



(10) 授权公告号 CN 110475570 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 27

(21) 申请号 201880022875.8

(22) 申请日 2018.02.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110475570 A

(43) 申请公布日 2019.11.19

(30) 优先权数据
1702091.8 2017.02.08 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/053232 2018.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/146230 EN 2018.08.16

(73) 专利权人 米达内克斯股份有限公司
地址 英国爱丁堡

(72) 发明人 H·C·W·海斯 C·B·伍德
T·C·弗拉托

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

专利代理师 尹吉伟

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103097414 A, 2013.05.08
US 2015004164 A1, 2015.01.01
WO 2011154705 A1, 2011.12.15
CN 101133083 A, 2008.02.27
葛慧娟; 杨晓群; 余宏宇. 膜联蛋白A1在恶性肿瘤中的研究进展. 现代生物医学进展. 2010, (第16期), 全文.

李红玲等. 膜联蛋白A1与生殖和代谢性疾病的关系. 《安徽医科大学学报》. 2012, (第08期),

审查员 唐善波

权利要求书2页 说明书32页
序列表45页 附图14页

(54) 发明名称
抗人膜联蛋白A1抗体

(57) 摘要
本发明涉及结合人Anx-A1的分离的特异性结合分子, 其包含互补决定区 (CDR) VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中每个所述CDR具有如下氨基酸序列: VLCDR1具有SEQ ID NO: 1、36或37所示的序列, VLCDR2具有SEQ ID NO: 2所示的序列, VLCDR3具有SEQ ID NO: 3所示的序列, VHCDR1具有SEQ ID NO: 4所示的序列, VHCDR2具有SEQ ID NO: 5所示的序列, 并且VHCDR3具有SEQ ID NO: 6所示的序列; 或者, 对于每个序列, 与其具有至少85%序列一致性的氨基酸序列。所公开的特异性结合分子在治疗上是有用的, 特别是可用于治疗T细胞介导的疾病, 包括自身免疫疾病, 例如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮、强迫症 (OCD) 和OCD相关疾病, 例如焦虑症。

1. 一种分离的抗体或其片段,其结合人Anx-A1,所述抗体或其片段包含互补决定区(CDR)VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中所述CDR的氨基酸序列如下:

VLCDR1的序列如SEQ ID NO:36或37所示;

VLCDR2的序列如SEQ ID NO:2所示;

VLCDR3的序列如SEQ ID NO:3所示;

VHCDR1的序列如SEQ ID NO:4所示;

VHCDR2的序列如SEQ ID NO:5所示;和

VHCDR3的序列如SEQ ID NO:6所示。

2. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段是人源化的。

3. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中当所述抗体是单克隆抗体时,所述片段是Fab或F(ab')₂抗体片段或scFv分子。

4. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段与人Anx-A1结合的K_d小于20nM。

5. 如权利要求3所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i) 包含SEQ ID NO:48或49所示的氨基酸序列的轻链可变区,以及包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的重链可变区;或者

(ii) 包含SEQ ID NO:50或51所示的氨基酸序列的轻链可变区,以及包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区。

6. 如权利要求5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i) 包含SEQ ID NO:46或76所示的氨基酸序列的轻链;和

(ii) 包含SEQ ID NO:41或55所示的氨基酸序列的重链。

7. 如权利要求5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

包含SEQ ID NO:44或54所示的氨基酸序列的轻链;和包含SEQ ID NO:41或55所示的氨基酸序列的重链。

8. 含有权利要求1至7中任一项所述的抗体或其片段的制剂,其中所述制剂中与人Anx-A1结合的至少90%的所述抗体或其片段以小于20nM的K_d结合。

9. 一种核酸分子,其包含编码权利要求1至7中任一项所述的抗体或其片段的核苷酸序列。

10. 根据权利要求9所述的核酸分子,其中所述核苷酸序列包含:

编码VLCDR1的SEQ ID NO:65、66、87或88所示的核苷酸序列;

编码VLCDR2的SEQ ID NO:21或67所示的核苷酸序列;

编码VLCDR3的SEQ ID NO:22、68或69所示的核苷酸序列;

编码VHCDR1的SEQ ID NO:23、70或71所示的核苷酸序列;

编码VHCDR2的SEQ ID NO:24或72所示的核苷酸序列;和

编码VHCDR3的SEQ ID NO:25、73或74所示的核苷酸序列;或者,对于每个序列,是对其简并或与其具有至少85%序列一致性的核苷酸序列。

11. 一种包含权利要求9所述的核酸分子的构体。

12. 一种载体,其包含权利要求9所述的核酸分子或权利要求11所述的构体。

13. 一种宿主细胞,其包含权利要求9所述的核酸分子,权利要求11所述的构体或权利

要求12所述的载体。

14. 一种制备权利要求1至7中任一项所述的抗体或其片段的方法,包括:

i) 将权利要求9定义的核酸分子、权利要求11定义的构体或权利要求12定义的载体导入宿主细胞中;

ii) 表达所述核酸分子使得产生所述抗体或其片段;和

iii) 收集所述抗体或其片段。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述抗体或其片段通过纯化收集。

16. 一种抗体或其片段,其通过权利要求14所定义的方法获得。

17. 一种药物组合物,包含权利要求1至7或16中任一项所定义的抗体或其片段或权利要求8所定义的制剂和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

18. 如权利要求17所述的药物组合物,其中所述抗体或其片段如权利要求5至7中任一项所定义。

19. 如权利要求17所述的药物组合物,还包含至少一种第二治疗活性剂。

20. 如权利要求1至7或16中任一项所定义的抗体或其片段、如权利要求8所定义的制剂或如权利要求17至19中任一项所定义的药物组合物在制备治疗自身免疫疾病、动脉粥样硬化、强迫症(OCD)或焦虑症的药物中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述抗体或其片段如权利要求5至7中任一项所定义,或者所述药物组合物如权利要求18所定义。

22. 如权利要求20所述的用途,其中所述自身免疫疾病是类风湿性关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、爱迪生氏病、格雷夫病、硬皮病、多发性肌炎、糖尿病、自身免疫性葡萄膜视网膜炎、溃疡性结肠炎、寻常性天疱疮、炎性肠病、自身免疫性甲状腺炎、葡萄膜炎、贝赛特氏症、Sjögren综合征和牛皮癣。

23. 如权利要求20所述的用途,其中所述焦虑症是创伤后应激障碍、社交焦虑症、广泛性焦虑症、恐慌症或惊恐发作。

抗人膜联蛋白A1抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及结合人膜联蛋白A1 (Anx-A1) 的特异性结合分子,特别是单克隆抗体及其片段,以及它们在治疗某些疾病中的用途。本发明还涉及编码本发明的特异性结合分子的核酸分子等,以及包含特异性结合分子的制剂和组合物。

背景技术

[0002] 近年来,许多研究小组已经证明Anx-A1在先天和适应性免疫系统两者的多种细胞类型中发挥稳态作用。例如,已显示Anx-A1对先天免疫系统的细胞如中性粒细胞和巨噬细胞施加稳态控制,并且还通过调节T细胞受体(TCR) 信号传导的强度在T细胞中发挥作用(D'Acquisto等,Blood 109:1095-1102,2007)。

[0003] 高水平的Anx-A1降低T细胞活化的阈值并促进CD4+T细胞分化为 T_H1 和 T_H17 细胞。相反,已经发现Anx-A1缺陷小鼠的T细胞显示出受损的活化并且增加向 T_H2 细胞的分化(D'Acquisto等人,Eur.J.Immunol.37:3131-3142,2007)。基于使用特异性结合分子(例如抗体)靶向Anx-A1,这些发现已导致针对许多疾病(特别是T细胞介导的疾病)的治疗的开发(参见例如,WO 2010/064012、WO 2011/154705和WO 2013/088111)。通过以这种方式靶向Anx-A1,T细胞活性水平降低,这缓解以过度T细胞活性为特征的疾病的症状,特别是自身免疫疾病。

[0004] 已知四种人Anx-A1转录变体:ANXA1-002、ANXA1-003、ANXA1-004和ANXA1-006,其通过Anx-A1基因的可变剪接获得。ANXA1-002和ANXA1-003编码Anx-A1的全长版本;由于可变剪接,ANXA1-002和ANXA1-003 mRNA转录物具有不同长度,但相同的蛋白质由每个(SEQ ID NO:10和11) 编码。由ANXA1-004(SEQ ID NO:12) 和ANXA1-006(SEQ ID NO:13) 编码的蛋白对应于全长Anx-A1的片段。

[0005] 本发明的发明人已经鉴定了以高亲和力结合人Anx-A1的单克隆抗体,因此能够特异性地抑制T细胞活化。有利地,该抗体能够抑制T细胞活化而不引起任何不利的细胞毒性作用。该抗体可用于治疗许多病症,包括T细胞介导的疾病,例如自身免疫疾病和移植宿主病、强迫症(OCD) 和OCD相关疾病。

[0006] 如本领域技术人员已知的,抗体是包含四条多肽链的蛋白:两条重链和两条轻链。通常,重链彼此相同并且轻链彼此相同。轻链比重链短(因此更轻)。重链包含四个或五个结构域:可变(V_H) 结构域位于N-末端,然后是三个或四个恒定结构域(从N-末端到C-末端分别为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和(如果存在) C_{H4})。轻链包含两个结构域:可变(V_L) 结构域位于N-末端,并且恒定(C_L) 结构域位于C-末端。在重链中,非结构化铰链区位于 C_{H1} 和 C_{H2} 结构域之间。抗体的两条重链通过铰链区中存在的半胱氨酸残基之间形成的二硫键连接,并且每条重链分别通过 C_{H1} 和 C_L 结构域中存在的半胱氨酸残基之间的二硫键与一条轻链连接。

[0007] 在哺乳动物中产生两种类型的轻链,称为 λ 和 κ 。对于 κ 轻链,可变和恒定结构域可分别称为 V_κ 和 C_κ 结构域。轻链是 λ 还是 κ 轻链由其恒定区决定: λ 和 κ 轻链的恒定区不同,但在任何给定物种中的相同类型的所有轻链中都是相同的。

[0008] 重链的恒定区在物种中的任何给定同种型的所有抗体中是相同的,但同种型之间不同(抗体同种型的实例是IgG、IgE、IgM、IgA和IgD种类;还有许多抗体亚型,例如有四种亚型的IgG抗体:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。抗体的特异性由其可变区的序列决定。可变区的序列在任何个体中的相同类型的抗体之间变化。特别地,抗体的轻链和重链均包含三个高变互补决定区(CDR)。在一对轻链和重链中,两条链的CDR形成抗原结合位点。CDR序列决定抗体的特异性。

[0009] 重链的三个CDR从N-末端到C-末端称为VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,并且轻链的三个CDR从N-末端到C-末端称为VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。

[0010] 在W0 2011/154705中,公开了一种单克隆抗体,其声称以高亲和力结合Anx-A1。使用来自人Anx-A1同种型ANXA1-003基因免疫的小鼠的鼠细胞从鼠杂交瘤(即,由鼠B细胞产生的杂交瘤)产生该抗体。该抗体称为VJ-4B6。VJ-4B6是同种型IgG2b的抗体。该抗体由保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的保藏号为10060301的杂交瘤产生。VJ-4B6定义为具有以下CDR序列:VHCDR1-GYTFTNYWIG(SEQ ID NO:4),VHCDR2-DIYPGGDYTNNEKFKG(SEQ ID NO:5),VHCDR3-WGLGYFFDY(SEQ ID NO:14),VLCDR1-KASENVVTYVS(SEQ ID NO:7),VLCDR2-GASNRYT(SEQ ID NO:8)和VLCDR3-GQGYSYPYT(SEQ ID NO:9)。

发明内容

[0011] 本发明的发明人合成了旨在用于医学的公开的VJ-4B6抗体的人源化形式。人源化VJ-4B6抗体不能在体外结合人Anx-A1。本发明人重新检查了由杂交瘤产生的抗体,并鉴定了由杂交瘤产生的第二轻链作为次要组分。当首次表征杂交瘤时,未鉴定出该轻链的序列及其在Anx-A1结合抗体中的存在。

[0012] 第二轻链具有以下序列的CDR:VLCDR1-RSSQSLENSNGKTYLN(SEQ ID NO:1),VLCDR2-GVSNRFS(SEQ ID NO:2)和VLCDR3-LQVTHVPYT(SEQ ID NO:3)。该第二轻链的完整序列如SEQ ID NO:15所示。

[0013] 此外,虽然确认ECACC 10060301仅产生单个重链,但重链的重新分析显示VHCDR3实际上具有序列ARWGLGYFFDY(SEQ ID NO:6)。杂交瘤ECACC 10060301产生的重链的完整序列如SEQ ID NO:16所示。

[0014] 合成鼠抗体,其中轻链具有SEQ ID NO:15的序列(即,VLCDR1-3分别具有SEQ ID NO:1-3的序列),并且重链具有SEQ ID NO:16的序列(即,VHCDR1-3分别具有SEQ ID NO:4-6的序列)。该鼠抗体,也具有同种型IgG2b,命名为Mdx001,并且发现其以高亲和力结合人Anx-A1(参见本文提供的实施例)。该抗体具有先前未知的序列和医学中的各种用途。该抗体对结合到人Anx-A1具有特别高的亲和力,使其特别适用于医学,并且优于先前已公开的结合Anx-A1的抗体或其他特异性结合分子。

[0015] 已经产生了人源化形式的Mdx001抗体。特别地,已经产生了两种人源化形式的抗体,以提供MDX-L1H4和MDX-L2H2。这些可变区的序列在SEQ ID NO:32和33(MDX-L1H4的轻链和重链可变区)和SEQ ID NO:34和35(MDX-L2H2的轻链和重链可变区)中提供。在这些序列中,CDR如上述针对Mdx001序列所示。

[0016] 发现人源化形式的Mdx001的VLCDR1序列的修饰产生增强的抗体。在SEQ ID NO:1(其如上详述是Mdx001 VLCDR1的序列)的第11位取代甘氨酸残基增强抗体稳定性和功能。

不受理论束缚,认为这通过去除CDR的翻译后修饰的位点来实现。具体地,认为该甘氨酸残基的取代除去了蛋白的脱酰胺位点。SEQ ID NO:1所示的VLCDR1序列包含序列基序Ser-Asn-Gly。该序列基序与Asn残基的脱酰胺作用相关,其导致天冬酰胺残基转化为天冬氨酸或异天冬氨酸,这可影响抗体稳定性和靶结合。认为取代Ser-Asn-Gly基序内的任何一个残基可除去脱酰胺位点。

[0017] 令人惊讶的是,本发明人已经鉴定了其中第11位的甘氨酸残基(其是位于上述脱酰胺位点内的甘氨酸残基)取代为丙氨酸并且其相对于天然Mdx001抗体显示与其靶标(Anx-A1)增强的结合的抗体。包含第11位甘氨酸取代为丙氨酸的VLCDR1具有氨基酸序列RSSQSLENSNAKTYLN(粗体的残基是通过上述取代引入的丙氨酸)。该氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示,并且被称为VLCDR1变体1。此外,还发现通过将丝氨酸取代为苏氨酸包含在第9位修饰的VLCDR1的人源化抗体显示相对于Mdx001的与Anx-A1的增强的结合。包含在第9位丝氨酸取代为苏氨酸的VLCDR1具有氨基酸序列RSSQSLENTNGKTYLN(粗体的残基是通过上述取代引入的苏氨酸)。该氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示,并且被称为VLCDR1变体2。

[0018] 具有VLCDR1变体1的人源化抗体MDX-L1H4的修饰形式称为MDX-L1M2H4;相应地,具有VLCDR1变体1的人源化抗体MDX-L2H2的修饰形式称为MDX-L2M2H2。具有VLCDR1变体2的人源化抗体MDX-L1H4的修饰形式称为MDX-L1M3H4;相应地,具有VLCDR1变体2的人源化抗体MDX-L2H2的修饰形式称为MDX-L2M3H2。

[0019] 因此,在第一个实施方案中,本发明提供了分离的特异性结合分子,其结合人Anx-A1,该特异性结合分子包含CDR VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中每个所述CDR具有氨基酸序列如下:

[0020] VLCDR1具有SEQ ID NO:1(RSSQSLENSNGKTYLN)或SEQ ID NO:36(RSSQSLENSNAKTYLN)或SEQ ID NO:37(RSSQSLENTNGKTYLN)所示的序列;

[0021] VLCDR2具有SEQ ID NO:2(GVSNRFS)所示的序列;

[0022] VLCDR3具有SEQ ID NO:3(LQVTHVPYT)所示的序列;

[0023] VHCDR1具有SEQ ID NO:4(GYTFTNYWIG)所示的序列;

[0024] VHCDR2具有SEQ ID NO:5(DIYPGGDYTNYNKFKG)所示的序列;且

[0025] VHCDR3具有SEQ ID NO:6(ARWGLGYFDY)所示的序列;或者,对于每个序列,与其具有至少85%序列一致性的氨基酸序列。优选地,所述序列一致性为至少90%或95%。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明提供了含有本发明的特异性结合分子的制剂,其中与人Anx-A1结合的制剂中的至少90%的特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结合。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明提供了核酸分子,其包含编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列。还提供了包含本发明的核酸分子的构体,以及包含本发明的核酸分子或构体的载体。本发明还提供了包含本发明的核酸分子、构体或载体的宿主细胞。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明提供了制备本发明的特异性结合分子的方法,包括:

[0029] i)向宿主细胞中引入本发明的核酸分子、构体或载体;

[0030] ii)表达核酸分子使得产生特异性结合分子;和

[0031] iii)收集所述特异性结合分子,优选通过纯化收集。

[0032] 本发明还提供了药物组合物,其包含本发明的特异性结合分子和一种或多种药学

上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。还提供了通过本发明的这种方法可获得的特异性结合分子。

[0033] 本发明的另一个实施方案是用于治疗的本发明的特异性结合分子。本发明还提供了用于治疗的本发明的制剂或药物组合物。在某些实施方案中,用于治疗的本发明的特异性结合分子、制剂或药物组合物用于治疗T细胞介导的疾病、强迫症(OCD)或OCD相关疾病。

[0034] 类似地,本发明还提供了本发明的特异性结合分子或制剂在制备用于治疗T细胞介导的疾病、OCD或OCD相关疾病的药物中的用途。

[0035] 本发明还提供治疗T细胞介导的疾病、OCD或OCD相关疾病的方法,包括向有此需要的受试者施用本发明的特异性结合分子、制剂或组合物。

[0036] 如上所述,本发明提供了结合人Anx-A1的分离的特异性结合分子。“特异性结合分子”是特异性结合特定分子伴侣的分子,在这种情况下是人Anx-A1。与人Anx-A1特异性结合的分子是与人Anx-A1结合的分子,其具有与结合其他分子或至少大多数其他分子的亲和力相比更大的亲和力(例如,具有实施例中所描述的亲和力)。因此,例如,如果结合人Anx-A1的特异性结合分子与人细胞的裂解物接触,则该特异性结合分子将主要结合Anx-A1。特别地,特异性结合分子结合所述人Anx-A1上存在的序列或构型,优选地其他分子上不存在的独特序列或构型。当特异性结合分子是抗体时,该序列或构型是特异性结合分子结合的表位。特异性结合分子不一定仅与人Anx-A1结合:特异性结合分子可能与某些其他未定义的靶分子交叉反应,或者当与大量的分子(例如,细胞裂解物等)的混合物接触时可能显示出非特异性结合水平。无论如何,本发明的特异性结合分子显示出对Anx-A1的特异性。技术人员使用本领域的标准技术,例如,ELISA、免疫印迹法、表面等离子体共振(SPR)等能够容易地鉴定特异性结合分子是否对Anx-A1具有特异性。

[0037] 如本文所提及的,“结合人Anx-1”的分子显示出如上所述的对人Anx-1分子的特异性。如上所述,存在四种人Anx-A1的人同种型。本发明的特异性结合分子与全长AnxA1(即由ANXA1-002或ANXA1-003转录物编码的Anx-A1)结合,其序列如SEQ ID NO:11(和SEQ ID NO:10)所示。全长Anx-A1(由ANXA1-002和ANXA1-003转录物编码)是346个氨基酸的蛋白质。抗体Mdx-001针对全长Anx-A1蛋白产生,如由ANXA1-002和ANXA1-003转录物编码。因此,特异性结合分子与全长人Anx-A1结合。该特异性结合分子还可以结合由ANXA1-002或ANXA1-003转录物编码的全长Anx-A1的特定片段、部分或变体,例如由ANXA1-004和ANXA1-006转录物编码的片段或含有本文所述抗体所结合的表位的全长Anx-A1的片段。

[0038] 所述特异性结合分子可以通过本领域已知的任何方法合成。特别地,特异性结合分子可以使用蛋白质表达系统合成,例如使用原核(例如,细菌)细胞或真核(例如,酵母、真菌、昆虫或哺乳动物)细胞的细胞表达系统。可用于产生所述特异性结合分子的细胞将在下面进一步讨论。另一种蛋白质表达系统是无细胞的体外表达系统,其中编码所述特异性结合分子的核苷酸序列在体外转录成mRNA,并将mRNA翻译成蛋白质。无细胞表达系统试剂盒广泛可得,并且可以从例如,ThermoFisher Scientific(USA)购买。或者,所述特异性结合分子可以在非生物系统中化学合成。液相合成或固相合成可用于产生可形成或包含在本发明的特异性结合分子内的多肽。技术人员可以使用本领域常用的适当方法容易地产生特异性结合分子。特别地,所述特异性结合分子可以在哺乳动物细胞(例如CHO细胞)中重组表达。

[0039] 如所指出的,本发明的特异性结合分子是“分离的”。(在一个替代实施方案中,所述特异性结合分子是不分离的。)如本文所用,“分离的”是指特异性结合分子是其中提供它的任何溶液等的主要组分(即,多数组分)。特别地,如果特异性结合分子在混合物或混合溶液中初始产生,则特异性结合分子的分离意味着它已经从中分离或纯化。因此,例如,如果特异性结合分子是多肽,并且所述多肽使用如上所述的蛋白质表达系统产生,则所述特异性结合分子是分离的,使得它是其中它存在的溶液或组合物中的最丰富的多肽,优选地构成溶液或组合物中的大多数多肽,并且相对于天然生产培养基中存在的其他多肽和生物分子是富集的。特别地,本发明的特异性结合分子是分离的,使其成为溶液或组合物中的主要(多数)特异性结合分子。在优选的特征中,当在溶液或组合物中,相对于其他组分(特别是其他多肽组分)的存在进行评估时,所述特异性结合分子以至少60、70、80、90、95或99%w/w的纯度存在于溶液或组合物中。

[0040] 如果特异性结合分子是蛋白,例如在蛋白表达系统中产生,可以通过定量蛋白质组学分析所述特异性结合分子的溶液,以鉴定本发明的特异性结合分子是否占优势并因此是分离的。例如,可以使用2D凝胶电泳和/或质谱法。这种分离的分子可以存在于如下所述的制剂或组合物中。

[0041] 可以使用本领域已知的任何技术分离本发明的特异性结合分子。例如,如果所述特异性结合分子是多肽,则可以用亲和标签(例如,多聚组氨酸标签、链霉素标签、FLAG标签和HA标签等)生产,以实现通过使用适当的结合伴侣的亲和色谱法分离分子,例如携带多聚组氨酸标签的分子可以使用 Ni^{2+} 离子纯化。在其中所述特异性结合分子是抗体的实施方案中,可以使用一种或多种抗体结合蛋白,例如蛋白G、蛋白A、蛋白A/G或蛋白L,使用亲和色谱法分离所述特异性结合分子。或者,所述特异性结合分子可以通过例如,尺寸排阻色谱法或离子交换色谱法分离。相反,通过化学合成(即,通过非生物学方法)产生的特异性结合分子可能以分离的形式产生。因此,如果以产生分离的分子的方式合成它,则对于被考虑分离的本发明的特异性结合分子不需要特定的纯化或分离步骤。

[0042] 本发明的特异性结合分子包含6个CDR序列,VLCDR1、VLCADR2、VLCADR3、VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中每个所述CDR具有如下氨基酸序列:

[0043] VLCADR1具有SEQ ID NO:1、36或37所示的序列;

[0044] VLCADR2具有SEQ ID NO:2所示的序列;

[0045] VLCADR3具有SEQ ID NO:3所示的序列;

[0046] VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列;

[0047] VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列;和

[0048] VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列;或者,对于每个序列,与其具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列。

[0049] “或者,对于每个序列,与其具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列”是指每个所述CDR可具有相关SEQ ID NO中指定的氨基酸序列,或与其具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列。因此,VLCDR1具有SEQ ID NO:1、36或37所示的序列,或与SEQ ID NO:1、36或37具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列;VLCADR2具有SEQ ID NO:2所示的序列,或与SEQ ID NO:2具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列;VLCADR3具有SEQ ID NO:3所示的序列或与SEQ ID NO:3具有至少85%、90%或95%序列

一致性的氨基酸序列; VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列,或与SEQ ID NO:4具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列; VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列,或与SEQ ID NO:5具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列;并且VHCDR3具有SEQ ID NO:6中所示的序列,或与SEQ ID NO:6具有至少85%、90%或95%序列一致性的氨基酸序列。

[0050] 在本发明的一个优选实施方案中, VLCDR1具有(在本文中意味着组成)SEQ ID NO:1、36或37所示的序列, VLCDR2具有SEQ ID NO:2所示的序列, VLCDR3具有SEQ ID NO:3所示的序列, VHCDR1具有SEQ ID NO:4所示的序列, VHCDR2具有SEQ ID NO:5所示的序列;且VHCDR3具有SEQ ID NO:6所示的序列。结合分子中使用的序列可包含本文所述的序列。

[0051] 如所指出的,本发明的特异性结合分子包含6个由多肽序列组成的CDR。如本文所用,“蛋白质”和“多肽”是可互换的,并且各自是指通过一个或多个肽键连接的两个或多个氨基酸的序列。因此,特异性结合分子可以是多肽。或者,特异性结合分子可包含一种或多种包含CDR序列的多肽。优选地,本发明的特异性结合分子是抗体或抗体片段。

[0052] 在本发明的一个特定实施方案中,所述CDR序列的组合序列与SEQ ID NO:1-6或SEQ ID NO:36和2-6或SEQ ID NO:37和2-6所示的氨基酸序列的组合序列具有至少85%、90%或95%(例如,至少97或98%)的序列一致性。“CDR序列的组合序列”(或CDR的组合序列)是指当序列端对端组装时形成的序列(即使在感兴趣的分子中它们会与间隔序列一起出现)。换句话说,CDR序列的组合序列是当CDR序列以上面列出的顺序连接在一起时获得的氨基酸序列(即,VLCDR1-VLCDR2-VLCDR3-VHCDR1-VHCDR2-VHCDR3),因此组合序列在其N-末端具有VLCDR1的N-末端氨基酸;VLCDR1的C-末端直接连接到VLCDR2的N-末端;VLCDR2的C-末端直接连接到VLCDR3的N-末端;VLCDR3的C-末端直接连接到VHCDR1的N-末端;VHCDR2的C-末端直接连接到VHCDR3的N-末端;并且VHCDR3的C-末端氨基酸形成组合序列的C末端。本文中“直接连接”是指特定CDR序列的N-末端氨基酸紧邻前CDR序列的C-末端氨基酸放置,没有间隔氨基酸(为了序列一致性评价的目的)。

