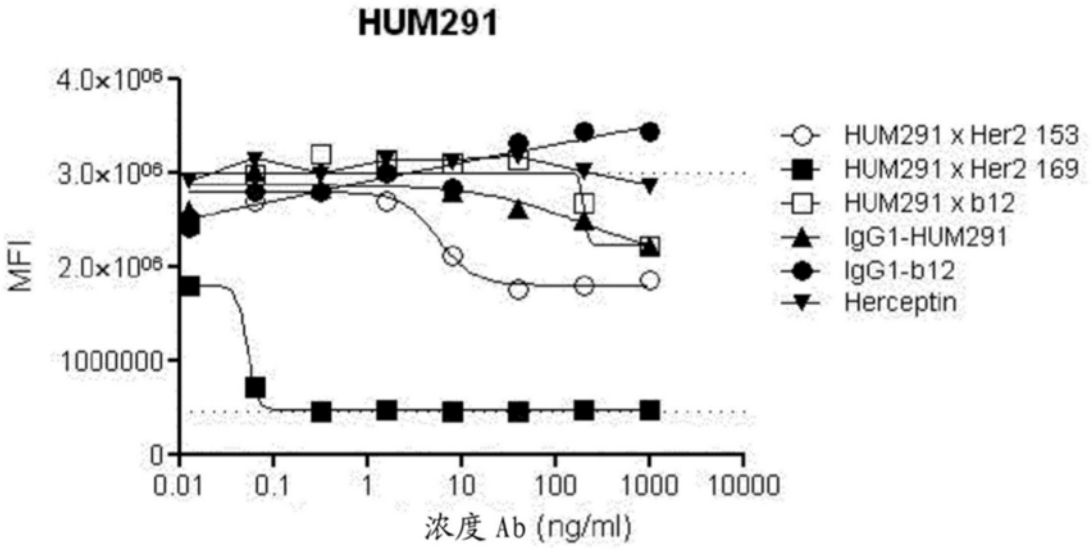

HUM291
4.0×10^06
3.0×10^06
2.0×10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
HUM291 x Her2 153
HUM291 x Her2 169
HUM291 x b12
IgG1-HUM291
IgG1-b12
Herceptin

图11B

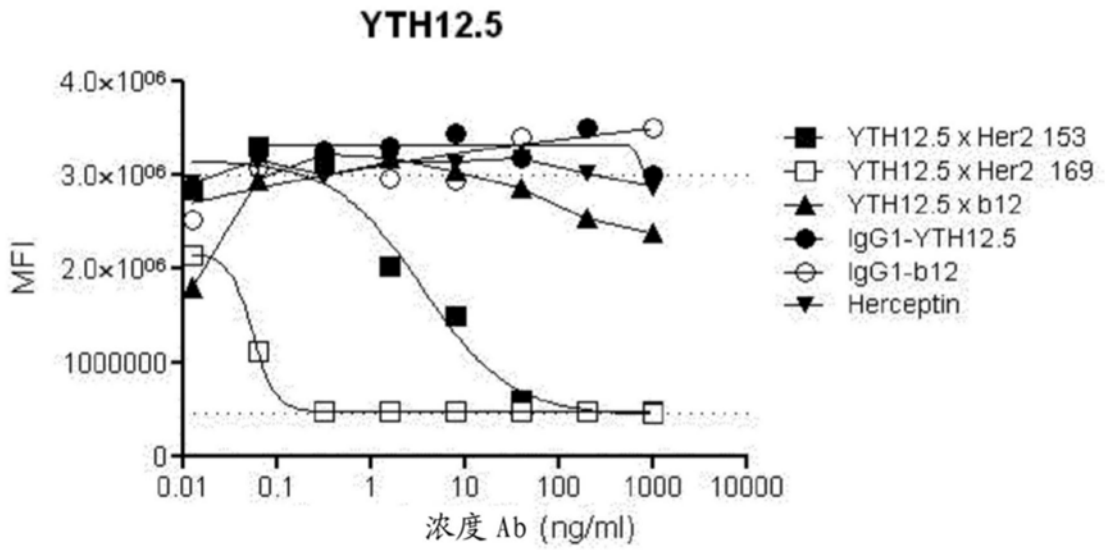

YTH12.5
4.0×10^06
3.0×10^06
2.0×10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
YTH12.5 x Her2 153
YTH12.5 x Her2 169
YTH12.5 x b12
IgG1-YTH12.5
IgG1-b12
Herceptin

图11C

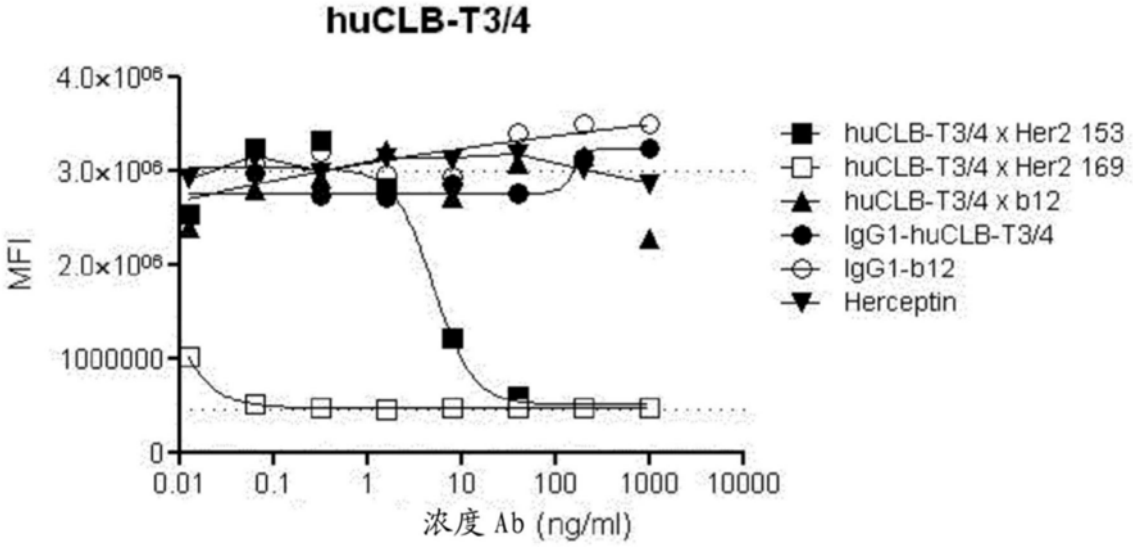

huCLB-T3/4
4.0×10^06
3.0×10^06
2.0×10^06
1000000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
huCLB-T3/4 x Her2 153
huCLB-T3/4 x Her2 169
huCLB-T3/4 x b12
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-b12
Herceptin

图11D

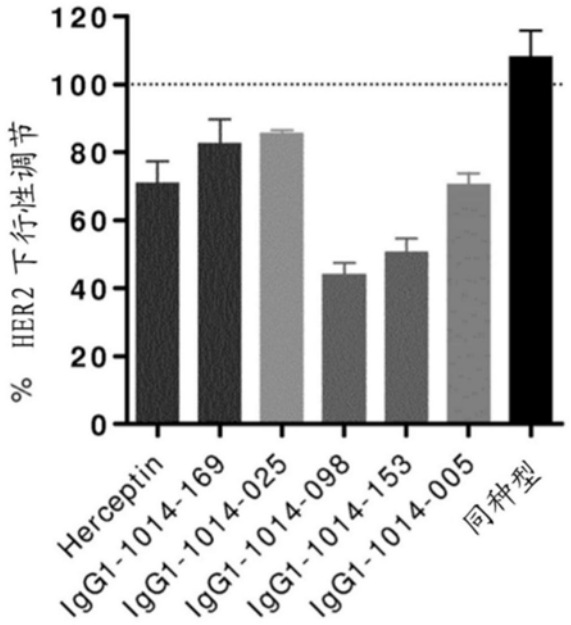

120
100
80
60
40
20
0
% HER2 下行性调节
Herceptin
IgG1-1014-169
IgG1-1014-025
IgG1-1014-098
IgG1-1014-153
IgG1-1014-005
同种型

图12

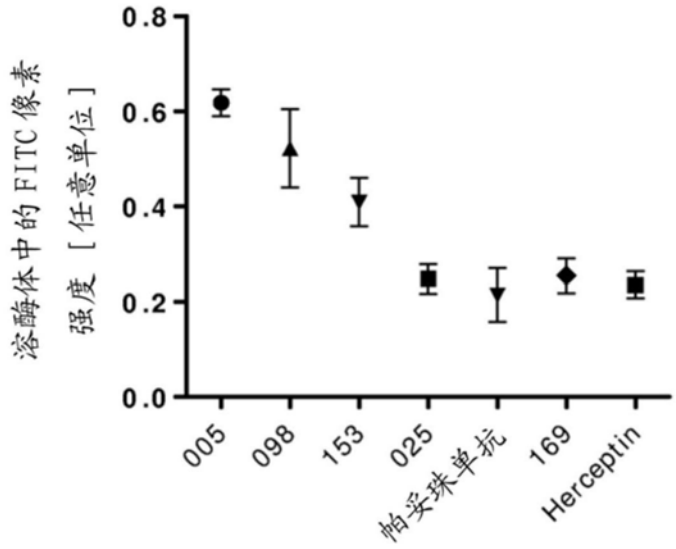

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
溶酶体中的 FITC 像素
强度 [任意单位]
005
098
153
025
帕妥珠单抗
169
Herceptin

图13

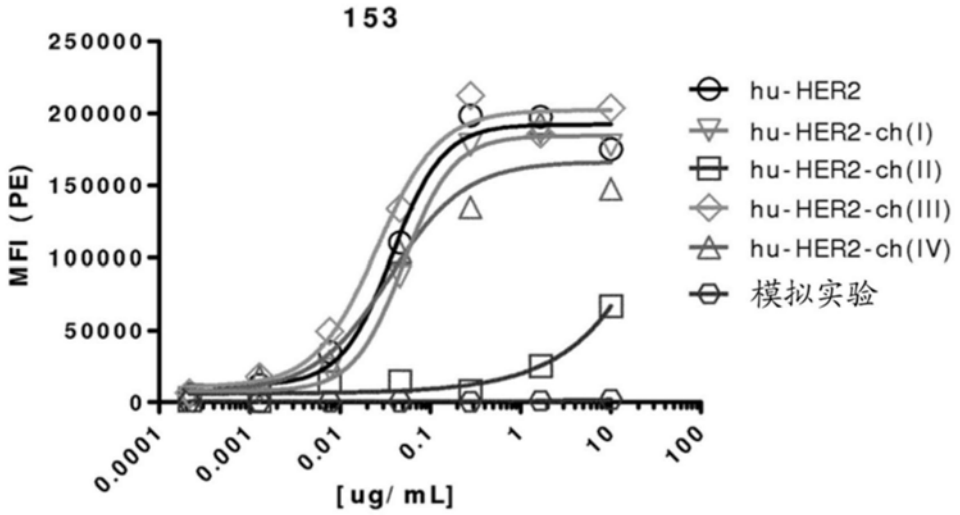

153
250000
200000
150000
100000
50000
0
MFI (PE)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[ug/ mL]
hu-HER2
hu-HER2-ch(I)
hu-HER2-ch(II)
hu-HER2-ch(III)
hu-HER2-ch(IV)
模拟实验

