



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114805583 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

(21) 申请号 202210148377.6

J.舒尔曼 E.N.v.d.布林克

(22) 申请日 2011.05.27

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

(30) 优先权数据

专利代理师 权陆军 彭昶

PA201000467 2010.05.27 DK

PA201100312 2011.04.20 DK

PCT/EP2011/056388 2011.04.20 EP

61/349180 2010.05.27 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/32 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201180036934.5 2011.05.27

(71) 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 B.d.戈艾杰 S.d.海杰 T.里德尔

R.霍埃特 O.巴德斯加尔德

J.v.d.温克尔 D.萨蒂恩 P.帕伦

A.F.拉布里恩 J.梅斯特斯

权利要求书4页 说明书75页

序列表66页 附图23页

(54) 发明名称

针对HER2的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对HER2的单克隆抗体。本发明公开了结合人表皮生长因子受体2 (HER2) 的分离的单克隆抗体,以及基于相关抗体的组合物和分子。本发明还公开了包含所述抗体的药物组合物和使用所述抗体的治疗和诊断方法。

IgHV1-18-01 / IGHJ4-02 - VH 比邻 (组1)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG  
TH1014-169 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG  
VH1014-123 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG  
VH1014-161 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG  
VH1014-124 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG  
共有 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEMMGWISATNGNTIYAQKLQG

IgHV1-18-01 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS  
TH1014-169 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
VH1014-123 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
VH1014-161 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
VH1014-124 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
共有 RVITMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS

1. 单克隆抗体, 所述单克隆抗体结合人表皮生长因子受体2 (HER2), 所述单克隆抗体包含VH区, 所述VH区包含选自如下的CDR3序列:

- a) SEQ ID NO:133, 如SEQ ID NO:4的序列(169);
- b) SEQ ID NO:11 (050、049、051、055);
- c) SEQ ID NO:130, 如SEQ ID NO:18的序列(084);
- d) SEQ ID NO:136, 如SEQ ID NO:25的序列(025);
- e) SEQ ID NO:139, 如SEQ ID NO:31的序列(091);
- f) SEQ ID NO:142, 如SEQ ID NO:38的序列(129);
- g) SEQ ID NO:148, 如SEQ ID NO:48的序列(127);
- h) SEQ ID NO:52 (159);
- i) SEQ ID NO:145, 如SEQ ID NO:59的序列(098);
- j) SEQ ID NO:154, 如SEQ ID NO:66的序列(153); 和
- k) SEQ ID NO:151, 如SEQ ID NO:73的序列(132)。

2. 权利要求1的抗体, 所述抗体包含VH区, 所述VH区包含选自如下的CDR1、CDR2、CDR3序列

- a) 分别地, SEQ ID NO:131、132和133 (169), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV1-18-1种系;
- b) 分别地, SEQ ID NO:9、127和11 (050), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV3-23-1种系;
- c) 分别地, SEQ ID NO:128、129和130 (084), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV1-69-04种系;
- d) 分别地, SEQ ID NO:134、135和136 (025), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV4-34-1种系;
- e) 分别地, SEQ ID NO:137、138和139 (091), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV4-34-01种系;
- f) 分别地, SEQ ID NO:140、141和142 (129), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV3-30-01种系;
- g) 分别地, SEQ ID NO:146、147和148 (127), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV5-51-01种系;
- h) 分别地, SEQ ID NO:149、51和52 (159), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV5-51-01种系;
- i) 分别地, SEQ ID NO:143、144和145 (098), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV3-23-01种系;
- j) 分别地, SEQ ID NO:152、153和154 (153), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV3-30-03-01种系; 和
- k) 分别地, SEQ ID NO:71、150和151 (132), 任选地, 其中所述VH区源自IgHV1-18-01种系。

3. 权利要求2的抗体, 所述抗体包含VH区, 所述VH区包含选自如下的CDR1、CDR2、CDR3序列

- a) 分别地, SEQ ID NO:2、3和4 (169);

- b) 分别地,SEQ ID NO:9、10和11 (050) ;
  - c) 分别地,SEQ ID NO:16、17和18 (084) ;
  - d) 分别地,SEQ ID NO:23、24和25 (025) ;
  - e) 分别地,SEQ ID NO:30、163和31 (091) ;
  - f) 分别地,SEQ ID NO:36、37和38 (129) ;
  - g) 分别地,SEQ ID NO:43、44和45 (127) ;
  - h) 分别地,SEQ ID NO:50、51和52 (159) ;
  - i) 分别地,SEQ ID NO:57、58和59 (098) ;
  - j) 分别地,SEQ ID NO:64、65和66 (153) ; 和
  - k) 分别地,SEQ ID NO:71、72和73 (132) 。
4. 权利要求3的抗体,所述抗体包含选自如下的VH区和VL区
- a) 包含分别地SEQ ID NO:2、3和4的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:6、DAS和SEQ ID NO:7的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (169) ;
  - b) 包含分别地SEQ ID NO:9、10和11的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:13、AAS和SEQ ID NO:14的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (050) ;
  - c) 包含分别地SEQ ID NO:16、17和18的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:20、VAS和SEQ ID NO:21的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (084) ;
  - d) 包含分别地SEQ ID NO:23、24和25的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:27、AAS和SEQ ID NO:28的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (025) ;
  - e) 包含分别地SEQ ID NO:30、163和31的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:33、AAS和SEQ ID NO:34的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (091) ;
  - f) 包含分别地SEQ ID NO:36、37和38的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:40、DAS和SEQ ID NO:41的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (129) ;
  - g) 包含分别地SEQ ID NO:43、44和45的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:47、AAS和SEQ ID NO:48的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (127) ;
  - h) 包含分别地SEQ ID NO:50、51和52的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:54、AAS和SEQ ID NO:55的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (159) ;
  - i) 包含分别地SEQ ID NO:57、58和59的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:60、AAS和SEQ ID NO:61的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (098) ;
  - j) 包含分别地SEQ ID NO:64、65和66的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:68、DAS和SEQ ID NO:69的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (153) ; 和
  - k) 包含分别地SEQ ID NO:71、72和73的CDR1、CDR2和CDR3序列的VH区;以及包含分别地SEQ ID NO:75、DAS和SEQ ID NO:76的CDR1、CDR2和CDR3序列的VL区 (132) 。
5. 前述任一权利要求的抗体,包括 (a) (169) 的特征。
6. 前述任一权利要求的抗体,包括 (d) (025) 的特征。
7. 前述任一权利要求的抗体,包括 (i) (098) 的特征。
8. 前述任一权利要求的抗体,包括 (j) (153) 的特征。
9. 单克隆抗体,所述单克隆抗体包含选自如下的VH区和VL区:
- a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:5的VL区 (169) ;