[0053] SEQ ID NO:1-6中所示的氨基酸序列的组合序列通过上面段落中描述的方法形成,即组合序列在其N-末端具有SEQ ID NO:1的N-末端氨基酸;SEQ ID NO:1的C-末端氨基酸直接连接到SEQ ID NO:2的N-末端氨基酸序列;SEQ ID NO:2的C-末端氨基酸直接连接到SEQ ID NO:3的N-末端氨基酸;SEQ ID NO:3的C-末端氨基酸直接连接到SEQ ID NO:4的N-末端氨基酸;SEQ ID NO:4的C-末端氨基酸直接连接到SEQ ID NO:5的N-末端氨基酸;SEQ ID NO:5的C-末端氨基酸直接连接到SEQ ID NO:6的N-末端氨基酸;并且SEQ ID NO:6的C-末端氨基酸形成组合序列的C-末端。SEQ ID NO:1-6所示的氨基酸序列的组合序列本身如SEQ ID NO:17所示。SEQ ID NO:36(或37)和2-6所示的氨基酸序列的组合序列由同样过程形成,除了SEQ ID NO:1替换为SEQ ID NO:36(或37)之外。SEQ ID NO:36和2-6(和37和2-6)所示的氨基酸序列的组合序列如SEQ ID NO:38(或39)所示。

[0054] 在本发明的实施方案中,其中所述特异性结合分子的CDR与SEQ ID NO:1(或36或37)和2-6的氨基酸序列具有小于100%的序列一致性,所述CDR序列可以通过取代、添加或缺失SEQ ID NO:1(或36或37)和2-6序列中的适当数量的氨基酸来改变。在本发明的另一个实施方案中,每个CDR序列可以通过相对于SEQ ID NO:1(或36或37)和2-6的多达2个氨基酸的取代、添加或缺失来修饰,条件是如上所述,得到的CDR序列与SEQ ID NO:1(或36或37)和2-6具有至少85%或90%的序列一致性。“取代、添加或缺失”包括取代、添加或缺失的组合。

因此,特别地,VLCDR1可具有含有1或2个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:1 (或36或37)的序列;VLCDR2可具有含有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:2的序列;VLCDR3可具有含有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:3的序列;VHCDR1可具有含有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:4的序列;VHCDR2可具有含有1或2个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:5的序列;并且VHCDR3可具有含有1个氨基酸取代、添加或缺失的SEQ ID NO:6的序列。优选地,SEQ ID NO:1、36或37的所述1或2个氨基酸取代在该序列中的第9位和/或第11位。

[0055] 当通过取代特定氨基酸残基修饰CDR序列时,取代可以是保守氨基酸取代。如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指氨基酸取代,其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基取代。具有相似侧链的氨基酸倾向于具有相似的性质,因此可以预期对多肽的结构或功能重要的氨基酸的保守取代影响多肽结构/功能,其小于在相同位置的非保守氨基酸取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)、非极性侧链(例如,甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,保守氨基酸取代可被认为是其中特定氨基酸残基取代为同一家族中的不同氨基酸的取代。然而,CDR残基的取代同样可以是非保守取代,其中一个氨基酸被具有属于不同家族的侧链的另一个氨基酸取代。

[0056] 本发明范围内的氨基酸取代或添加可以使用由遗传密码编码的蛋白原氨基酸、不由遗传密码编码的蛋白原氨基酸或非蛋白原氨基酸进行。优选地,使用蛋白原氨基酸进行任何氨基酸取代或添加。构成CDR序列的氨基酸可包括不是天然存在的氨基酸,但是其是天然存在的氨基酸的修饰。提供这些非天然存在的氨基酸不改变序列并且不影响特异性,它们可用于产生本文所述的CDR而不降低序列一致性,即被认为提供CDR的氨基酸。例如,可以使用氨基酸的衍生物,例如甲基化氨基酸。在一个方面,本发明的特异性结合分子不是天然分子,即不是天然存在的分子。

[0057] 对SEQ ID NO:1-6、36和37中所示的CDR的氨基酸序列的修饰可以使用任何合适的技术进行,例如编码DNA序列的定点诱变或固相合成。

[0058] 本发明的特异性结合分子包含上述CDR。此外,此类分子可含有接头部分或框架序列以允许CDR的适当呈递。还可以存在另外的序列,其可以方便地赋予附加性能,例如,允许分离或鉴定含有例如上文所述的那些CDR的分子的肽序列。在这种情况下,可以产生融合蛋白。

[0059] 如上所述,本发明的特异性结合分子的CDR与SEQ ID NO:1 (或36或37) 和2-6具有至少85%的序列一致性,如上所述。可以通过任何方便的方法评估序列一致性。然而,为了确定序列之间的序列一致性程度,进行序列成对或多重比对的计算机程序是有用的,例如EMBOSS Needle或EMBOSS stretcher(Rice,P.等,Trends Genet.,16,(6)pp276-277,2000)可用于成对序列比对,而Clustal Omega(Sievers F人,Mol.Syst.Biol.7:539,2011)或MUSCLE(Edgar,R.C.,Nucleic Acids Res.32(5):1792-1797,2004)可用于多重序列比对,尽管可以使用任何其他适当的程序。无论比对是成对还是多重,它必须全局地(即,横跨整个参考序列)而不是局部地进行。

[0060] 序列比对和%一致性计算可以使用例如标准Clustal Omega参数来确定:矩阵Gonnet、空位开放罚分6、空位延伸罚分1。或者,可以使用标准EMBOSS Needle参数:矩阵BLOSUM62、空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5。可以替代地使用任何其他合适的参数。

[0061] 出于本申请的目的,在通过不同方法获得的序列一致性值之间存在争议的情况下,使用具有默认参数的EMBOSS Needle的全局成对比对获得的值应被认为是有效的。

[0062] 如上所述,本发明的特异性结合分子优选为抗体或抗体片段。“抗体”是具有上文所述特征的免疫球蛋白。本发明还考虑了天然存在的抗体的变体,其保留CDR但是存在于不同的框架中,如下文所讨论的并且其以相同的方式起作用,即保留对抗原的特异性。因此,抗体包括功能等同物或同源物,其中天然存在的结构域部分或全部被天然或非天然等同物或以相同方式起作用的同源物替换。

[0063] 当本发明的特异性结合分子是抗体时,它优选是单克隆抗体。“单克隆抗体”是指由单一抗体种类组成的抗体制剂,即制剂中的所有抗体具有相同的氨基酸序列,包括相同的CDR,因此在其具有相同的效果的靶抗原上结合相同的表位(“靶抗原”是指含有被特定抗体结合的表位的抗原,即抗Anx-A1抗体的靶抗原是Anx-A1)。换句话说,本发明的抗体优选不是抗体的多克隆混合物的部分。

[0064] 在抗体中,如上所述,CDR序列位于重链和轻链的可变结构域中。CDR序列位于多肽框架内,其适当地定位CDR以用于抗原结合。因此,可变结构域的其余部分(即,不形成任何一个CDR的一部分的可变结构域序列的部分)构成框架区。成熟可变结构域的N-末端形成框架区1(FR1);CDR1和CDR2之间的多肽序列形成FR2;CDR2和CDR3之间的多肽序列形成FR3;并且将CDR3连接到恒定结构域的多肽序列形成FR4。在本发明的抗体中,可变区框架区可具有任何合适的氨基酸序列,使得抗体通过其CDR与人Anx-A1结合。恒定区可以是任何哺乳动物(优选人)抗体同种型的恒定区。

[0065] 在本发明的某些实施方案中,所述特异性结合分子可以是多特异性的,例如,双特异性单克隆抗体。多特异性结合分子含有与至少两个不同的分子结合伴侣结合的区域或结构域(抗原结合区),例如,结合两种或多种不同的抗原或表位。在双特异性抗体的情况下,抗体在如上所述的形成中包含两条重链和轻链,除了两条重链和两条轻链的可变结构域分别不同,因此形成两个不同的抗原结合区。在多特异性(例如,双特异性)结合分子中,例如,本发明的单克隆抗体,其中一个抗原结合区具有如本文所定义的本发明的特异性结合分子的CDR序列,因此结合Anx-A1。本发明的多特异性结合分子的其他抗原结合区与由本发明的CDR形成的抗原结合区不同,例如,具有与本文针对本发明的特异性结合分子定义的那些不同的序列的CDR。特异性结合分子的另外的(例如,第二)抗原结合区,例如,在双特异性抗体中,也可以结合Anx-A1,但在与结合Anx-A1的第一抗原结合区不同的表位(其具有本发明的特异性结合分子的CDR)。或者,另外的(例如,第二)抗原结合区可以结合另外的(例如,第二)不同的抗原,其不是Anx-A1。在另一个实施方案中,所述特异性结合分子中(例如,在抗体中)的两个或多个抗原结合区可以各自结合相同的抗原,即提供多价(例如,二价)分子。

[0066] 所述特异性结合分子可以是能够结合人Anx-A1的抗体片段或合成构体。抗体片段在Rodrigo等,Antibodies,第4(3)卷,第259-277页,2015中讨论。本发明的抗体片段优选是单克隆的(即,它们不是抗体片段的多克隆混合物的一部分)。抗体片段包括例如Fab、F(ab')₂、Fab' 和Fv片段。Fab片段在Roitt等,Immunology,第二版(1989),丘吉尔利文斯敦,

伦敦中讨论。Fab片段由抗体的抗原结合结构域组成,即,可以看到单个抗体含有两个Fab片段,每个片段由轻链及其联接的重链的N-末端部分组成。因此,Fab片段含有整个轻链和与其结合的重链的 V_H 和 C_H1 结构域。可以通过用木瓜蛋白酶消化抗体来获得Fab片段。

[0067] $F(ab')_2$ 片段由抗体的两个Fab片段加上重链结构域的铰链区组成,包括将两条重链连接在一起的二硫键。换句话说, $F(ab')_2$ 片段可以看作两个共价连接的Fab片段。通过用胃蛋白酶消化抗体可以获得 $F(ab')_2$ 片段。 $F(ab')_2$ 片段的还原产生两个Fab'片段,其可被视为含有另外的巯基基团的Fab片段,其可以用于片段与其他分子的缀合。

[0068] Fv片段仅由轻链和重链的可变结构域组成。这些不是共价连接的,并且仅通过非共价相互作用弱结合在一起。可以修饰Fv片段以产生称为单链Fv(scFv)分子的合成构体。这种修饰通常通过工程化抗体基因来重组进行,以产生融合蛋白,其中单个多肽包含 V_H 和 V_L 结构域。scFv片段通常包括共价连接 V_H 和 V_L 区的肽接头,这有助于分子的稳定性。接头可以包含1至20个氨基酸,诸如例如1、2、3或4个氨基酸,5、10或15个氨基酸,或者方便的1至20个范围中的其他中间数。肽接头可以由任何通常方便的氨基酸残基形成,例如甘氨酸和/或丝氨酸。合适的接头的一个实例是 Gly_4Ser 。可以使用这种接头的多聚体,诸如例如二聚体、三聚体、四聚体或五聚体,例如 $(Gly_4Ser)_2$ 、 $(Gly_4Ser)_3$ 、 $(Gly_4Ser)_4$ 或 $(Gly_4Ser)_5$ 。然而,存在接头不是必需的,并且 V_L 结构域可以通过肽键与 V_H 结构域连接。scFv在本文中定义为抗体片段。

[0069] 所述特异性结合分子可以是scFv的类似物。例如,scFv可以与其他特异性结合分子(例如,其他scFv、Fab抗体片段和嵌合IgG抗体(例如,具有人框架))连接。scFv可以与其他scFv连接,以形成多聚体,其是多特异性结合蛋白,例如二聚体、三聚体或四聚体。双特异性scFv有时被称为双抗体,三特异性scFv称为三抗体,并且四特异性scFv称为四抗体。在其他实施方案中,本发明的scFv可以与其他相同的scFv分子结合,从而形成单特异性但多价的多聚体,例如,可以形成二价二聚体或三价三聚体。

[0070] 可以使用的合成构体包括CDR肽。这些是包含抗原结合决定簇的合成肽。也可以使用肽模拟物。这些分子通常是构象限制的有机环,其模拟CDR环的结构并且包括抗原相互作用的侧链。

[0071] 如上所述,本发明的特异性结合分子的CDR序列所基于的SEQ ID NO:1-6的CDR序列最初在鼠抗体Mdx001中鉴定。如上所述,Mdx001轻链具有SEQ ID NO:15的序列,并且Mdx001重链具有SEQ ID NO:16的序列(在两种情况下都包括信号序列,其分别对应于SEQ ID NO:15的前20个氨基酸和SEQ ID NO:16的前19个氨基酸)。Mdx001的轻链可变结构域和重链可变结构域分别具有SEQ ID NO:18和19所示的序列。在本发明的某些实施方案中,所述特异性结合分子可以是包含轻链和重链的抗体,轻链和重链分别包含或具有(组成于)SEQ ID NO:15和16的序列,其可以包括或排除信号序列,例如本发明的特异性结合分子可以是Mdx001抗体,或与其具有至少70%(优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列(但对于CDR满足85%序列一致性要求)。在本发明的其他实施方案中,所述特异性结合分子是从包含轻链和重链的抗体获得的抗体片段,轻链和重链分别包含或具有SEQ ID NO:15和16的序列,其可包括或排除信号序列,例如,它可以是包含这种抗体的抗原结合区的Fab或包含这种抗体的轻链和重链的可变区的scFv,例如包含轻链可变结构域和重链可变结构域,轻链可变结构域和重链可变结构域分别包含或具有SEQ ID NO:

18和19的序列,或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列(但对于CDR满足85%序列一致性要求)。具有此类序列的抗体或抗体片段含有鼠序列。然而,优选地,修饰本发明的抗体或抗体片段以使其更适合于人类的治疗用途。

[0072] 本发明的抗体或抗体片段可以是人/小鼠嵌合抗体,或优选地可以是人源化的。这对于单克隆抗体和抗体片段尤其如此。当该分子用作人治疗剂时,人源化或嵌合抗体或抗体片段是理想的。用鼠抗体对人进行治疗性处理可能由于多种原因而无效,例如,抗体的体内半衰期短、由鼠重链恒定区介导的弱效应物功能、由于人免疫效应细胞上的Fc受体对鼠重链恒定区的低识别、患者对抗体敏感和人抗小鼠抗体(HAMA)反应的产生以及HAMA中和小鼠抗体导致治疗效果丧失。

[0073] 嵌合抗体是具有衍生自一个物种的可变区和衍生自另一个物种的恒定区的抗体。因此,本发明的抗体或抗体片段可以是嵌合抗体或嵌合抗体片段,其包含鼠可变结构域和人恒定结构域。鼠轻链可变结构域可以是Mdx001轻链可变结构域,其具有SEQ ID NO:18所示的序列。或者,鼠轻链可变结构域可以是与SEQ ID NO:18具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性的序列,其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1-3具有至少85%的序列一致性。鼠重链可变结构域可以是Mdx001重链可变结构域,其具有SEQ ID NO:19所示的序列。或者,鼠重链可变结构域可以是与SEQ ID NO:19具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性的序列,其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0074] 如上所述,抗体的同种型由其重链恒定区的序列限定。本发明的嵌合抗体可具有任何人抗体同种型的恒定区,以及每个同种型内的任何亚类。例如,嵌合抗体可具有IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体的Fc区(即,嵌合抗体可分别包含重链 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 的恒定结构域),尽管优选地,本发明的抗体是IgG同种型。因此,本发明的嵌合抗体可以是任何同种型。嵌合抗体的轻链可以是 κ 或 λ 轻链,即它可以包含人 λ 轻链或人 κ 轻链的恒定区。相应地,嵌合抗体片段是包含恒定结构域的抗体片段(例如Fab、Fab'或F(ab')₂片段)。本发明的嵌合抗体片段的恒定结构域可以如上所述用于嵌合单克隆抗体。

[0075] 嵌合抗体可以使用任何合适的技术产生,例如,重组DNA技术,其中鼠可变结构域的DNA序列与人恒定结构域的DNA序列融合以编码嵌合抗体。如上所述,嵌合抗体片段可以通过使用重组DNA技术以产生编码这种多肽的DNA序列,或通过加工本发明的嵌合抗体以产生期望的片段而获得。可以预期嵌合抗体克服与在人类治疗中使用鼠抗体相关的短体内半衰期和弱效应物功能的问题,并且可以降低患者敏感和HAMA发生的可能性。然而,由于可变结构域中存在鼠序列,因此当向人患者施用嵌合抗体时,仍可能发生患者敏感和HAMA。

[0076] 因此,优选地,本发明的抗体或抗体片段是完全人源化的。人源化抗体是衍生自另一物种的抗体,例如,鼠,其中不仅抗体链的恒定结构域被人恒定结构域替换,而且可变区的氨基酸序列被修饰,特别是用人框架序列替换外源(例如,鼠)框架序列,使得优选地,抗体中唯一的非人序列是CDR序列。人源化抗体可以克服与非人抗体在人体内的治疗用途相关的所有问题,包括避免或最小化患者敏感和HAMA发生的可能性。

[0077] 抗体人源化通常通过称为CDR移植的过程进行,尽管可以使用本领域中的任何其他技术。抗体移植在Williams,D.G.等,抗体工程第1卷,R.Kontermann和S.Dübel编辑,第21章,第319-339页中有详细描述。在该过程中,首先产生如上所述的嵌合抗体。随后的外源

(例如鼠)可变结构域的人源化涉及在最适合的人可变区的FR内插入来自每个免疫球蛋白链的鼠CDR。这通过将鼠可变结构域与已知人可变结构域的数据库(例如,IMGT或Kabat)比对来完成。从最佳比对的可变结构域鉴定合适的人框架区,例如,在人和鼠框架区之间具有高序列一致性的结构域,含有相同长度的CDR的结构域,具有最相似结构的结构域(基于同源建模)等。然后,使用重组DNA技术在适当位置将鼠CDR序列移植到前导人框架序列中,然后产生人源化抗体并测试其与靶抗原的结合。抗体人源化的过程是技术人员已知和理解的,他们可以在没有进一步指导的情况下执行该技术。抗体人源化服务也由许多商业公司提供,例如,GenScript(美国/中国)或MRC Technology(英国)。如上所述,人源化抗体片段可以容易地从人源化抗体获得。

[0078] 因此,本发明的抗体或抗体片段可以衍生自任何物种,例如,它可以是鼠抗体或抗体片段。然而,优选地,所述抗体或抗体片段是嵌合抗体或抗体片段,即仅抗体或抗体片段的可变结构域是非人的,并且恒定结构域都是人的。最佳地,本发明的抗体或抗体片段是人源化抗体或抗体片段。

[0079] 本发明人已经开发出Mdx001的人源化形式,即MDX-L1H4和MDX-L2H2,如上所述。还提供了优选的变体,其中VLCDR1具有SEQ ID NO:36(变体1)或37(变体2)所示的序列。如上所述,本发明的抗体可包含具有SEQ ID NO:36或37(或与其具有至少85%序列一致性的氨基酸序列)所示的氨基酸序列的VLCDR1,并且这种抗体具有增强的稳定性,并且可与包含SEQ ID NO:1的VLCDR1的等同抗体相比以更高的亲和力结合Anx-A1。因此,包含这些修饰的VLCDR1序列之一的抗体相对于包含SEQ ID NO:1的VLCDR1的等同抗体具有改善的功能性。如上所述,这些人源化抗体已被命名为MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2。MDX-L1H4和MDX-L2H2属于IgG同种型,特别是亚类IgG1。由于它们是人源化的,因此它们可以比Mdx001更安全且更少副作用地施用给人类患者。

[0080] 如上所述,抗体的CDR确定其结合特异性,即其结合的一种或多种靶标和其与一种或多种靶标结合的亲和力。抗体CDR序列的改变可能损害或消除抗体与其靶标的结合。出乎意料的是,包含具有SEQ ID NO:36或37序列的VLCDR1的Mdx001的人源化版本相对于Mdx001,对Anx-A1具有提高的亲和力。如以下实施例中所证明的,MDX-L1M2H4和MDX-L2M2H2分别具有相对于Mdx001对Anx-A1结合的提高了的 K_D 值(实际上MDX-L1M2H4对Anx-A1具有小于Mdx001的一半的 K_D 值),意味着它们以比Mdx001更高的亲和力结合Anx-A1(实际上MDX-L1M2H4以高于Mdx001亲和力的两倍以上结合Anx-A1)。靶亲和力的这种提高对应于MDX-L1H4和MDX-L2H2变体相对于Mdx001的治疗潜力的提高。

[0081] 因此,在一个具体实施方案中,本发明提供了人源化抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:36或37所示的氨基酸序列的VLCDR1,和分别具有SEQ ID NO:2-6所示的氨基酸序列的VLCDR2-3和VHCDR1-3。

[0082] MDX-L1H4包含具有SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的人源化轻链和具有SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的人源化重链。MDX-L2H2包含具有SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的人源化轻链和具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的人源化重链。如技术人员已知的,天然产生的抗体链具有信号序列。抗体信号序列是位于轻链和重链的N-末端的氨基酸序列,在可变区的N-末端。信号序列指导抗体链从其中产生它们的细胞中输出。SEQ ID NO:40-43的氨基酸序列各自包括信号序列。MDX-L1H4和MDX-L2H2的轻链的信号序列如SEQ ID

NO:52所示,其对应于SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42的前20个氨基酸;MDX-L1H4和MDX-L2H2的重链的信号序列如SEQ ID NO:53中所示,其对应于SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43的前19个氨基酸。

[0083] MDX-L1M2H4的轻链具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列,MDX-L1M3H4的轻链具有SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列。MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4的重链相对于MDX-L1H4未改变,即MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4均包含具有SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的重链。MDX-L1M2H4轻链的可变区具有SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列,并且MDX-L1M3H4的可变区具有SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。

[0084] MDX-L2M2H2的轻链具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,并且MDX-L2M3H2的轻链具有SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列。MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2的重链相对于MDX-L2H2未改变,即MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2都包含具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的重链。MDX-L2M2H2的轻链的可变区具有SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列,并且MDX-L2M3H2的可变区具有SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

[0085] 同样如技术人员已知的,在从其中合成它的细胞中输出蛋白质时,信号序列从抗体链上切割下来。信号序列的切割可以称为抗体链的成熟;已经从其中制备它们的细胞中输出的功能性循环抗体包含缺乏信号序列的成熟重链和轻链。成熟的MDX-L1H4轻链具有SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,成熟的MDX-L1M2H4轻链具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,成熟的MDX-L1M3H4轻链具有SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,并且成熟的MDX-L1H4重链具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列(其在所有变体和母体MDX-L1H4序列中相同)。

[0086] 成熟的MDX-L2H2轻链具有SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列,成熟的MDX-L2M2H2轻链具有SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列,成熟的MDX-L2M3H2轻链具有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,并且成熟的MDX-L2H2重链具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列(其在所有变体和母体MDX-L2H2序列中相同)。

[0087] 在本发明的一个具体实施方案中,所述特异性结合分子包含:

[0088] (i) 包含SEQ ID NO:32、34或48-51所示的氨基酸序列或其变体或由其或其变体组成的轻链可变区,其变体与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一致性;和

[0089] (ii) 含SEQ ID NO:33或35所示的氨基酸序列或其变体或由其或其变体组成的重链可变区,其变体与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。这种特异性结合分子可以是抗体 (特别是单克隆抗体), 或者可以是例如如上所述的抗体片段,例如Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv或scFv。

[0090] 所述特异性结合分子可以是人源化单克隆抗体,其包含MDX-L1H4或MDX-L2H2或其变体的轻链和重链。在抗体中,轻链和重链可包括或排除信号序列。因此,所述特异性结合分子可包含:

[0091] (i) 包含SEQ ID NO:40、42、44-47、54或75-79所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列一致性的氨基酸序列或由其组成,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一

致性;和

[0092] (ii) 包含SEQ ID NO:41、43、55或80所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的重链,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0093] 在一个优选的实施方案中,所述特异性结合分子包含:

[0094] (i) 包含SEQ ID NO:40、44、46、54、75或76所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列一致性的氨基酸序列或由其组成的轻链,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一致性;和

[0095] (ii) 包含SEQ ID NO:41或55所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的重链,,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0096] 在另一个优选的实施方案中,所述特异性结合分子包含:

[0097] (i) 包含SEQ ID NO:42、45、47或77-79所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列一致性的氨基酸序列或由其组成的轻链,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一致性;和

[0098] (ii) 包含SEQ ID NO:43或80所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的重链,,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0099] 在另一个优选的实施方案中,所述特异性结合分子包含:

[0100] (i) 包含SEQ ID NO:54、75或76所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列一致性的氨基酸序列或由其组成的轻链,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一致性;和

[0101] (ii) 包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的重链,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0102] 在另一个优选的实施方案中,所述特异性结合分子包含:

[0103] (i) 包含SEQ ID NO:77-79所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列一致性的氨基酸序列或由其组成的轻链,并且其中CDR序列VLCDR1-3分别与SEQ ID NO:1、36或37和2-3具有至少85%的序列一致性;且

[0104] (ii) 包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或与其具有至少70% (优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列一致性的氨基酸序列或由其组成的重链,并且其中CDR序列VHCDR1-3分别与SEQ ID NO:4-6具有至少85%的序列一致性。

[0105] 在一个具体实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或由其组成。

[0106] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:43所示的氨基

酸序列或由其组成。

[0107] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或由其组成。

[0108] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或由其组成。

[0109] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或由其组成。

[0110] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或由其组成。

[0111] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或由其组成。

[0112] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或由其组成。

[0113] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或由其组成。

[0114] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或由其组成。

[0115] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或由其组成。

[0116] 在另一个实施方案中,所述特异性结合分子是包含轻链和重链的抗体,所述轻链包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列或由其组成,所述重链包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或由其组成。

[0117] 本发明的特异性结合分子优选以高亲和力结合Anx-A1。如技术人员已知的,结合分子对其配体(或结合伴侣)的亲和力,例如抗体对其靶抗原的亲和力,可以通过结合分子和配体的复合物的解离常数(K_d)定量地定义。特异性结合分子(例如,抗体)的 K_d 值对应于结合分子解离速率(即,它从其配体解离有多快)与结合分子缔合速率(即,它与其配体的结合有多快)的比。较低的 K_d 值对应于结合分子对其配体的较高的结合亲和力。优选地,本发明的特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结合Anx-A1。本文中Anx-A1是指Anx-A1的任何人同种型。特别地,它可以是指同种型ANXA1-003。

[0118] 优选地,本发明的任何特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结

合Anx-A1。如果本发明的特异性结合分子是抗体,则尤其如此。然而,如果本发明的特异性结合分子是抗体片段(例如,scFv),则在一些实施方案中,可以略低于此的亲和力结合Anx-A1,即其Anx-A1结合的 K_d 可以高于10nM、15nM或20nM,例如小于40nM,但优选小于20nM。

[0119] 特异性结合分子与Anx-A1的结合的 K_d 优选在鉴定为对抗体Mdx001最佳的结合条件下测量,这是指在该条件下 Ca^{2+} 离子以至少1mM的浓度存在,并且任选地HEPES以10-20mM的浓度存在,并且pH为7至8,优选在7.2至7.5(包括)的生理水平。可以存在NaCl(例如浓度为100-250mM),也可以存在低浓度的洗涤剂(例如,聚山梨醇酯20)。这种低浓度可以是例如0.01至0.5%v/v。方便地,可以使用实施例中描述的方法。或者,可以使用被鉴定为促进本发明的特异性结合分子与人Anx-A1结合的任何其他条件。

[0120] 可以计算特异性结合分子与其配体之间的相互作用的 K_d 的许多方法是本领域熟知的。已知技术包括SPR(例如,Biacore)和偏振调制斜入射反射率差(OI-RD)。

[0121] 对其配体具有高亲和力的特异性结合分子在本发明中是有利的,因为通常需要较少的对其配体具有高亲和力的特异性结合分子以与对相同的配体具有较低亲和力的特异性结合分子相比获得特殊效果。例如,如果特异性结合分子用于治疗用途,可以预期与对相同配体具有较低亲和力的特异性结合分子相比对其配体具有高亲和力的特异性结合分子需要更低的剂量。这对于可能需要更少或更小剂量的特异性结合分子(例如,抗体)的患者可能是有利的也会是更经济的,因为治疗会需要较少的特异性结合分子。