图14

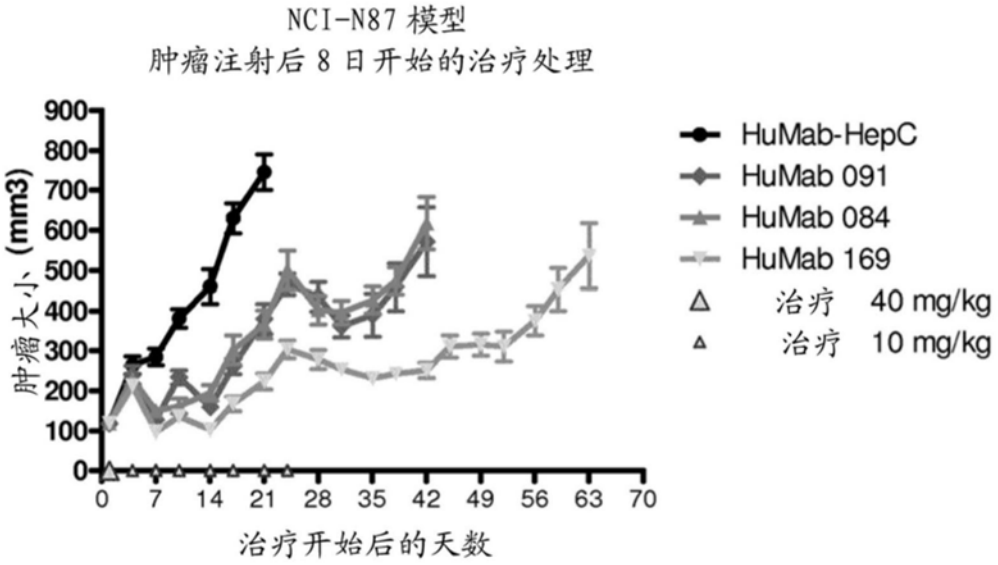

NCI-N87 模型
肿瘤注射后 8 日开始的治疗处理
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
肿瘤大小 (mm3)
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
治疗开始后的天数
HuMab-HepC
HuMab 091
HuMab 084
HuMab 169
治疗 40 mg/kg
治疗 10 mg/kg

图15A

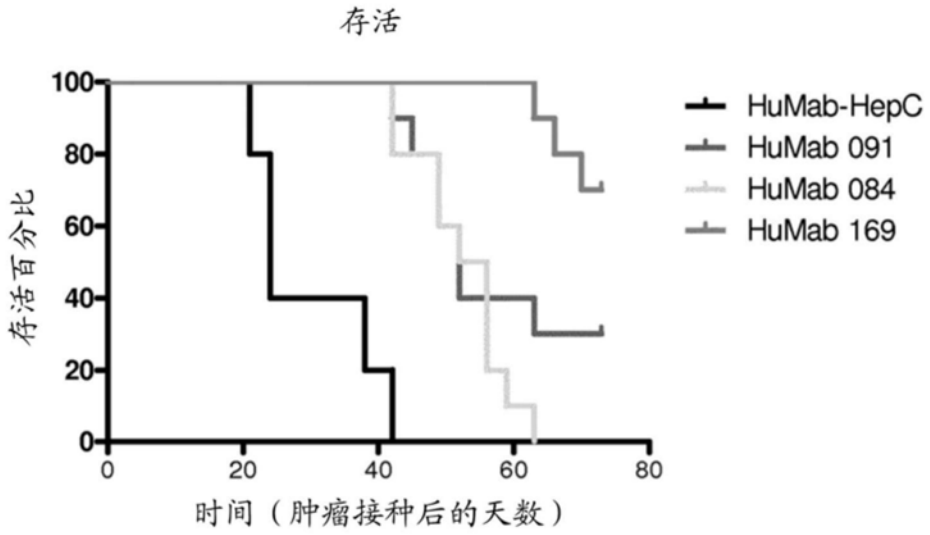

存活
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
20
40
60
80
时间（肿瘤接种后的天数）
HuMab-HepC
HuMab 091
HuMab 084
HuMab 169

图15B

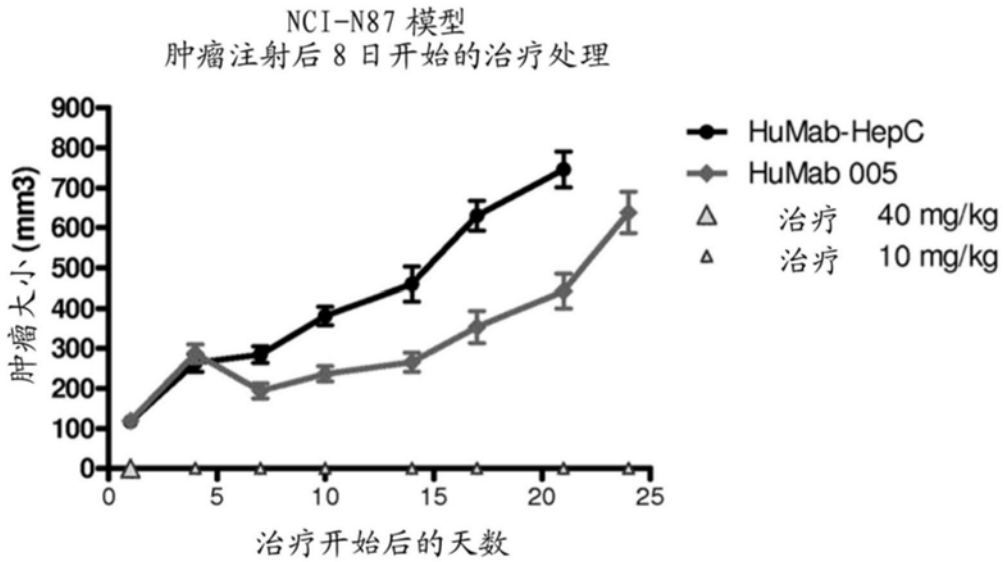

NCI-N87 模型
肿瘤注射后 8 日开始的治疗处理
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
肿瘤大小 (mm3)
0
5
10
15
20
25
治疗开始后的天数
HuMab-HepC
HuMab 005
治疗 40 mg/kg
治疗 10 mg/kg

图15C

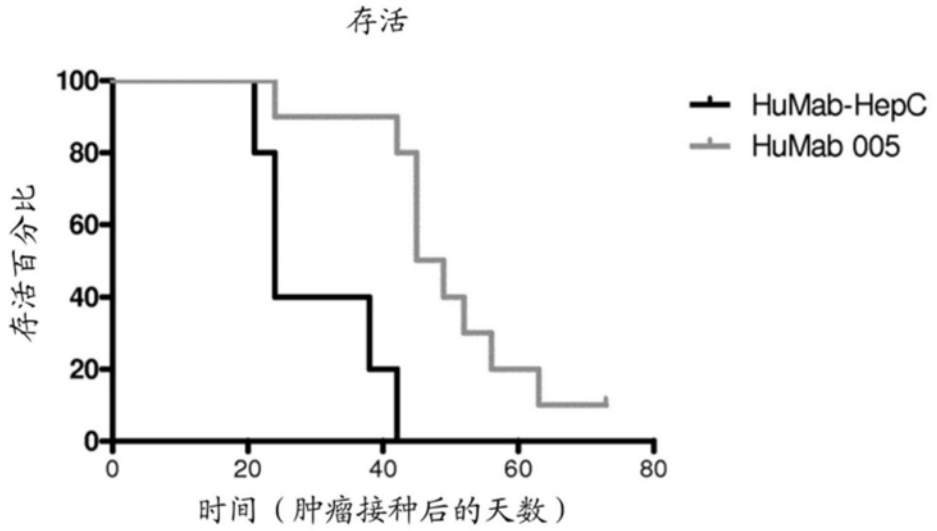

存活
100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
20
40
60
80
时间（肿瘤接种后的天数）
HuMab-HepC
HuMab 005

图15D

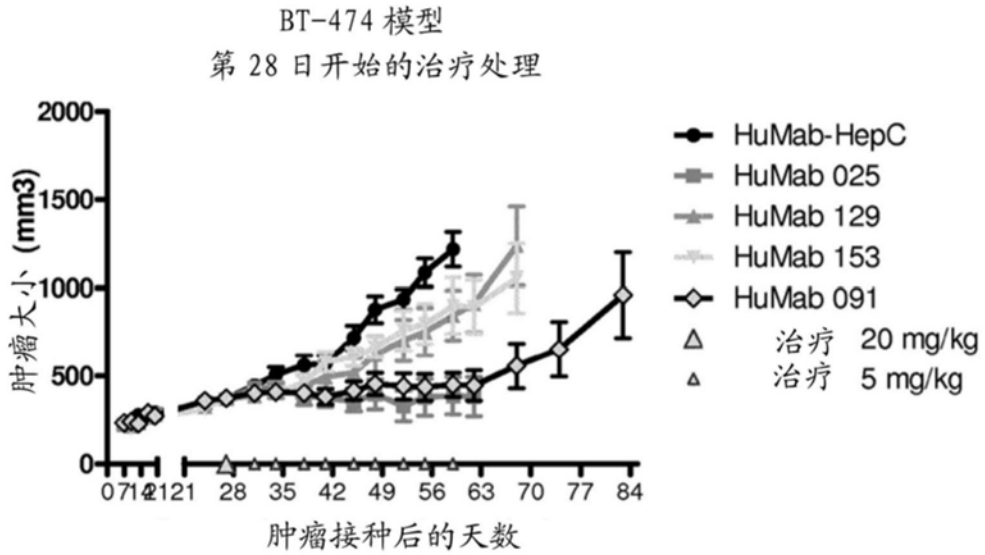

BT-474 模型
第 28 日开始的治疗处理
2000
1500
1000
500
0
肿瘤大小 (mm3)
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84
肿瘤接种后的天数
HuMab-HepC
HuMab 025
HuMab 129
HuMab 153
HuMab 091
治疗 20 mg/kg
治疗 5 mg/kg