- b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050);
- c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);
- d) 包含序列SEQ ID NO:77的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:78的VL区(049);
- e) 包含序列SEQ ID NO:79的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:80的VL区(051);
- f) 包含序列SEQ ID NO:81的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:82的VL区(055);
- g) 包含序列SEQ ID NO:83的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:84的VL区(123);
- h) 包含序列SEQ ID NO:85的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:86的VL区(161);
- i) 包含序列SEQ ID NO:87的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:88的VL区(124);
- j) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);
- k) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);
- l) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);
- m) 包含序列SEQ ID NO:89的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:90的VL区(001);
- n) 包含序列SEQ ID NO:91的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:92的VL区(143);
- o) 包含序列SEQ ID NO:93的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:94的VL区(019);
- p) 包含序列SEQ ID NO:95的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:96的VL区(021);
- q) 包含序列SEQ ID NO:97的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:98的VL区(027);
- r) 包含序列SEQ ID NO:99的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:100的VL区(032);
- s) 包含序列SEQ ID NO:101的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:102的VL区(035);
- t) 包含序列SEQ ID NO:103的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:104的VL区(036);
- u) 包含序列SEQ ID NO:105的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:106的VL区(054);
- v) 包含序列SEQ ID NO:106的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:108的VL区(094);
- w) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127);
- x) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:53的VL区(159);
- y) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);
- z) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153);
- aa) 包含序列SEQ ID NO:70的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:74的VL区(132);
- bb) 包含序列SEQ ID NO:109的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:110的VL区(105);
- cc) 包含序列SEQ ID NO:111的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:112的VL区(100);
- dd) 包含序列SEQ ID NO:113的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:114的VL区(125);
- ee) 包含序列SEQ ID NO:115的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:116的VL区(162);
- ff) 包含序列SEQ ID NO:117的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:118的VL区(033);
- gg) 包含序列SEQ ID NO:119的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:120的VL区(160);
- hh) 包含序列SEQ ID NO:121的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:122的VL区(166);
- ii) 包含序列SEQ ID NO:123的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:124的VL区(152);
- jj) 包含序列SEQ ID NO:125的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:126的VL区(167);
- 和
- kk) 所述抗体中任一种的变体,其中所述变体优选地具有最多1、2或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守的氨基酸取代,以及其中新的氨基酸是在图1或2中比对的序列的相同位置处,尤其是在对应的共有序列中通过“X”表示的位置处的氨基酸的取代。



10. 权利要求9的抗体,所述抗体包含(a) (169)、(c) (084)、(j) (025)、(k) (091)、(w) (127)、(x) (159)、(y) (098)、(z) (153)或(aa) (132)的VH和VL区序列。

## 针对HER2的单克隆抗体

[0001] 本申请是申请日为2011年5月27日的、申请号为201710259581.4的、题为“针对HER2的单克隆抗体”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及针对人表皮生长因子受体2 (HER2) 的单克隆抗体,和这类抗体的用途,尤其是它们在治疗癌症中的用途。

### 背景技术

[0003] HER2是185-kDa的细胞表面受体酪氨酸激酶,是表皮生长因子受体 (EGFR) 家族的成员,该家族包括四种不同的受体:EGFR/ErbB-1,HER2/ErbB-2,HER3/ErbB-3和HER4/ErbB-4。EGFR家族的四个成员形成同源和异源二聚体,HER2是对于其他ErbB受体优选并且最有效的二聚体伴侣 (Graus-Porta等,Embo J 1997;16:1647-1655;Tao等,J Cell Sci2008;121:3207-3217)。可以通过过表达或者通过与可以被配体结合而活化的其他ErbBs的异源二聚化而活化HER2 (Riese和Stern,Bioessays1998;20:41-48)。对于HER2,没有鉴别到任何配体。HER2活化导致受体磷酸化,这通过多种信号通路如MAPK、磷酸肌醇3-激酶/AKT、JAK/STAT和PKC触发下游信号的级联,这最终导致多种细胞功能如生长、生存和分化的调控 (Huang等,Expert Opin Biol Ther 2009;9:97-110)。

[0004] 对HER2在肿瘤中的很多注意力集中在其在乳腺癌中的作用,其中报道了HER2在约20%的病例中过表达并且HER2过表达与预后较差相关 (Reese等,Stem Cells 1997;15:1-8;Andrechek等,Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:3444-3449;和Slamon等,Science 1987;235:177-182)。除了乳腺癌,HER2表达还与其他人肿瘤类型,包括前列腺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠癌,食管癌和头部和颈部的鳞状细胞癌相关 (Garcia de Palazzo等,Int J Biol Markers 1993;8:233-239;Ross等,Oncologist 2003;8:307-325;Osman等,J Urol 2005;174:2174-2177;Kapitanovic等,Gastroenterology 1997;112:1103-1113;Turken等,Neoplasma 2003;50:257-261;和Oshima等,Int J Biol Markers2001;16:250-254)。

[0005] 曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)是重组的人源化的单克隆抗体,其针对HER2蛋白的结构域IV,从而在高HER2过表达的细胞中阻断配体非依赖性HER2同源二聚化,导致在更小的程度上HER2与其他家族成员的异源二聚化 (Cho等,Nature 2003;421:756-760和Wehrman等,Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:19063-19068)。在具有适度HER2表达水平的细胞中,发现曲妥珠单抗(trastuzumab)抑制HER2/EGFR异源二聚体的形成 (Wehrman等,(2006),同上;Schmitz等.,Exp Cell Res 2009;315:659-670)。曲妥珠单抗介导抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 并防止胞外结构域脱落,否则胞外结构域脱落可以导致HER2过表达细胞中截短的组成型活性的蛋白的形成。对于曲妥珠单抗也已经报道了表达高水平的HER2的肿瘤细胞的体外和体内增殖的抑制 (Nahta和Esteva的综述,Oncogene2007;26:

3637-3643)。已经批准了Herceptin<sup>®</sup>用于HER2过表达的转移性乳腺癌第一线和辅助治疗,或与化疗相结合,或作为遵循一个或多个化疗方案的单一药物。已经发现曲妥珠单抗仅在20-50%的HER2过表达的乳腺癌肿瘤患者中是有效的,许多初始应答者在几个月后表现复发(Dinh等,Clin Adv Hematol Oncol 2007;5:707-717)。

[0006] 帕妥珠单抗(Omnitarg<sup>™</sup>)是另一种人源化单克隆抗体。它针对HER2蛋白的结构域II,导致配体诱导的异源二聚化(即,HER2与已经被配体结合的ErbB家族的另一个成员的二聚化)的抑制;据报道不严格地要求高HER2表达水平的机制(Franklin等.,Cancer Cell 2004;5:317-328.)。尽管帕妥珠单抗也介导ADCC,帕妥珠单抗的作用的主要机制依赖于其二聚化阻断(Hughes等,Mol Cancer Ther 2009;8:1885-1892)。此外,发现帕妥珠单抗增强EGFR内化并通过抑制EGFR/HER2异源二聚体的形成而增强下调,否则使EGFR拴系(tether)于质膜(Hughes等,2009,同上)。这与EGFR二聚体比EGFR/HER2二聚体更有效地内化这一观察结果相关(Pedersen等,Mol Cancer Res 2009;7:275-284。据报道,当在以前的曲妥珠单抗治疗期间进展的患者中组合时,帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的作用的互补机制导致增强的抗肿瘤效果和有效性(Baselga等,J Clin Oncol 2010;28:1138-1144),评价在以前未治疗的HER2阳性转移性乳腺癌中这种抗体与多西他赛(Docetaxel)共同组合的III期试验正在进行中。