[0122] 本发明还提供了包含上述特异性结合分子的制剂。制剂中与人Anx-A1结合的至少90%的特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结合。可以测量结合分子的 K_d 的技术和可以测量 K_d 的条件如上所述。在一个替代实施方案中,提供了包含本发明的特异性结合分子的制剂,其中制剂中与人Anx-A1结合的至少90%的特异性结合分子具有如上所述的CDR,并且优选地在每个分子中(例如,在抗体中)含有两个CDR拷贝。在又一个实施方案中,提供了包含本发明的特异性结合分子的制剂,其中特异性结合分子是抗体或其片段,并且所述制剂中至少90%的抗体或片段是本发明的所述抗体或片段(即,含有如上所述的CDR,优选含有两个上文所述的CDR拷贝)。根据本发明的进一步优选的制剂包括本发明的抗体片段、单克隆抗体或其片段、嵌合抗体或其片段,或人源化抗体或其片段。

[0123] 如本文所用,术语“制剂”是指至少含有本发明的分离的特异性结合分子的产物(例如,溶液或组合物)。制剂应以其中可以稳定储存特异性结合分子的形式制备,即其中特异性结合分子不降解或变性,或失去其结构或活性的形式。其中可以储存抗体的合适条件是技术人员公知的。本发明的制剂可以是液体制剂(即,溶液),例如含水制剂(即,在水中制成的溶液)或在溶剂中制备的制剂,例如一种或多种有机溶剂,或主要在溶剂中制备。这种溶剂可以是极性的或非极性的。或者,所述制剂可以是粉末,例如冻干粉末,或者可以是用于储存特异性结合分子的任何其他合适的形式。这些选择也适用于本发明的组合物。

[0124] 制剂中与人Anx-A1结合的至少90%的特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结合。优选地,制剂中与人Anx-A1结合的至少95%、96%、97%、98%或99%的特异性结合分子以小于20nM、15nM或10nM的 K_d 结合。在该实施方案中,所述特异性结合分子具有上文所述的定义,但不一定是本发明的特异性结合分子,即评估结合人Anx-A1的所有特异性结合分子以确定是否至少90%具有期望的 K_d 。优选地,待评估的特异性结合分子是抗体或其片段。人Anx-A1是指Anx-A1的任何人同种型。特别地,它可以指同种型ANXA1-003。技

术人员能够计算特异性结合分子与其配体结合的 K_d 。可以计算本发明的特异性结合分子的 K_d 的条件,以及可以实现这一点的方法如上所述。90%是指结合Anx-A1的特异性结合分子的数量的90%(即,如上所述,10个结合Anx-A1的特异性结合分子中有9个)而不是90%w/w。正如指出的,至少90%的结合Anx-A1的特异性结合分子以小于20nM,优选小于15nM或10nM的 K_d 结合。这并不排除制剂含有任何浓度的结合其他抗原的特异性结合分子。因此,这提供了一种制剂,其中与人Anx-A1结合的分子在很大程度上是均匀的,即具有相似的功能。

[0125] 本发明的制剂(和组合物)可含有添加剂,其可有利于储存特异性结合分子,例如抗体或抗体片段。例如,如果制剂是液体,则所述制剂可有利地包含高浓度的冷冻保护剂,例如甘油或乙二醇,例如至少20%、至少25%、至少30%、至少40%或至少50%的甘油或乙二醇。冷冻保护剂防止制剂在低温下冻结,保护特异性结合分子在储存期间免受冰损伤。浓缩的蔗糖(例如,至少250mM,至少500mM,至少750mM或至少1M的蔗糖)可有利地包含在液体制剂中。液体制剂还可包含一种或多种抗氧化剂(例如 β -巯基乙醇或二硫苏糖醇)、一种或多种金属螯合剂(例如,乙二胺四乙酸(EDTA))和一种或多种载体蛋白,特别是牛血清白蛋白(BSA)。液体制剂可优选地包含高达1%的BSA,例如0.1-0.5%的BSA。本发明的制剂可以在pH 5-8下,例如,pH 6-8、pH 7-8或pH 7-7.5。可以通过向制剂中加入缓冲液来维持pH,例如Tris(即三(羟甲基)氨基甲烷)、HEPES或MOPS。例如,所述制剂可含有5-50mM的HEPES,例如,10-20mM的HEPES。本发明的冻干制剂(或组合物)可含有一种或多种稳定剂,例如多元醇(例如甘油或山梨糖醇)和/或糖(例如蔗糖、海藻糖或甘露醇)。该制剂还可含有用于如下文所述的组合物的所述其他组分。

[0126] 本发明还提供一种核酸分子,其包含编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列。因此,本发明提供一种核酸分子,其包含编码如上定义的CDR序列的核苷酸序列,即,本发明的核酸分子包含核苷酸序列,其包含以下:

[0127] 核苷酸序列VLCDR1,其编码SEQ ID NO:1、36或37所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列;

[0128] 核苷酸序列VLCDR2,其编码SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列;

[0129] 核苷酸序列VLCDR3,其编码SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列;

[0130] 核苷酸序列VHCDR1,其编码SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列;

[0131] 核苷酸序列VHCDR2,其编码SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列;和

[0132] 核苷酸序列VHCDR3,其编码SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或与其具有至少85%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列。

[0133] 核苷酸序列VLCDR1可具有SEQ ID NO:20、85或86所示的核苷酸序列(其各自编码SEQ ID NO:1),与SEQ ID NO:20、85或86简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:20、85或86具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:20是Mdx001的VLCDR1 DNA序列,SEQ ID NO:85是MDX-L1H4的VLCDR1 DNA序列并且SEQ ID NO:86是MDX-L2H2的VLCDR1 DNA序列。

[0134] 或者,核苷酸序列VLCDR1可具有SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66所示的核苷酸序列(其各自编码SEQ ID NO:36),与SEQ ID NO:65或66简并的核苷酸序列或与SEQ ID No:65或66具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:65是MDX-L1M2H4的VLCDR1 DNA序列并且SEQ ID NO:66是MDX-L2M2H2的VLCDR1DNA序列。

[0135] 或者,核苷酸序列VLCDR1可具有SEQ ID NO:87或88所示的核苷酸序列(其各自编码SEQ ID NO:37),与SEQ ID NO:87或88简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:87或88具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:87是MDX-L1M3H4的VLCDR1 DNA序列并且SEQ ID NO:88是MDX-L2M3H2的VLCDR1 DNA序列。

[0136] 核苷酸序列VLCDR2可具有SEQ ID NO:21或67所示的核苷酸序列,与SEQ ID NO:21或67简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21或67具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:21是Mdx001的VLCDR2 DNA序列;SEQ ID NO:67是MDX-L1H4和MDX-L2H2的VLCDR2 DNA序列(包括MDX-L1H4和MDX-L2H2MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2的变体)。

[0137] 核苷酸序列VLCDR3可具有SEQ ID NO:22、68或69所示的核苷酸序列,与SEQ ID NO:22、68或69简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22、68或69具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:22是Mdx001的VLCDR3 DNA序列;SEQ ID NO:68是MDX-L1H4的VLCDR3 DNA序列(包括其变体MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4);SEQ ID NO:69是MDX-L2H2的VLCDR3 DNA序列(包括其变体MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2)。

[0138] 核苷酸序列VHCDR1可具有SEQ ID NO:23、70或71所示的核苷酸序列,与SEQ ID NO:23、70或71简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:23、70或71具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:23是Mdx001的VHCDR1 DNA序列;SEQ ID NO:70是MDX-L1H4的VHCDR1 DNA序列(包括其变体MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4);SEQ ID NO:71是MDX-L2H2的VHCDR1 DNA序列(包括其变体MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2)。

[0139] 核苷酸序列VHCDR2可具有SEQ ID NO:24或72所示的核苷酸序列,与SEQ ID NO:24或72简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:24或72具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:24是Mdx001的VHCDR2 DNA序列;SEQ ID NO:72是MDX-L1H4和MDX-L2H2的VHCDR2 DNA序列(包括它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2)。

[0140] 核苷酸序列VHCDR3可具有SEQ ID NO:25、73或74所示的核苷酸序列,与SEQ ID NO:25、73或74简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:25、73或74具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。SEQ ID NO:25是Mdx001的VHCDR3 DNA序列;SEQ ID NO:73是MDX-L1H4的VHCDR3 DNA序列(包括其变体MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4);SEQ ID NO:74是MDX-L2H2的VHCDR3 DNA序列(包括其变体MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2)。(在关于优选的核苷酸序列的优选的方面中,核苷酸序列可与SEQ ID NO:20-25或65-74具有至少96%、97%、98%或99%的序列一致性。)

[0141] 本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,存在许多可编码任何给定氨基酸序列(例如本文所述的CDR)的核苷酸序列。简并核苷酸序列是指编码相同蛋白质(或蛋白质序列)的两个(或更多个)核苷酸序列,特别是在起始于第1位的参考核苷酸序列的开放阅读框中(即,其中编码序列的密码子1对应于参考核苷酸序列的位置1-3)。因此,例如,

与SEQ ID NO.20简并的核苷酸序列是与SEQ ID NO.20不同的核苷酸序列,但由于遗传密码的简并性,其编码与SEQ ID NO.20相同的蛋白质序列,即,SEQ ID NO.1的CDR氨基酸序列。

[0142] 每个CDR的序列在本发明的核酸分子中提供。这些序列优选在它们之间提供适当的接头序列,其在表达时提供用于呈递CDR的适当框架,使得它们结合靶表位。可以呈现重链和轻链的CDR,使得在表达时它们在不同的多肽上表达。在本发明的一些实施方案中,重链和轻链的CDR可以在单独的核酸分子上提供。这样的一对分子构成了本发明的另一方面。下文描述的构体、载体和宿主细胞可以掺入或包含单个核酸分子,其包含所有CDR或两个单独的核酸分子,所述两个单独的核酸分子分别包含重链和轻链的CDR。

[0143] 编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列可以优选编码抗体或其片段。这种抗体或其片段包含所述抗体或抗体片段的重链和轻链的可变结构域。在该实施方案中,核苷酸序列优选编码Mdx001(或MDX-L1H4或MDX-L2H2或其变体)抗体的可变结构域的序列,即本发明的核酸分子优选包含编码具有SEQ ID NO:18(或32、34、48、49、50或51)的序列或与其具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列的轻链可变结构域的核苷酸序列,和具有SEQ ID NO:19(或33或35)的序列或与其具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的氨基酸序列的重链可变结构域的核苷酸序列。

[0144] 本发明的核酸分子可以是分离的核酸分子,并且可以进一步包括DNA或RNA或DNA或RNA的化学衍生物。术语“核酸分子”具体包括DNA和RNA的单链和双链形式。

[0145] 用于制备编码本发明的特异性结合分子的核酸分子的方法是本领域熟知的,例如,常规聚合酶链式反应(PCR)克隆技术可用于构建本发明的核酸分子。编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列可经密码子优化以在特定类型或来源的细胞中表达,例如,该序列可以是仓鼠优化的以用于在CHO细胞中表达。

[0146] 在本发明的具体实施方案中,本发明的核酸分子因此包含编码Mdx001的轻链和重链的可变结构域的核苷酸序列。特别地,核苷酸序列可以进行密码子优化以在仓鼠细胞(特别是CHO细胞)中表达。在该实施方案中,轻链可变结构域的核苷酸序列可以是SEQ ID NO:28并且重链可变结构域的核苷酸序列可以是SEQ ID NO:29或与其具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的序列。在一个替代实施方案中,完整的轻链和完整的重链核苷酸序列可以是密码子优化的,例如轻链和重链可分别具有或包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31所示的核苷酸序列,其可以包括或排除编码信号序列的序列,或与其具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的序列。

[0147] 在本发明的另一个优选实施方案中,编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列编码包含MDX-L1H4、MDX-L2H2或其变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2的轻链和重链或其可变区或CDR的抗体或其片段。MDX-L1H4的轻链由SEQ ID NO:81所示的核苷酸序列编码,MDX-L1M2H4的轻链由SEQ ID NO:57所示的核苷酸序列编码,且MDX-L1M3H4的轻链由SEQ ID NO:89所示的核苷酸序列编码;MDX-L1H4(包括其变体MDX-L1M2H4和MDX-L1M3H4)的重链由SEQ ID NO:58所示的核苷酸序列编码。MDX-L1H4轻链的可变区由SEQ ID NO:82所示的核苷酸序列编码,MDX-L1M2H4轻链的可变区由SEQ ID NO:59所示的核苷酸序列编码,并且MDX-L1M3H4轻链的可变区由SEQ ID NO:90所示的核苷酸序列编码;MDX-L1H4重链的可变区由SEQ ID NO:60所示的核苷酸序列编码。

[0148] MDX-L2H2的轻链由SEQ ID NO:83所示的核苷酸序列编码,MDX-L2M2H2的轻链由

SEQ ID NO:61所示的核苷酸序列编码,并且MDX-L2M3H2的轻链由SEQ ID NO:91所示的核苷酸序列编码;MDX-L2H2(包括其变体MDX-L2M2H2和MDX-L2M3H2)的重链由SEQ ID NO:62所示的核苷酸序列编码。MDX-L2H2轻链的可变区由SEQ ID NO:84所示的核苷酸序列编码,MDX-L2M2H2轻链的可变区由SEQ ID NO:63所示的核苷酸序列编码,并且MDX-L2M3H2轻链的可变区由SEQ ID NO:92所示的核苷酸序列编码;MDX-L2H2重链的可变区由SEQ ID NO:64所示的核苷酸序列编码。

[0149] 因此,本发明的核酸分子可包含编码MDX-L1H4或MDX-L2H2或它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2的轻链可变区或其变体的核苷酸序列,和编码MDX-L1H4或MDX-L2H2的重链可变区或其变体的核苷酸序列。编码MDX-L1H4或MDX-L2H2或它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2(或其变体)的轻链可变区的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:59、63、82、84、90或92所示的核苷酸序列、与SEQ ID NO:59、63、82、84、90或92简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:59、63、82、84、90或92具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列或由其组成。编码MDX-L1H4或MDX-L2H2(或其变体)的重链可变区的核苷酸序列可包含SEQ ID NO:60或64所示的核苷酸序列、与SEQ ID NO:60或64简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:60或64具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列或由其组成。

[0150] 或者,本发明的核酸分子可包含编码MDX-L1H4或MDX-L2H2或它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2的轻链或其变体的核苷酸序列,和编码MDX-L1H4或MDX-L2H2的重链或其变体的核苷酸序列。编码MDX-L1H4或MDX-L2H2或它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2(或其变体)的轻链的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:57、61、81、83、89或91所示的核苷酸序列、与SEQ ID NO:57、61、81、83、89或91简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:57、61、81、83、89或91具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列或由其组成。编码MDX-L1H4或MDX-L2H2(或其变体)的重链的核苷酸序列可包含SEQ ID NO:58或62所示的核苷酸序列、与SEQ ID NO:58或62简并的核苷酸序列或与SEQ ID NO:58或62具有至少70%、80%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列或由其组成。

[0151] 在另一个替代方案中,本发明的核酸分子可包含编码结合人Anx-A1的特异性结合分子的核苷酸序列,并具有MDX-L1H4、MDX-L2H2或它们的变体MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2或其变体的CDR序列(如上所述)。优选地,所述核酸分子对于(即,其编码)VLCDR1包含SEQ ID NO:20、65、66或85-88所示的核苷酸序列,对于VLCDR2包含SEQ ID NO:21或67所示的核苷酸序列,对于VLCDR3包含SEQ ID NO:22、68或69所示的核苷酸序列,对于VHCDR1包含SEQ ID NO:23、70或71所示的核苷酸序列,对于VHCDR2包含SEQ ID NO:24或72所示的核苷酸序列,并且对于VHCDR3包含SEQ ID NO:25、73或74所示的核苷酸序列,或分别对SEQ ID NO:20、65、66、85-88、21、67、22、68、69、23、70、71、24、72、25、73或74简并的核苷酸序列,或分别与SEQ ID NO:20、65、66、85-88、21、67、22、68、69、23、70、71、24、72、25、73或74具有至少85%、90%或95%的序列一致性的核苷酸序列。优选地,在本发明的上述实施方案中,所述核苷酸序列是Mdx001、MDX-L1H4、MDX-L1M2H4、MDX-L1M3H4、MDX-L2H2、MDX-L2M2H2或MDX-L2M3H2(及其简并和序列一致性相关序列)的那些,例如对于MDX-L1M2H4为SEQ ID NO:65、67、68、70、72和73。

[0152] 本发明进一步提供了包含本发明的核酸分子的构体。所述构体方便地是包含本发明的核酸分子的重组构体。在所述构体中,本发明的核酸分子可以侧接限制性位点(即,由一种或多种限制酶识别的核苷酸序列),以便能够容易地克隆本发明的核酸分子。在本发明的构体中,编码本发明的特异性结合分子的核苷酸序列可以方便地在所述构体内与表达控制序列可操作地连接,所述表达控制序列可以与核酸分子异源的,即非天然的。这种表达控制序列通常是启动子,尽管编码特异性结合分子的核苷酸序列可以替代地或另外地与其他表达控制序列可操作地连接,所述其他表达控制序列例如终止子序列、操纵子序列、增强子序列等。因此,所述构体可包含天然或非天然启动子。

[0153] 术语“可操作地连接”是指两个或多个核酸分子在单个核酸片段上的缔合,使得一个的功能受另一个的影响。例如,当启动子能够影响该编码序列的表达时(即,编码序列在启动子的转录控制下),启动子与编码序列可操作地连接。编码序列可以正义或反义方向与调控序列可操作地连接。

[0154] 术语“表达控制序列”是指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、内部或下游(3'非编码序列)的核苷酸序列,其影响转录、RNA加工或稳定性,或相关编码序列的翻译。表达控制序列可包括启动子、操纵子、增强子、翻译前导序列、TATA盒、B识别元件等。如本文所用,术语“启动子”是指能够控制编码序列或RNA的表达的核苷酸序列。以下提供合适的实例。通常,编码序列位于启动子序列的3'。启动子可以其整体衍生自天然基因,或者由衍生自天然存在的不同启动子的不同元件组成,或甚至包含合成的核苷酸片段。进一步认识到,由于在大多数情况下调控序列的确切边界尚未完全确定,因此不同长度的核酸片段可能具有相同的调控活性。

[0155] 用于制备本发明的构体的方法是本领域熟知的,例如,常规聚合酶链式反应(PCR)克隆技术可用于构建本发明的核酸分子,其可使用已知方法插入到合适的构体(例如,含有表达控制序列)中。

[0156] 本发明进一步提供了包含本发明的核酸分子或构体的载体。如本文所用,术语“载体”是指可以向其中引入(例如共价插入)本发明的核酸分子或构体的载体,从其可以表达特异性结合分子或编码它的mRNA,和/或可以克隆本发明的核酸分子/构体。因此,所述载体可以是克隆载体或表达载体。

[0157] 可以使用本领域已知的任何合适的方法将本发明的核酸分子或构体插入载体中,例如但不限于,可以使用合适的限制酶消化载体和核酸分子,然后可以与具有匹配的粘性末端的核酸分子连接,或者适当地,可以使用平末端克隆将消化的核酸分子连接到消化的载体中。

[0158] 所述载体可以是细菌或原核载体,或者它可以是真核载体,特别是哺乳动物载体。本发明的核酸分子或构体可以在通用克隆载体中产生或引入其中,特别是细菌克隆载体,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)克隆载体。此类载体的实例包括pUC19、pBR322、pBluescript载体(Stratagene Inc.)和来自Invitrogen Inc.的pCR TOPO[®](例如,pCR2.1-TOPO)。

[0159] 可以将本发明的核酸分子或构体亚克隆到表达载体中,用于表达本发明的特异性结合分子,特别是哺乳动物表达载体。表达载体可含有多种表达控制序列。除了管理转录和翻译的控制序列外,载体可以含有发挥其他功能的另外的核酸序列,包括例如载体复制、选

择标记等。

[0160] 表达载体应具有必需的5'上游和3'下游调控元件,例如启动子序列,例如巨细胞病毒(CMV)、PGK或EF1a启动子,特别是人CMV(HCMV)启动子、核糖体识别和结合TATA盒、翻译起始位点的Kozak序列,以及在其各自的宿主细胞中的用于有效基因转录和翻译的3'UTR AATAAA转录终止序列。其他启动子包括组成型猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、HIV LTR启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、EBV立即早期启动子和劳氏肉瘤病毒启动子。还可以使用人基因启动子,包括但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在某些实施方案中,可以使用诱导型启动子。这些提供了能够打开或关闭核酸分子表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子或四环素启动子。

[0161] 此外,所述表达载体可以含有5'和3'非翻译调控序列,其可以充当增强子序列和/或终止子序列,其可以促进或增强核酸分子的有效转录。

[0162] 载体的实例是质粒、自主复制序列和转座元件。另外的示例性载体包括但不限于噬菌粒、粘粒、人工染色体(如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或PI衍生的人工染色体(PAC))、噬菌体(如 λ 噬菌体或M13噬菌体)和动物病毒。可用作载体的动物病毒类别的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如SV40)。

[0163] 特别优选的表达载体是Kettleborough等(Protein Eng,第4(7)卷:773-783,1991)中公开的那些,其被特别设计用于在哺乳动物细胞中表达嵌合或重构的人轻链和重链。这些载体包含用于转录的人巨细胞病毒(HCMV)增强子和启动子,适当的人轻链或重链恒定区,用于选择转化细胞的基因如新霉素抗性(neo),以及用于宿主细胞中的DNA复制的SV40复制起点。

[0164] 该方法还提供了包含本发明的核酸分子、构体或载体的宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核(例如细菌)或真核(例如哺乳动物)细胞。原核细胞尤其可以用作本发明的核酸分子、构体或载体的克隆宿主。用作克隆宿主的合适的原核细胞包括但不限于真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),例如埃希氏杆菌属(Escherichia),特别是大肠杆菌(E.Coli)和杆菌如枯草芽孢杆菌(B.subtilis)等。或者,克隆宿主可以是真核细胞,例如真菌细胞,例如毕赤酵母(Pichia pastoris),或酵母细胞,或甚至更高等真核细胞,如哺乳动物细胞。

[0165] 或者,本发明的宿主细胞可以是生产宿主,即用于表达和产生本发明的特异性结合分子的细胞。生产宿主细胞可以是如上定义的原核细胞,但优选是真核细胞。所述生产宿主可以是真菌细胞,例如毕赤酵母(Pichia pastoris)或酵母细胞,但优选是哺乳动物细胞,特别是啮齿动物细胞、人细胞或其他灵长类动物的细胞。

[0166] 可以构成根据本发明的生产宿主的细胞的特定实例包括Cos细胞,例如COS-7细胞、HEK293细胞、CHO细胞,尽管可以使用任何合适的细胞类型或细胞系。

[0167] 本发明的核酸分子、构体或载体可以整合到宿主细胞染色体中或者可以在染色体外保持。可以通过本领域已知的任何方法将核酸分子、构体或载体引入到宿主细胞中。这些方法尤其包括原核细胞转化、转导和接合。转化是指通过直接摄取DNA的感受态细菌的遗传改变。转导是指使用噬菌体感染细菌以引入感兴趣的DNA。接合是指直接接触的细菌细胞之

间的遗传物质的直接转移。

[0168] 对于真核细胞,可以通过转染或转导引入核酸分子、构体和载体。转染可通过本领域已知的多种方法完成,包括但不限于磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和基因枪法。转导是指通过病毒感染而不是通过转染使用病毒或逆转录病毒载体递送基因。在某些实施方案中,通过在与细胞接触之前将载体包装入病毒颗粒或病毒粒子中来转导逆转录病毒载体。技术人员充分了解将这种遗传物质引入宿主细胞的合适方法。

[0169] 本发明还提供了制备如本文所定义的特异性结合分子的方法,包括:

[0170] i) 向宿主细胞中引入本发明的核酸分子、构体或载体;

[0171] ii) 表达核酸分子使得产生所述特异性结合分子;和

[0172] iii) 收集所述特异性结合分子,优选通过纯化收集。

[0173] 该方法中使用的宿主细胞如上文参考本发明提供的宿主细胞所述。将本发明的核酸分子、构体或载体导入宿主细胞的方法如上所述。有利地,本发明的核酸分子、构体或载体包含选择标记,使得可以选择其中已经导入该选择标记的宿主细胞。选择标记的实例包括抗生素抗性基因,例如氨苄青霉素抗性基因(例如 β -内酰胺酶)、卡那霉素抗性基因或氯霉素抗性基因(例如,氯霉素乙酰转移酶)。特别适用于哺乳动物宿主细胞的选择标记包括赋予对潮霉素B的抗性的潮霉素-B磷酸转移酶基因(hph)、编码对抗生素G418的抗性的来自Tn5的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph)、二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、腺苷脱氨酶基因(ADA)和多药耐药(MDR)基因。

[0174] 然后可以适当地容易地选择其中引入了核酸分子、构体或载体的细胞,例如,通过暴露于选择标记赋予抗性的化合物。在本发明的一个具体实施方案中,缺乏DHFR基因的CHO细胞用携带DHFR基因的本发明的载体转染或转导,恢复细胞中的DHFR功能。然后,转染的细胞通过在缺乏胸苷的培养基中培养进行选择,其需要DHFR来合成。

[0175] 本发明的核酸分子的“表达”是指编码本发明的特异性结合分子的核酸分子内的基因(即核苷酸序列)被转录和翻译,以产生本发明的特异性结合分子。用于产生本发明的特异性结合分子的核酸分子的表达可以是组成型或诱导型的,这取决于用于驱动基因表达的启动子。对于技术人员来说在宿主细胞中表达基因是简单的,尽管这可能需要优化表达条件。这完全在技术人员的能力范围内。

[0176] 最后收集由生产宿主产生的特异性结合分子。通过该方法产生的特异性结合分子的“收集”仅意味着将它从生产宿主细胞分离。收集不一定需要分离特异性结合分子,尽管优选通过纯化分离特异性结合分子。可以产生特异性结合分子,使得它从宿主细胞分泌,例如特异性结合分子可以产生有信号序列。如果特异性结合分子是由宿主细胞分泌的,其可以最简单地简单地通过例如通过离心培养物分离培养物上清液来收集它。因此,收集特异性结合分子,因为它将从生产宿主细胞中分离。抗体重链和轻链天然地用N-末端信号序列编码,因此从产生它们的细胞中分泌。优选地,产生本发明的特异性结合分子,使得其从宿主细胞分泌,例如它可以产生有信号序列(因此本发明的核酸分子可以编码具有信号序列的特异性结合分子)。在多肽链跨越相关膜(细菌中的细胞表面膜、真核生物中的ER膜)易位后,信号序列被切割,产生成熟的多肽序列。具有和不具有信号序列的特异性结合分子属于本发明的范围。

[0177] 如果不产生本发明的特异性结合分子以使其从宿主细胞分泌,则可以通过收获和裂解产生该分子的宿主细胞来收集特异性结合分子。本领域技术人员可以容易地执行该任务。可以通过离心收获宿主细胞,并通过例如超声处理、弗氏压碎器、使用蛋白质提取试剂(例如, **BugBuster®**、EMD Millipore(美国))的化学裂解,或通过例如AbCam(英国)或Sigma-Aldrich(美国)生产的哺乳动物细胞裂解试剂盒)裂解。

[0178] 然后,优选纯化本发明的特异性结合分子。前面描述了纯化特异性结合分子的方法。优选实现纯化,使得当以w/w为基础评估相对于溶液或组合物(不包括溶剂)中存在的其他组分时,特异性结合分子的纯度为至少50%(例如60%、70%、80%、90%、95%)。