图16A

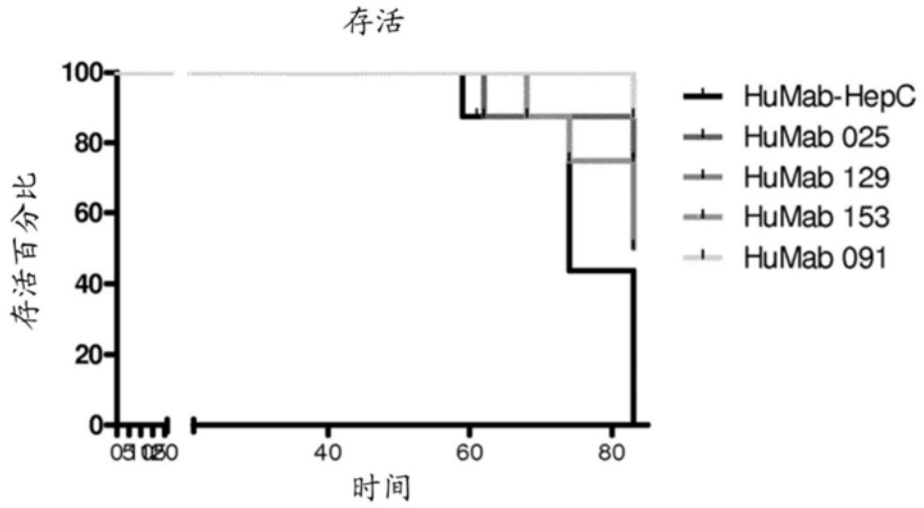

存活
100
80
60
40
20
0
存活百分比
40
60
80
时间
HuMab-HepC
HuMab 025
HuMab 129
HuMab 153
HuMab 091

图16B

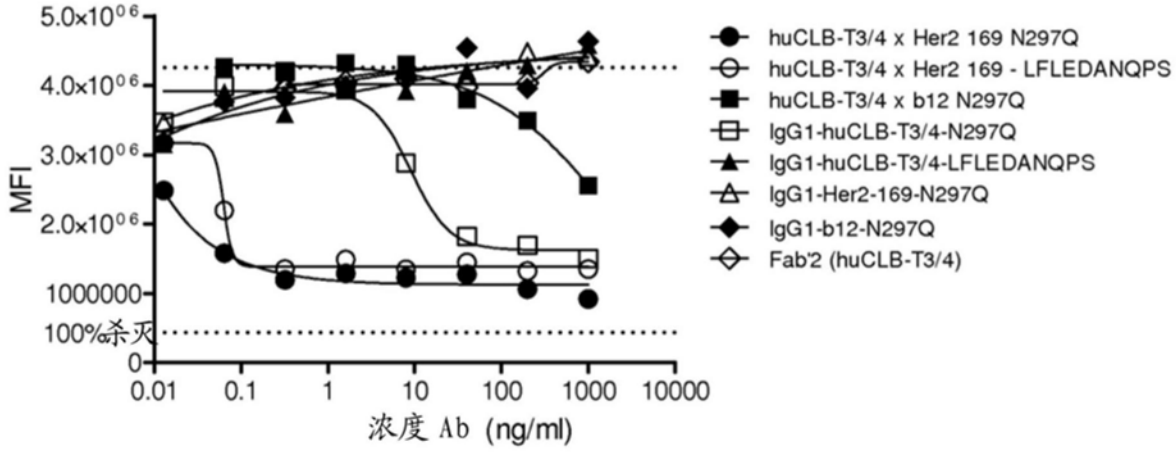

5.0x10^06
4.0x10^06
3.0x10^06
2.0x10^06
1000000
100%杀灭
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
huCLB-T3/4 x Her2 169 N297Q
huCLB-T3/4 x Her2 169 - LFLEDANQPS
huCLB-T3/4 x b12 N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS
IgG1-Her2-169-N297Q
IgG1-b12-N297Q
Fab'2 (huCLB-T3/4)

图17

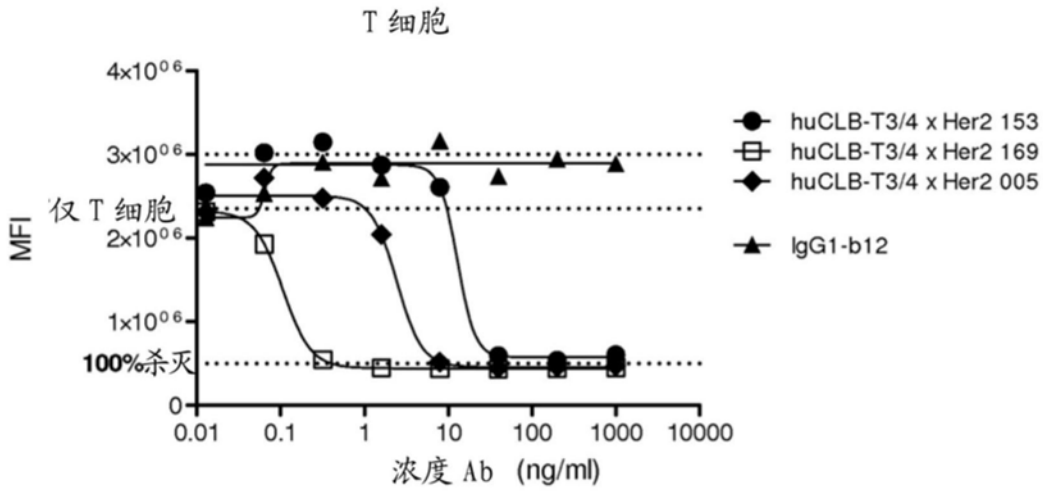

T 细胞
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
MFI
仅 T 细胞
100%杀灭
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
huCLB-T3/4 x Her2 153
huCLB-T3/4 x Her2 169
huCLB-T3/4 x Her2 005
IgG1-b12

图18A

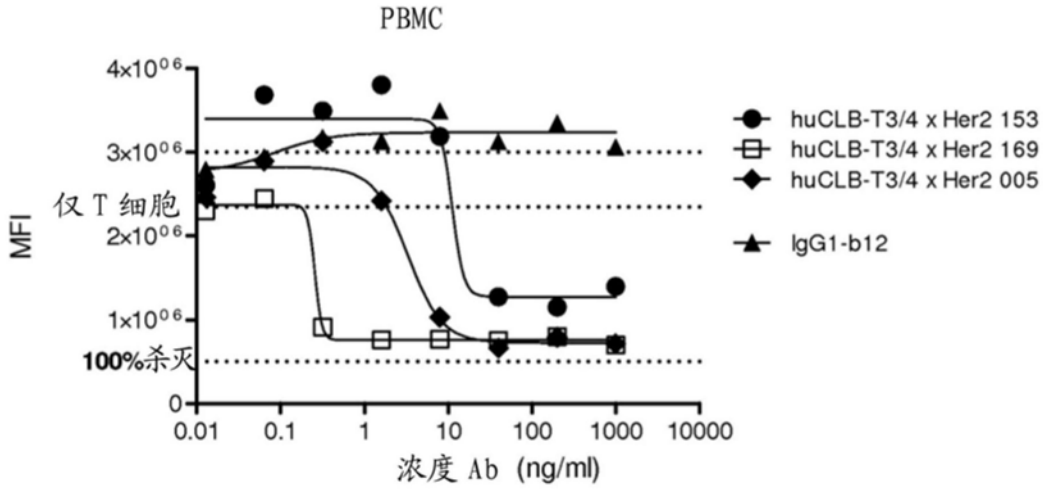

PBMC
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
MFI
仅 T 细胞
100%杀灭
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
huCLB-T3/4 x Her2 153
huCLB-T3/4 x Her2 169
huCLB-T3/4 x Her2 005
IgG1-b12

图18B

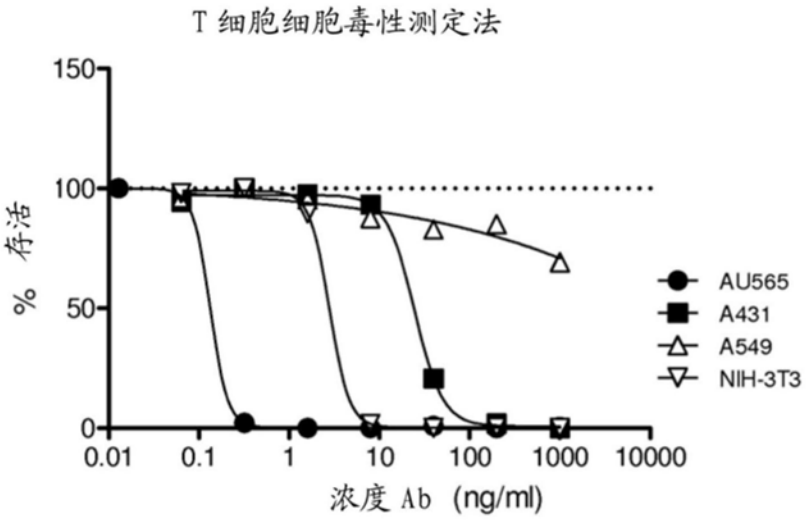

T 细胞细胞毒性测定法
150
100
50
0
% 存活
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
AU565
A431
A549
NIH-3T3

图19

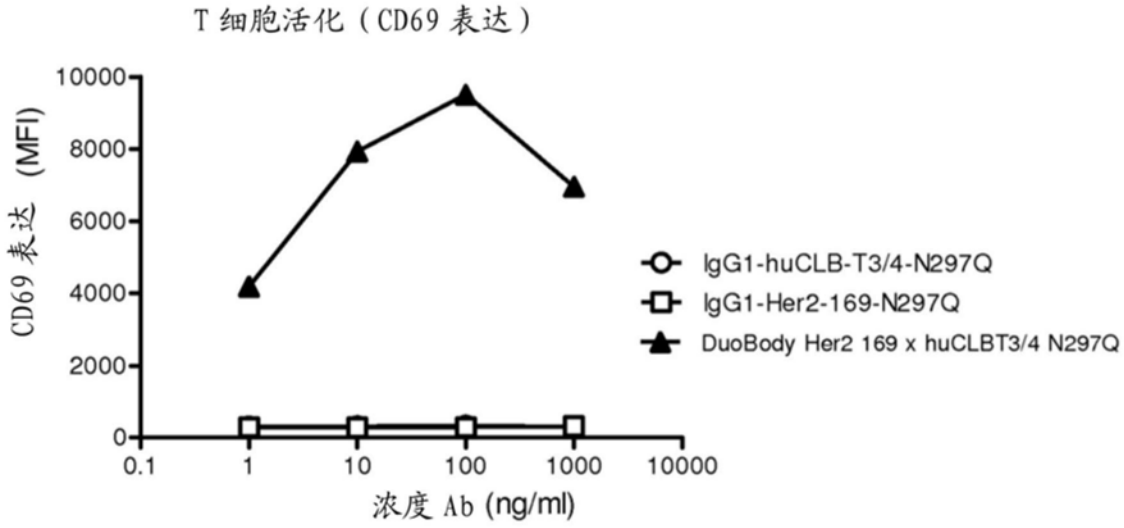

T 细胞活化（CD69 表达）
10000
8000
6000
4000
2000
0
CD69 表达 (MFI)
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-Her2-169-N297Q
DuoBody Her2 169 x huCLBT3/4 N297Q