[0007] 改进靶向抗体治疗的另一种方法是通过将细胞毒性细胞或药物特异性递送至表达抗原的癌细胞。例如,所谓的三功能性抗体是双特异性抗体,具有一个靶向肿瘤细胞上的抗原的臂以及另一个靶向T细胞上的抗原例如CD3的臂。结合后,形成结合Fc的T细胞、肿瘤细胞和效应物细胞的复合物,导致杀死肿瘤细胞(Muller和Kontermann,BioDrugs 2010;24:89-98)。Ertumaxomab就是这种针对HER2的三功能性抗体,其在低HER2表达的细胞系中诱导细胞毒性,在转移性乳腺癌的II期临床开发中(Jones等,Lancet Oncol 2009;10:1179-1187和Kiewe等,Clin Cancer Res 2006;12:3085-3091)。

[0008] HER2抗体药物缀合物(ADC)目前在临床开发中。T-DM1由与真菌毒素maytansine缀合的曲妥珠单抗组成。Burris等,2011,J Clin Oncol 29:398-405和Lewis Phillips等,Cancer Res 2008;68:9280-9290报道了在II期试验中严重预处理患者组群(包括以前的曲妥珠单抗和/或拉帕替尼(lapatinib)治疗)中的应答。报道了来自II期试验的初步数据,其测定了T-DM1比曲妥珠单抗联合多西他赛在没有以前用于转移性疾病的化疗的her2-阳性转移性乳腺癌患者中的疗效和安全性(Perez等,Abstract BA3,European Society for Medical Oncology meeting 2010)。III期试验正在进行中,其中评价T-DM1比卡培他滨+拉帕替尼在以前接受曲妥珠单抗治疗的HER2-阳性的局部晚期或转移性乳腺癌的患者中的疗效和安全性。

[0009] 尽管许多因素参与选择用于HER2靶向治疗的合适的抗体,如果HER2-抗体复合物在抗体结合后有效地内化,这对于ADC方法通常是一种优势。对于小鼠HER2抗体的研究显示,抗体的某些组合促进HER2内吞作用(Ben-Kasus等,PNAS 2009;106:3294-9)。已经报道人HER2抗体F5和C1相对于它们自身迅速地内化并结合相同的表位(WO 99/55367和WO 2006/116107)。然而,与EGFR相比,HER2的内化受损。事实上,EGFR同源二聚体的内化效率远远高于HER2同源二聚体(Dinh等,Clin Adv Hematol Oncol 2007;5:707-717)。EGFR,也还有HER3,可以分别通过形成EGFR/HER2和HER3/HER2异源二聚体而增加HER2的内吞作用

(Baulida等,J Biol Chem 1996;271:5251-5257;Pedersen NM,等,Mol Cancer Res 2009;7:275-84)。

[0010] 调节HER2的功能的复杂机制需要进一步研究针对这种原癌基因的新的并且优化的治疗策略。因此,对于治疗HER2相关的疾病如癌症,仍然需要有效和安全的产物。

## 发明内容

[0011] 本发明的一个目的是提供用于医疗用途的新的、高度特异的、有效的单克隆HER2抗体。本发明的抗体显示与本领域中已有描述的抗体不同的HER2结合特性。特别地,虽然如交叉阻断HER2的结合测定中显示大部分抗体显然结合与曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或F5/C1结合的那些HER2区段重叠的HER2区段,新的抗体的特征在于,与已知抗体相比,在ADC测定中杀死表达HER-2的肿瘤细胞的更高的效率,改进的内化和/或其他优势。

[0012] 在优选的实施方案中,本发明的抗体是完全人的,结合新的表位,和/或对于人患者中的治疗用途具有有利的特性。示例性的特性包括但不限于,与以高或低水平表达人HER2的癌细胞的有利的结合特性,特异性结合表达HER2直接同源物的猕猴上皮细胞,结合HER2后有效的内化,当作为ADC施用杀死高-或低-水平表达HER2的癌细胞的高能力,在促进表达HER2的细胞的增殖方面低于F5,对表达HER2的癌细胞的增殖的中和或抑制的效果并提供对表达HER2的细胞的有效ADCC-介导的杀死,以及上述特性的任何组合。

[0013] 下面进一步详细描述了本发明的这些和其他方面。

## 附图说明

[0014] 图1:HuMab重链可变区(VH)序列与种系(参照)序列的比对(A-K)。在每个VH序列中,在特定位置与种系(参照)的那些氨基酸不同的氨基酸突出显示。显示共有VH序列,其中“X”表示可能有其他氨基酸(选自在每个位置比对的那些氨基酸)的位置。在每个VH序列中,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线表示。在表4中进一步定义了共有CDR序列。

[0015] 图2:HuMab轻链可变区(VL)序列与种系(参照)序列的比对(部分A-B)。在每个VL序列中,在特定位置与种系(参照)的那些氨基酸不同的氨基酸突出显示。在图2A中,所有VL序列源自相同的V-区段(IgKV1-12-01),但抗体间最接近的J-区段不同。显示共有VL序列,其中“X”表示可能有其他氨基酸(选自在指明位置比对的那些氨基酸)的位置。在每个VL序列中,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线表示。在表4中进一步定义了共有CDR序列。

[0016] 图3:如实施例12中所述测定的,HER2抗体与(A、B)高(AU565)和(C、D)低(A431)表达HER2的细胞系的结合曲线。显示数据是每种细胞系的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。EC<sub>50</sub>值表示表观亲和力。

[0017] 图4:HER2抗体与猕猴上皮细胞上表达的HER2的结合。显示数据是实施例13中所述的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。

[0018] 图5:HER2抗体的铬-释放(ADCC)测定,显示在与HER2抗体孵育后<sup>51</sup>Cr-标记的SK-BR-3细胞的PBMC-介导的裂解。显示的值是来自用SK-BR-3细胞的一次代表性的体外ADCC实验的平均最高百分比<sup>51</sup>Cr-释放±标准偏差。详细信息见实施例15。

[0019] 图6:与未处理的细胞(设置为100%)相比,HER2抗体对AU565细胞的增殖的影响。显示数据是在三次独立的实验中测定的与未处理的细胞相比的AU565细胞的百分比增殖±