[0179] 通过上述方法可获得的特异性结合分子属于本发明的范围(即,即使不使用该特定方法,其具有使用这种方法时获得的分子的特征)。本发明还涉及通过使用该方法获得的特异性结合分子。这种特异性结合分子具有上述本发明提供的特异性结合分子的特征。通过上述方法可获得的特异性结合分子是多肽,优选为抗体或抗体片段。

[0180] 本发明进一步提供了药物组合物,其包含本文公开的特异性结合分子或制剂,和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。本发明的组合物可根据药学领域已知的技术和方法以任何方便的方式配制。特异性结合分子可以药学上可接受的盐的形式存在,并且在这种情况下,相应地制备组合物。如本文所用,“药学上可接受的”是指与组合物的其他成分相容以及接受者在生理上可接受的成分。组合物和载体或赋形剂材料的性质,剂量等可根据选择和所需的给药途径、治疗目的等以常规方式选择。剂量同样可以常规方式确定,并可取决于分子性质、治疗目的、患者年龄、给药方式等。

[0181] 可以制备药物组合物,用于通过任何合适的方式施用给受试者。这种施用可以是例如口服、直肠、鼻腔、局部、阴道或肠胃外。本文所用的口服施用包括颊和舌下施用。如本文所用的局部施用包括透皮施用。如本文所定义的肠胃外施用包括皮下、肌肉、静脉内、腹膜内和皮内施用。

[0182] 本文公开的药物组合物包括液体溶液或糖浆、固体组合物如粉末、颗粒、片剂或胶囊、乳膏、软膏和本领域常用的任何其他类型的组合物。用于此类组合物的合适的药学上可接受的稀释剂、载体和赋形剂是本领域熟知的。

[0183] 例如,合适的赋形剂包括乳糖、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或其盐、植物油、蜡、脂肪和多元醇。合适的载体或稀释剂包括羧甲基纤维素(CMC)、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、葡萄糖、海藻糖、脂质体、聚乙烯醇、药用级淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖(和其他糖)、碳酸镁、明胶、油、酒精、洗涤剂 and 乳化剂如聚山梨醇酯。还可以使用稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂等。

[0184] 液体药物组合物,无论它们是溶液、悬浮液或其他类似形式,可包括下列中的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油如可用作溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如EDTA;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节渗透压的试剂如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0185] 本发明的药物组合物可以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量

和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性等因素确定,尽管适当的剂量可以通过临床试验确定。方便地,本发明的特异性结合分子可以每日、每周或每月剂量提供给受试者,或者以间隔频率给药,例如给药可以每2、3、4、5或6天,每2、3、4、5或6周,每2、3、4、5或6个月,每年或每半年提供。给药可以10ng/kg至100mg/kg的量提供,例如,1 μ g/kg至10mg/kg体重,例如10 μ g/kg至1mg/kg。熟练的临床医生将能够基于所有相关因素计算患者的适当剂量,例如,年龄、身高、体重、待治疗病况及其严重程度。

[0186] 本发明的药物组合物可以进一步包含至少一种第二治疗活性剂,即该组合物可以包含本发明的特异性结合分子和另一种治疗剂。所述第二治疗活性剂可以是例如,药物分子,第二特异性结合分子(即,结合非人Anx-A1配体的特异性结合分子)等。所述第二治疗活性剂可以是本发明的特异性结合分子被施用于受试者的治疗期间用于治疗病症的第二药剂,即本发明的特异性结合分子和组合物中的第二治疗剂是两者都旨在治疗相同的疾病或病症。

[0187] 所述第二治疗剂尤其可以是抗炎药或免疫调节药或分子。所述免疫调节药物特别是免疫抑制剂。这些药物包括类固醇,例如糖皮质激素,例如泼尼松、泼尼松龙、甲基强的松龙、可的松、氢化可的松、倍他米松、地塞米松或曲安西龙;非甾体抗炎药(NSAID),例如阿司匹林、布洛芬、塞来昔布或萘普生;或抗炎肽,例如免疫选择性抗炎衍生物(ImSAID)。

[0188] 还提供了如本文所定义的用于治疗的特异性结合分子、制剂或药物组合物。治疗是指受试者的治疗。如本文所用,“治疗”是指任何医学病症的治疗。这种治疗可以是预防性(即,预防的)、治愈性(或旨在治愈的治疗),或缓解性(即,仅设计用于限制、缓解或改善病症症状的治疗)。如本文所定义,受试者是指任何哺乳动物,例如农场动物(如牛、马、绵羊、猪或山羊),宠物动物(例如兔子、猫或狗),或灵长类动物(例如猴子、黑猩猩、大猩猩或人类)。最优选地,受试者是人。

[0189] 本发明进一步提供了用于治疗T细胞介导的疾病、强迫症(OCD)或OCD相关疾病的如本文所定义的特异性结合分子、制剂或药物组合物。已发现对Anx-A1特异的抗体可用于治疗OCD(WO2013/088111,通过引用并入本文)和T细胞介导的疾病(WO2010/064012和WO2011/154705,两者均并入本文引作参考),因此本文所述的对膜联蛋白-A1具有类似特异性的特异性结合分子可用于这些目的。

[0190] 类似地,本发明提供了用于治疗T细胞介导的疾病、OCD或OCD相关疾病的方法,其包括向有此需要的受试者施用如本文所定义的特异性结合分子、制剂或药物组合物。或者,本发明还提供了如本文所定义的特异性结合分子或制剂在制备用于治疗受试者中的T细胞介导的疾病、OCD或OCD相关疾病的药物中的用途。

[0191] 优选地,将本发明的特异性结合分子、制剂或药物组合物以治疗有效量施用给有此需要的受试者。“治疗有效量”是指足以显示对受试者的病症的益处的量。量是否足以显示对受试者的病症的益处可由受试者自己或医生/兽医确定。

[0192] 如本文所用,“T细胞介导的疾病”是指其中T-细胞在疾病或病症的发病机理或发展中起作用的任何疾病或病症。T-细胞介导的疾病通常由异常的T细胞活化引起,因此可以通过阻断Anx-A1的活性来治疗,如通过使用本发明的特异性结合分子、制剂或药物组合物实现。

[0193] T细胞介导的疾病尤其包括但不限于自身免疫疾病、移植物抗宿主病、移植物排

斥、动脉粥样硬化、流产和HIV/AIDS。可根据本发明治疗的特定自身免疫疾病包括类风湿性关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、爱迪生氏病、格雷夫病、硬皮病、多发性肌炎、糖尿病、自身免疫性葡萄膜视网膜炎、溃疡性结肠炎、寻常性天疱疮、炎性肠病、自身免疫性甲状腺炎、葡萄膜炎、贝赛特氏症、Sjögren综合征和牛皮癣。

[0194] 可根据本发明治疗的T细胞介导的疾病包括流产。已知不受控制的 T_H1 T细胞应答涉及在一些流产中，而增加 T_H2 T细胞应答有利于妊娠。因此，可以通过用本发明的特异性结合分子预防性治疗孕妇来预防流产，其通过结合Anx-A1抑制 T_H1 应答并增强 T_H2 应答。

[0195] 可根据本发明治疗的T细胞介导的疾病还包括动脉粥样硬化。炎症在冠状动脉疾病和动脉粥样硬化的其他表现中起关键作用。免疫细胞主导早期动脉粥样硬化病变，并且免疫细胞产生的效应分子加速病变的进展。因此，通过向受试者施用本发明的特异性结合分子实现的免疫细胞应答的抑制可以减轻或延迟动脉粥样硬化。

[0196] 本发明特别适用于治疗的T细胞介导的疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化症(MS)和系统性红斑狼疮(SLE)。

[0197] 如上所述，还发现结合Anx-A1的特异性结合分子可有效治疗OCD和OCD相关疾病(WO2013/088111)。因此，本发明的特异性结合分子可用于治疗这些病症。

[0198] 可以使用本发明治疗的与OCD相关的疾病包括拔毛癖、强迫性皮肤搔抓症、抽动秽语综合征、阿斯伯格综合征、厌食症、贪食症、抑郁症、恐慌症、惊恐发作、双相情感障碍、疑病症、创伤后应激障碍、社交焦虑障碍、精神分裂症、注意力缺陷多动障碍或身体变形症。在一个优选的实施方案中、与使用本发明治疗的OCD有关的疾病是焦虑症。焦虑症包括广泛性焦虑症、社交焦虑症、恐慌症、惊恐发作和创伤后应激障碍，其中每一种都可以使用本发明进行治疗。

[0199] 本申请中引用的所有文献全部合并在此引作参考。

[0200] 通过参考下面的非限制性实施例可以进一步理解本发明。

[0201] 序列定义

[0202]

SEQ ID NO:	说明	类型	来源
1	Mdx001 VLCDR1	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
2	Mdx001 VLCDR2	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
3	Mdx001 VLCDR3	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
4	Mdx001 VHCDR1	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
5	Mdx001 VHCDR2	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
6	Mdx001 VHCDR3	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
7	VJ-4B6 VLCDR1	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
8	VJ-4B6 VLCDR2	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
9	VJ-4B6 VLCDR3	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
10 和 11	由 ANXA1-002 和 ANXA1-003 转录本编码的全长人 Anx-A1	蛋白质	智人(<i>Homo sapiens</i>)
12	人 Anx-A1 片段(由 ANXA1-004 转录本编码)	蛋白质	智人(<i>Homo sapiens</i>)
13	人 Anx-A1 片段(由 ANXA1-006 转录本编码)	蛋白质	智人(<i>Homo sapiens</i>)
14	VJ-4B6 VHCDR3	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
15	Mdx001 轻链	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
16	Mdx001 重链	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
17	Mdx001 CDR 组合	蛋白质	人工序列
18	Mdx001 轻链可变区	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
19	Mdx001 重链可变区	蛋白质	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
20	Mdx001 VLCDR1 (密码子优化的)	DNA	人工序列

[0203]

21	Mdx001 VLCDR2 (密码子优化的)	DNA	人工序列
22	Mdx001 VLCDR3 (密码子优化的)	DNA	人工序列
23	Mdx001 VHCDR1 (密码子优化的)	DNA	人工序列
24	Mdx001 VHCDR2 (密码子优化的)	DNA	人工序列
25	Mdx001 VHCDR3 (密码子优化的)	DNA	人工序列
26	Mdx001 轻链可变区	DNA	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
27	Mdx001 重链可变区	DNA	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
28	Mdx001 轻链可变区 (密码子优化的)	DNA	人工序列
29	Mdx001 重链可变区 (密码子优化的)	DNA	人工序列
30	Mdx001 轻链 (密码子优化的)	DNA	人工序列
31	Mdx001 重链 (密码子优化的)	DNA	人工序列
32	MDX-L1H4 轻链可变区	蛋白质	人工序列
33	MDX-L1H4 重链可变区	蛋白质	人工序列
34	MDX-L2H2 轻链可变区	蛋白质	人工序列
35	MDX-L2H2 重链可变区	蛋白质	人工序列
36	MDX-L1M2H4/MDX-L2M2H2 VLCDR1	蛋白质	人工序列
37	MDX-L1M3H4/MDX-L2M3H2 VLCDR1	蛋白质	人工序列
38	MDX-L1M2H4/MDX-L2M2H2 CDR 组合	蛋白质	人工序列
39	MDX-L1M3H4/MDX-L2M3H2 CDR 组合	蛋白质	人工序列
40	MDX-L1H4 轻链	蛋白质	人工序列
41	MDX-L1H4 重链	蛋白质	人工序列
42	MDX-L2H2 轻链	蛋白质	人工序列
43	MDX-L2H2 重链	蛋白质	人工序列
44	MDX-L1M2H4 轻链	蛋白质	人工序列
45	MDX-L2M2H2 轻链	蛋白质	人工序列
46	MDX-L1M3H4 轻链	蛋白质	人工序列
47	MDX-L2M3H2 轻链	蛋白质	人工序列
48	MDX-L1M2H4 轻链可变区	蛋白质	人工序列
49	MDX-L1M3H4 轻链可变区	蛋白质	人工序列
50	MDX-L2M2H2 轻链可变区	蛋白质	人工序列
51	MDX-L2M3H2 轻链可变区	蛋白质	人工序列
52	MDX-L1H4/MDX-L2H2 轻链信号序列	蛋白质	人工序列
53	MDX-L1H4/MDX-L2H2 重链信号序列	蛋白质	人工序列
54	MDX-L1M2H4 成熟轻链	蛋白质	人工序列
55	MDX-L1H4 成熟重链	蛋白质	人工序列

[0204]

56	LC1(mod1)HC4/LC2(mod1)HC2 VLCDR1	蛋白质	人工序列
57	MDX-L1M2H4 轻链	DNA	人工序列
58	MDX-L1H4 重链	DNA	人工序列
59	MDX-L1M2H4 轻链可变区	DNA	人工序列
60	MDX-L1H4 重链可变区	DNA	人工序列
61	MDX-L2M2H2 轻链	DNA	人工序列
62	MDX-L2H2 重链	DNA	人工序列
63	MDX-L2M2H2 轻链可变区	DNA	人工序列
64	MDX-L2H2 重链可变区	DNA	人工序列
65	MDX-L1M2H4 VLCDR1	DNA	人工序列
66	MDX-L2M2H2 VLCDR1	DNA	人工序列
67	MDX-L1H4/MDX-L2H2 VLCDR2	DNA	人工序列
68	MDX-L1H4 VLCDR3	DNA	人工序列
69	MDX-L2H2 VLCDR3	DNA	人工序列
70	MDX-L1H4 VHCDR1	DNA	人工序列
71	MDX-L2H2 VHCDR1	DNA	人工序列
72	MDX-L1H4/MDX-L2H2 VHCDR2	DNA	人工序列
73	MDX-L1H4 VHCDR3	DNA	人工序列
74	MDX-L2H2 VHCDR3	DNA	人工序列
75	MDX-L1H4 成熟轻链	蛋白质	人工序列
76	MDX-L1M3H4 成熟轻链	蛋白质	人工序列
77	MDX-L2H2 成熟轻链	蛋白质	人工序列
78	MDX-L2M2H2 成熟轻链	蛋白质	人工序列
79	MDX-L2M3H2 成熟轻链	蛋白质	人工序列
80	MDX-L2H2 成熟重链	蛋白质	人工序列
81	MDX-L1H4 轻链	DNA	人工序列
82	MDX-L1H4 轻链可变区	DNA	人工序列
83	MDX-L2H2 轻链	DNA	人工序列
84	MDX-L2H2 轻链可变区	DNA	人工序列
85	MDX-L1H4 VLCDR1	DNA	人工序列
86	MDX-L2H2 VLCDR1	DNA	人工序列
87	MDX-L1M3H4 VLCDR1	DNA	人工序列
88	MDX-L2M3H2 VLCDR1	DNA	人工序列
89	MDX-L1M3H4 轻链	DNA	人工序列
90	MDX-L1M3H4 轻链可变区	DNA	人工序列
91	MDX-L2M3H2 轻链	DNA	人工序列
92	MDX-L2M3H2 轻链可变区	DNA	人工序列

附图说明

[0205] 图1显示了ELISA测定的结果,证明了Mdx001与Anx-A1的结合。A492值与通过缀合至第二抗体的HRP的OPD降解成比例,因此代表Mdx001结合。

[0206] 图2显示了Mdx001与Anx-A1结合的Biacore分析的结果。A、B和C部分各自呈现单独测定的结果。测定1 (A部分) 显示 K_D 为9.43nM;测定2 (B部分) 显示 K_D 为9.58nM;测定3 (C部分) 显示 K_D 为6.46nM。

[0207] 图3显示了MDX-L1H4和MDX-L2H2的轻链可变区和重链可变区,以及由MDX-L1H4和MDX-L2H2产生的变体。序列以单字母氨基酸代码表示。CDR序列以粗体显示。突出了变体序列中的氨基酸取代(相对于MDX-L1H4和MDX-L2H2)。

[0208] 图4显示了ELISA测定的结果,证明了抗体MDX-L1H4及其变体(A)和MDX-L2H2及其变体(B)与Anx-A1的结合。如图1所示,A492值与通过缀合至第二抗体的HRP的OPD降解成比例,因此代表抗体与Anx-A1的结合。

[0209] 图5显示了MDX-L1M2H4和MDX-L2M2H2与Anx-A1的结合的Biacore分析的结果。A-C部分各自显示MDX-L1M2H4与Anx-A1结合的单独测定的结果;D-F部分各自显示MDX-L2M2H2与Anx-A1的结合的单独测定的结果。对于MDX-L1M2H4,测定1 (A部分) 显示 K_D 为3.96nM;测定2 (B部分) 显示 K_D 为3.94nM;测定3 (C部分) 显示 K_D 为4.04nM。对于MDX-L2M2H2测定1 (D部分) 显示 K_D 为4.44nM;测定2 (E部分) 显示 K_D 为4.37nM;测定3 (F部分) 显示 K_D 为5.17nM。

具体实施方式

[0210] 实施例

[0211] 实施例1:杂交瘤ECACC 10060301产生的Anx-A1结合抗体的测序

[0212] 从杂交瘤ECACC 10060301中提取mRNA。使用逆转录方案将提取的mRNA转录成cDNA。使用专有引物,通过Aldevron (美国)的标准染料-终止子毛细管测序对cDNA进行测序。

[0213] 使用BigDye®终止子v3.1循环测序试剂盒,在Life Technologies®提供的标准方案下进行循环测序。所有数据均使用3730x1 DNA分析仪系统和Life Technologies®提供的统一数据收集软件收集,该软件用于3730x1 DNA分析仪的操作并收集通过3730x1 DNA分析仪产生的数据。

[0214] 使用CodonCode Aligner (CodonCode Corporation,美国)进行序列组装。通过将最普遍的碱基响应自动分配给混合碱基响应来解析混合碱基响应。普遍性由碱基响应的频率和碱基响应的个体质量决定。

[0215] 通过cDNA测序获得的轻链可变区和重链可变区的序列分别示于SEQ ID NO:26和27。

[0216] SEQ ID NO:26和27显示的序列针对已知种系的数据库运行,并鉴定抗体的种系。这表明对于轻链获得的序列是截短的并且在其N-末端缺失5个氨基酸。基于鉴定的种系序列,通过融合抗体 (Fusion Antibodies) (英国)重建完整序列,并且密码子优化以在CHO细胞中表达。密码子优化的可变结构域具有SEQ ID NO:28 (轻链)和29 (重链)所示的序列。

[0217] 实施例2:Anx-A1结合Mdx001抗体的生产

[0218] 使用标准重组技术将密码子优化的序列克隆到载体pD2610-v13 (ATUM,美国)中,并转染到ExpiCHO细胞 (Thermo Fisher Scientific,美国)中。产生200ml的培养物。使用蛋白A亲和柱从细胞上清液中回收抗体 (Mdx001),并洗脱到磷酸盐缓冲介质中。

[0219] 实施例3:Mdx001结合Anx-A1

[0220] 通过ELISA确认Mdx001与Anx-A1的结合, The Antibody Company (英国) 使用标准ELISA技术进行。ELISA板用25 μ g/ml的Anx-A1和包被缓冲液(45mM Na₂CO₃, pH 9.6, 补充1mM的CaCl₂) 在4℃下包被过夜(发现Ca²⁺是Mdx001与Anx-A1结合所必需的, 因此所有结合实验在1mM CaCl₂存在下进行。)

[0221] 然后, 将板在室温下用封闭缓冲液(1mM CaCl₂、10mM HEPES, 2%w/v BSA)封闭1小时。然后, 将第一抗体(Mdx001)应用于板。将抗体一式两份地施加到在整个板上制备的四倍稀释液中, 从1 μ g/ml的浓度开始并以2.38 $\times 10^{-7}$ μ g/ml的浓度结束。将抗体稀释于补充有0.1BSA的洗涤缓冲液(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) 吐温-20和1mM CaCl₂) 中。将第一抗体在室温下施加到板上1小时, 然后用洗涤缓冲液洗涤板。

[0222] 然后进行检测抗体。为了检测, 以1:1000的稀释度使用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的山羊抗小鼠抗体(Sigma-Aldrich, A2554)。将其在室温下应用于ELISA板1小时。然后用洗涤缓冲液再次洗涤ELISA板。

[0223] 然后, 将比色底物OPD(邻苯二胺二盐酸盐, Sigma-Aldrich P4664)施加到板上。根据制造商的说明制备OPD溶液, 以在pH5的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中产生0.4mg/ml的OPD溶液。在使用前立即在每100ml的OPD溶液加入40 μ l的30%的H₂O₂。然后, 将100 μ l的所得OPD溶液加入板的每个孔中。

[0224] 将板在室温下在黑暗中孵育20分钟, 之后加入50 μ l的3M H₂SO₄以终止反应。加入H₂SO₄后, 立即在492nm处读取板的吸光度(492nm处的吸光度缩写为A492)。发现Mdx001与Anx-A1很好地结合。结果如表1和图1所示。发现Mdx001在整个平板上结合, 除了在最高稀释度下。即使在抗Anx-A1抗体的最高稀释度下, 一些结合也是明显的, 具有空白值和最高抗体稀释度值之间观察到的吸光度差。(空白孔用包被缓冲液中的25 μ g/ml的Anx-A1包被, 并且与实验孔相同地处理, 除了没有添加第一抗体之外。) 低于0.0625 μ g/ml的第一抗体(Mdx001)结合迅速下降。在低于3.9 $\times 10^{-3}$ μ g/ml的第一抗体浓度下, 结合似乎达到平台。

[0225]	Mdx001 浓度(μ g/ml)	A492
	1	1.772
	0.25	1.66765
	0.0625	1.59375
	0.015625	0.8651
	0.003906	0.31225

[0226]	0.000977	0.20415
	0.000244	0.17125
	6.1 $\times 10^{-5}$	0.14415
	1.53 $\times 10^{-5}$	0.16205
	3.81 $\times 10^{-6}$	0.1608
	9.54 $\times 10^{-7}$	0.1316
	2.38 $\times 10^{-7}$	0.1345

[0227] 实施例4:Mdx001与膜联蛋白-A1结合的Biacore分析

[0228] Biacore分析在NMI,蒂宾根大学,德国进行。如上所述,使用标准Biacore程序分析在CHO细胞中表达的纯化的Mdx001。

[0229] 使用的运行缓冲液如下:HEPES 10mM,NaCl 150mM,CaCl₂ 1mM,吐温20 0.05% v/v,pH 7.4。使用0.22μM的过滤器过滤缓冲液,并通过超声处理脱气15分钟。

[0230] 通过山羊抗小鼠IgG将Mdx001抗体固定在芯片上。在运行缓冲液中将配体(Anx-A1)通过固定化抗体。Anx-A1以5、10、20、40或80nM的浓度使用。在每个实验中,总共150μl的含有Anx-A1的运行缓冲液以30μl/min的流速通过抗体。

[0231] 使用再生缓冲液,10mM甘氨酸-HCl,pH 2进行再生。为了再生芯片,将70μl的再生缓冲液以10μl/min的速率通过芯片。

[0232] 实验一式三份进行。3个实验中的每一个的结果显示在图2中。三个实验给出了Mdx001与Anx-A1的结合的K_D值为9.43nM,9.58nM和6.46nM,平均为8.49nM。

[0233] 实施例5-Mdx001的人源化

[0234] 使用结合已知人框架区序列的抗体结构和数据库分析的标准CDR移植技术将Mdx001人源化。使用的所有框架区序列均源自分离自人的成熟IgG,因此预期其是非免疫原性的并保留CDR环的经典结构。

[0235] 人源化过程产生两种抗体,MDX-L1H4和MDX-L2H2,其序列如上所述。

[0236] 实施例6-Mdx002与Anx-A1的结合

[0237] 使用标准生物信息学工具分析人源化抗体以鉴定可能的翻译后修饰的位点。脱酰胺是抗体中的主要降解途径,因此检查人源化序列的脱酰胺基序Ser-Asn-Gly、Glu-Asn-Asn、Leu-Asn-Gly和Leu-Asn-Asn。在MDX-L1H4/MDX-L2H2的VLCDR1中鉴定出具有序列Ser-Asn-Gly的脱酰胺基序。对MDX-L1H4和MDX-L2H2进行修饰以除去该序列基序。产生包含经修饰的VLCDR1序列的人源化抗体,以鉴定功能性修饰的VLCDR1序列。

[0238] 为每种人源化抗体产生三种变体。图3显示了由MDX-L1H4和MDX-L2H2产生的变体的轻链可变区和重链可变区。

[0239] 第一种修饰抗体,变体1(即,MDX-L1M2H4)包含具有SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的VLCDR1,即将第11位的甘氨酸残基取代为丙氨酸残基。第二种修饰抗体,变体2(即,MDX-L1M3H4)包含具有SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的VLCDR1,即将第9位的丝氨酸残基取代为苏氨酸残基。第三种修饰抗体,变体3(标注为LC1(mod1)HC4)包含修饰的Mdx001 VLCDR1序列,其中第10位的天冬酰胺残基被取代为天冬氨酸残基。LC1(mod1)HC4 VLCDR1序列如SEQ ID NO:56中所示。

[0240] 来自MDX-L2H2的变体与来自MDX-L1H4的那些变体相关,只要它们在VLCDR1中含有相同的修饰。它们被称为变体1(MDX-L2M2H2)、变体2(MDX-L2M3H2)和变体3(LC2(mod1)HC2)。

[0241] 如实施例5中所述,两种抗体均含有人源化的可变区和恒定区。相对于MDX-L1H4和MDX-L2H2,CDR序列在其他方面未改变,并且除了上述VLCDR1修饰与其亲本序列相同之外。

[0242] 使用与实施例3中所述相同的方法,最初通过ELISA测试修饰的人源化抗体与Anx-A1的结合。该ELISA的结果如图4所示。作为对照,使用MDX-L1H4和MDX-L2H2。在图4A中可见,MDX-L1M2H4(LC1(mod2)HC4)和MDX-L1M3H4(LC1(mod3)HC4)(和MDXL-L2M2H2(LC2(mod2)HC2)和MDX-L2M3H2(LC2(mod3)HC2),图4B)结合Anx-A1,与MDX-L1H4(或MDX-L2H2)相当,但

LC1 (mod1)HC4 (和LC2 (mod1)HC2) 与Anx-A1的结合显著弱于对照。这证明了Mdx001 VLCDR1中的天冬酰胺10取代为天冬氨酸对抗体与Anx-A1的结合产生了负面影响。然而,在相同CDR序列中甘氨酸11取代为丙氨酸或苏氨酸9取代为丝氨酸不会负面影响结合。

[0243] 根据ELISA结果,丢弃LC1 (mod1)HC4和LC2 (mod1)HC2抗体。LC1 (mod2)HC4和LC2 (mod2)HC2抗体,其显示抗体与修饰的VLCDR1序列的最佳结合,被用于进一步分析。使用与实施例4中所述相同的方法,通过Biacore定量LC1 (mod2)HC4和LC2 (mod2)HC2与Anx-A1的结合。如实施例4,Biacore实验一式三份进行。三个实验中的每一个的结果显示在图5中。如图所示,对于LC1 (mod2)HC4,三次实验给出的 K_D 值为3.96nM、3.94nM和4.04nM,平均为3.98nM。这表明,LC1 (mod2)HC4 (其对于Anx-A1结合具有3.98nM的 K_D) 以显著高于Mdx001 (其对于Anx-A1结合具有8.49nM的 K_D) 的亲和力结合Anx-A1。LC1 (mod2)HC4的名称为MDX-L1M2H4。对于LC2 (mod2)HC2,三次实验给出的 K_D 值为4.44nM、4.37nM和5.17nM,平均为4.66nM。这表明,LC2 (mod2)HC2 (其对于Anx-A1结合具有4.66nM的 K_D) 也以显著高于Mdx001 (其对于Anx-A1结合具有8.49nM的 K_D) 的亲和力结合Anx-A1。LC2 (mod2)HC2的名称为MDX-L2M2H2。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 米达内克斯股份有限公司 (Medannex Ltd.)
- [0003] <120> 抗人膜联蛋白A1抗体
- [0004] <130> 42.18.131219/02
- [0005] <150> GB 1702091.8
- [0006] <151> 2017-02-08
- [0007] <160> 92
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 16
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0013] <400> 1
- [0014] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
- [0015] 1 5 10 15
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 7
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0020] <400> 2
- [0021] Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
- [0022] 1 5
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 9
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0027] <400> 3
- [0028] Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
- [0029] 1 5
- [0030] <210> 4
- [0031] <211> 10
- [0032] <212> PRT
- [0033] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0034] <400> 4
- [0035] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly
- [0036] 1 5 10
- [0037] <210> 5
- [0038] <211> 17
- [0039] <212> PRT
- [0040] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0041] <400> 5