图20

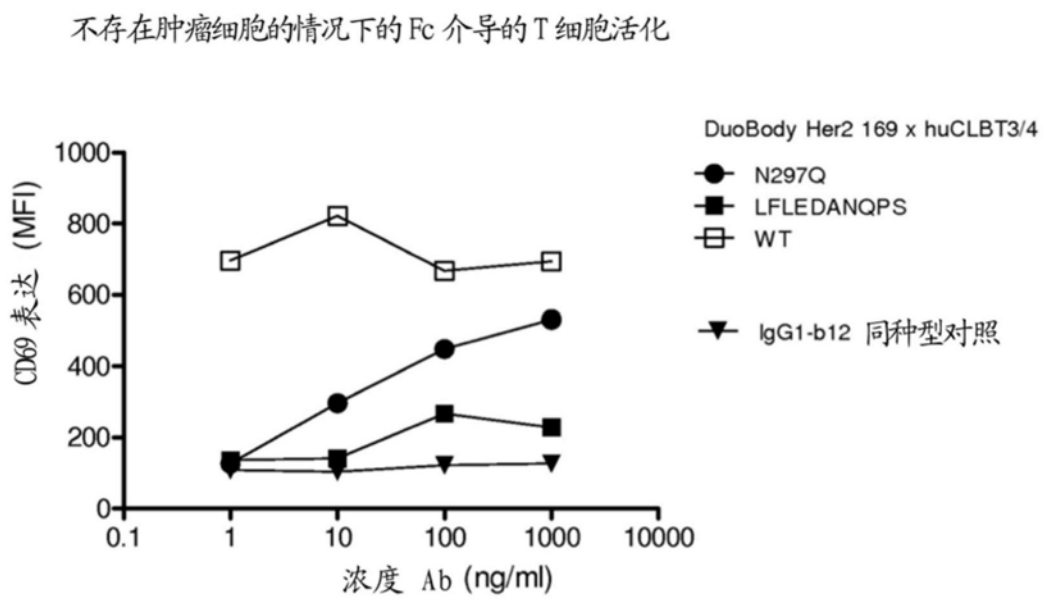

不存在肿瘤细胞的情况下的Fc介导的T细胞活化
DuoBody Her2 169 x huCLBT3/4
N297Q
LFLEDANQPS
WT
IgG1-b12 同种型对照
CD69表达 (MFI)
1000
800
600
400
200
0
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)

图21

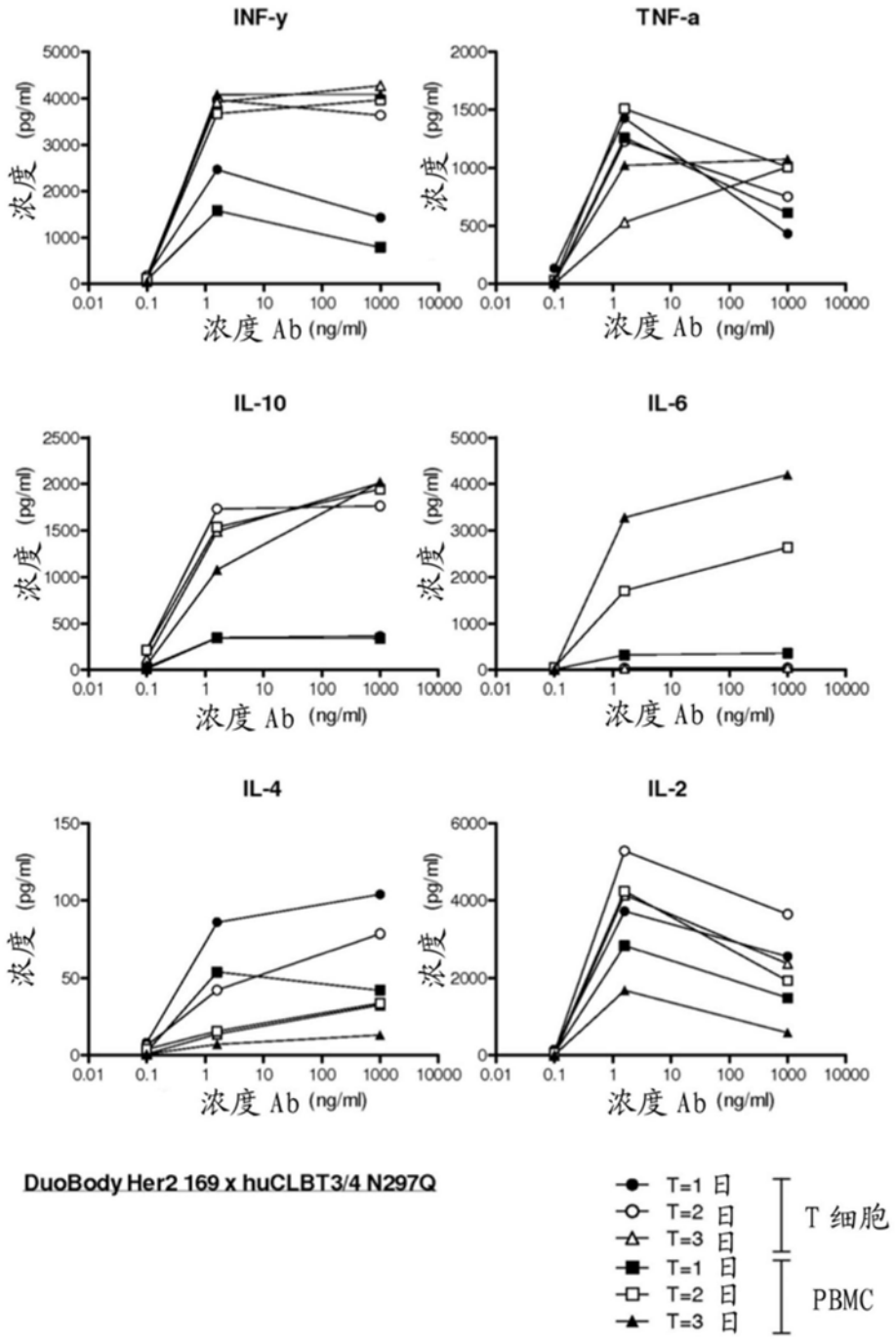

INF-y
TNF-a
IL-10
IL-6
IL-4
IL-2
浓度 (pg/ml)
浓度 Ab (ng/ml)
DuoBody Her2 169 x huCLBT3/4 N297Q
T=1 日
T=2 日
T=3 日
T 细胞
T=1 日
T=2 日
T=3 日
PBMC

图22

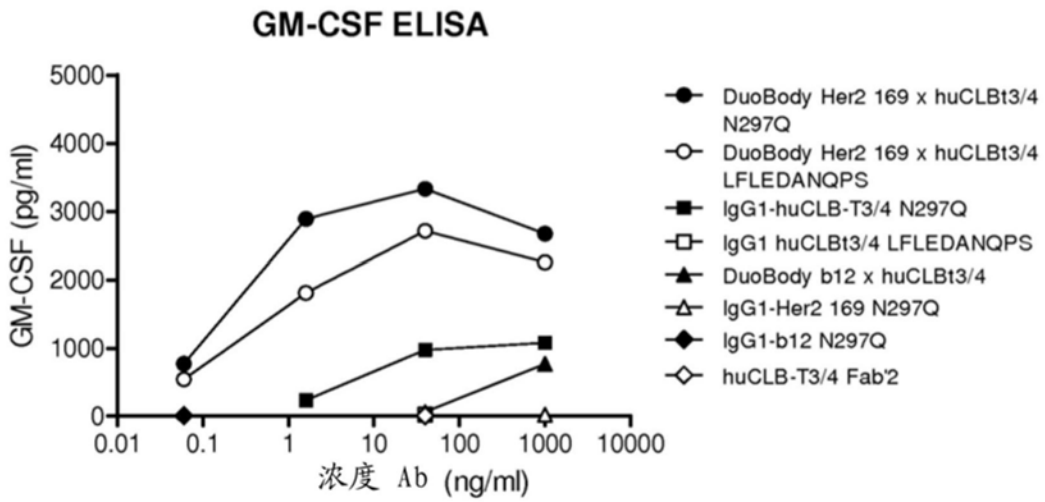

GM-CSF ELISA
GM-CSF (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 Ab (ng/ml)
DuoBody Her2 169 x huCLBt3/4 N297Q
DuoBody Her2 169 x huCLBt3/4 LFLEDANQPS
IgG1-huCLB-T3/4 N297Q
IgG1 huCLBt3/4 LFLEDANQPS
DuoBody b12 x huCLBt3/4
IgG1-Her2 169 N297Q
IgG1-b12 N297Q
huCLB-T3/4 Fab'2

图23

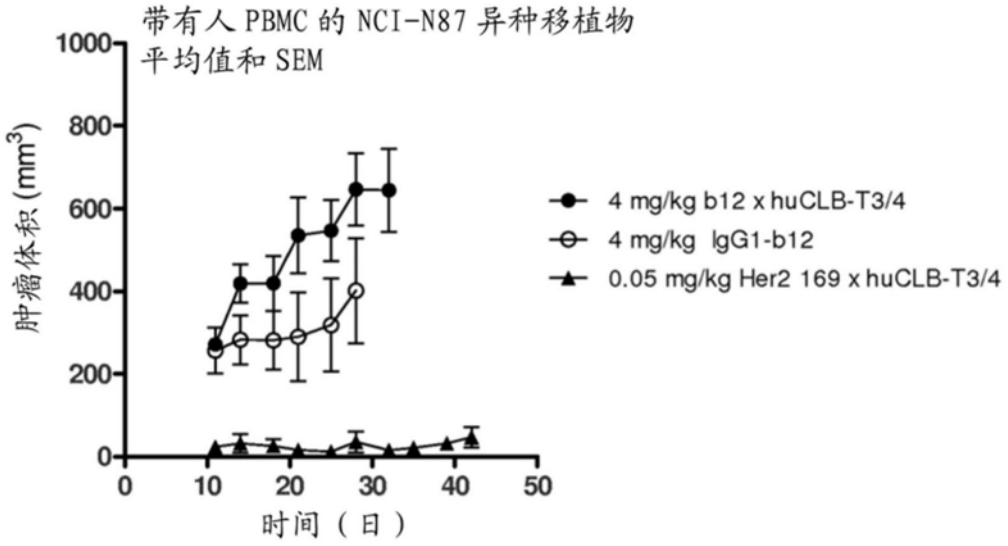

带有人 PBMC 的 NCI-N87 异种移植物
平均值和 SEM
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
时间（日）
4 mg/kg b12 x huCLB-T3/4
4 mg/kg IgG1-b12
0.05 mg/kg Her2 169 x huCLB-T3/4