标准偏差。\*显著的 ( $P < 0.05$ )。详细信息见实施例16。

[0020] 图7:相对于仅用调蛋白- $\beta 1$  (Heregulin- $\beta 1$ ) 刺激的细胞,用调蛋白- $\beta 1$ 刺激并用指明的HER2抗体处理的活的MCF7细胞的百分比。作为对照,显示未刺激的细胞的增殖的百分比(无)。数据是从三次独立的实验获得的 $\pm$ 标准偏差。\*调蛋白- $\beta 1$ 诱导的增殖的显著性抑制 ( $P < 0.05$ )。详细信息见实施例17。

[0021] 图8:ADC测定,显示通过抗- $\kappa$ -ETA'-缀合的HER2抗体的AU565细胞(A、B)或A431细胞(C、D)的杀死。(A、B)显示数据是使用以未缀合的和抗- $\kappa$ -ETA'-缀合的HER2抗体处理的AU565细胞的一次代表性实验的荧光强度(FI)。(C、D)显示数据是使用以未缀合的和抗- $\kappa$ -ETA'-缀合的HER2抗体处理的A431细胞的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。详细信息见实施例18。

[0022] 图9:HER2 $\times$ HER2双特异性抗体与抗- $\kappa$ -ETA'预先孵育诱导的A431细胞的杀死。HER2抗体与抗- $\kappa$ -ETA'预先孵育3天后A431细胞的活力。使用阿尔玛蓝定量细胞活力。显示数据是使用以抗- $\kappa$ -ETA'-缀合的HER2抗体和HER2 $\times$ HER2双特异性抗体处理的A431细胞的一次实验的荧光强度(FI)。使用星形孢菌素作为阳性对照,而使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。

[0023] 图10:HER2 $\times$ HER2双特异性分子诱导HER2受体的下调。用10 $\mu$ g/mL mAb孵育3天后AU565细胞裂解物中HER2表达水平的相对百分比。用HER2特异性捕获ELISA定量HER2的量并表示为与未处理的细胞相比的抑制百分比。显示数据是两次实验(除了测试一次的单特异性IgG1抗体的组合)的平均值加上标准偏差。

[0024] 图11:HER2 $\times$ HER2双特异性抗体(FITC)与溶酶体标记LAMP1(Cy5)的共定位分析。对于各种单特异性HER2抗体和HER2 $\times$ HER2双特异性抗体的与Cy5重叠的FITC像素强度(图11(A))。对于每种测试的抗体绘制三个不同的图像的LAMP1/Cy5阳性像素的FITC像素强度。单特异性显示与双特异性相比在LAMP1/Cy5阳性像素中更低的FITC像素。图11(B)代表从三个不同的图像计算出的每个LAMP1/Cy5阳性像素的FITC像素强度的平均值。连同这些结果表明,在内化后,与单特异性抗体相比,更高水平的双特异性抗体定位到Lamp1/Cy5阳性囊泡。

[0025] 图12:通过HER-2单和双特异性抗体的增殖的抑制。在10 $\mu$ g/mL HER2抗体或HER2 $\times$ HER2双特异性抗体存在的情况下在无血清的细胞培养基中接种AU565细胞。3天后,以阿尔玛蓝定量活细胞的量,细胞活力表示为相对于未处理的细胞的百分比。使用同种型对照抗体作为阴性对照。显示数据是五次测定的与未处理的细胞相比的活的AU565细胞的百分比 $\pm$ 标准偏差。\*表示仅描述一个数据点。

[0026] 图13:通过HER2 $\times$ CD3双特异性抗体以及HER2 $\times$ CD3双特异性抗体的N297Q突变体(双特异性表示为Duo)的AU565细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0027] 图14:HER2的抗体诱导的下调。用10 $\mu$ g/mL mAb孵育3天后AU565细胞裂解物中表达的HER2的相对百分比。用HER2特异性捕获ELISA定量HER2的量并表示为相对于未处理的细胞的百分比。显示数据是三次实验的平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0028] 图15:HER2抗体(FITC)与溶酶体标记LAMP1(Cy5)的共定位分析。对于各种单特异性HER2抗体的与Cy5重叠的FITC像素强度。对于每种抗体绘制三个不同的图像的LAMP1/Cy5阳性像素的FITC像素强度。第3组抗体098和153表现出与来自第2组的抗体025和帕妥珠单

抗以及来自第1组的169和Herceptin相比LAMP1/Cy5阳性对应物中更高的FITC像素强度。

[0029] 图16:借助流式细胞仪分析的HER2抗体与用不同的HER2 ECD构建体转染的CHO-S细胞的结合。Hu-HER2=完全人HER2, Hu-HER2-ch (I) CR1=具有鸡结构域I的hu-HER2, Hu-HER2-ch (II)=具有鸡结构域II的hu-HER2, hu-HER2-ch (III)=具有鸡结构域III的hu-HER2和Hu-HER2-ch (IV)=具有鸡结构域IV的hu-HER2。显示数据是一种代表性抗体TH1014-153的平均荧光强度(MFI)。详细信息见实施例25。

[0030] 图17:在雌性CB.17重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中NCI-N87人胃癌异种移植植物模型中HER2-HuMabs的体内效果。显示数据是每组(n=10只小鼠/组)的平均肿瘤大小±S.E.M. (A)和生存(B)。详细信息见实施例29。

[0031] 图18:Balb/C裸鼠中BT-474乳腺肿瘤异种移植植物中HER2 HuMabs的体内效果。显示数据是每组(n=8只小鼠/组)的平均肿瘤大小±S.E.M. (A)和生存(B)。详细信息见实施例30。

## 具体实施方式

### [0032] 定义

[0033] 当本文中使用时,术语“HER2”(也被称为ErbB-2, NEU, HER-2和CD340)是指人表皮生长因子受体2(SwissProt P04626),包括细胞(包括肿瘤细胞)天然表达的或用HER2基因转染的细胞上表达的HER2的任何变体、同种型和物种同源物。物种同源物包括猕猴HER2(猕猴;GenBank登录号GI:109114897)。

[0034] 术语“免疫球蛋白”是指一类结构上相关的糖蛋白,由两对多肽链(一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链)组成,所有四条链通过二硫键内部连接。免疫球蛋白的结构已经得到充分表征。见例如Fundamental Immunology第7章(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。简而言之,每条重链典型地由重链可变区(本文缩写为V<sub>H</sub>或VH)和重链恒定区组成。重链恒定区典型地由三个结构域(C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>和C<sub>H3</sub>)组成。每条轻链典型地由轻链可变区(这里缩写为V<sub>L</sub>或VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区典型地由一个结构域C<sub>L</sub>构成。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可以进一步再分成超可变区(或超变区,其在结构限定环的序列和/或形式中具有高度可变性),也称作互补决定区(CDRs),它们之间散布着更保守的、称作框架区(FRs)的区域。每个V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>典型地由3个CDR和4个FR组成,从氨基末端向羧基末端以下列顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4(另见Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917(1987))。除非上下文另外指明或与之矛盾,根据IMGT规则鉴别本文的CDR序列(Brochet X., Nucl Acids Res. 2008;36:W503-508和Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999;27:209-212;也参见因特网http地址imgt.cines.fr/IMGT\_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg。然而,也可以通过Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中所述的方法进行抗体序列中氨基酸残基的编号(本文中短语如“如Kabat中可变结构域残基编号”, “Kabat位置”或“根据Kabat”是指这种编号系统)。具体而言,对于恒定区中氨基酸的编号,可以使用根据同上的Kabat等的EU索引编号系统。对于给定抗体,可以通过在该抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源区的比对而确定残基的Kabat编号。