[0042]	Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0043]	1 5 10 15
[0044]	Gly
[0045]	<210> 6
[0046]	<211> 11
[0047]	<212> PRT
[0048]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0049]	<400> 6
[0050]	Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0051]	1 5 10
[0052]	<210> 7
[0053]	<211> 11
[0054]	<212> PRT
[0055]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0056]	<400> 7
[0057]	Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
[0058]	1 5 10
[0059]	<210> 8
[0060]	<211> 7
[0061]	<212> PRT
[0062]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0063]	<400> 8
[0064]	Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
[0065]	1 5
[0066]	<210> 9
[0067]	<211> 9
[0068]	<212> PRT
[0069]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0070]	<400> 9
[0071]	Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
[0072]	1 5
[0073]	<210> 10
[0074]	<211> 346
[0075]	<212> PRT
[0076]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0077]	<400> 10
[0078]	Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
[0079]	1 5 10 15
[0080]	Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
[0081]	20 25 30
[0082]	Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
[0083]	35 40 45

[0084]	Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
[0085]	50 55 60
[0086]	Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
[0087]	65 70 75 80
[0088]	Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu
[0089]	85 90 95
[0090]	Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu
[0091]	100 105 110
[0092]	Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys
[0093]	115 120 125
[0094]	Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg
[0095]	130 135 140
[0096]	Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu
[0097]	145 150 155 160
[0098]	Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe
[0099]	165 170 175
[0100]	Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe
[0101]	180 185 190
[0102]	Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu
[0103]	195 200 205
[0104]	Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile
[0105]	210 215 220
[0106]	Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr
[0107]	225 230 235 240
[0108]	Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu
[0109]	245 250 255
[0110]	Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr
[0111]	260 265 270
[0112]	Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly
[0113]	275 280 285
[0114]	Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser
[0115]	290 295 300
[0116]	Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly
[0117]	305 310 315 320
[0118]	Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu
[0119]	325 330 335
[0120]	Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn
[0121]	340 345
[0122]	<210> 11
[0123]	<211> 346
[0124]	<212> PRT
[0125]	<213> 智人(Homo sapiens)

[0126]	<400> 11																
[0127]	Met	Ala	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Ala	Trp	Phe	Ile	Glu	Asn	
[0128]	1			5			10			15							
[0129]	Glu	Glu	Gln	Glu	Tyr	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Lys	Gly	Gly	Pro	
[0130]	20					25					30						
[0131]	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Tyr	Pro	Thr	Phe	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	
[0132]	35				40				45								
[0133]	Ala	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Ile	Met	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	
[0134]	50			55			60										
[0135]	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile	
[0136]	65		70		75		80										
[0137]	Lys	Ala	Ala	Tyr	Leu	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	
[0138]	85					90					95						
[0139]	Lys	Lys	Ala	Leu	Thr	Gly	His	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	
[0140]	100				105				110								
[0141]	Lys	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Asp	Ala	Asp	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Met	Lys	
[0142]	115			120			125										
[0143]	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Glu	Ile	Leu	Ala	Ser	Arg	
[0144]	130		135		140												
[0145]	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Arg	Asp	Ile	Asn	Arg	Val	Tyr	Arg	Glu	Glu	Leu	
[0146]	145		150		155		160										
[0147]	Lys	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	
[0148]	165				170				175								
[0149]	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Asp	Phe	
[0150]	180			185			190										
[0151]	Gly	Val	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Tyr	Glu	
[0152]	195			200			205										
[0153]	Ala	Gly	Glu	Arg	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Asn	Val	Phe	Asn	Thr	Ile	
[0154]	210		215		220												
[0155]	Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Tyr	Pro	Gln	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Gln	Lys	Tyr	
[0156]	225		230		235		240										
[0157]	Thr	Lys	Tyr	Ser	Lys	His	Asp	Met	Asn	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu	
[0158]	245				250				255								
[0159]	Lys	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Cys	Leu	Thr	Ala	Ile	Val	Lys	Cys	Ala	Thr	
[0160]	260			265			270										
[0161]	Ser	Lys	Pro	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu	Lys	Leu	His	Gln	Ala	Met	Lys	Gly	
[0162]	275			280			285										
[0163]	Val	Gly	Thr	Arg	His	Lys	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	
[0164]	290		295		300												
[0165]	Glu	Ile	Asp	Met	Asn	Asp	Ile	Lys	Ala	Phe	Tyr	Gln	Lys	Met	Tyr	Gly	
[0166]	305		310		315		320										
[0167]	Ile	Ser	Leu	Cys	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Asp	Tyr	Glu	

[0168]		325		330		335
[0169]	Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn					
[0170]		340		345		
[0171]	<210> 12					
[0172]	<211> 204					
[0173]	<212> PRT					
[0174]	<213> 智人(Homo sapiens)					
[0175]	<400> 12					
[0176]	Met Asn Leu Ile Leu Arg Tyr Thr Phe Ser Lys Met Ala Met Val Ser					
[0177]	1	5		10		15
[0178]	Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr					
[0179]		20		25		30
[0180]	Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser					
[0181]		35		40		45
[0182]	Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala Ala Leu His Lys					
[0183]		50		55		60
[0184]	Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr Ile Ile Asp Ile Leu					
[0185]	65	70		75		80
[0186]	Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile Lys Ala Ala Tyr Leu					
[0187]		85		90		95
[0188]	Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu Lys Lys Ala Leu Thr					
[0189]		100		105		110
[0190]	Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu Lys Thr Pro Ala Gln					
[0191]		115		120		125
[0192]	Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp					
[0193]		130		135		140
[0194]	Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Asn Lys Glu Ile					
[0195]	145	150		155		160
[0196]	Arg Asp Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu Lys Arg Asp Leu Ala					
[0197]		165		170		175
[0198]	Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe Arg Asn Ala Leu Leu					
[0199]		180		185		190
[0200]	Ser Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe Gly					
[0201]		195		200		
[0202]	<210> 13					
[0203]	<211> 115					
[0204]	<212> PRT					
[0205]	<213> 智人(Homo sapiens)					
[0206]	<400> 13					
[0207]	Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn					
[0208]	1	5		10		15
[0209]	Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro					

[0210]	20	25	30
[0211]	Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val		
[0212]	35	40	45
[0213]	Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr		
[0214]	50	55	60
[0215]	Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile		
[0216]	65	70	75
[0217]	Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu		
[0218]	85	90	95
[0219]	Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu		
[0220]	100	105	110
[0221]	Lys Thr Pro		
[0222]	115		
[0223]	<210> 14		
[0224]	<211> 9		
[0225]	<212> PRT		
[0226]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0227]	<400> 14		
[0228]	Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr		
[0229]	1	5	
[0230]	<210> 15		
[0231]	<211> 239		
[0232]	<212> PRT		
[0233]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0234]	<400> 15		
[0235]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln		
[0236]	1	5	10
[0237]	Gly Thr Arg Cys Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro		
[0238]	20	25	30
[0239]	Val Ser Leu Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser		
[0240]	35	40	45
[0241]	Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys		
[0242]	50	55	60
[0243]	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe		
[0244]	65	70	75
[0245]	Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
[0246]	85	90	95
[0247]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe		
[0248]	100	105	110
[0249]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		
[0250]	115	120	125
[0251]	Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro		

[0252]	130	135	140
[0253]	Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe		
[0254]	145	150	155
[0255]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp		
[0256]	165	170	175
[0257]	Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp		
[0258]	180	185	190
[0259]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys		
[0260]	195	200	205
[0261]	Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys		
[0262]	210	215	220
[0263]	Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0264]	225	230	235
[0265]	<210> 16		
[0266]	<211> 473		
[0267]	<212> PRT		
[0268]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0269]	<400> 16		
[0270]	Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly		
[0271]	1	5	10
[0272]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg		
[0273]	20	25	30
[0274]	Pro Gly Thr Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[0275]	35	40	45
[0276]	Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu		
[0277]	50	55	60
[0278]	Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn		
[0279]	65	70	75
[0280]	Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser		
[0281]	85	90	95
[0282]	Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile		
[0283]	100	105	110
[0284]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly		
[0285]	115	120	125
[0286]	Gln Gly Ile Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser		
[0287]	130	135	140
[0288]	Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val		
[0289]	145	150	155
[0290]	Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val		
[0291]	165	170	175
[0292]	Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala		
[0293]	180	185	190

[0294]	Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro		
[0295]	195	200	205
[0296]	Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro		
[0297]	210	215	220
[0298]	Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile		
[0299]	225	230	235 240
[0300]	Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro		
[0301]	245	250	255
[0302]	Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn		
[0303]	260	265	270
[0304]	Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val		
[0305]	275	280	285
[0306]	Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe		
[0307]	290	295	300
[0308]	Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu		
[0309]	305	310	315 320
[0310]	Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His		
[0311]	325	330	335
[0312]	Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys		
[0313]	340	345	350
[0314]	Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu		
[0315]	355	360	365
[0316]	Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu		
[0317]	370	375	380
[0318]	Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro		
[0319]	385	390	395 400
[0320]	Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn		
[0321]	405	410	415
[0322]	Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile		
[0323]	420	425	430
[0324]	Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser		
[0325]	435	440	445
[0326]	Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys		
[0327]	450	455	460
[0328]	Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys		
[0329]	465	470	
[0330]	<210> 17		
[0331]	<211> 70		
[0332]	<212> PRT		
[0333]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0334]	<220>		
[0335]	<223> Mdx001 CDR的组合序列		

[0336]	<400> 17
[0337]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
[0338]	1 5 10 15
[0339]	Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
[0340]	20 25 30
[0341]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly
[0342]	35 40 45
[0343]	Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Ala Arg Trp Gly Leu
[0344]	50 55 60
[0345]	Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0346]	65 70
[0347]	<210> 18
[0348]	<211> 112
[0349]	<212> PRT
[0350]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0351]	<400> 18
[0352]	Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0353]	1 5 10 15
[0354]	Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0355]	20 25 30
[0356]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0357]	35 40 45
[0358]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
[0359]	50 55 60
[0360]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0361]	65 70 75 80
[0362]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[0363]	85 90 95
[0364]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0365]	100 105 110
[0366]	<210> 19
[0367]	<211> 118
[0368]	<212> PRT
[0369]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0370]	<400> 19
[0371]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
[0372]	1 5 10 15
[0373]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0374]	20 25 30
[0375]	Trp Ile Gly Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
[0376]	35 40 45
[0377]	Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

[0378]	50	55	60
[0379]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0380]	65	70	75 80
[0381]	Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys		
[0382]	85	90	95
[0383]	Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile		
[0384]	100	105	110
[0385]	Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[0386]	115		
[0387]	<210> 20		
[0388]	<211> 48		
[0389]	<212> DNA		
[0390]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0391]	<220>		
[0392]	<223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VLCDR1序列		
[0393]	<400> 20		
[0394]	cgggtcaagcc agagcttgga gaactcgaat ggaaagacct acctcaat 48		
[0395]	<210> 21		
[0396]	<211> 21		
[0397]	<212> DNA		
[0398]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0399]	<220>		
[0400]	<223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VLCDR2序列		
[0401]	<400> 21		
[0402]	gggggtgtcga acagattttc c 21		
[0403]	<210> 22		
[0404]	<211> 27		
[0405]	<212> DNA		
[0406]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0407]	<220>		
[0408]	<223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VLCDR3序列		
[0409]	<400> 22		
[0410]	cttcaggtca cccatgtgcc gtacacc 27		
[0411]	<210> 23		
[0412]	<211> 30		
[0413]	<212> DNA		
[0414]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0415]	<220>		
[0416]	<223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VHCDR1序列		
[0417]	<400> 23		
[0418]	ggctacacct tcaccaacta ctggatcggc 30		
[0419]	<210> 24		

- [0420] <211> 51
- [0421] <212> DNA
- [0422] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0423] <220>
- [0424] <223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VLCDR2序列
- [0425] <400> 24
- [0426] gacatctatc cgggtggaga ctacaccaac tacaacgaaa agttcaaggg a 51
- [0427] <210> 25
- [0428] <211> 33
- [0429] <212> DNA
- [0430] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0431] <220>
- [0432] <223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001 VHCDR3序列
- [0433] <400> 25
- [0434] gcccggtggg gacttggta ctacttcgac tac 33
- [0435] <210> 26
- [0436] <211> 321
- [0437] <212> DNA
- [0438] <213> 小家鼠(Mus musculus)
- [0439] <400> 26
- [0440] cagactccac tctccctgcc tgtcagtcct ggagatcaag tctccatctc ttgcaggtct 60
- [0441] agtcagagcc ttgaaaacag taatggaaaa acctatttga actggtacct ccagaaacca 120
- [0442] ggccagtctc cacagtcct gatctacggg gtttccaacc gatcttctgg ggtcctagac 180
- [0443] aggttcagtg gtagtgatc agggacagat ttcacactga aaatcagcag agtggaggct 240
- [0444] gaggatttgg gaggttatct ctgcctccaa gttacacatg tcccgtacac gttcggaggg 300
- [0445] gggaccaagc tggaataaaa a 321
- [0446] <210> 27
- [0447] <211> 357
- [0448] <212> DNA
- [0449] <213> 小家鼠(Mus musculus)
- [0450] <400> 27
- [0451] ccaggtccag ctgcagcagt ctggacctga actggtcagg cctgggactt cagtgaagat 60
- [0452] gtcttgcaag gcttctggat acacctcac taactactgg ataggttggg caaagcagag 120
- [0453] gcctggacat ggccttgagt ggattggaga tatttaccct ggaggtgatt atactaacta 180
- [0454] caatgagaag ttcaagggca aggccacact gactgcagac aaatcctcca gcacagccta 240
- [0455] catgcagttc agcagcctga catctgagga ctctgccatc tattattgtg caagatgggg 300
- [0456] gttaggatac tactttgact actggggcca aggcactact ctcacagtct cctcagc 357
- [0457] <210> 28
- [0458] <211> 336
- [0459] <212> DNA
- [0460] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0461] <220>

- [0462] <223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001轻链可变区
- [0463] <400> 28
- [0464] gacgctgtga tgaccagac tcctctgtcc ctgcccgtgt ccctggggga ccaagtctcc 60
- [0465] atctcctgcc ggtcaagcca gagcttgag aactcgaatg gaaagaccta cctcaattgg 120
- [0466] tacctccaga agccggggca gtcccccaa ctctgatct acggggtgtc gaacagattt 180
- [0467] tccggagtgc tggatcggtt ctggggtcc ggaagcggca ccgacttcac tctgaaaatt 240
- [0468] agccgcgtgg aagccgagga cttgggcgtg tattttctgcc ttcaggtcac ccatgtgccg 300
- [0469] tacaccttcg gtggcggcac aaagctggaa atcaag 336
- [0470] <210> 29
- [0471] <211> 354
- [0472] <212> DNA
- [0473] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0474] <220>
- [0475] <223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001重链可变区
- [0476] <400> 29
- [0477] caagtgcagc tgcagcagtc cggccccgaa ctctgtcggc caggcacctc cgtgaagatg 60
- [0478] tcctgcaaag cgtccggcta caccttcacc aactactgga tcggctgggc aaagcagagg 120
- [0479] cccggacatg gcctcgaatg gattggcgac atctatccgg gtggagacta caccaactac 180
- [0480] aacgaaaagt tcaagggaaa ggccaccctg accgctgata agtccagctc caccgcatac 240
- [0481] atgcagttct cgtcactgac tagcgaagat tccgcgatct actactgcgc ccggtgggga 300
- [0482] cttggttact acttcgacta ctggggacag ggaattaccc tgaccgtgtc cagc 354
- [0483] <210> 30
- [0484] <211> 717
- [0485] <212> DNA
- [0486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0487] <220>
- [0488] <223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001轻链
- [0489] <400> 30
- [0490] atggtgtcat ctgcacaatt tctgggactt cttctgtgtg gtttccaagg aaccgcgtgt 60
- [0491] gacgctgtga tgaccagac tcctctgtcc ctgcccgtgt ccctggggga ccaagtctcc 120
- [0492] atctcctgcc ggtcaagcca gagcttgag aactcgaatg gaaagaccta cctcaattgg 180
- [0493] tacctccaga agccggggca gtcccccaa ctctgatct acggggtgtc gaacagattt 240
- [0494] tccggagtgc tggatcggtt ctggggtcc ggaagcggca ccgacttcac tctgaaaatt 300
- [0495] agccgcgtgg aagccgagga cttgggcgtg tattttctgcc ttcaggtcac ccatgtgccg 360
- [0496] tacaccttcg gtggcggcac aaagctggaa atcaagaggg cggacgcggc ccctaccgtg 420
- [0497] tcaattttcc caccgagctc cgaacagctc accagcggcg gtgcctcggc cgtgtgtctc 480
- [0498] ctcaacaact tctatccaaa agacattaac gtcaagtga agatcgatgg atcggagaga 540
- [0499] cagaacggag tgctgaacag ctggactgat caggactcca aggattcgac ctactccatg 600
- [0500] agtccactc tgacctgac caaggacgaa tacgagcggc acaattccta cacttgcgaa 660
- [0501] gccaccaca agacctcaac gtcccccatc gtgaagtcct tcaaccgcaa cgagtgc 717
- [0502] <210> 31
- [0503] <211> 1422

[0504]	<212> DNA
[0505]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0506]	<220>
[0507]	<223> 用于在仓鼠中表达的密码子优化的Mdx001重链
[0508]	<400> 31
[0509]	atgggatgga ctctcgtgtt cttttttctc ctctctgtca ctgccgggggt gcatttcgcaa 60
[0510]	gtgcagctgc agcagtcagg ccccgaaactc gtgcggccag gcacctccgt gaagatgtcc 120
[0511]	tgcaaagcgt ccggctacac cttcaccaac tactggatcg gctgggcaaa gcagaggccc 180
[0512]	ggacatggcc tcgaatggat tggcgacatc tatccgggtg gagactacac caactacaac 240
[0513]	gaaaagttca agggaaaggc caccctgacc gctgataagt ccagctccac cgcatacatg 300
[0514]	cagttctcgt cactgactag cgaagattcc gcgatctact actgcgcccg gtggggactt 360
[0515]	ggttactact tcgactactg gggacaggga attacctga ccgtgtccag cgccaagact 420
[0516]	acgccgccgt ccgtctaccc tttggccccc gggttcggcg acaccaccgg ctctgtcagt 480
[0517]	actctgggct gcctcgtgaa ggggtacttc cccgagtccg tcaccgtcac ttggaacagc 540
[0518]	ggcagccttt cgtcctcggc ccacaccttc cccgctctgc tgcaaagcgg tctgtacacc 600
[0519]	atgtcctcat ccgtgaccgt gccctcctcc acttggccga gccagaccgt gacttgctcc 660
[0520]	gtggcccacc cggcgtcctc gaccaccgtg gacaagaagc tggagccgtc aggtccaatc 720
[0521]	tccaccatca atccctgccc gccttgtaaa gagtgccaca agtgccctgc cccaatctg 780
[0522]	gagggaggac cttcgggtgtt cattttccct ccgaatatca aggacgtgtt gatgatctcc 840
[0523]	ctgaccccca aggtcacatg cgtggtcgtc gacgtgtccg aggacgatcc ggacgtgcag 900
[0524]	attagctggc tcgtgaacaa cgtggaagtg cactactgcg agaccctaac ccacgggag 960
[0525]	gactataact ccactatccg cgtcgtgtca aactgcccga tccagcacca ggactggatg 1020
[0526]	agcggaaagg aattcaagtg taaagtcaac aacaaggatc tgccaagccc tatcgagcgc 1080
[0527]	accattagca agatcaaggg actcgtgcgc gcccacaag tgtacattct cccctcctcg 1140
[0528]	gcggaacagc tgagcagaaa ggatgtgtcg ctgacgtgtt tggctgtggg attcaacccc 1200
[0529]	gggatatttt ccgtggaatg gacttcgaac gggcacaccg aagagaacta caaggacacc 1260
[0530]	gcccctgtgc tggacagcga cggatcatac ttcatctatt cgaagctgaa catgaaaact 1320
[0531]	tccaaatggg aaaagaccga ctctgtttcc tgtaacgtgc gccacgaagg actcaagaac 1380
[0532]	tactacctga agaaaactat ctctcgtgcc ccggggaagt ga 1422
[0533]	<210> 32
[0534]	<211> 112
[0535]	<212> PRT
[0536]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0537]	<220>
[0538]	<223> 人源化轻链可变区L1
[0539]	<400> 32
[0540]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0541]	1 5 10 15
[0542]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0543]	20 25 30
[0544]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0545]	35 40 45

[0546]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0547]	50 55 60
[0548]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0549]	65 70 75 80
[0550]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[0551]	85 90 95
[0552]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0553]	100 105 110
[0554]	<210> 33
[0555]	<211> 118
[0556]	<212> PRT
[0557]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0558]	<220>
[0559]	<223> 人源化重链可变区H4
[0560]	<400> 33
[0561]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0562]	1 5 10 15
[0563]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0564]	20 25 30
[0565]	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
[0566]	35 40 45
[0567]	Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[0568]	50 55 60
[0569]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0570]	65 70 75 80
[0571]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0572]	85 90 95
[0573]	Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0574]	100 105 110
[0575]	Met Val Thr Val Ser Ser
[0576]	115
[0577]	<210> 34
[0578]	<211> 112
[0579]	<212> PRT
[0580]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0581]	<220>
[0582]	<223> 人源化轻链可变区L2
[0583]	<400> 34
[0584]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0585]	1 5 10 15
[0586]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[0587]	20 25 30

[0588]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0589]	35 40 45
[0590]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0591]	50 55 60
[0592]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0593]	65 70 75 80
[0594]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val
[0595]	85 90 95
[0596]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0597]	100 105 110
[0598]	<210> 35
[0599]	<211> 118
[0600]	<212> PRT
[0601]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0602]	<220>
[0603]	<223> 人源化重链可变区H2
[0604]	<400> 35
[0605]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[0606]	1 5 10 15
[0607]	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0608]	20 25 30
[0609]	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0610]	35 40 45
[0611]	Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[0612]	50 55 60
[0613]	Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0614]	65 70 75 80
[0615]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0616]	85 90 95
[0617]	Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
[0618]	100 105 110
[0619]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0620]	115
[0621]	<210> 36
[0622]	<211> 16
[0623]	<212> PRT
[0624]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0625]	<220>
[0626]	<223> VLCDR1变体1
[0627]	<400> 36
[0628]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
[0629]	1 5 10 15

[0630]	<210>	37
[0631]	<211>	16
[0632]	<212>	PRT
[0633]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0634]	<220>	
[0635]	<223>	VLCDR1变体2
[0636]	<400>	37
[0637]		Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
[0638]	1	5 10 15
[0639]	<210>	38
[0640]	<211>	70
[0641]	<212>	PRT
[0642]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0643]	<220>	
[0644]	<223>	MDX-L1M2H4 和 MDX-L2M2H2的CDR的组合序列
[0645]	<400>	38
[0646]		Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
[0647]	1	5 10 15
[0648]		Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
[0649]		20 25 30
[0650]		Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly
[0651]		35 40 45
[0652]		Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Ala Arg Trp Gly Leu
[0653]		50 55 60
[0654]		Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0655]	65	70
[0656]	<210>	39
[0657]	<211>	70
[0658]	<212>	PRT
[0659]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0660]	<220>	
[0661]	<223>	MDX-L1M3H4 和 MDX-L2M3H2的CDR的组合序列
[0662]	<400>	39
[0663]		Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
[0664]	1	5 10 15
[0665]		Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
[0666]		20 25 30
[0667]		Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly
[0668]		35 40 45
[0669]		Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Ala Arg Trp Gly Leu
[0670]		50 55 60
[0671]		Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

[0672]	65	70
[0673]	<210> 40	
[0674]	<211> 239	
[0675]	<212> PRT	
[0676]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0677]	<220>	
[0678]	<223> MDX-L1H4轻链	
[0679]	<400> 40	
[0680]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
[0681]	1 5 10 15	
[0682]	Gly Thr Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
[0683]	20 25 30	
[0684]	Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
[0685]	35 40 45	
[0686]	Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg	
[0687]	50 55 60	
[0688]	Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe	
[0689]	65 70 75 80	
[0690]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
[0691]	85 90 95	
[0692]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe	
[0693]	100 105 110	
[0694]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
[0695]	115 120 125	
[0696]	Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
[0697]	130 135 140	
[0698]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
[0699]	145 150 155 160	
[0700]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
[0701]	165 170 175	
[0702]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
[0703]	180 185 190	
[0704]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
[0705]	195 200 205	
[0706]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
[0707]	210 215 220	
[0708]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[0709]	225 230 235	
[0710]	<210> 41	
[0711]	<211> 467	
[0712]	<212> PRT	
[0713]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

[0714]	<220>	
[0715]	<223> MDX-L1H4重链	
[0716]	<400> 41	
[0717]	Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly	
[0718]	1 5 10 15	
[0719]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
[0720]	20 25 30	
[0721]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
[0722]	35 40 45	
[0723]	Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
[0724]	50 55 60	
[0725]	Glu Trp Val Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn	
[0726]	65 70 75 80	
[0727]	Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
[0728]	85 90 95	
[0729]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
[0730]	100 105 110	
[0731]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
[0732]	115 120 125	
[0733]	Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
[0734]	130 135 140	
[0735]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	
[0736]	145 150 155 160	
[0737]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
[0738]	165 170 175	
[0739]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
[0740]	180 185 190	
[0741]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
[0742]	195 200 205	
[0743]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
[0744]	210 215 220	
[0745]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	
[0746]	225 230 235 240	
[0747]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
[0748]	245 250 255	
[0749]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
[0750]	260 265 270	
[0751]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
[0752]	275 280 285	
[0753]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
[0754]	290 295 300	
[0755]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	

[0756]	305	310	315	320
[0757]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[0758]		325	330	335
[0759]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
[0760]		340	345	350
[0761]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0762]		355	360	365
[0763]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0764]		370	375	380
[0765]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0766]	385	390	395	400
[0767]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0768]		405	410	415
[0769]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0770]		420	425	430
[0771]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0772]		435	440	445
[0773]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0774]		450	455	460
[0775]	Pro Gly Lys			
[0776]	465			
[0777]	<210> 42			
[0778]	<211> 239			
[0779]	<212> PRT			
[0780]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0781]	<220>			
[0782]	<223> MDX-L2H2轻链			
[0783]	<400> 42			
[0784]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln			
[0785]	1	5	10	15
[0786]	Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser			
[0787]		20	25	30
[0788]	Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser			
[0789]		35	40	45
[0790]	Leu Glu Asn Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys			
[0791]		50	55	60
[0792]	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe			
[0793]	65	70	75	80
[0794]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
[0795]		85	90	95
[0796]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr			
[0797]		100	105	110

[0798]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0799]	115 120 125
[0800]	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0801]	130 135 140
[0802]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0803]	145 150 155 160
[0804]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[0805]	165 170 175
[0806]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[0807]	180 185 190
[0808]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[0809]	195 200 205
[0810]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[0811]	210 215 220
[0812]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0813]	225 230 235
[0814]	<210> 43
[0815]	<211> 467
[0816]	<212> PRT
[0817]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0818]	<220>
[0819]	<223> MDX-L2H2重链
[0820]	<400> 43
[0821]	Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
[0822]	1 5 10 15
[0823]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
[0824]	20 25 30
[0825]	Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
[0826]	35 40 45
[0827]	Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0828]	50 55 60
[0829]	Glu Trp Met Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn
[0830]	65 70 75 80
[0831]	Glu Lys Phe Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
[0832]	85 90 95
[0833]	Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
[0834]	100 105 110
[0835]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
[0836]	115 120 125
[0837]	Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0838]	130 135 140
[0839]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