图24A

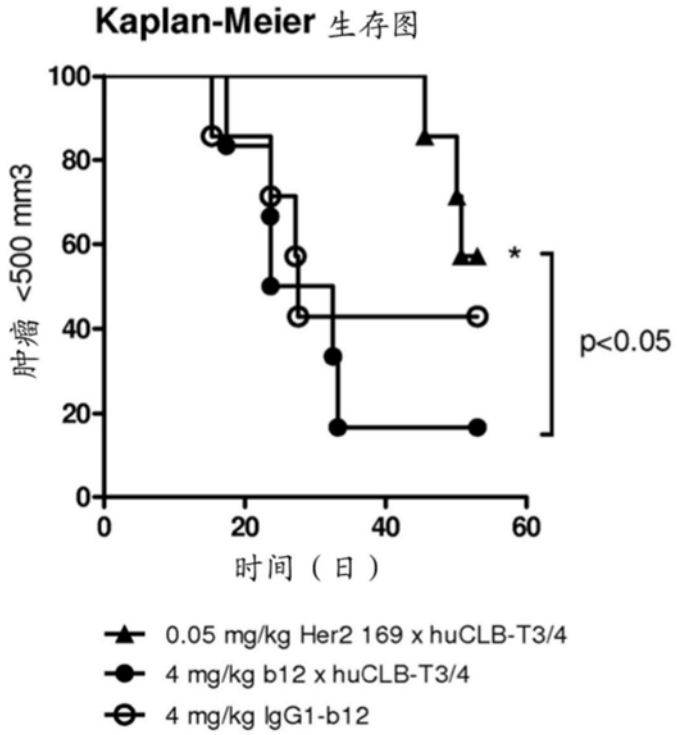

Kaplan-Meier 生存图
肿瘤 <500 mm3
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
时间（日）
*
p<0.05
0.05 mg/kg Her2 169 x huCLB-T3/4
4 mg/kg b12 x huCLB-T3/4
4 mg/kg lgG1-b12

图24B

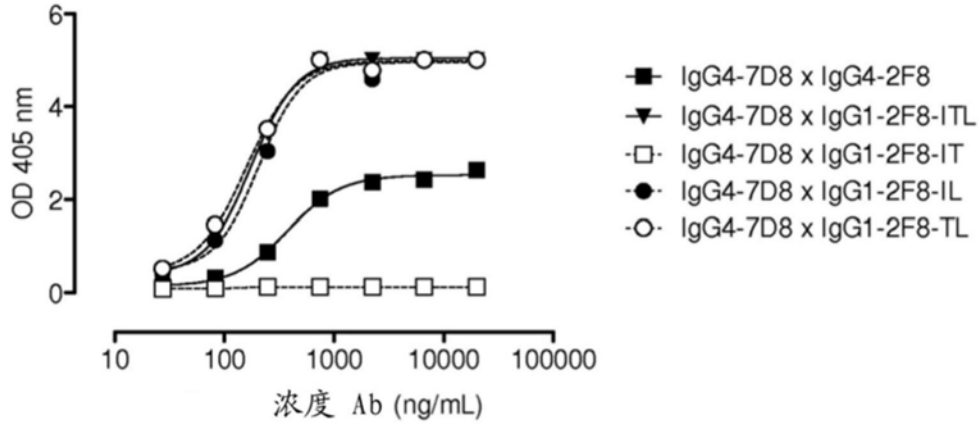

OD 405 nm
6
4
2
0
10
100
1000
10000
100000
浓度 Ab (ng/mL)
IgG4-7D8 x IgG4-2F8
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-ITL
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-IT
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-IL
IgG4-7D8 x IgG1-2F8-TL

图25A

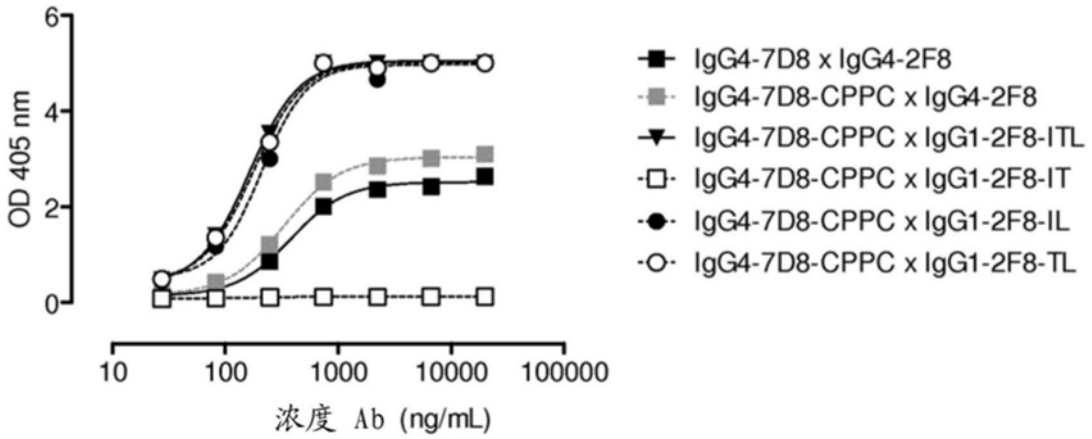

6
4
2
0
OD 405 nm
10
100
1000
10000
100000
浓度 Ab (ng/mL)
IgG4-7D8 x IgG4-2F8
IgG4-7D8-CPPC x IgG4-2F8
IgG4-7D8-CPPC x IgG1-2F8-ITL
IgG4-7D8-CPPC x IgG1-2F8-IT
IgG4-7D8-CPPC x IgG1-2F8-IL
IgG4-7D8-CPPC x IgG1-2F8-TL

图25B

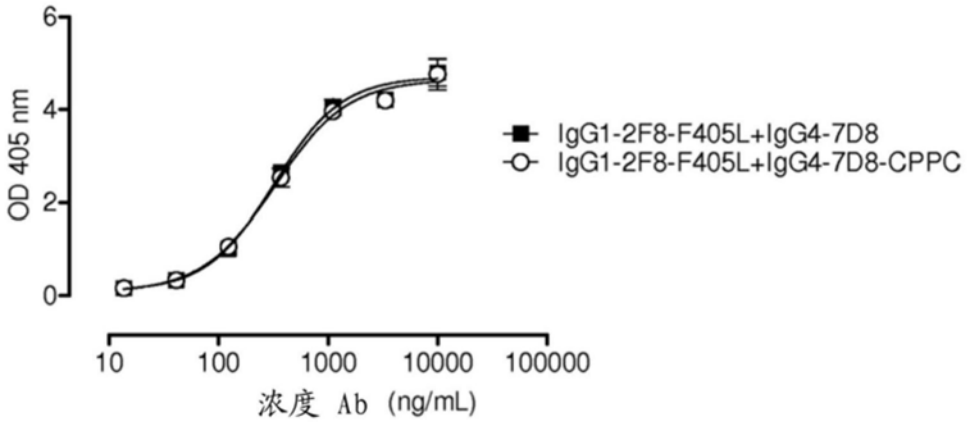

6
4
2
0
OD 405 nm
10
100
1000
10000
100000
浓度 Ab (ng/mL)
IgG1-2F8-F405L+IgG4-7D8
IgG1-2F8-F405L+IgG4-7D8-CPPC

图25C

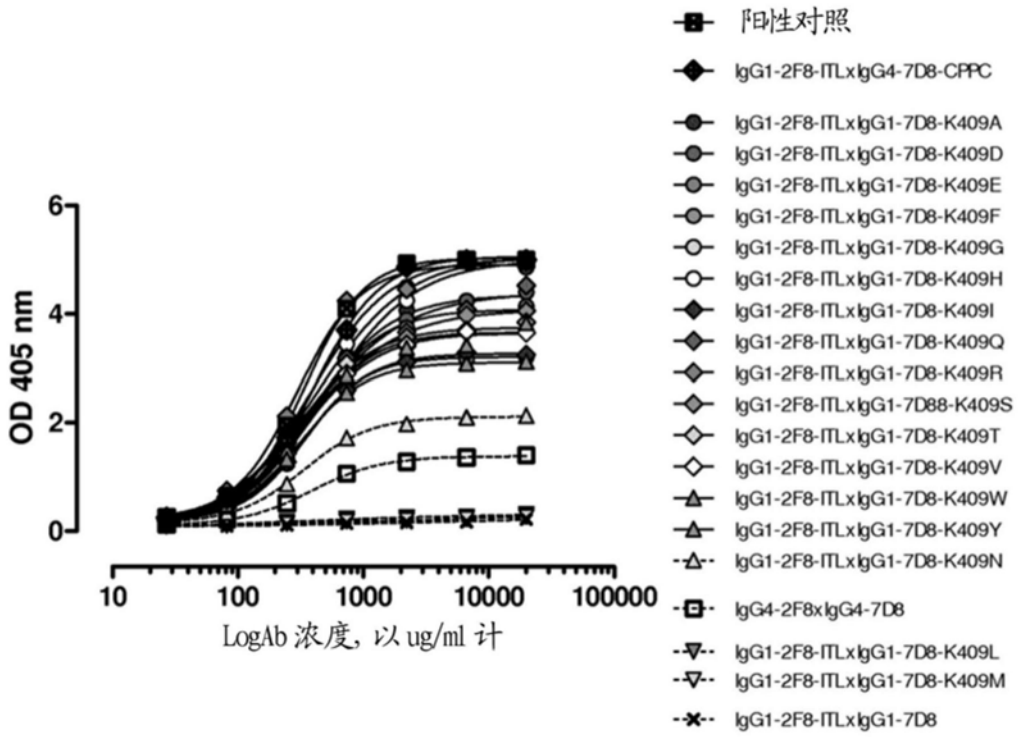

OD 405 nm
6
4
2
0
10
100
1000
10000
100000
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409A
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409D
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409E
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409F
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409G
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409I
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Q
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D88-K409S
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409T
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409V
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409W
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Y
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409N
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409L
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409M
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8

图26A

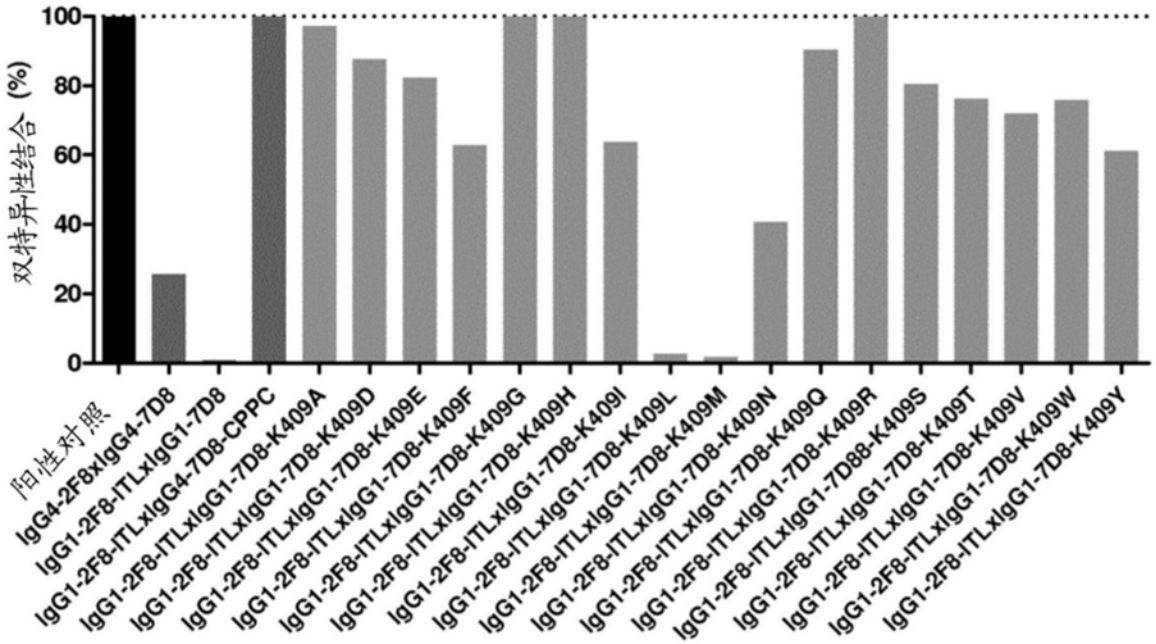

双特异性结合 (%)
100
80
60
40
20
0
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8
IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409A
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409D
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409E
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409F
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409G
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409I
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409L
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409M
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409N
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Q
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D88-K409S
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409T
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409V
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409W
IgG1-2F8-ITLxIgG1-7D8-K409Y