[0035] 在本发明的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指免疫球蛋白分子,免疫球蛋白分子的

片段,或其二者中任一种的衍生物,其在典型的生理条件下具有与抗原特异性结合的能力,具有显著时间期间的半衰期,如至少约30分钟,至少约45分钟,至少约1小时,至少约2小时,至少约4小时,至少约8小时,至少约12小时,约24小时或者更长,约48小时或者更长,约3、4、5、6、7或更多天等,或者任何其他相关的功能上定义的期间(如足够诱发、促进、提高和/或调节和抗体与抗原的结合关联的生理应答的时间,和/或足以供抗体招募效应物活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体(Abs)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和补体系统的组分,如补体活化经典途径中的第一组分C1q。HER2抗体也可以是双特异性抗体、双抗体(diabody)或类似分子(双抗体的描述见例如PNAS USA 90(14), 6444-8(1993))。事实上,本发明提供的双特异性抗体、双抗体等除了结合HER2的一部分以外,还可以结合任何合适的目标。如前所述,除非上下文另外指明或与之明显矛盾,本文的术语抗体包括抗体的片段,该抗体片段是抗原结合片段,即保持与抗原特异性结合能力。已经显示,可以由全长抗体的片段行使抗体的抗原结合功能。术语“抗体”中涵盖的抗原结合片段的例子包括(i) Fab' 或Fab片段,由 $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$ 和 $C_H1$ 结构域组成的单价片段,或者如W02007059782 (Genmab) 中描述的单价抗体;(ii)  $F(ab')_2$ 片段,包含通过在铰链区中的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由 $V_H$ 和 $C_H1$ 结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体的单一臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等, Nature 341, 544-546 (1989)),其基本上由 $V_H$ 结构域组成,也称作结构域抗体(Holt等; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90);(vi) 骆驼抗体(camelid)或纳米抗体(nanobodies) (Revets等; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1):111-24),和(vii)分离的互补决定区(CDR)。而且,尽管Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 是由分别的基因编码,但是可以通过合成的接头用重组方法将它们连接起来,该合成的接头能够使它们作为单一蛋白链制造出来,其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区配对形成单价分子(被称为单链抗体或单链Fv(scFv), 见例如Bird等., Science 242, 423-426 (1988) 和Huston等., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988))。除非上下文另外指出或明显指明,这种单链抗体涵盖在术语抗体中。尽管这种片段通常包括在抗体的意义内,它们共同地并且各自独立地是本发明的独特特征,显示不同的生物学特性和效用。本文进一步讨论了在本发明的上下文中的这些和其他有用的抗体片段以及这种片段的双特异性形式。还应当理解的是,除非另外指出,术语抗体还包括通过任何已知的技术如酶切割(enzymatic cleavage)、肽合成和重组技术提供的多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs)、抗体样多肽,如嵌合抗体和人源化抗体,以及保留与抗原特异性结合能力的抗体片段(抗原结合片段)。产生的抗体可以具有任何同种型。

[0036] 如本文所使用的,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类型(例如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 或IgM)。

[0037] 术语“单价抗体”在本发明的上下文中意味着抗体分子能够结合单个抗原分子,因此不能够抗原交联。

[0038] “效应物功能缺陷的抗体”或“效应物功能缺陷抗体”是指如下抗体,其具有显著降低的活化一种或多种效应物机制(如补体活化或Fc受体结合)的能力或者没有该能力。因此,效应物功能缺陷抗体具有显著降低的介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒性(CDC)的能力或者没有该能力。这种抗体的一个例子是IgG4。

[0039] “HER2抗体”或“抗-HER2抗体”是如上所述的抗体,其与抗原HER2特异性结合。

[0040] 如本文所使用的,术语“人抗体”意图包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”并不意图包括如下抗体,其中源自另一种哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列被接枝到人框架序列上。

[0041] 如本文所使用的,如果抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统获得的(例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者通过筛选人免疫球蛋白基因文库),并且其中选择的人抗体在氨基酸序列与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%,如至少95%,例如至少96%,如至少97%,例如至少98%,或者如至少99%相同,则人抗体“源自”特定的种系序列。典型地,除了重链CDR3,源自特定人种系序列的人抗体与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,显示不超过20个氨基酸的差异,例如不超过10个氨基酸的差异,例如不超过9、8、7、6或5个,例如不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0042] 在一个优选实施方案中,本发明的抗体是分离的。如本文所使用的,“分离的抗体”意图是指如下抗体,其基本上不含其他具有不同抗原特异性的抗体(例如,特异性结合HER2的分离抗体基本上不含特异性结合除HER2以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合HER2的表位、同种型或变体的分离的抗体可以与其他相关抗原,例如来自其他物种的抗原(例如HER2种间同源物)具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学剂。在本发明的一个实施方案中,两种或多种具有不同抗原结合特异性的“分离的”单克隆抗体被组合在良好定义的组合物中。

[0043] 当本文中在两种或更多种抗体的上下文中使用时,术语“与...竞争”或“与...交叉竞争”表明,两种或更多种抗体竞争结合HER2,例如在实施例14中所述的测定中竞争结合HER2。如果抗体竞争一种或多种其他抗体25%或更高时,抗体“阻断”或“交叉阻断”一种或多种其他抗体结合HER2,25%-74%代表“部分阻断”,75%-100%代表“完全阻断”,优选使用实施例14的测定来确定。对于一些抗体对,实施例的测定中的竞争或阻断只有在将一种抗体包被在平板上,而用另一种进行竞争时才能观察到,但反之则不行。除非上下文另外定义或否定,当在本文中使用时,术语“与...竞争”,“与...交叉竞争”,“阻断”或“交叉阻断”还意图涵盖这种抗体对。

[0044] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子的表面基团如氨基酸或糖侧链组成,通常具有特定的三维结构特征,以及特定的带电特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性剂存在的情况下,与前者的结合消失,而与后者的结合不消失。表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基(也称作表位的免疫显性组分(immunodominant component)),和其他不直接参与结合的氨基酸残基,如可以被特异性抗原结合肽有效阻断或覆盖的氨基酸残基(换言之,这些氨基酸残基位于特异抗原结合肽的足迹(footprint)内)。

[0045] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一的结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,杂交瘤包括与永生化细胞融合的、从转基因或