[0840]	145	150	155	160
[0841]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
[0842]		165	170	175
[0843]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
[0844]		180	185	190
[0845]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
[0846]		195	200	205
[0847]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
[0848]		210	215	220
[0849]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
[0850]	225	230	235	240
[0851]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
[0852]		245	250	255
[0853]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[0854]		260	265	270
[0855]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[0856]		275	280	285
[0857]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[0858]		290	295	300
[0859]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[0860]	305	310	315	320
[0861]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[0862]		325	330	335
[0863]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
[0864]		340	345	350
[0865]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0866]		355	360	365
[0867]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0868]		370	375	380
[0869]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0870]	385	390	395	400
[0871]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0872]		405	410	415
[0873]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0874]		420	425	430
[0875]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0876]		435	440	445
[0877]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0878]		450	455	460
[0879]	Pro Gly Lys			
[0880]	465			
[0881]	<210> 44			

[0882]	<211>	239
[0883]	<212>	PRT
[0884]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0885]	<220>	
[0886]	<223>	MDX-L1M2H4轻链
[0887]	<400>	44
[0888]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
[0889]	1 5 10 15	
[0890]	Gly Thr Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
[0891]	20 25 30	
[0892]	Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
[0893]	35 40 45	
[0894]	Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg	
[0895]	50 55 60	
[0896]	Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe	
[0897]	65 70 75 80	
[0898]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
[0899]	85 90 95	
[0900]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe	
[0901]	100 105 110	
[0902]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
[0903]	115 120 125	
[0904]	Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
[0905]	130 135 140	
[0906]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
[0907]	145 150 155 160	
[0908]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
[0909]	165 170 175	
[0910]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
[0911]	180 185 190	
[0912]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
[0913]	195 200 205	
[0914]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
[0915]	210 215 220	
[0916]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[0917]	225 230 235	
[0918]	<210>	45
[0919]	<211>	239
[0920]	<212>	PRT
[0921]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0922]	<220>	
[0923]	<223>	MDX-L2M2H2轻链

[0924]	<400> 45
[0925]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
[0926]	1 5 10 15
[0927]	Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
[0928]	20 25 30
[0929]	Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
[0930]	35 40 45
[0931]	Leu Glu Asn Ser Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys
[0932]	50 55 60
[0933]	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0934]	65 70 75 80
[0935]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0936]	85 90 95
[0937]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
[0938]	100 105 110
[0939]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0940]	115 120 125
[0941]	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0942]	130 135 140
[0943]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0944]	145 150 155 160
[0945]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[0946]	165 170 175
[0947]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[0948]	180 185 190
[0949]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[0950]	195 200 205
[0951]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[0952]	210 215 220
[0953]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0954]	225 230 235
[0955]	<210> 46
[0956]	<211> 239
[0957]	<212> PRT
[0958]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0959]	<220>
[0960]	<223> MDX-L1M3H4轻链
[0961]	<400> 46
[0962]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
[0963]	1 5 10 15
[0964]	Gly Thr Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
[0965]	20 25 30

[0966]	Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
[0967]	35 40 45
[0968]	Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg
[0969]	50 55 60
[0970]	Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0971]	65 70 75 80
[0972]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0973]	85 90 95
[0974]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
[0975]	100 105 110
[0976]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[0977]	115 120 125
[0978]	Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0979]	130 135 140
[0980]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0981]	145 150 155 160
[0982]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[0983]	165 170 175
[0984]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[0985]	180 185 190
[0986]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[0987]	195 200 205
[0988]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[0989]	210 215 220
[0990]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0991]	225 230 235
[0992]	<210> 47
[0993]	<211> 239
[0994]	<212> PRT
[0995]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0996]	<220>
[0997]	<223> MDX-L2M3H2轻链
[0998]	<400> 47
[0999]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
[1000]	1 5 10 15
[1001]	Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
[1002]	20 25 30
[1003]	Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
[1004]	35 40 45
[1005]	Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys
[1006]	50 55 60
[1007]	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe

[1008]	65	70	75	80
[1009]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
[1010]		85	90	95
[1011]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr			
[1012]		100	105	110
[1013]	Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys			
[1014]		115	120	125
[1015]	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
[1016]		130	135	140
[1017]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
[1018]		145	150	155
[1019]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			
[1020]		165	170	175
[1021]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp			
[1022]		180	185	190
[1023]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
[1024]		195	200	205
[1025]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
[1026]		210	215	220
[1027]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[1028]		225	230	235
[1029]	<210> 48			
[1030]	<211> 112			
[1031]	<212> PRT			
[1032]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1033]	<220>			
[1034]	<223> MDX-L1M2H4轻链可变区			
[1035]	<400> 48			
[1036]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly			
[1037]	1	5	10	15
[1038]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser			
[1039]		20	25	30
[1040]	Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
[1041]		35	40	45
[1042]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
[1043]		50	55	60
[1044]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[1045]	65	70	75	80
[1046]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val			
[1047]		85	90	95
[1048]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1049]		100	105	110

[1050]	<210>	49
[1051]	<211>	112
[1052]	<212>	PRT
[1053]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1054]	<220>	
[1055]	<223>	MDX-L1M3H4轻链可变区
[1056]	<400>	49
[1057]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[1058]	1	5 10 15
[1059]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr	
[1060]	20	25 30
[1061]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[1062]	35	40 45
[1063]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1064]	50	55 60
[1065]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1066]	65	70 75 80
[1067]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val	
[1068]	85	90 95
[1069]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1070]	100	105 110
[1071]	<210>	50
[1072]	<211>	112
[1073]	<212>	PRT
[1074]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1075]	<220>	
[1076]	<223>	MDX-L2M2H2轻链可变区
[1077]	<400>	50
[1078]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1079]	1	5 10 15
[1080]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser	
[1081]	20	25 30
[1082]	Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[1083]	35	40 45
[1084]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1085]	50	55 60
[1086]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1087]	65	70 75 80
[1088]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val	
[1089]	85	90 95
[1090]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[1091]	100	105 110

[1092]	<210>	51
[1093]	<211>	112
[1094]	<212>	PRT
[1095]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1096]	<220>	
[1097]	<223>	MDX-L2M3H2轻链可变区
[1098]	<400>	51
[1099]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1100]	1 5 10 15	
[1101]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr	
[1102]	20 25 30	
[1103]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[1104]	35 40 45	
[1105]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1106]	50 55 60	
[1107]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1108]	65 70 75 80	
[1109]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val	
[1110]	85 90 95	
[1111]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[1112]	100 105 110	
[1113]	<210>	52
[1114]	<211>	20
[1115]	<212>	PRT
[1116]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1117]	<220>	
[1118]	<223>	人源化轻链的信号序列
[1119]	<400>	52
[1120]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
[1121]	1 5 10 15	
[1122]	Gly Thr Arg Cys	
[1123]	20	
[1124]	<210>	53
[1125]	<211>	19
[1126]	<212>	PRT
[1127]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1128]	<220>	
[1129]	<223>	人源化重链的信号序列
[1130]	<400>	53
[1131]	Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly	
[1132]	1 5 10 15	
[1133]	Val His Ser	

[1134]	<210>	54
[1135]	<211>	219
[1136]	<212>	PRT
[1137]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1138]	<220>	
[1139]	<223>	MDX-L1M2H4成熟轻链
[1140]	<400>	54
[1141]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[1142]	1 5 10 15	
[1143]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser	
[1144]	20 25 30	
[1145]	Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[1146]	35 40 45	
[1147]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1148]	50 55 60	
[1149]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1150]	65 70 75 80	
[1151]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val	
[1152]	85 90 95	
[1153]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1154]	100 105 110	
[1155]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
[1156]	115 120 125	
[1157]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
[1158]	130 135 140	
[1159]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
[1160]	145 150 155 160	
[1161]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
[1162]	165 170 175	
[1163]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
[1164]	180 185 190	
[1165]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
[1166]	195 200 205	
[1167]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[1168]	210 215	
[1169]	<210>	55
[1170]	<211>	448
[1171]	<212>	PRT
[1172]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1173]	<220>	
[1174]	<223>	MDX-L1H4成熟重链
[1175]	<400>	55

[1176]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1177]	1 5 10 15
[1178]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[1179]	20 25 30
[1180]	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
[1181]	35 40 45
[1182]	Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
[1183]	50 55 60
[1184]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1185]	65 70 75 80
[1186]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1187]	85 90 95
[1188]	Ala Arg Trp Gly Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1189]	100 105 110
[1190]	Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[1191]	115 120 125
[1192]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[1193]	130 135 140
[1194]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[1195]	145 150 155 160
[1196]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[1197]	165 170 175
[1198]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[1199]	180 185 190
[1200]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[1201]	195 200 205
[1202]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[1203]	210 215 220
[1204]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[1205]	225 230 235 240
[1206]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1207]	245 250 255
[1208]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1209]	260 265 270
[1210]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1211]	275 280 285
[1212]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1213]	290 295 300
[1214]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1215]	305 310 315 320
[1216]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1217]	325 330 335

[1218]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[1219]	340	345	350
[1220]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[1221]	355	360	365
[1222]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[1223]	370	375	380
[1224]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1225]	385	390	395 400
[1226]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1227]	405	410	415
[1228]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1229]	420	425	430
[1230]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1231]	435	440	445
[1232]	<210> 56		
[1233]	<211> 16		
[1234]	<212> PRT		
[1235]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1236]	<220>		
[1237]	<223> VLCDR1 "mod1"		
[1238]	<400> 56		
[1239]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn		
[1240]	1	5	10 15
[1241]	<210> 57		
[1242]	<211> 720		
[1243]	<212> DNA		
[1244]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1245]	<220>		
[1246]	<223> MDX-L1M2H4轻链		
[1247]	<400> 57		
[1248]	atggtgtcat ccgetcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgcgtgc	60	
[1249]	gacgttgtca tgaccagag ccactgagc cttccgtca cttgggaca gccgcctca	120	
[1250]	atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aactccaacg ccaagaccta tctgaactgg	180	
[1251]	ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc	240	
[1252]	tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc	300	
[1253]	tcaagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactttctgcc tccaagtcac gcacgtgccg	360	
[1254]	tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg	420	
[1255]	ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgacctg	480	
[1256]	ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtgga aagtggataa cgcactccaa	540	
[1257]	tcggggaact ccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg	600	
[1258]	tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa	660	
[1259]	gtgaccacc agggtctgag ctccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga	720	

[1260]	<210> 58
[1261]	<211> 1404
[1262]	<212> DNA
[1263]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1264]	<220>
[1265]	<223> MDX-L1H4重链
[1266]	<400> 58
[1267]	atgggatgga ctctcgtgtt cttttttctc ctctctgtca ctgccgggt gcattcgcaa 60
[1268]	gtccagctgg tgcagtcggg agcagaggtg aaaaagcccg gatcgtcagt gaaggtcagc 120
[1269]	tgcaaagcct cgggatacac ttccaccaac tactggattg gatgggtcag acaggccccc 180
[1270]	ggccaaggac tggagtgggt cggcgacatc taccctgggg gcgactatac caactacaac 240
[1271]	gaaaagtcca agggacgcgt gacaattacc gccgataaga gcaccagcac tgcctacatg 300
[1272]	gagcttagct cattgcggtc cgaggatacc gctgtgtact actgtgcgcg gtggggcctt 360
[1273]	ggttactact tcgactactg gggacagggt accatgggtc cgggtgtcctc cgcgtccacc 420
[1274]	aagggtccct ccgtgttccc tctcgcgccg tcctcaaagt ctacctccg tggaactgcc 480
[1275]	gcgtcgcgtt gtctcgtgaa ggactacttc ccggagcctg tgactgtctc ctggaactcc 540
[1276]	ggggccctca ccagcggagt gcacacttcc cccgccgtgc tgcaatcctc cggcctgtac 600
[1277]	agcctgtcct ccgtcgtgac tgtgcctagc tcctccctgg gaaccagac ctacatctgc 660
[1278]	aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtcgacaaga aggtcgaacc gaagtcgtgc 720
[1279]	gacaagactc atacgtgccc tccttgcccc gccccggaac tgctgggagg cccatccgtg 780
[1280]	ttcctgttcc caccgaagcc taaggatacc ctgatgatca gcagaacacc ggaagtgacc 840
[1281]	tgtgtggtgg tggacgtcag ccacgaagat cccgaggtca agttcaattg gtacgtggac 900
[1282]	gggtggagg tgcacaacgc aaagaccaag ccccgaggagg aacagtacaa ctccacctat 960
[1283]	cgcgtggtgt cgggtcgtgac ggtgctgcac caggactggt tgaacggaaa ggagtataag 1020
[1284]	tgcaaagtgt cgaacaaggc cctgcccgt cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080
[1285]	ggccagccgc gggaacccca ggtctacact ctcccaccga gccgcgacga actgactaag 1140
[1286]	aatcaagtgt cgctgacttg cctcgtcaag ggcttctacc cgtccgacat cgccgtggaa 1200
[1287]	tgggagagca acggccagcc ggaaaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggattcc 1260
[1288]	gacgggtcct tcttctgtga ctcaaaactg accgtggata agtccagatg gcagcagggc 1320
[1289]	aatgtctttt catgctccgt gatgcacgag gctctgcata accactacac ccagaagtcg 1380
[1290]	ctgtccctgt ccccgaggaa gtga 1404
[1291]	<210> 59
[1292]	<211> 336
[1293]	<212> DNA
[1294]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1295]	<220>
[1296]	<223> MDX-L1M2H4轻链可变区
[1297]	<400> 59
[1298]	gacgtgttca tgaccagag cccactgagc cttccggtca ccttgggaca gcccgctca 60
[1299]	atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aactccaacg ccaagaccta tctgaactgg 120
[1300]	ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc 180
[1301]	tcgggcgtgc cggacagatt ctccggtcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 240

[1302] tcaagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactttctgcc tccaagtcac gcacgtgccg 300
 [1303] tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaag 336
 [1304] <210> 60
 [1305] <211> 354
 [1306] <212> DNA
 [1307] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1308] <220>
 [1309] <223> MDX-L1H4重链可变区
 [1310] <400> 60
 [1311] caagtccagc tgggtgcagtc gggagcagag gtgaaaaagc ccgcatcgtc agtgaaggtc 60
 [1312] agctgcaaag cctcgggata cactttcacc aactactgga ttggatgggt cagacaggcc 120
 [1313] cccggccaag gactggagtg ggtcggcgac atctaccctg ggggcgacta taccaactac 180
 [1314] aacgaaaagt tcaaggagc cgtgacaatt accgccgata agagcaccag cactgcctac 240
 [1315] atggagctta gctcattgcg gtccgaggat accgctgtgt actactgtgc gcggtggggc 300
 [1316] cttggttact acttcgacta ctggggacag ggtaccatgg tcacggtgtc ctcc 354
 [1317] <210> 61
 [1318] <211> 720
 [1319] <212> DNA
 [1320] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1321] <220>
 [1322] <223> MDX-L2M2H2轻链
 [1323] <400> 61
 [1324] atggtgtcat ccgtcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgcgtgc 60
 [1325] gacatcgtca tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gccgcctcc 120
 [1326] atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aactcaaagc ccaagaccta cctgaattgg 180
 [1327] tatctgcaga agcctggaca gagcccgag ctgctgatct acggcgtcag caacaggttc 240
 [1328] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
 [1329] tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 360
 [1330] tacactttcg gacaaggac taaggtcgag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420
 [1331] ttcatittcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480
 [1332] ctcaacaact tctaccccg ggaagcgaag gtccagtgga aagtggataa cgcactcaa 540
 [1333] tcggggaact ccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
 [1334] tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgctgcgaa 660
 [1335] gtgaccaccc aggtctgag ctccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720
 [1336] <210> 62
 [1337] <211> 1404
 [1338] <212> DNA
 [1339] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1340] <220>
 [1341] <223> MDX-L2H2重链
 [1342] <400> 62
 [1343] atgggatgga ctctcgtgtt cttttttctc ctctctgtca ctgccgggt gcattcgcaa 60

[1344]	gtccagctgg tgcagtcggg accagaggtg aaaaagcccg gagagtcact taagatcagc	120
[1345]	tgcaaaggct cgggatacac ttccaccaac tactggattg gttgggtcag acaggccccc	180
[1346]	ggcaaaggac tggagtggat gggcgacatc taccctgggg gcgactatac caactacaac	240
[1347]	gaaaagttca agggacaagt gacaatttcg gccgataaga gcattagcac tgcatacctt	300
[1348]	cagtggagct cattgaaggc ctccgatacc gctatctact actgtgcgcg gtggggcctg	360
[1349]	ggatactact tcgactactg gggaaggggt accttgggtc cggtgtcctc cgcgtccacc	420
[1350]	aagggtccct ccgtgttccc tctcgcgcg tctctaaagt ctacctccg tggaactgcc	480
[1351]	gcgctcggtt gtctcgtgaa ggactacttc ccggagcctg tgactgtctc ctggaactcc	540
[1352]	ggggccctca ccagcggagt gcacacttcc cccgccgtgc tgcaatcctc cggcctgtac	600
[1353]	agcctgtcct ccgtcgtgac tgtgcctagc tctccctgg gaaccagac ctacatctgc	660
[1354]	aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtcgacaaga aggtcgaacc gaagtcgtgc	720
[1355]	gacaagactc atacgtgcc tcttggccc gcccggaaac tgctgggagg cccatccgtg	780
[1356]	ttcctgttcc caccgaagcc taaggatacc ctgatgatca gcagaacacc ggaagtgacc	840
[1357]	tgtgtgggtg tggacgtcag ccacgaagat cccgaggtca agttcaattg gtacgtggac	900
[1358]	gggtggagg tgcacaacgc aaagaccaag ccccgaggagg aacagtacaa ctccacctat	960
[1359]	cgcgtggtgt cgggtgtgac ggtgtgtcac caggactggt tgaacgaaa ggagtataag	1020
[1360]	tgcaaagtgt cgaacaaggc cctgcccgt cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag	1080
[1361]	ggccagccgc gggaaccca ggtctacact ctcccaccga gccgcgacga actgactaag	1140
[1362]	aatcaagtgt cgctgacttg cctcgtcaag ggcttctacc cgtccgacat cgccgtggaa	1200
[1363]	tgggagagca acggccagcc ggaaaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggattcc	1260
[1364]	gacgggtcct tcttctgta ctcaaaactg accgtggata agtccagatg gcagcagggc	1320
[1365]	aatgtctttt catgctccgt gatgcacgag gctctgcata accactacac ccagaagtcg	1380
[1366]	ctgtccctgt ccccggggaa gtga	1404
[1367]	<210>	63
[1368]	<211>	336
[1369]	<212>	DNA
[1370]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1371]	<220>	
[1372]	<223>	MDX-L2M2H2轻链可变区
[1373]	<400>	63
[1374]	gacatcgtca tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gccgcctcc	60
[1375]	atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aactcaaagc ccaagaccta cctgaattgg	120
[1376]	tatctgcaga agcctggaca gagccgcag ctgctgatct acggcgtcag caacaggttc	180
[1377]	tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc	240
[1378]	tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg	300
[1379]	tacactttcg gacaaggac taaggtcgag atcaag	336
[1380]	<210>	64
[1381]	<211>	354
[1382]	<212>	DNA
[1383]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1384]	<220>	
[1385]	<223>	MDX-L2H2重链可变区

- [1386] <400> 64
- [1387] caagtccagc tgggtgcagtc gggaccagag gtgaaaaagc ccggagagtc acttaagatc 60
- [1388] agctgcaaag gctcgggata cactttcacc aactactgga ttggttgggt cagacaggcc 120
- [1389] cccggcaaag gactggagtg gatgggcgac atctaccctg ggggcgacta taccaactac 180
- [1390] aacgaaaagt tcaagggaca agtgacaatt tcggccgata agagcattag cactgcatac 240
- [1391] cttcagtgga gctcattgaa ggcctccgat accgctatct actactgtgc gcggtggggc 300
- [1392] ctgggatact acttcgacta ctggggaagg ggtaccttgg tcacggtgtc ctcc 354
- [1393] <210> 65
- [1394] <211> 48
- [1395] <212> DNA
- [1396] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1397] <220>
- [1398] <223> MDX-L1M2H4 VLCDR1
- [1399] <400> 65
- [1400] cgggtccagcc agtccctgga gaactccaac gccaaagacct atctgaac 48
- [1401] <210> 66
- [1402] <211> 48
- [1403] <212> DNA
- [1404] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1405] <220>
- [1406] <223> MDX-L2M2H2 VLCDR1
- [1407] <400> 66
- [1408] cgctcaagcc agtccctgga gaactcaaac gccaaagacct acctgaat 48
- [1409] <210> 67
- [1410] <211> 21
- [1411] <212> DNA
- [1412] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1413] <220>
- [1414] <223> MDX-L1H4 和 MDX-L2H2 VLCDR2
- [1415] <400> 67
- [1416] ggcgtcagca acaggttctc g 21
- [1417] <210> 68
- [1418] <211> 27
- [1419] <212> DNA
- [1420] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1421] <220>
- [1422] <223> MDX-L1H4 VLCDR3
- [1423] <400> 68
- [1424] ctccaagtca cgcacgtgcc gtacact 27
- [1425] <210> 69
- [1426] <211> 27
- [1427] <212> DNA

- [1428] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1429] <220>
[1430] <223> MDX-L2H2 VLCDR3
[1431] <400> 69
[1432] ctccaagtca cccacgtgcc gtacact 27
[1433] <210> 70
[1434] <211> 30
[1435] <212> DNA
[1436] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1437] <220>
[1438] <223> MDX-L1H4 VHCDR1
[1439] <400> 70
[1440] ggatacactt tcaccaacta ctggattgga 30
[1441] <210> 71
[1442] <211> 30
[1443] <212> DNA
[1444] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1445] <220>
[1446] <223> MDX-L2H2 VHCDR1
[1447] <400> 71
[1448] ggatacactt tcaccaacta ctggattggt 30
[1449] <210> 72
[1450] <211> 51
[1451] <212> DNA
[1452] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1453] <220>
[1454] <223> MDX-L1H4 和 MDX-L2H2 VHCDR2
[1455] <400> 72
[1456] gacatctacc ctgggggcga ctataccaac tacaacgaaa agttcaaggg a 51
[1457] <210> 73
[1458] <211> 33
[1459] <212> DNA
[1460] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1461] <220>
[1462] <223> MDX-L1H4 VHCDR3
[1463] <400> 73
[1464] gcgcggtggg gccttggtta ctacttcgac tac 33
[1465] <210> 74
[1466] <211> 33
[1467] <212> DNA
[1468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1469] <220>

[1470] <223> MDX-L2H2 VHCDR3
 [1471] <400> 74
 [1472] gcgcgggtggg gcctgggata ctacttcgac tac 33
 [1473] <210> 75
 [1474] <211> 219
 [1475] <212> PRT
 [1476] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1477] <220>
 [1478] <223> MDX-L1H4成熟轻链
 [1479] <400> 75
 [1480] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 [1481] 1 5 10 15
 [1482] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 [1483] 20 25 30
 [1484] Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 [1485] 35 40 45
 [1486] Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [1487] 50 55 60
 [1488] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [1489] 65 70 75 80
 [1490] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 [1491] 85 90 95
 [1492] Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1493] 100 105 110
 [1494] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [1495] 115 120 125
 [1496] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [1497] 130 135 140
 [1498] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [1499] 145 150 155 160
 [1500] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [1501] 165 170 175
 [1502] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [1503] 180 185 190
 [1504] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [1505] 195 200 205
 [1506] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [1507] 210 215
 [1508] <210> 76
 [1509] <211> 219
 [1510] <212> PRT
 [1511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1512]	<220>
[1513]	<223> MDX-L1M3H4成熟轻链
[1514]	<400> 76
[1515]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[1516]	1 5 10 15
[1517]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr
[1518]	20 25 30
[1519]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[1520]	35 40 45
[1521]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1522]	50 55 60
[1523]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1524]	65 70 75 80
[1525]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
[1526]	85 90 95
[1527]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1528]	100 105 110
[1529]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[1530]	115 120 125
[1531]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[1532]	130 135 140
[1533]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[1534]	145 150 155 160
[1535]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[1536]	165 170 175
[1537]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1538]	180 185 190
[1539]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1540]	195 200 205
[1541]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1542]	210 215
[1543]	<210> 77
[1544]	<211> 219
[1545]	<212> PRT
[1546]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1547]	<220>
[1548]	<223> MDX-L2H2成熟轻链
[1549]	<400> 77
[1550]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1551]	1 5 10 15
[1552]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[1553]	20 25 30

[1554]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1555]	35 40 45
[1556]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1557]	50 55 60
[1558]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1559]	65 70 75 80
[1560]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val
[1561]	85 90 95
[1562]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1563]	100 105 110
[1564]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[1565]	115 120 125
[1566]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[1567]	130 135 140
[1568]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[1569]	145 150 155 160
[1570]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[1571]	165 170 175
[1572]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1573]	180 185 190
[1574]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1575]	195 200 205
[1576]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1577]	210 215
[1578]	<210> 78
[1579]	<211> 219
[1580]	<212> PRT
[1581]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1582]	<220>
[1583]	<223> MDX-L2M2H2成熟轻链
[1584]	<400> 78
[1585]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1586]	1 5 10 15
[1587]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
[1588]	20 25 30
[1589]	Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1590]	35 40 45
[1591]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1592]	50 55 60
[1593]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1594]	65 70 75 80
[1595]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val

[1596]	85	90	95
[1597]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[1598]	100	105	110
[1599]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[1600]	115	120	125
[1601]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[1602]	130	135	140
[1603]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[1604]	145	150	155
[1605]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[1606]	165	170	175
[1607]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[1608]	180	185	190
[1609]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[1610]	195	200	205
[1611]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[1612]	210	215	
[1613]	<210> 79		
[1614]	<211> 219		
[1615]	<212> PRT		
[1616]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1617]	<220>		
[1618]	<223> MDX-L2M3H2成熟轻链		
[1619]	<400> 79		
[1620]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly		
[1621]	1	5	10
[1622]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Thr		
[1623]	20	25	30
[1624]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[1625]	35	40	45
[1626]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[1627]	50	55	60
[1628]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[1629]	65	70	75
[1630]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val		
[1631]	85	90	95
[1632]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[1633]	100	105	110
[1634]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[1635]	115	120	125
[1636]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[1637]	130	135	140

[1638]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
[1639]	145					150				155					160	
[1640]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[1641]					165					170					175	
[1642]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
[1643]					180					185					190	
[1644]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
[1645]			195					200						205		
[1646]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
[1647]		210						215								
[1648]	<210> 80															
[1649]	<211> 448															
[1650]	<212> PRT															
[1651]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1652]	<220>															
[1653]	<223> MDX-L2H2成熟重链															
[1654]	<400> 80															
[1655]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
[1656]	1				5					10					15	
[1657]	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
[1658]					20					25					30	
[1659]	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[1660]			35					40					45			
[1661]	Gly	Asp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gly	Asp	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
[1662]		50						55					60			
[1663]	Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1664]	65							70					75			80
[1665]	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
[1666]					85					90					95	
[1667]	Ala	Arg	Trp	Gly	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr
[1668]					100					105					110	
[1669]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
[1670]					115					120					125	
[1671]	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
[1672]					130					135					140	
[1673]	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
[1674]	145					150						155			160	
[1675]	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
[1676]					165					170					175	
[1677]	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
[1678]					180					185					190	
[1679]	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser

[1680]	195	200	205
[1681]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
[1682]	210	215	220
[1683]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
[1684]	225	230	235
[1685]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[1686]	245	250	255
[1687]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
[1688]	260	265	270
[1689]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[1690]	275	280	285
[1691]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[1692]	290	295	300
[1693]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[1694]	305	310	315
[1695]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[1696]	325	330	335
[1697]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[1698]	340	345	350
[1699]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[1700]	355	360	365
[1701]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[1702]	370	375	380
[1703]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1704]	385	390	395
[1705]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1706]	405	410	415
[1707]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1708]	420	425	430
[1709]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1710]	435	440	445
[1711]	<210> 81		
[1712]	<211> 720		
[1713]	<212> DNA		
[1714]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1715]	<220>		
[1716]	<223> MDX-L1H4轻链		
[1717]	<400> 81		
[1718]	atggtgtcat ccgtcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgctgc 60		
[1719]	gacgtggtca tgaccagag ccactgagc cttccggtca cttgggaca gccgcctca 120		
[1720]	atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aactccaacg gaaagaccta tctgaactgg 180		
[1721]	ttccagcagc gcctggaca gtccccgagg cgctgatct acggcgtcag caacaggttc 240		

[1722]	tcgggctgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
[1723]	tcaagagtgg aagccgagga cgtgggctg tactactgcc tccaagtcac gcacgtgccg 360
[1724]	tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420
[1725]	ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480
[1726]	ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtga aagtggataa cgcactccaa 540
[1727]	tcggggaact cccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
[1728]	tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660
[1729]	gtgaccacc agggtctgag ctcccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720
[1730]	<210> 82
[1731]	<211> 336
[1732]	<212> DNA
[1733]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1734]	<220>
[1735]	<223> MDX-L1H4轻链可变区
[1736]	<400> 82
[1737]	gacgtgtca tgaccagag ccactgagc cttccgtca ccttgggaca gccgcctca 60
[1738]	atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aactccaacg gaaagaccta tctgaactgg 120
[1739]	ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc 180
[1740]	tcgggctgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 240
[1741]	tcaagagtgg aagccgagga cgtgggctg tactactgcc tccaagtcac gcacgtgccg 300
[1742]	tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaag 336
[1743]	<210> 83
[1744]	<211> 720
[1745]	<212> DNA
[1746]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1747]	<220>
[1748]	<223> MDX-L2H2轻链
[1749]	<400> 83
[1750]	atggtgtcat ccgtcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgcctgc 60
[1751]	gacatcgtca tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gccgcctcc 120
[1752]	atttctgcc gctcaagcca gtccctggag aactcaaacg gaaagaccta cctgaattgg 180
[1753]	tatctgcaga agcctggaca gagcccgag ctgctgatct acggcgtcag caacaggttc 240
[1754]	tcgggctgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
[1755]	tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggctg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 360
[1756]	tacactttcg gacaaggac taagctcgag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420
[1757]	ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480
[1758]	ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtga aagtggataa cgcactccaa 540
[1759]	tcggggaact cccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
[1760]	tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660
[1761]	gtgaccacc agggtctgag ctcccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720
[1762]	<210> 84
[1763]	<211> 336

- [1764] <212> DNA
[1765] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1766] <220>
[1767] <223> MDX-L2H2轻链可变区
[1768] <400> 84
[1769] gacatcgtca tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gcccgcctcc 60
[1770] atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aactcaaacg gaaagaccta cctgaattgg 120
[1771] tatctgcaga agcctggaca gagcccgag ctgctgatct acggcgtcag caacaggttc 180
[1772] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 240
[1773] tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 300
[1774] tacactttcg gacaaggac taaggctcag atcaag 336
[1775] <210> 85
[1776] <211> 48
[1777] <212> DNA
[1778] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1779] <220>
[1780] <223> MDX-L1H4 VLCDR1
[1781] <400> 85
[1782] cgggtccagcc agtccctgga gaactccaac ggaaagacct atctgaac 48
[1783] <210> 86
[1784] <211> 48
[1785] <212> DNA
[1786] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1787] <220>
[1788] <223> MDX-L2H2 VLCDR1
[1789] <400> 86
[1790] cgctcaagcc agtccctgga gaactcaaac ggaaagacct acctgaat 48
[1791] <210> 87
[1792] <211> 48
[1793] <212> DNA
[1794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1795] <220>
[1796] <223> MDX-L1M3H4 VLCDR1
[1797] <400> 87
[1798] cgggtccagcc agtccctgga gaacaccaac ggaaagacct atctgaac 48
[1799] <210> 88
[1800] <211> 48
[1801] <212> DNA
[1802] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1803] <220>
[1804] <223> MDX-L2M3H2 VLCDR1
[1805] <400> 88

[1806] cgctcaagcc agtccctgga gaacaccaac ggaaagacct acctgaat 48
 [1807] <210> 89
 [1808] <211> 720
 [1809] <212> DNA
 [1810] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1811] <220>
 [1812] <223> MDX-L1M3H4轻链
 [1813] <400> 89
 [1814] atggtgtcat ccgtcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgcgtgc 60
 [1815] gacgtggtca tgaccagag cccactgagc cttccggtca cttgggaca gccgcctca 120
 [1816] atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aacaccaacg gaaagaccta tctgaactgg 180
 [1817] ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc 240
 [1818] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
 [1819] tcaagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tacttctgcc tccaagtcac gcacgtgccg 360
 [1820] tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaagcga cgtggcggc cccctctgtg 420
 [1821] ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgctg 480
 [1822] ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtga aagtggataa cgcactccaa 540
 [1823] tcggggaact cccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
 [1824] tcgtccaccc tgactctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660
 [1825] gtgaccacc agggtctgag ctccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720
 [1826] <210> 90
 [1827] <211> 336
 [1828] <212> DNA
 [1829] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1830] <220>
 [1831] <223> MDX-L1M3H4轻链可变区
 [1832] <400> 90
 [1833] gacgtggtca tgaccagag cccactgagc cttccggtca cttgggaca gccgcctca 60
 [1834] atttcatgcc ggtccagcca gtccctggag aacaccaacg gaaagaccta tctgaactgg 120
 [1835] ttccagcagc gccctggaca gtccccgagg cgcctgatct acggcgtcag caacaggttc 180
 [1836] tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 240
 [1837] tcaagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tacttctgcc tccaagtcac gcacgtgccg 300
 [1838] tacactttcg gacaaggac taagctggag atcaag 336
 [1839] <210> 91
 [1840] <211> 720
 [1841] <212> DNA
 [1842] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1843] <220>
 [1844] <223> MDX-L2M3H2轻链
 [1845] <400> 91
 [1846] atggtgtcat ccgtcaatt tctcggttg cttctcctgt gtttccaagg caccgcgtgc 60
 [1847] gacatcgta tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgcgggaca gccgcctcc 120

[1848]	atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aacaccaacg gaaagaccta cctgaattgg 180
[1849]	tatctgcaga agcctggaca gagcccgag ctgctgatct acggcgtag caacagggtc 240
[1850]	tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 300
[1851]	tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 360
[1852]	tacactttcg gacaaggac taaggtcgag atcaagcgga ccgtggcggc cccctctgtg 420
[1853]	ttcattttcc ctccctcgga cgaacagctg aagtcgggaa cagcctccgt cgtgtgcctg 480
[1854]	ctcaacaact tctacccccg ggaagcgaag gtccagtga aagtggataa cgcactccaa 540
[1855]	tcggggaact ccaggaatc cgtgactgag caggactcga aggattccac ttactccctg 600
[1856]	tcgtccaccc tgactctgag caagccgac tacgagaagc ataaggtcta cgcctgcgaa 660
[1857]	gtgaccacc agggtctgag ctccctgtg accaagagct ttaatcgggg cgaatgttga 720
[1858]	<210> 92
[1859]	<211> 336
[1860]	<212> DNA
[1861]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1862]	<220>
[1863]	<223> MDX-L2M3H2轻链可变区
[1864]	<400> 92
[1865]	gacatcgta tgaccagac ccattgagc ctttccgtca cgccgggaca gcccgctcc 60
[1866]	atttcctgcc gctcaagcca gtccctggag aacaccaacg gaaagaccta cctgaattgg 120
[1867]	tatctgcaga agcctggaca gagcccgag ctgctgatct acggcgtag caacagggtc 180
[1868]	tcgggcgtgc cggacagatt ctccggctcc ggaagcggaa ctgacttcac cctgaaaatc 240
[1869]	tcacgcgtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tccaagtcac ccacgtgccg 300
[1870]	tacactttcg gacaaggac taaggtcgag atcaag 336

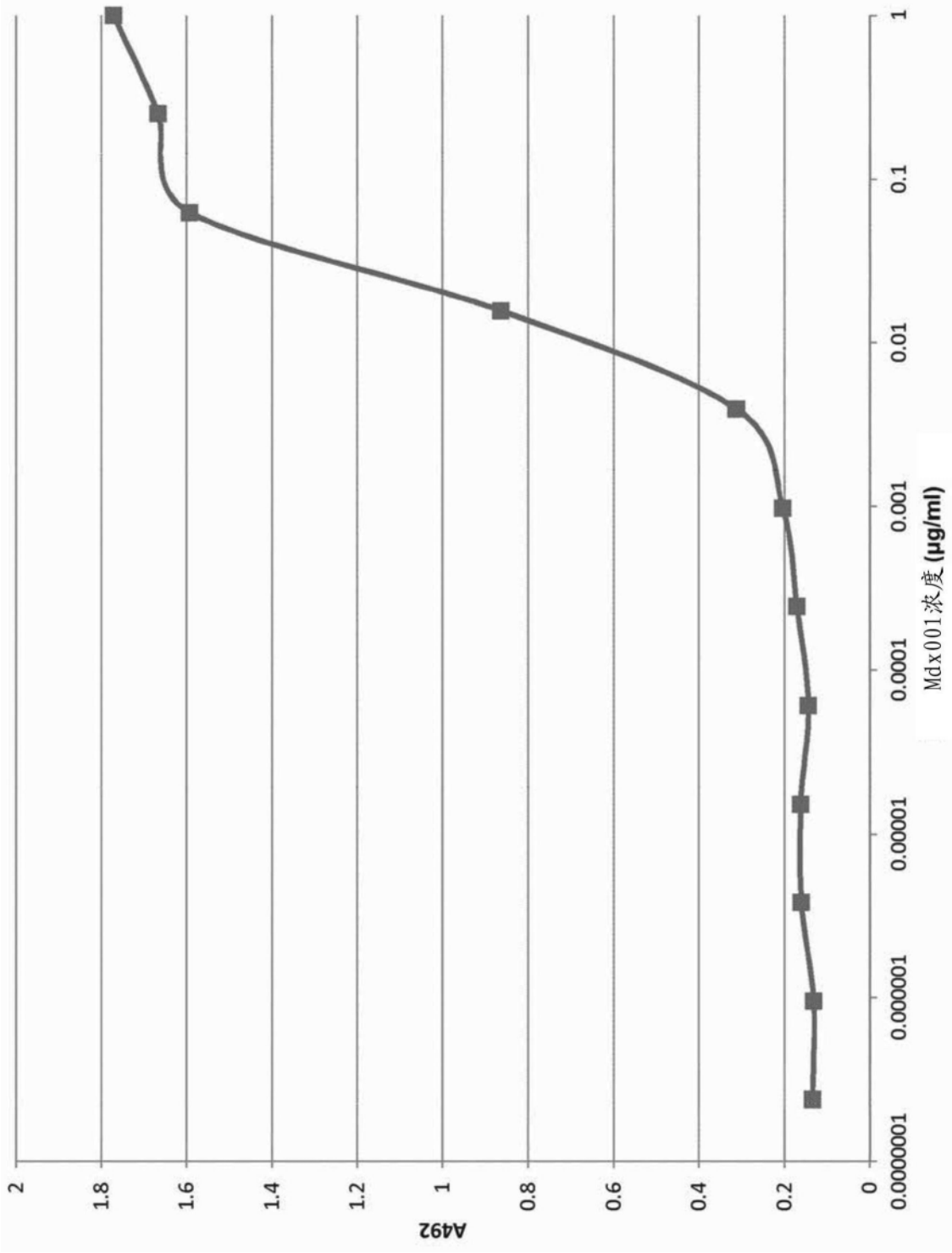
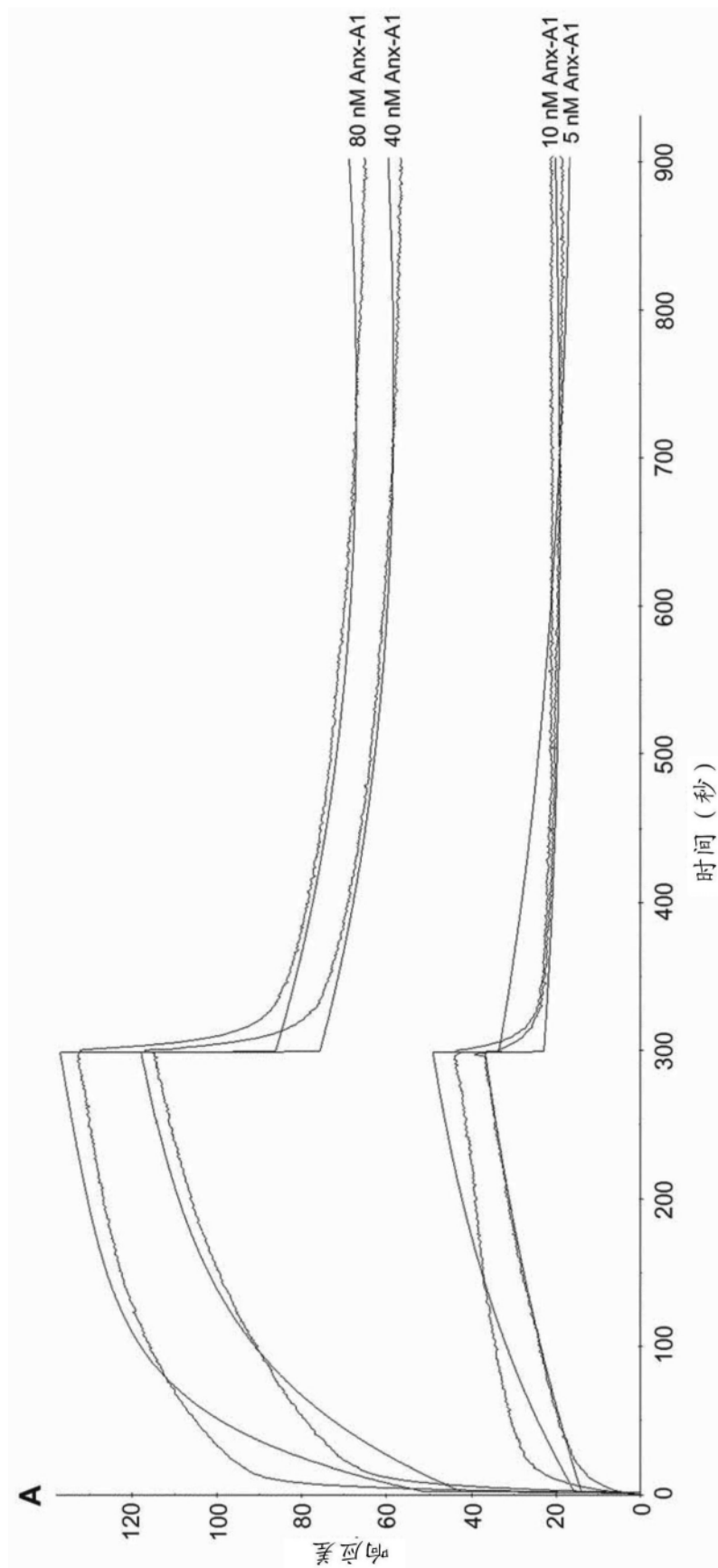
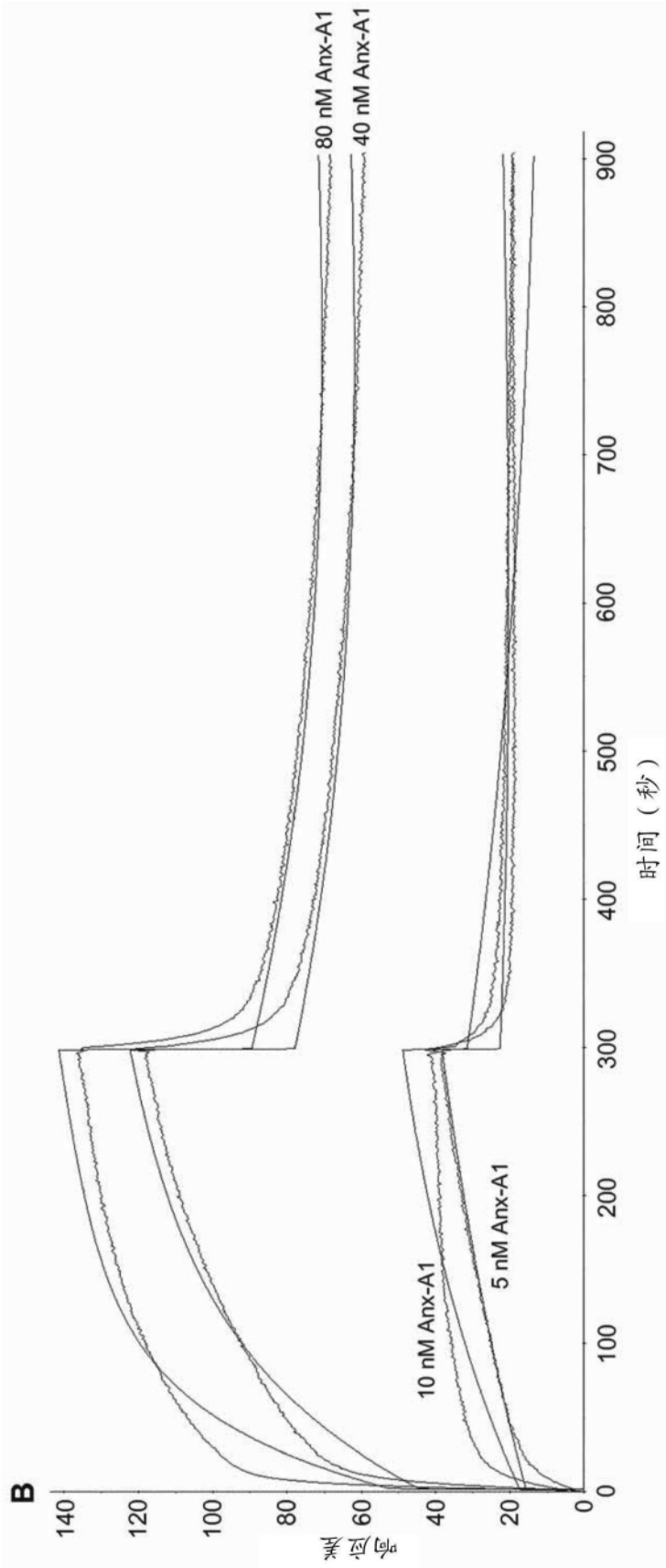


图1





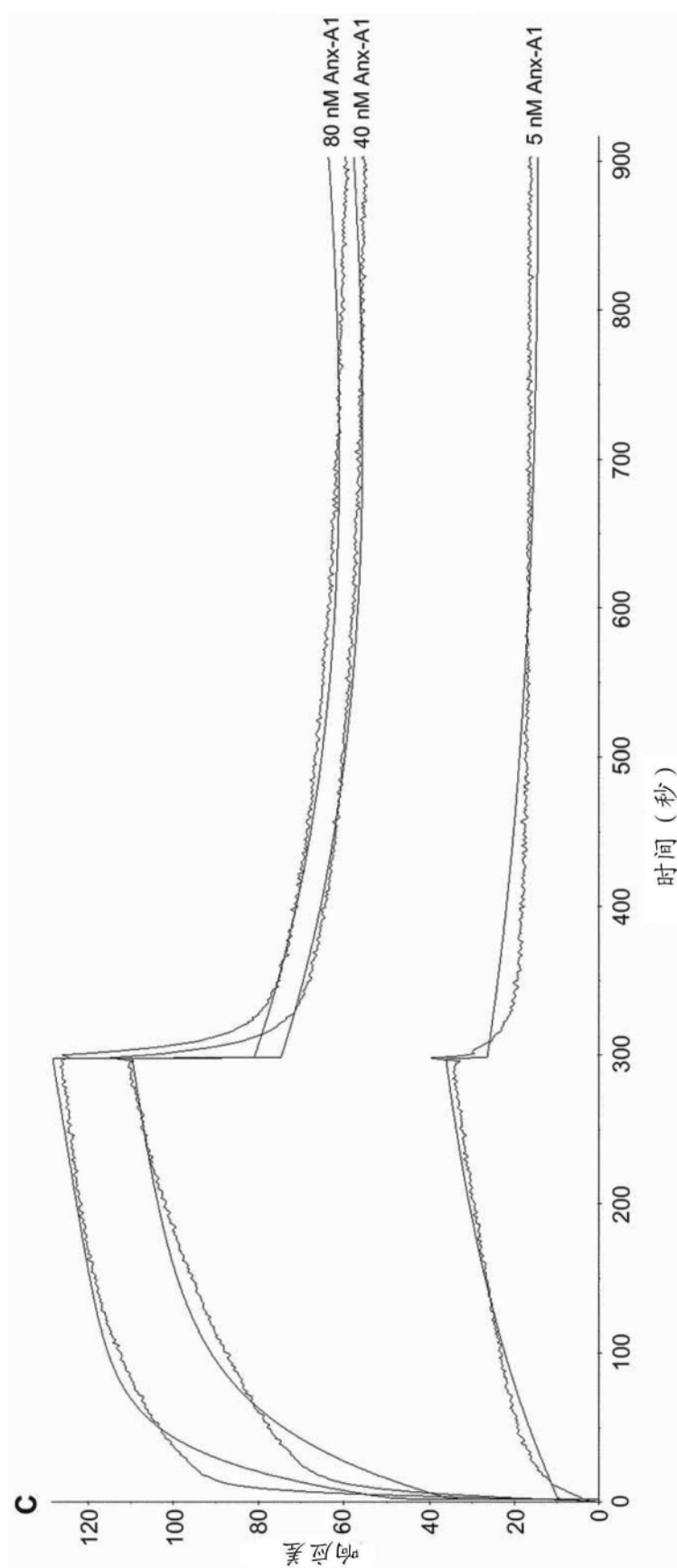


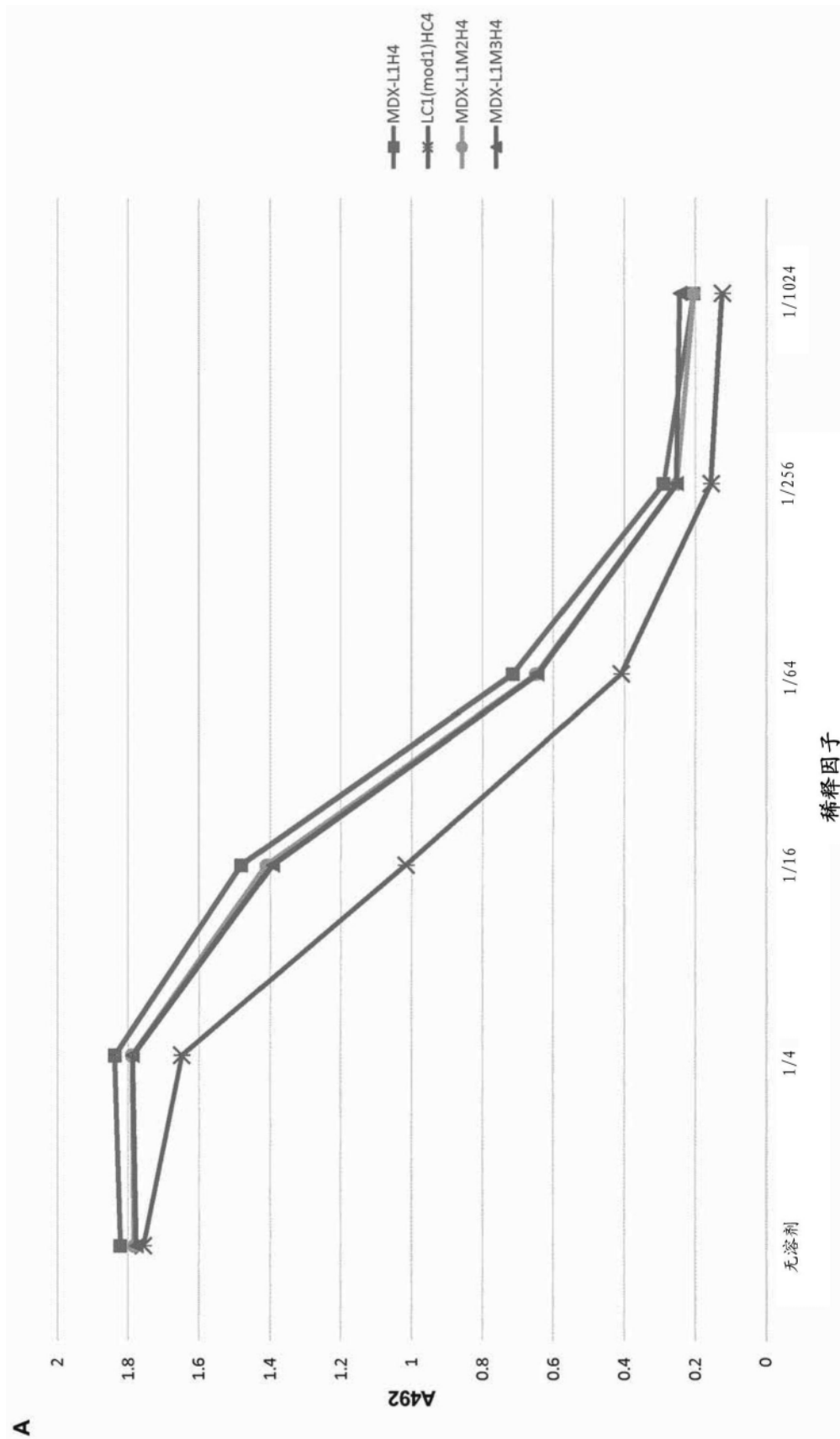
图2

MDX-L1H4	
天然的	
>轻链	DVWMTQSP LS LPVTLGQPASISCRSSQ SL EN TS NGKTYLNWFQRPQGSPRRLIYG VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG V YFCLQVTHVPYTFGGQGTKLEIK
>重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TN YWIGWVVRQAPGQGLEWVGDIYP GGDYTN Y NEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARWGLGY Y FDYW GQGTMTVTVSS
变体 1	
>轻链	DVWMTQSP LS LPVTLGQPASISCRSSQ SL EN SA KTYLNWFQRPQGSPRRLIYG VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG V YFCLQVTHVPYTFGGQGTKLEIK
>重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TN YWIGWVVRQAPGQGLEWVGDIYP GGDYTN Y NEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARWGLGY Y FDYW GQGTMTVTVSS
变体 2	
>轻链	DVWMTQSP LS LPVTLGQPASISCRSSQ SL EN TS NGKTYLNWFQRPQGSPRRLIYG VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG V YFCLQVTHVPYTFGGQGTKLEIK
>重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TN YWIGWVVRQAPGQGLEWVGDIYP GGDYTN Y NEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARWGLGY Y FDYW GQGTMTVTVSS
变体 3 (功能差的)	
>轻链	DVWMTQSP LS LPVTLGQPASISCRSSQ SL EN SD GKTYLNWFQRPQGSPRRLIYG VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVG V YFCLQVTHVPYTFGGQGTKLEIK
>重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TN YWIGWVVRQAPGQGLEWVGDIYP GGDYTN Y NEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARWGLGY Y FDYW GQGTMTVTVSS