图26B

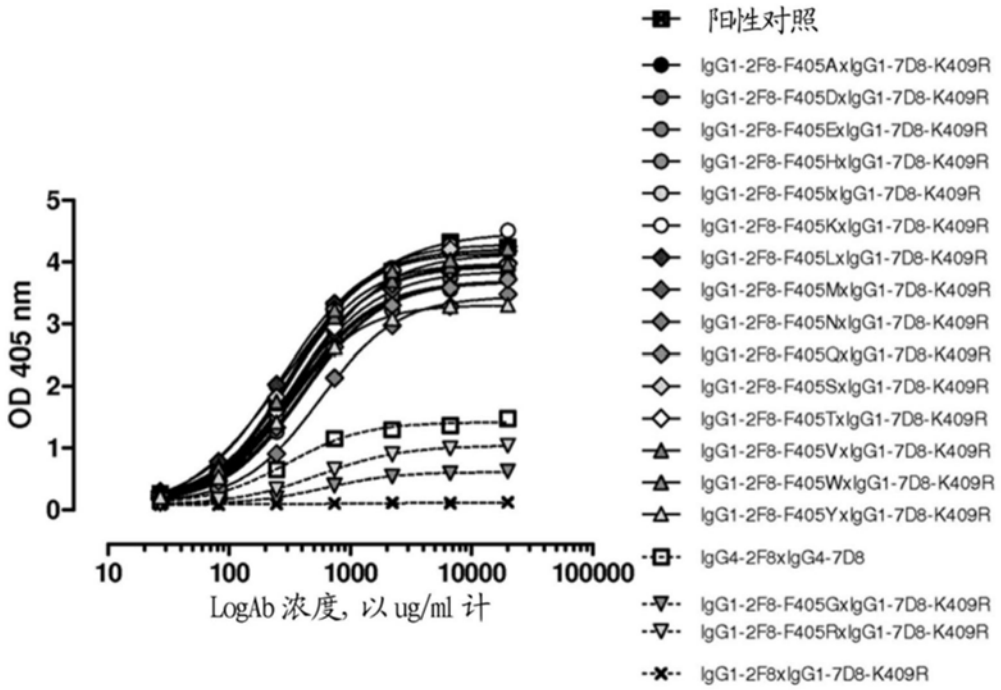

OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
10
100
1000
10000
100000
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG1-2F8-F405AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405YxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-F405GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R

图27A

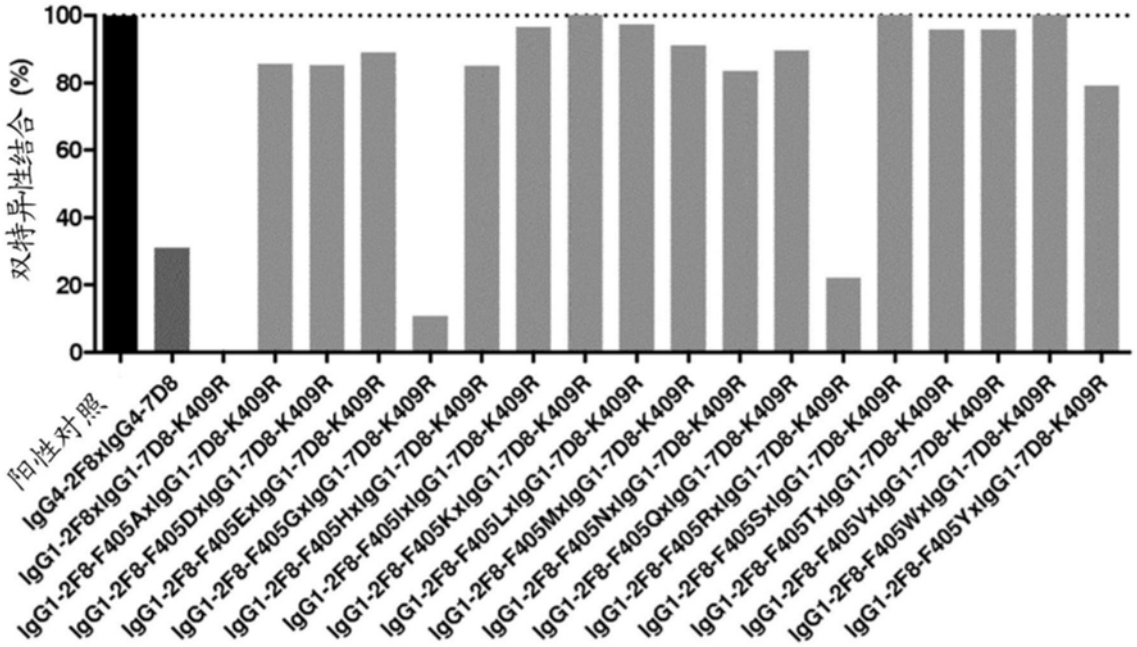

双特异性结合 (%)
100
80
60
40
20
0
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-F405YxIgG1-7D8-K409R

图27B

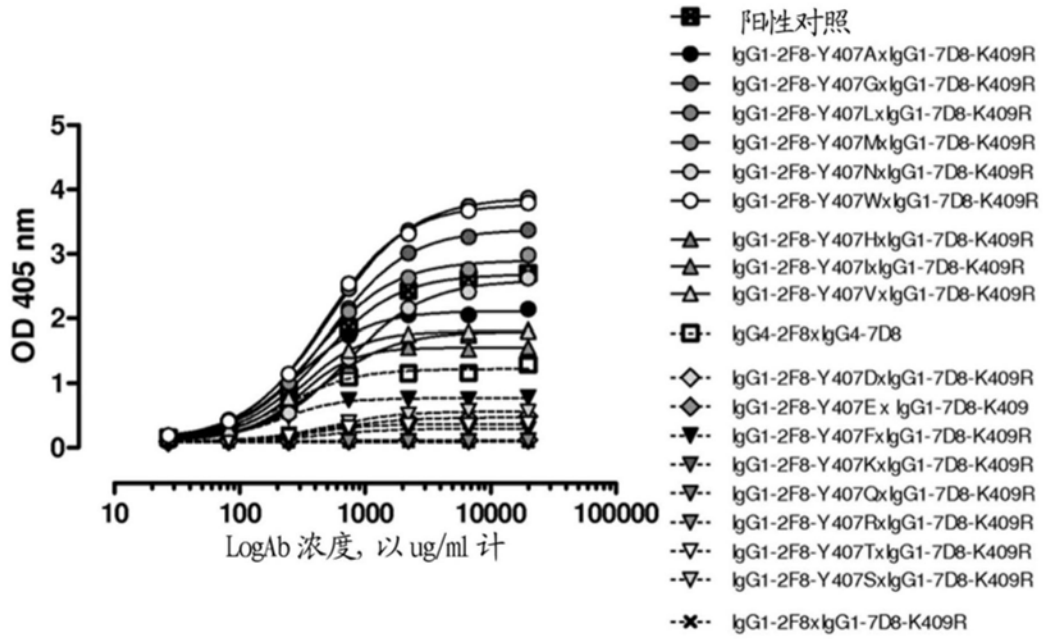

OD 405 nm
5
4
3
2
1
0
10
100
1000
10000
100000
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG1-2F8-Y407AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407VxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-Y407DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407E x IgG1-7D8-K409
IgG1-2F8-Y407FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R

图28A

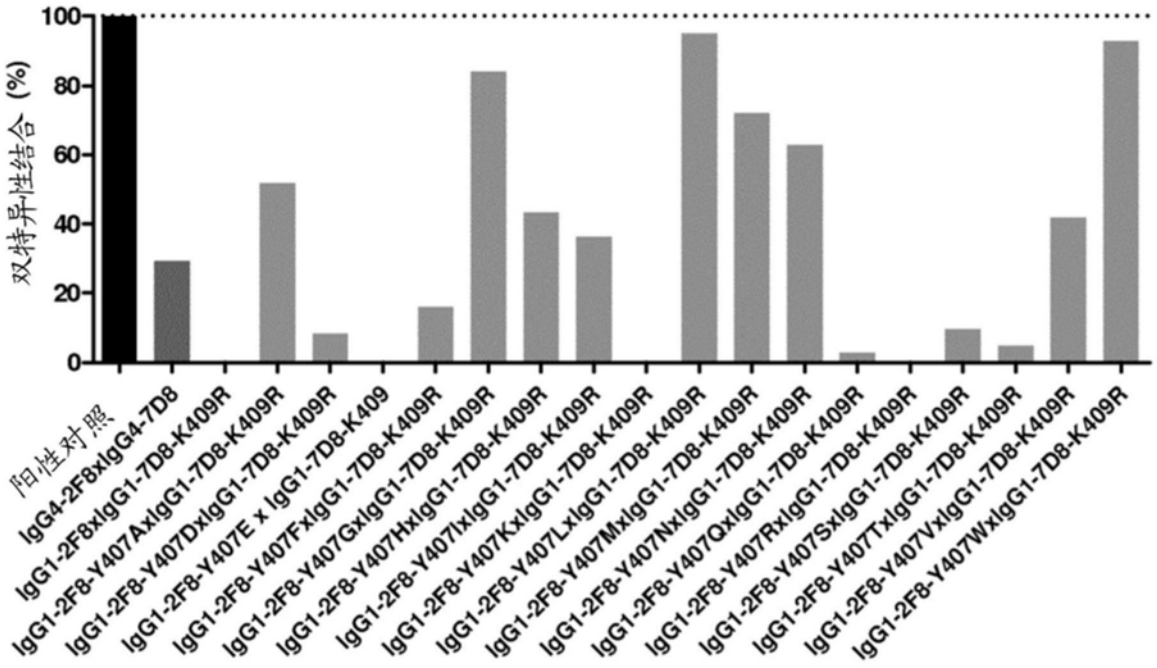

双特异性结合 (%)
100
80
60
40
20
0
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407E x IgG1-7D8-K409
IgG1-2F8-Y407FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-Y407WxIgG1-7D8-K409R