转染色体非人类动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,该动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0046] 如本文所使用的,在抗体与预定抗原或表位的结合的上下文中,术语“结合”典型地是其以对应于约 $10^{-7}$ M或者更小,如约 $10^{-8}$ M或者更小,如约 $10^{-9}$ M或者更小,约 $10^{-10}$ M或者更小,或者约 $10^{-11}$ M或者甚至更小的 $K_D$ 的亲合力结合(当通过例如在BIAcore 3000设备中用抗原作为配体、以抗体作为分析物通过表面等离子体共振(SPR)技术进行测定时),并且与除预定抗原或密切相关的抗原之外的非特异性抗原(例如BSA或酪蛋白)结合的其亲合力相比,其与预定抗原结合的亲合力对应的 $K_D$ 低至少10倍,如至少低100倍,例如至少低1,000倍,如至少低10,000倍,例如至少低100,000倍。亲合力低出的量取决于抗体的 $K_D$ ,因此当抗体的 $K_D$ 非常低时(即抗体是高度特异性的),对抗原的亲合力低于对非特异性抗原的亲合力的量可以是至少10,000倍。

[0047] 如本文所使用的,术语“ $k_d$ ”(sec $^{-1}$ )是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称作 $k_{off}$ 值。

[0048] 如本文所使用的,术语“ $k_a$ ”(M $^{-1} \times$  sec $^{-1}$ )是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数。

[0049] 如本文所使用的,术语“ $K_D$ ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0050] 如本文所使用的,术语“ $K_A$ ”(M $^{-1}$ )是指特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数,并且通过 $k_a$ 除以 $k_d$ 获得。

[0051] 如本文所使用的,术语“抑制增殖”(例如涉及细胞,如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时,和不与HER2抗体接触的相同细胞的增殖相比,细胞增殖的任何明显的降低,例如,抑制细胞培养物增殖至少约10%,至少约20%或至少约30%,或至少与参照抗体如曲妥珠单抗一样,例如,通过实施例,例如实施例16中的测定所确定的。

[0052] 如本文所使用的,术语“促进增殖”(例如涉及细胞,如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时,和不与HER2抗体接触的相同细胞的增殖相比,细胞增殖的任何明显的增加,例如,促进细胞培养物增殖至少约10%,至少约20%或至少约30%,或至少与参照抗体如F5一样,例如,通过实施例中的测定所确定的。

[0053] 如本文所使用的,当本文中在HER2抗体的上下文中使用时,术语“内化”包括其中所述抗体从细胞表面和/或从周围培养基内化进表达HER-2的细胞的任何机制,例如,通过内吞作用。可以使用测量内化抗体的量的直接测定(如,例如,实施例18中所述的fab-CypHer5E测定)或其中测定内化的抗体-毒素缀合物的作用的间接测定(如,例如,实施例17的抗- $\kappa$ -ETA'测定)评价抗体的内化。

[0054] 本发明还提供了包括实施例抗体的 $V_L$ 区、 $V_H$ 区、或一个或多个CDR的功能变体的抗体。在HER2抗体的上下文中使用的 $V_L$ 、 $V_H$ 或CDR的功能变体仍然允许该抗体保留母体抗体(parent antibody)的亲合力(affinity)/亲合力(avidity)和/或特异性/选择性的至少相当部分(至少约50%,60%,70%,80%,90%,95%或更多),在一些情况下,与母体抗体相比,这种HER2抗体可以与更大的亲合力、选择性和/或特异性相关。

[0055] 这些功能变体典型地保留与母体抗体的显著的序列同一性。两条序列之间的百分比同一性是序列所共享的相同位置的数量的函数(即,%同源性=相同位置数/位置的总数 $\times 100$ ),同时考虑缺口的数量和每个缺口的长度,需要引入缺口是为了在两条序列间进行

最佳比对。可以通过E.Meyers和W.Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) 的算法 (其已经被引入到ALIGN程序 (2.0版) 中), 使用PAM120加权残基表、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分确定两条核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性。此外, 可以使用Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970) 算法确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。

[0056] 示例性的变体包括在一个或多个“变体”氨基酸位置 (在对应的共有序列表示为“X”) 与图1和2所示的母体抗体VH和/或VL序列不同的那些。优选的变体是其中的新的氨基酸选自在图1或2中比对序列之一的对应位置的那些氨基酸 (关于CDR序列变体的详细信息, 见表4)。另外地或额外地, VH, VL或CDR变体的序列可以主要通过保守的取代而与母体抗体序列的VH, VL或CDR序列不同; 例如变体中的至少10个, 如至少9、8、7、6、5、4、3、2或1个取代是保守的氨基酸残基替换。

[0057] 在本发明的上下文中, 可以通过下列表格中反映的氨基酸类型内的取代定义保守取代。

[0058] 对于保守取代的氨基酸残基类型

[0059]	酸性残基	Asp (D)和 Glu (E)
	碱性残基	Lys (K)、 Arg (R)和 His (H)
	亲水性不带电荷的残基	Ser (S)、 Thr (T)、 Asn (N)和 Gln (Q)
	脂肪族不带电荷的残基	Gly (G)、 Ala (A)、 Val (V)、 Leu (L)和 Ile (I)
	非极性不带电荷的残基	Cys (C)、 Met (M)和 Pro (P)
	芳香族残基	Phe (F)、 Tyr (Y)和 Trp (W)

[0060] 如本文所使用的, 术语“重组宿主细胞” (或简称为“宿主细胞”) 意图是指其中已经引入表达载体, 例如编码本发明的抗体的表达载体的细胞。重组宿主细胞包括例如转染瘤 (transfectomas), 如CHO细胞、HEK293细胞、NS/O细胞和淋巴细胞。

[0061] 术语“转基因非人类动物”是指如下非人类动物, 其基因组包括一个或多个重链和/或轻链转基因或转染色体 (整合或者不整合进动物的天然基因组DNA中), 并且能够表达完全的人抗体。例如, 转基因小鼠可以具有人轻链转基因, 以及人重链转基因或人重链转染色体, 使得当用HER2抗原和/或表达HER2的细胞进行免疫时, 小鼠产生人HER2抗体。可以将人重链转基因整合进小鼠的染色体DNA中, 如同在转基因小鼠 (例如HuMAb小鼠如HCo7, HCo12或HCo17小鼠) 中那样, 或者人重链转基因可以保持在染色体外部, 如在W002/43478中描述的转染色体KM小鼠中那样。具有更大的人Ab基因所有组成成分类似小鼠包括HCo7和HCo20 (见例如W02009097006)。这些转基因和转染色体小鼠 (本文共同地称为“转基因小鼠”) 能够通过经历V-D-J重组和同种型转换 (isotype switching) 而产生针对给定抗原的人单克隆抗体的多种同种型 (如IgG, IgA, IgM, IgD和/或IgE)。还可以通过引入编码这种特异性抗体的基因, 例如通过将基因与在动物乳汁中表达的基因可操作连接而利用转基因非人动物用于产生针对特定抗原的抗体。