图3

MDX-L2H2	
天然的	变体 2
>轻链 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLENSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYGV SNRFGVPPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYVCLQVTHVPYTFGGQGTKVEIK	>轻链 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLENTNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYGV SNRFGVPPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYVCLQVTHVPYTFGGQGTKVEIK
>重链 QVQLVQSGPEVKKPKGESLKISCKSGGYTFTNWIWVVRQAPGKGLEWMGDIYP GGDYTNVNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARWGLGYFFDYW GRGTLVTVSS	>重链 QVQLVQSGPEVKKPKGESLKISCKSGGYTFTNWIWIGWVVRQAPGKGLEWMGDIYP GGDYTNVNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARWGLGYFFDYW GRGTLVTVSS
变体 1	变体 3 (功能差的)
>轻链 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLENSNAGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYGV SNRFGVPPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYVCLQVTHVPYTFGGQGTKVEIK	>轻链 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLENSDGGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYGV SNRFGVPPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYVCLQVTHVPYTFGGQGTKVEIK
>重链 QVQLVQSGPEVKKPKGESLKISCKSGGYTFTNWIWIGWVVRQAPGKGLEWMGDIYP GGDYTNVNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARWGLGYFFDYW GRGTLVTVSS	>重链 QVQLVQSGPEVKKPKGESLKISCKSGGYTFTNWIWIGWVVRQAPGKGLEWMGDIYP GGDYTNVNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCARWGLGYFFDYW GRGTLVTVSS

图3 (续)



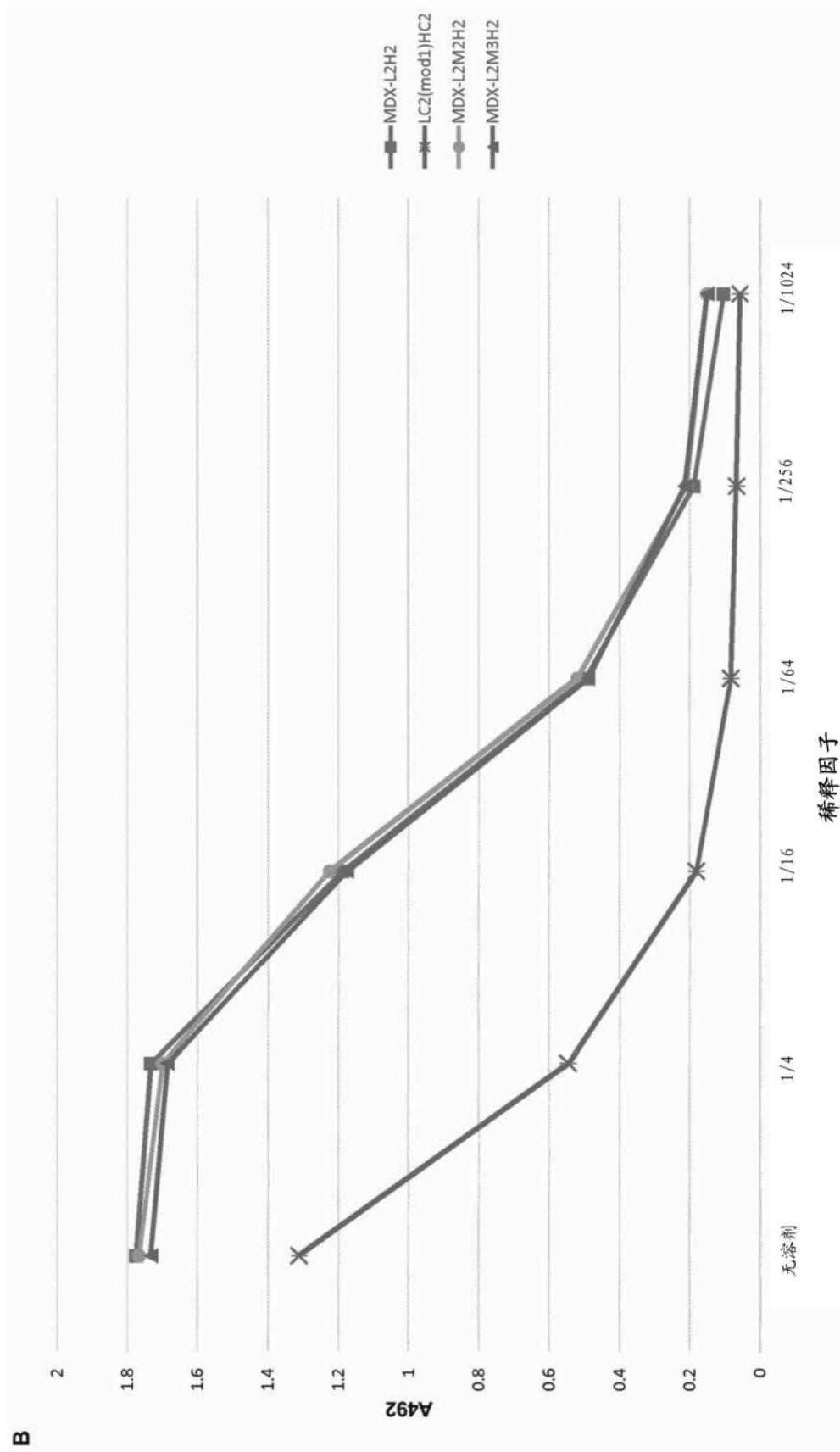


图4

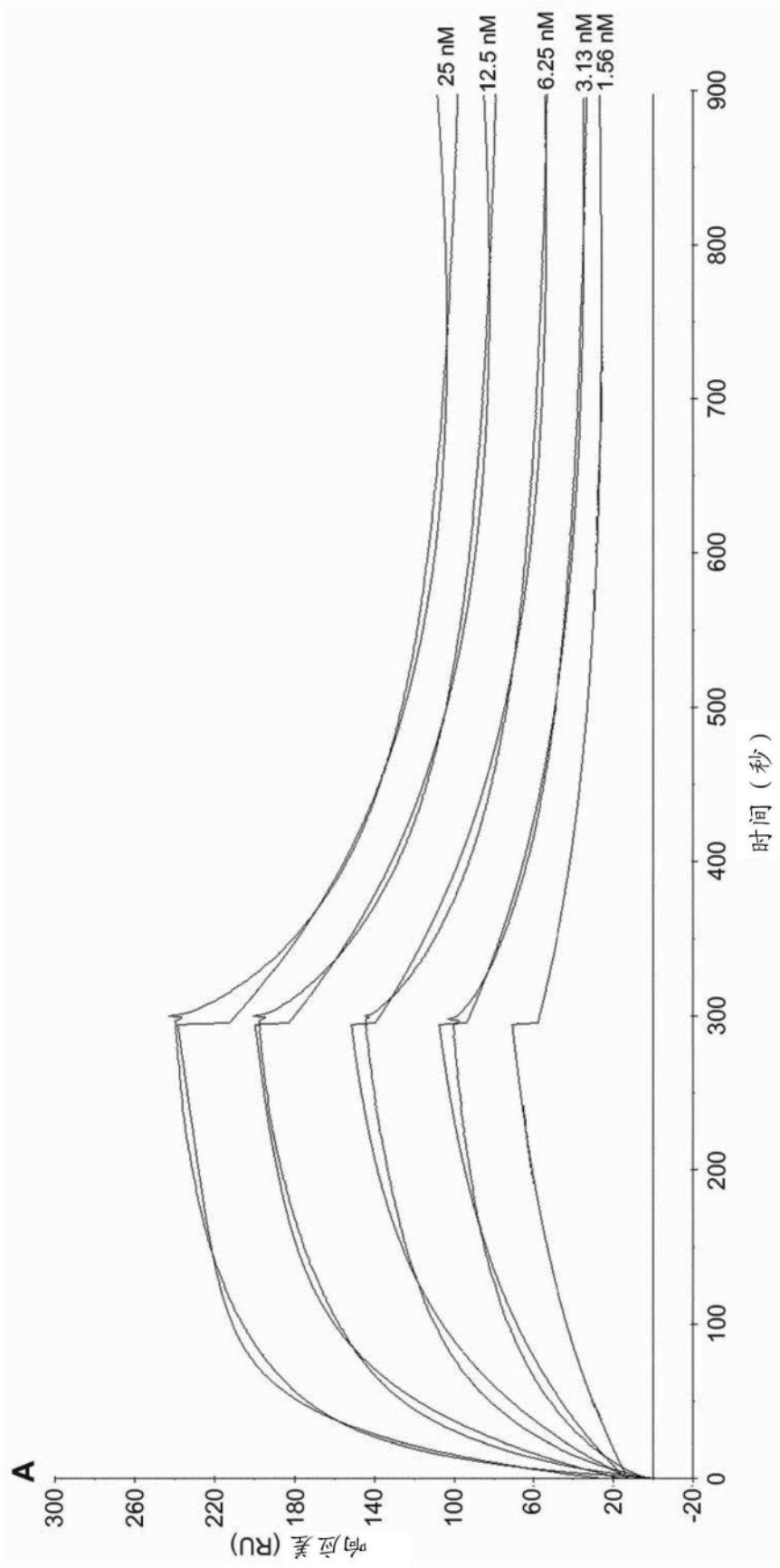


图5

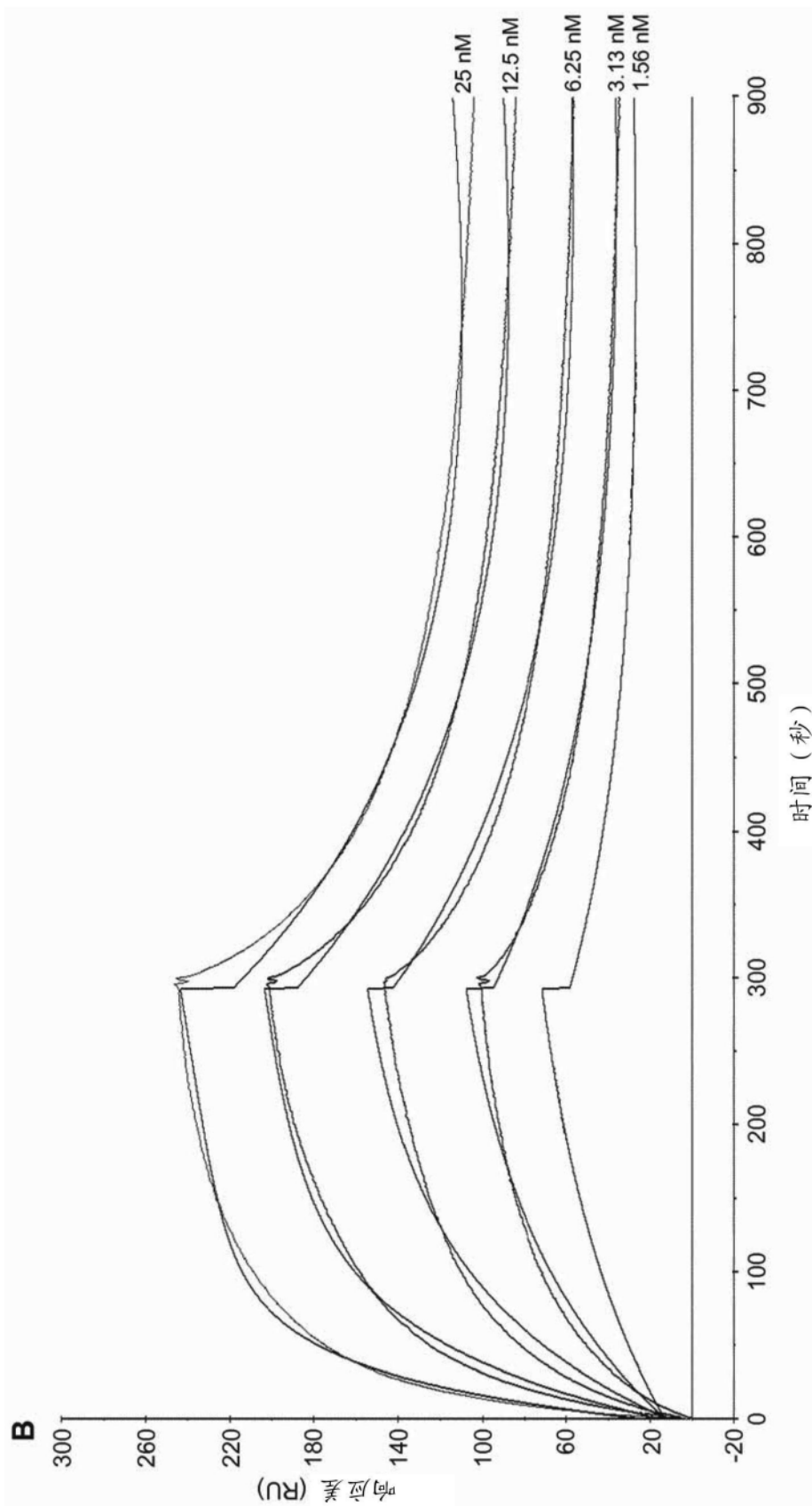


图5(续)

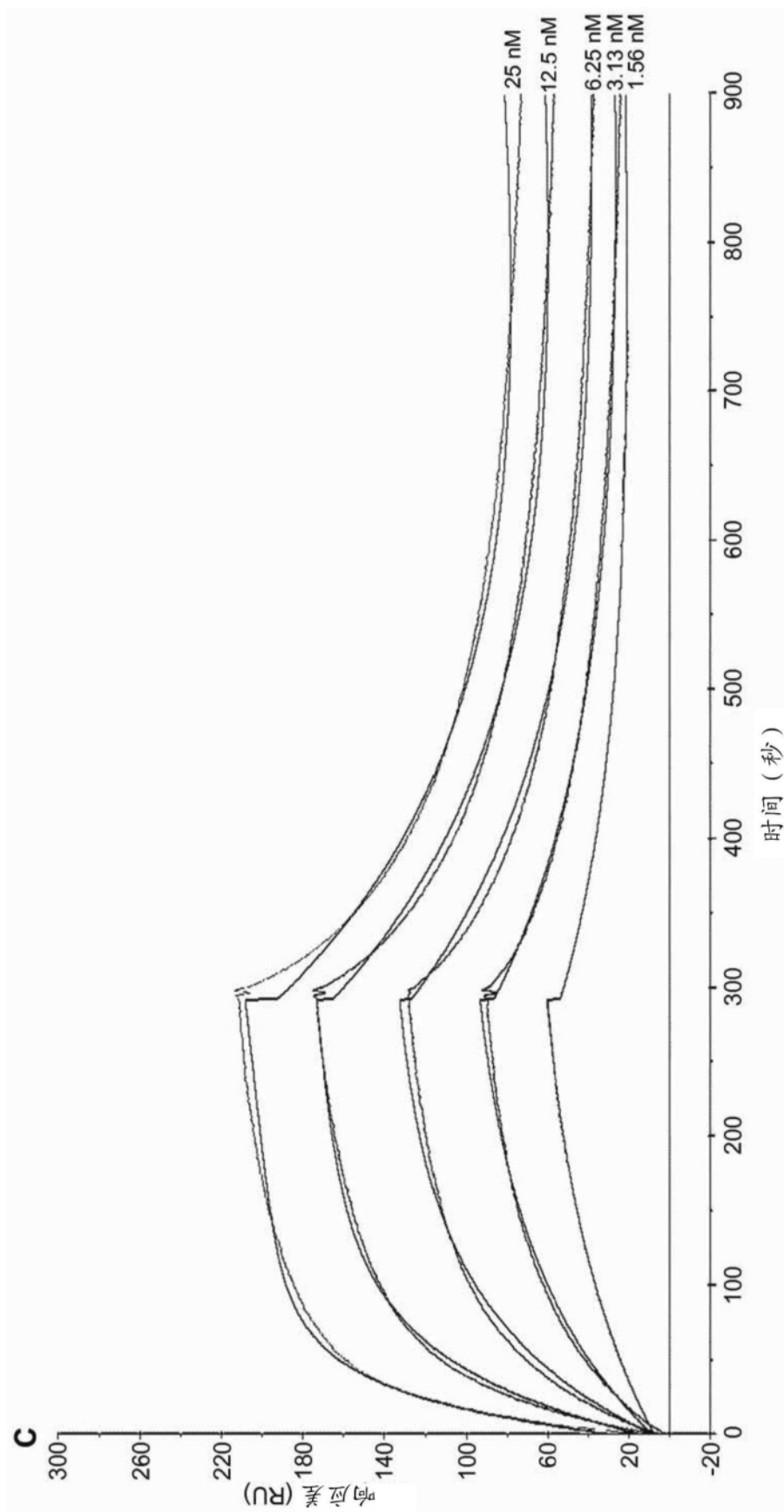


图5(续)

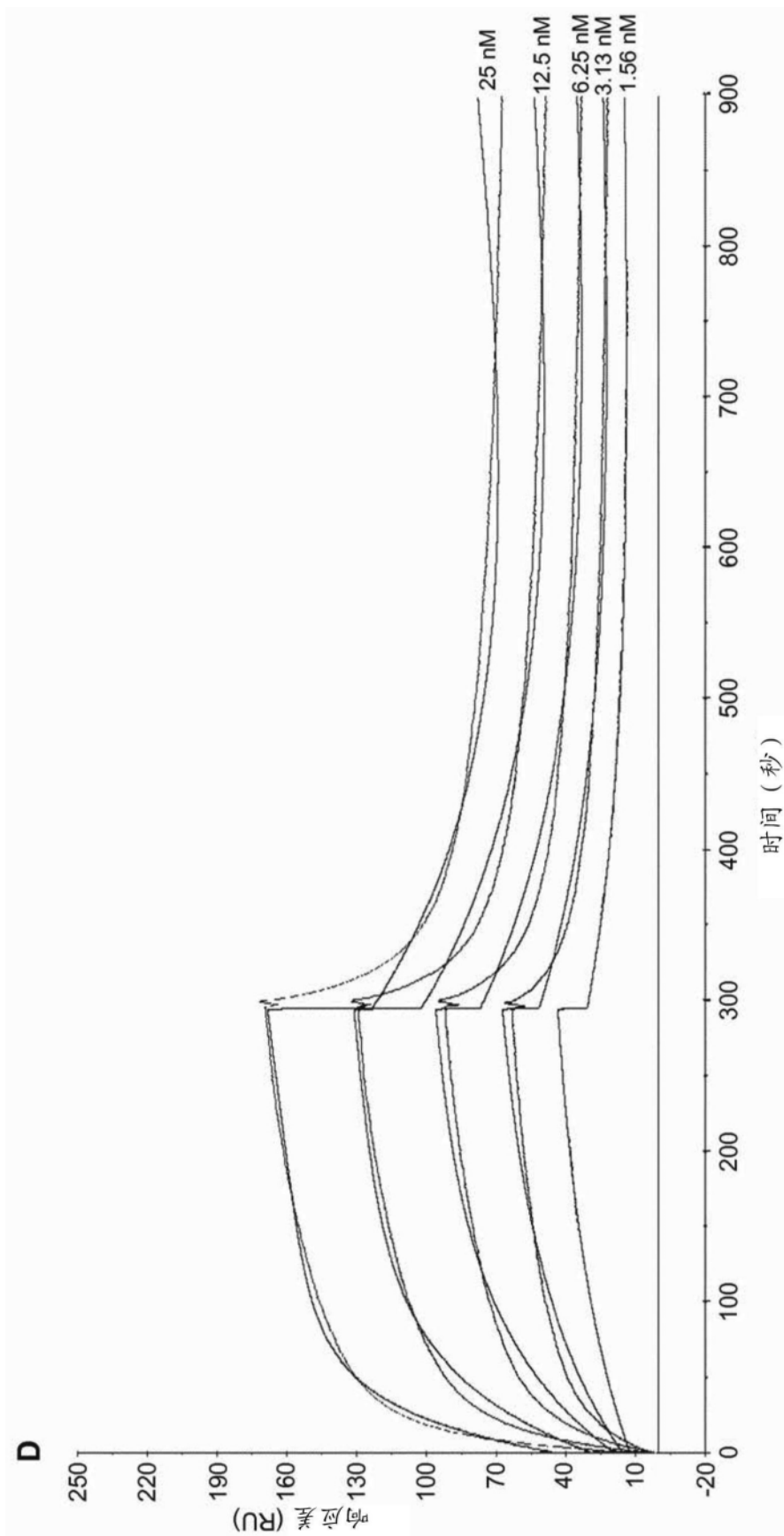


图5(续)

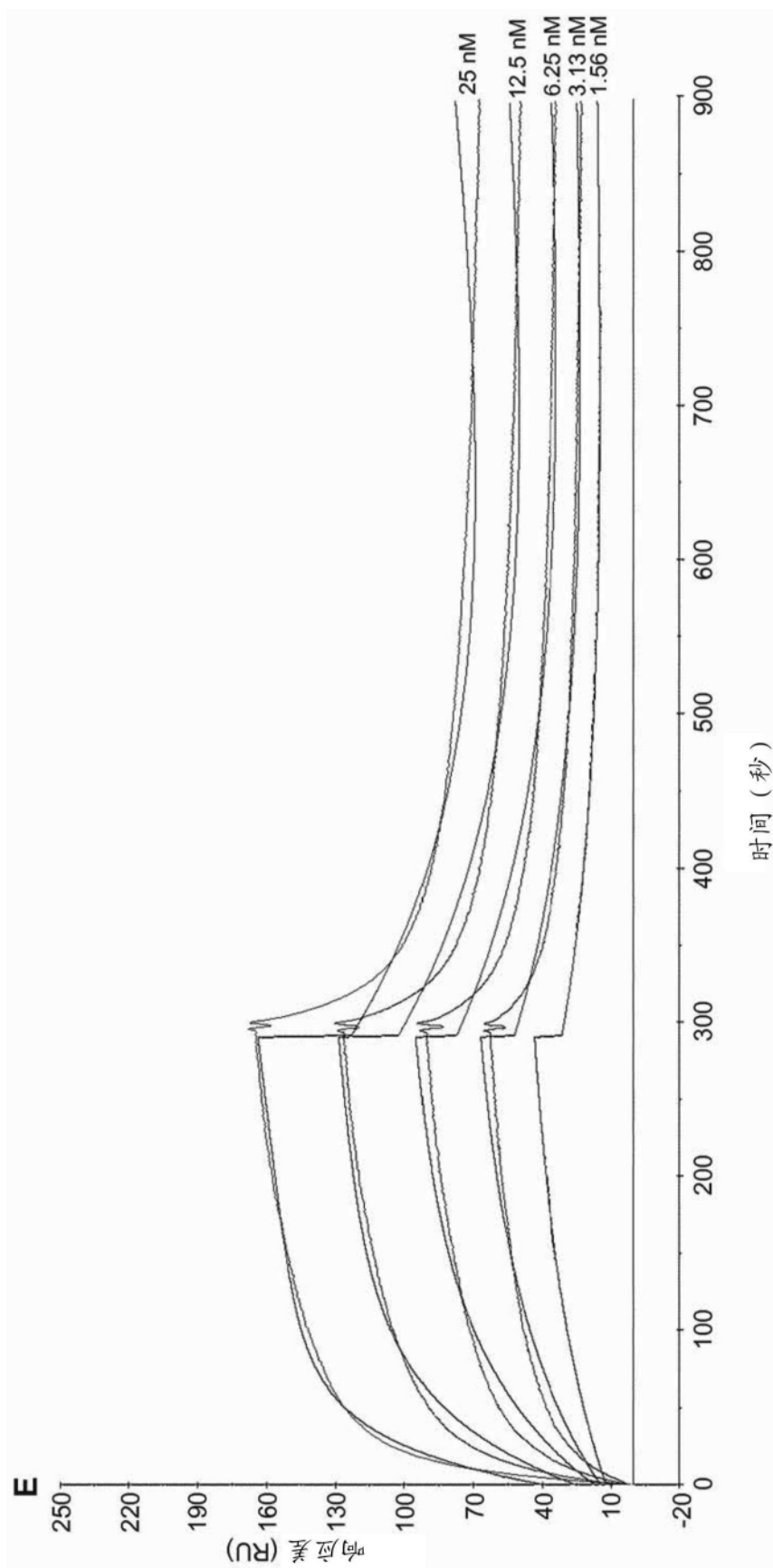


图5(续)

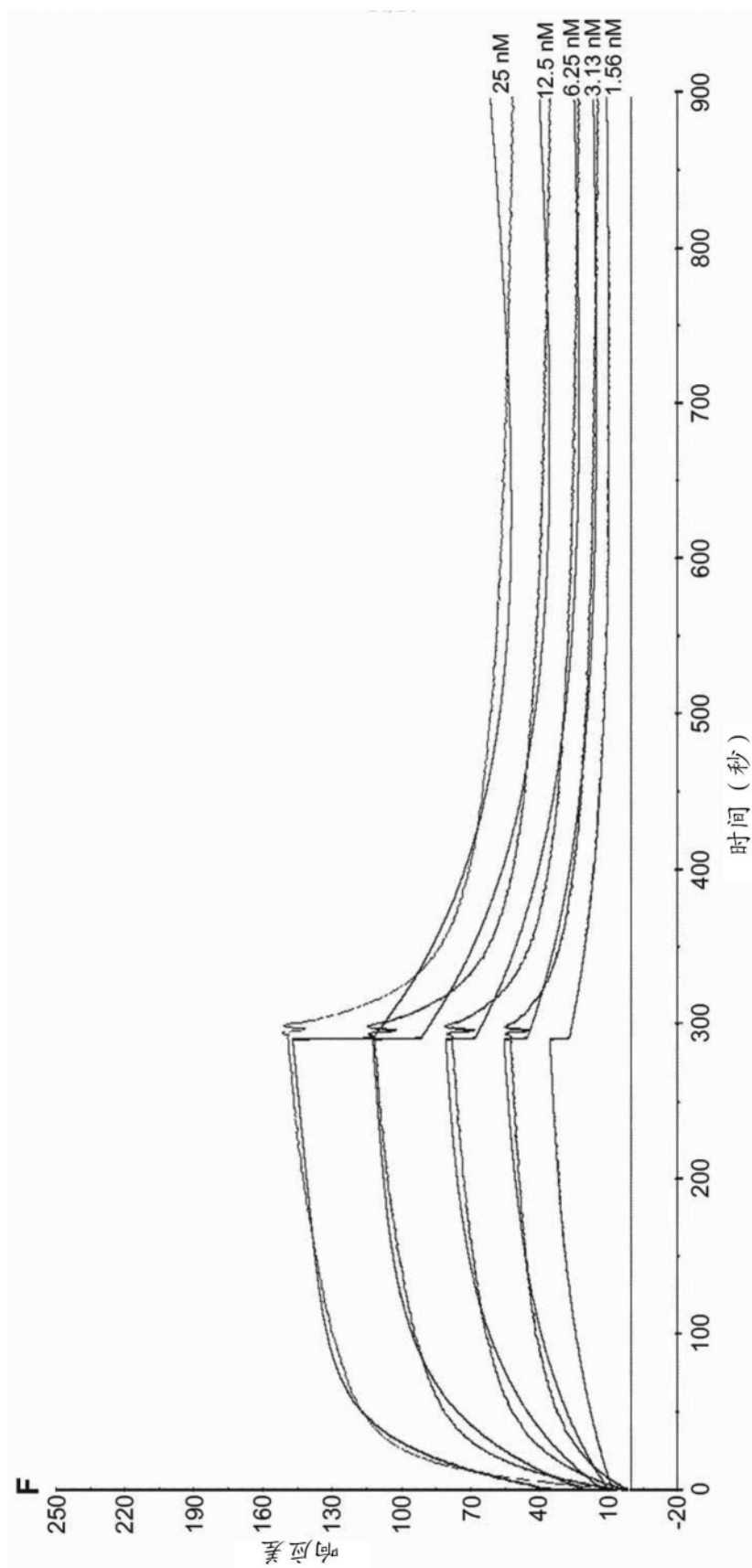


图5(续)