图28B

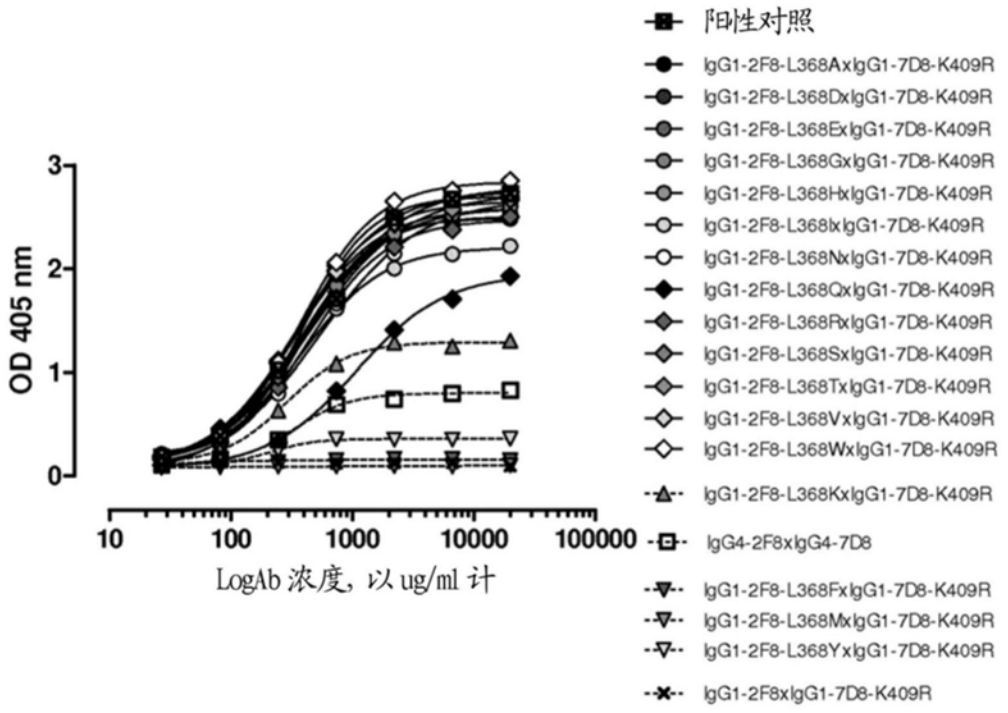

OD 405 nm
3
2
1
0
10
100
1000
10000
100000
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG1-2F8-L368AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368KxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-L368FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368YxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R

图29A

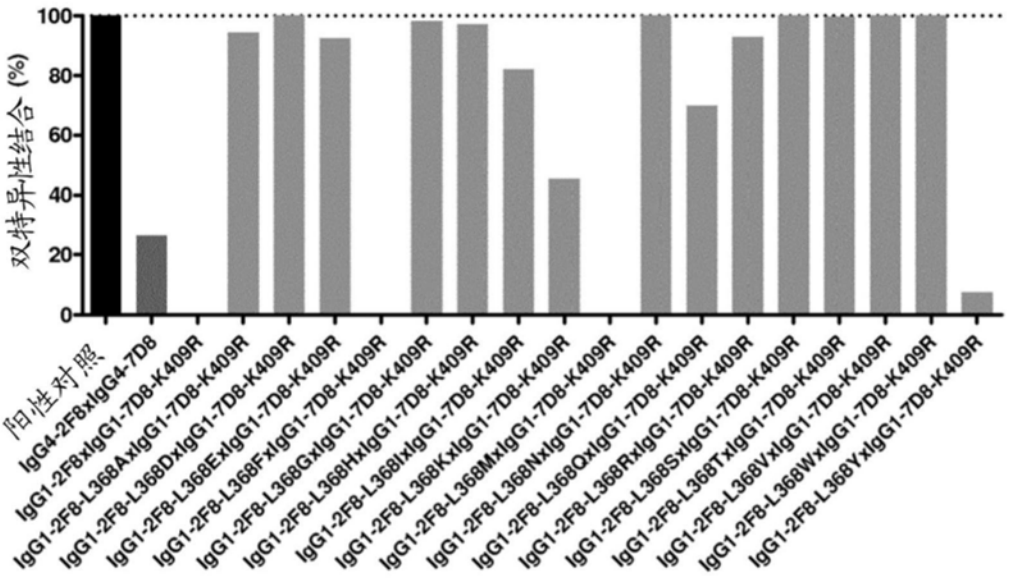

双特异性结合 (%)
100
80
60
40
20
0
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-L368YxIgG1-7D8-K409R

图29B

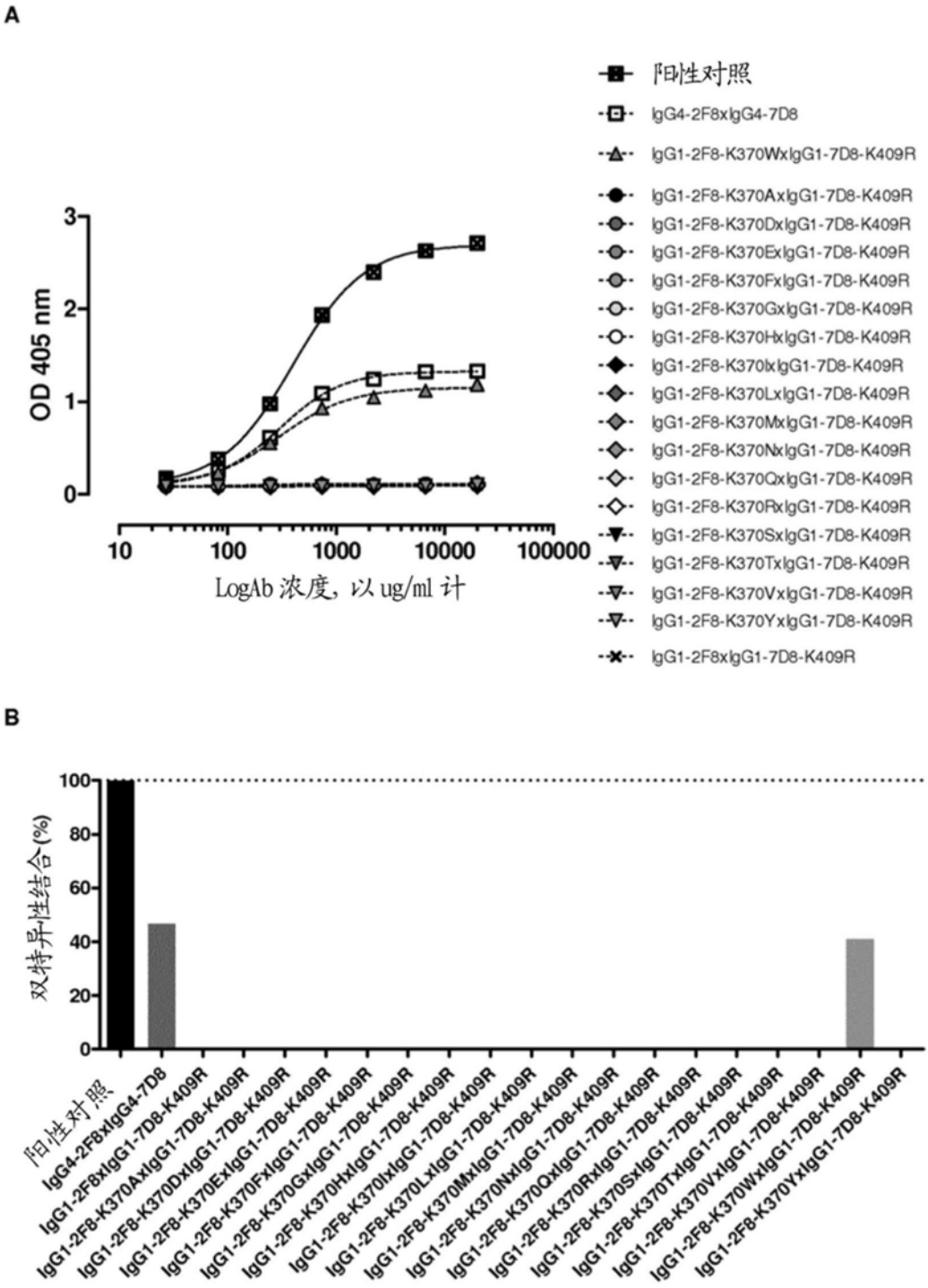

A
OD 405 nm
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-K370WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370DxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-K370YxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
B
双特异性结合(%)

图30

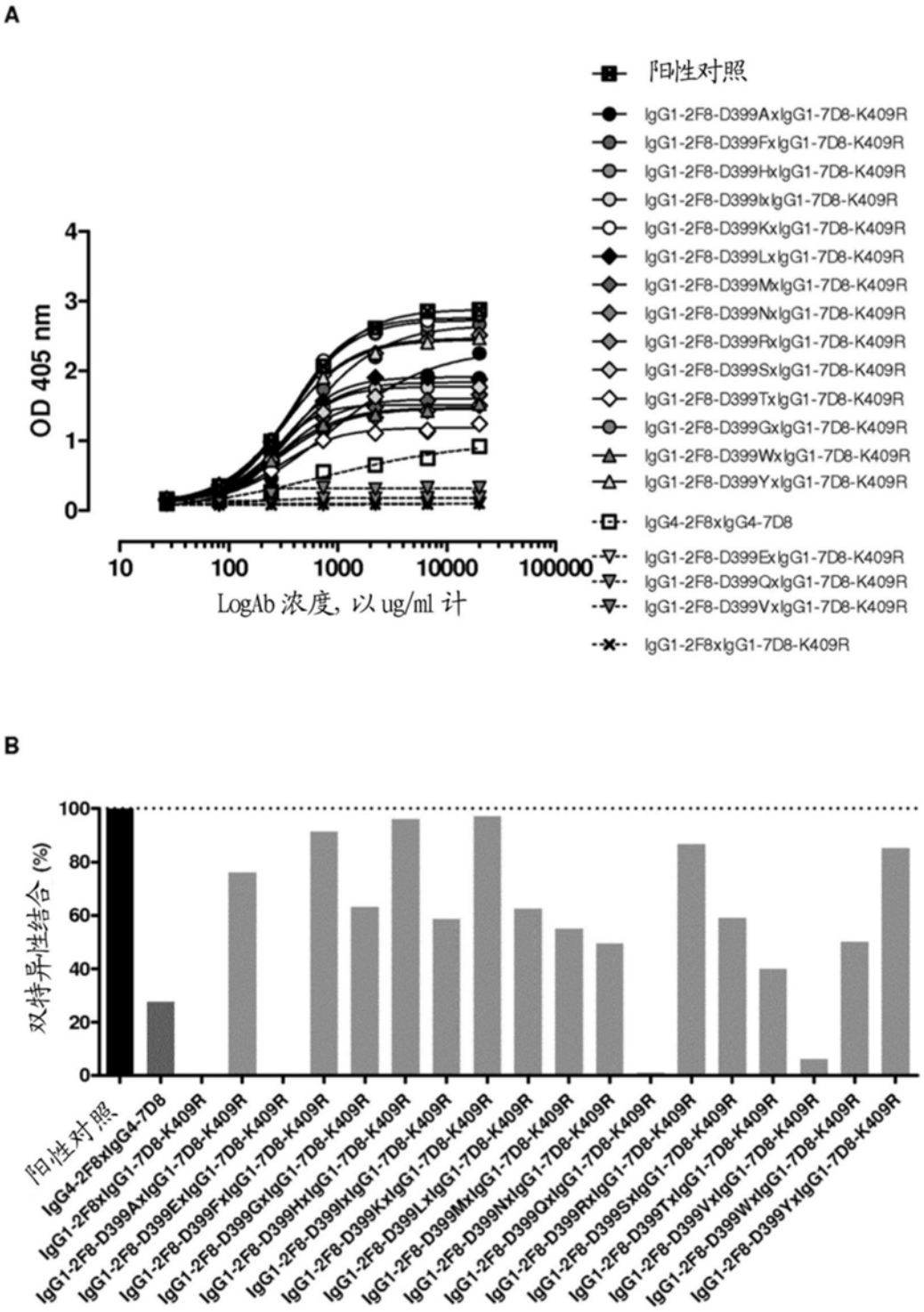

A
OD 405 nm
LogAb 浓度，以 ug/ml 计
阳性对照
IgG1-2F8-D399AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399YxIgG1-7D8-K409R
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8-D399ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
B
双特异性结合 (%)
阳性对照
IgG4-2F8xIgG4-7D8
IgG1-2F8xIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399AxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399ExIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399FxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399GxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399HxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399IxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399KxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399LxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399MxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399NxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399QxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399RxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399SxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399TxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399VxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399WxIgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-D399YxIgG1-7D8-K409R