[0062] “治疗”是指施用有效量的本发明的治疗活性化合物, 用于缓解、减轻、遏制或根除 (治愈) 症状或疾病状态的目的。

[0063] “有效量”或“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间期间,有效获得期望的治疗结果的量。治疗有效量的HER2抗体可以随着多种因素而改变,如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及HER2抗体在个体内引发期望的应答的能力。治疗有效量还是这样的量,其中抗体或抗体部分的治疗有益效果超过其任何毒性或有害效果。

[0064] “抗-独特型”抗体是如下抗体,其识别通常与抗体的抗原结合位点关联的独特决定簇。

[0065] 本发明的进一步的方面和实施方案

[0066] 如上所述,在第一个方面,本发明涉及结合HER2的单克隆抗体。

[0067] 可以例如通过Kohler等,Nature 256,495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法产生,或者可以通过重组DNA方法产生本发明的单克隆抗体。还可以使用例如Clackson等,Nature 352,624-628 (1991) 和Marks等,J.Mol.Biol.222,581-597 (1991) 中描述的技术从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。可以从任何合适的来源获得单克隆抗体。因此,例如,可以从杂交瘤获得单克隆抗体,其中所述杂交瘤可以从用感兴趣的抗原免疫的小鼠获得的小鼠脾B细胞制备,该感兴趣的抗原的形式可以是例如在表面上表达抗原的细胞,或者是编码感兴趣的抗原的核酸。还可以从杂交瘤获得单克隆抗体,所述杂交瘤源自被免疫的人或非人哺乳动物(如大鼠、狗、灵长动物等)的表达抗体的细胞。

[0068] 在一个实施方案中,本发明的抗体是人抗体。可以使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生针对HER2的人单克隆抗体。这种转基因和转染色体小鼠包括在本文分别被称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并在本文共同地被称为“转基因小鼠”。

[0069] HuMAb小鼠包含编码未重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列,连同使内源 $\mu$ 和 $\kappa$ 链基因座失活的靶向的突变的人免疫球蛋白基因迷你基因座(miniloci) (Lonberg, N.等,Nature 368,856-859 (1994))。因此,小鼠显示降低的小鼠IgM或 $\kappa$ 的表达,并且对免疫应答中,引入的人重链和轻链转基因经历类型转换(class switching)和体细胞突变(somatic mutation)从而产生高亲和力人IgG, $\kappa$ 单克隆抗体 (Lonberg, N.等. (1994), 同上; 综述见Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N.和Huszar, D., Intern.Rev.Immunol.Vol.13 65-93 (1995) 以及Harding, F.和Lonberg, N. Ann.N.Y.Acad.Sci 764 536-546 (1995))。Taylor, L.等, Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J.等, International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon等, J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L.等, International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D.等, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) 中详细描述了HuMAb小鼠的制备。也参见US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918和WO 01/09187。

[0070] HCo7, HCo12, HCo17和HCo20小鼠在它们的内源轻链( $\kappa$ )基因中具有JKD破坏(JKD disruption) (如Chen等, EMBO J. 12, 821-830 (1993) 中所述), 在它们的内源重链基因中具有CMD破坏(如WO 01/14424的实施例1中所述), 并具有KCo5人 $\kappa$ 轻链转基因(如Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) 中所述)。此外, HCo7小鼠具有HCo7人重链转基

因(如US 5,770,429中所述),HCo12小鼠具有HCo12人重链转基因(如WO 01/14424的实施例2中所述),HCo17小鼠具有HCo17人重链转基因(如WO 01/09187的实施例2中所述)以及HCo20小鼠具有HCo20人重链转基因。产生的小鼠在对于内源的小鼠重链和 $\kappa$ 轻链基因座的破坏纯合的背景中表达人免疫球蛋白重链和 $\kappa$ 轻链转基因。

[0071] 在KM小鼠品系中,已经如Chen等,EMBO J.12,811-820(1993)中所述将内源小鼠 $\kappa$ 轻链基因纯合地破坏,并且已经如WO 01/09187的实施例1所述将内源小鼠重链基因纯合地破坏。如Fishwild等,Nature Biotechnology 14,845-851(1996)中所述,该小鼠品系携带人 $\kappa$ 轻链转基因KCo5。该小鼠品系还携带由如WO 02/43478中所述的染色体14片段hCF(SC20)组成的人重链转染色体。可以通过如WO/2009/097006中所述通过将HCo12与KCo5[J/K](Balb)交配而产生HCo12-Balb/C小鼠。

[0072] 可以根据公知的技术使用来自这些转基因小鼠的脾细胞来产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。

[0073] 进一步,可以使用本领域公知的技术通过展示型技术(包括但不限于,噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其他技术)鉴别本发明的人抗体或来自其他物种的本发明的抗体,产生的分子可以经受额外的成熟过程,例如亲和力成熟,因为这些技术是本领域公知的(见例如Hoogenboom等,J.Mol.Biol.227,381(1991)(噬菌体展示),Vaughan等,Nature Biotech 14,309(1996)(噬菌体展示),Hanes和Plucthau,PNAS USA 94,4937-4942(1997)(核糖体展示),Parmley和Smith,Gene 73,305-318(1988)(噬菌体展示),Scott TIBS 17,241-245(1992),Cwirla等,PNAS USA 87,6378-6382(1990),Russel等,Nucl.Acids Research 21,1081-1085(1993),Hogenboom等,Immunol.Reviews 130,43-68(1992),Chiswell和McCafferty TIBTECH 10,80-84(1992),和US 5,733,743)。如果使用展示技术产生非人的抗体,则这些抗体可以进行人源化。

[0074] 交叉阻断组1的抗体

[0075] 在本发明的抗体一个方面,抗体与本文所述的交叉阻断组1的新的人抗体中的一种或多种结合HER2上的相同表位。

[0076] 在一个实施方案中,当如实施例14中所述测定时,抗体交叉阻断曲妥珠单抗与可溶性HER2的结合。

[0077] 在一个实施方案中,抗体与含有包含SEQ ID NO:1的序列的VH区和包含SEQ ID NO:5的序列的VL区的参照抗体(169)结合相同的表位。

[0078] 在一个实施方案中,抗体与含有包含SEQ ID NO:8的序列的VH区和包含SEQ ID NO:12的序列的VL区的参照抗体(050)结合相同的表位。

[0079] 在一个实施方案中,抗体与含有包含SEQ ID NO:15的序列的VH区和包含SEQ ID NO:84的序列的VL区的参照抗体(084)结合相同的表位。

[0080] 在一个实施方案中,抗体与包含选自如下的VH和VL区的参照抗体结合相同的表位:

[0081] a) 包含序列SEQ ID NO:77的VH区和包含序列SEQ ID NO:78的VL区(049);

[0082] b) 包含序列SEQ ID NO:79的VH区和包含序列SEQ ID NO:80的VL区(051);