图31

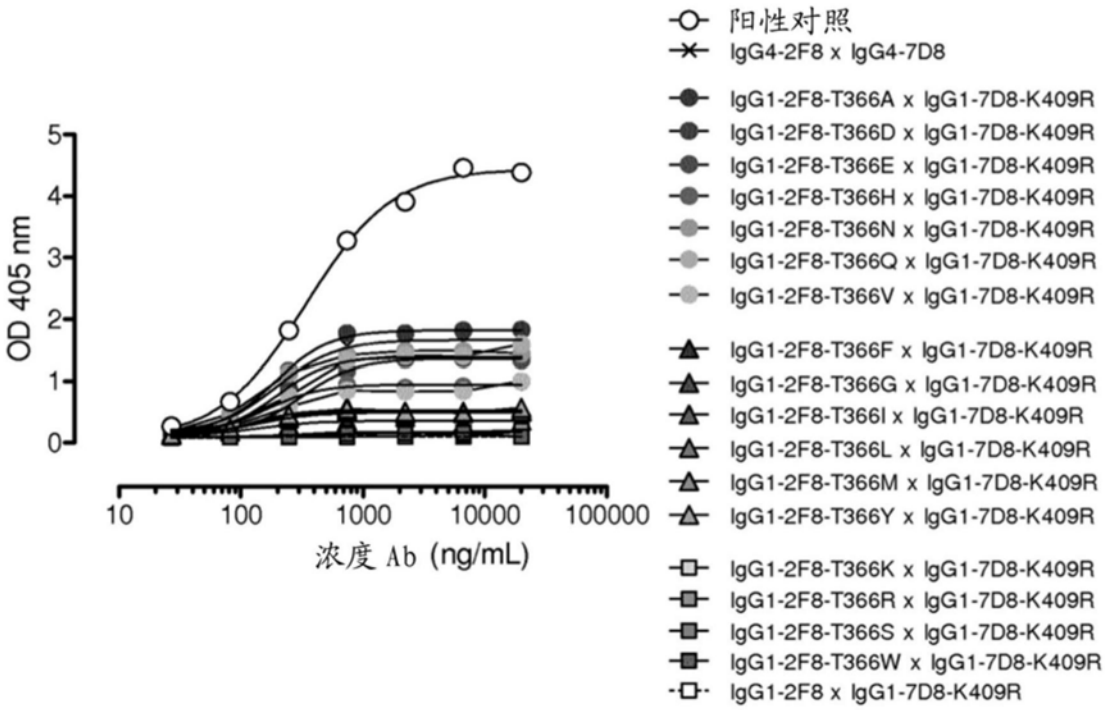

OD 405 nm
0
1
2
3
4
5
10
100
1000
10000
100000
浓度 Ab (ng/mL)
阳性对照
IgG4-2F8 x IgG4-7D8
IgG1-2F8-T366A x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366D x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366E x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366H x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366N x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366Q x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366V x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366F x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366G x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366I x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366L x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366M x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366Y x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366K x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366R x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366S x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8-T366W x IgG1-7D8-K409R
IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R

图32A

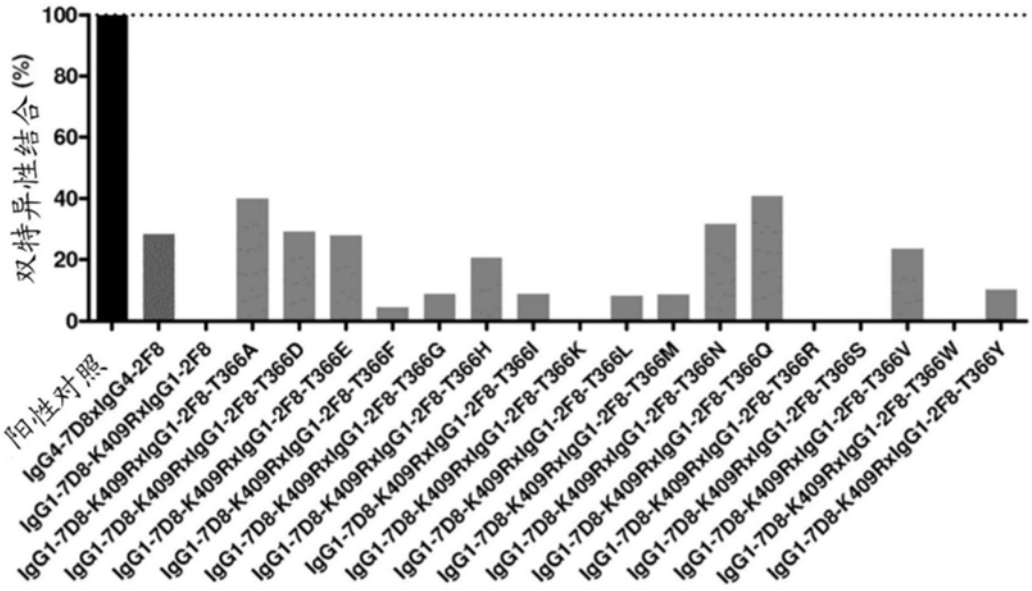

双特异性结合 (%)
0
20
40
60
80
100
阳性对照
IgG4-7D8xIgG4-2F8
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366A
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366D
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366E
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366F
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366G
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366H
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366I
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366K
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366L
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366M
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366N
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366Q
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366R
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366S
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366V
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366W
IgG1-7D8-K409RxIgG1-2F8-T366Y

图32B

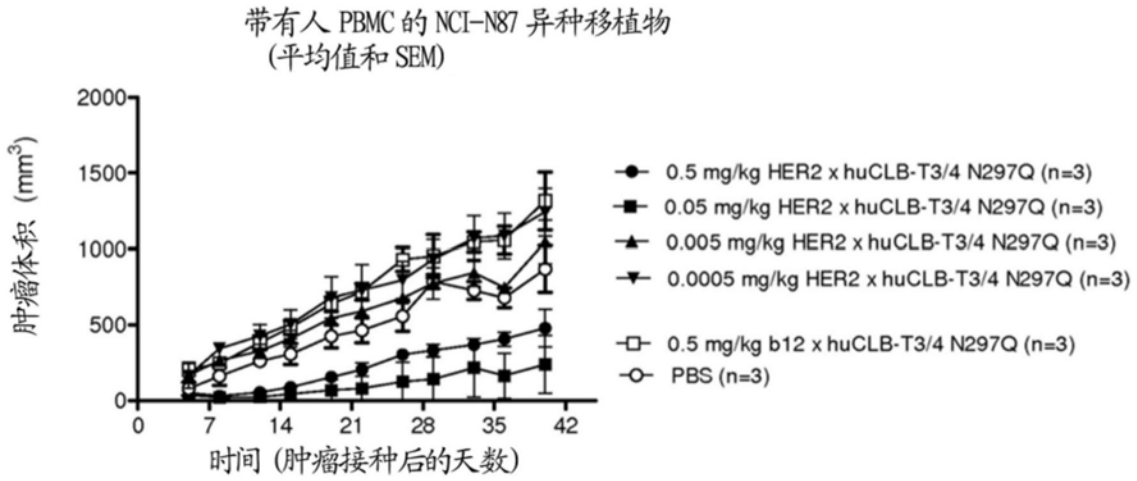

带有人 PBMC 的 NCI-N87 异种移植物
(平均值和 SEM)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
时间 (肿瘤接种后的天数)
0.5 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q (n=3)
0.05 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q (n=3)
0.005 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q (n=3)
0.0005 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q (n=3)
0.5 mg/kg b12 x huCLB-T3/4 N297Q (n=3)
PBS (n=3)

图33A

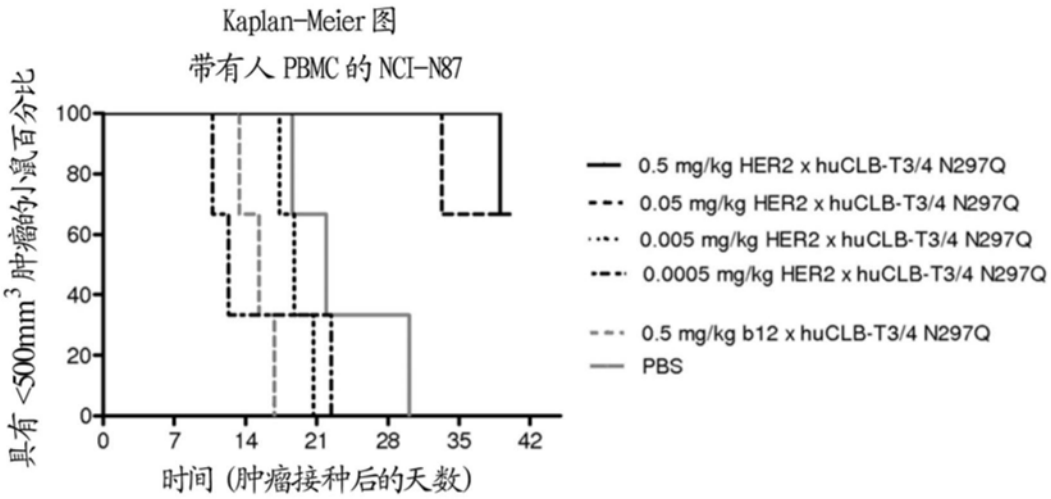

Kaplan-Meier 图
带有人 PBMC 的 NCI-N87
具有 <500mm3 肿瘤的小鼠百分比
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
42
时间 (肿瘤接种后的天数)
0.5 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q
0.05 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q
0.005 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q
0.0005 mg/kg HER2 x huCLB-T3/4 N297Q
0.5 mg/kg b12 x huCLB-T3/4 N297Q
PBS

图33B