[0083] c) 包含序列SEQ ID NO:81的VH区和包含序列SEQ ID NO:82的VL区(055);

[0084] d) 包含序列SEQ ID NO:83的VH区和包含序列SEQ ID NO:84的VL区(123);

[0085] e) 包含序列SEQ ID NO:85的VH区和包含序列SEQ ID NO:86的VL区(161);和

[0086] f) 包含序列SEQ ID NO:87的VH区和包含序列SEQ ID NO:88的VL区(124)。

[0087] 在本发明的抗体的另一个额外的或另外的方面,抗体结合HER2,包含与本文所述的新的抗体的序列相似或相同的VH CDR3,VH区和/或VL区序列。

[0088] 在一个实施方案中,抗体包含具有选自如下的序列的VH CDR3区:

[0089] SEQ ID NO:11(050,049,051,055),任选地,其中VH区源自IgHV3-21-1种系序列;

[0090] SEQ ID NO:130,如SEQ ID NO:18的序列(084),任选地,其中VH区源自IgHV1-69-04种系序列;

[0091] SEQ ID NO:133(169,123,161,124),如SEQ ID NO:4的序列(169),任选地,其中VH区源自IgHV1-18-1种系序列;或者

[0092] 在一个实施方案中,抗体包含如图1中所示的抗体123,161或124中一种的VH CDR3区,任选地,其中VH区源自IgHV1-18-1种系。

[0093] 在一个实施方案中,抗体包含选自如下的VH区

[0094] a) 包含SEQ ID NOs:9,127和11的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:9,10和11的CDR1,CDR2和CDR3序列(050)的VH区;任选地,其中VH区源自IGHV3-23-1种系;

[0095] b) 包含SEQ ID NOs:128,129和130的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:16,17和18的CDR1,CDR2和CDR3序列(084)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV1-69-04种系;以及

[0096] c) 包含分别地SEQ ID NOs:131,132和133的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:2,3和4的CDR1,CDR2和CDR3序列(169)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV1-18-1种系。

[0097] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a)或(b),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:13,XAS(其中X是A或V)和SEQ ID No:155的CDR1,CDR2和CDR3序列,如选自SEQ ID Nos:13或20的CDR1,是AAS或VAS的CDR2和选自SEQ ID NOs:14和21的CDR3序列(050,084);分别地,任选地,其中VL区源自IgKV1-12-01种系。

[0098] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(c),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:6,DXS(其中X=A或T),和SEQ ID NO:156的CDR1,CDR2和CDR3序列(169),任选地,其中所述VL区源自IgKV3-11-01。

[0099] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:6,DAS,和SEQ ID NO:7的CDR1,CDR2和CDR3(169)。

[0100] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:9,10和11的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:13,AAS,和SEQ ID NO:14的CDR1,CDR2和CDR3(050)。

[0101] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:16,17和18的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:20,VAS,和SEQ ID NO:21的CDR1,CDR2和CDR3(084)。

[0102] 在单独的实施方案中,抗体包括:

[0103] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);

[0104] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050);

- [0105] c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);
- [0106] d) 包含序列SEQ ID NO:77的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:78的VL区(049);
- [0107] e) 包含序列SEQ ID NO:79的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:80的VL区(051);
- [0108] f) 包含序列SEQ ID NO:81的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:82的VL区(055);
- [0109] g) 包含序列SEQ ID NO:83的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:84的VL区(123);
- [0110] h) 包含序列SEQ ID NO:85的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:86的VL区(161);
- [0111] i) 包含序列SEQ ID NO:87的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:88的VL区(124);和/或
- [0112] j) 所述抗体中任一种的变体,其中所述变体优选地具有最多1,2或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守的氨基酸取代,以及其中新的氨基酸是在图1或2中比对的序列的相同位置处,尤其是在对应的共有序列中通过“X”表示的位置处的氨基酸的取代。
- [0113] 交叉阻断组2的抗体
- [0114] 在本发明的一个方面,抗体与本文所述的交叉阻断组2的新的人抗体中的一种或多种结合HER2上的相同表位。
- [0115] 在一个实施方案中,当如实施例14中所述测定时,抗体交叉阻断帕妥珠单抗与可溶性HER2的结合。
- [0116] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区的参照抗体(025)结合相同的表位。
- [0117] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区的参照抗体(091)结合相同的表位。
- [0118] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:35的VH区和包含序列SEQ ID NO:39的VL区的参照抗体(129)结合相同的表位。
- [0119] 在一个实施方案中,抗体与包含选自如下的VH和VL区的参照抗体结合相同的表位:
- [0120] a) 包含序列SEQ ID NO:89的VH区和包含序列SEQ ID NO:90的VL区(001);
- [0121] b) 包含序列SEQ ID NO:91的VH区和包含序列SEQ ID NO:92的VL区(143);
- [0122] c) 包含序列SEQ ID NO:93的VH区和包含序列SEQ ID NO:94的VL区(019);
- [0123] d) 包含序列SEQ ID NO:95的VH区和包含序列SEQ ID NO:96的VL区(021);
- [0124] e) 包含序列SEQ ID NO:97的VH区和包含序列SEQ ID NO:98的VL区(027);
- [0125] f) 包含序列SEQ ID NO:99的VH区和包含序列SEQ ID NO:100的VL区(032);
- [0126] g) 包含序列SEQ ID NO:101的VH区和包含序列SEQ ID NO:102的VL区(035);
- [0127] h) 包含序列SEQ ID NO:103的VH区和包含序列SEQ ID NO:104的VL区(036);
- [0128] i) 包含序列SEQ ID NO:105的VH区和包含序列SEQ ID NO:106的VL区(054);和

[0129] j) 包含序列SEQ ID NO:107的VH区和包含序列SEQ ID NO:108的VL区(094)。

[0130] 在本发明的抗体的另一个额外的或另外的方面,抗体结合HER2,包含与本文所述的新的抗体的序列相似或相同的VH CDR3,VH区和/或VL区序列。

[0131] 在一个实施方案中,抗体包含具有选自如下的序列的VH CDR3区:

[0132] SEQ ID NO:136,如SEQ ID NO:25的序列(025),任选地,其中VH区源自IgHV4-34-1种系序列;

[0133] SEQ ID NO:139,如SEQ ID NO:31的序列(091),任选地,其中VH区源自IgHV4-34-01种系序列;和

[0134] SEQ ID NO:142,如SEQ ID NO:38的序列(129),任选地,其中VH区源自IgHV3-30-01种系序列。

[0135] 在一个实施方案中,抗体包含如图1中所示的抗体001,143,019,021,027,032,035,036,054或094中一种的VH CDR3区,任选地,其中VH区源自IgHV4-34-1种系。

[0136] 在一个实施方案中,抗体包含选自如下的VH区

[0137] a) 包含SEQ ID NOs:134,135和136的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:23,24和25的CDR1,CDR2和CDR3序列(025)的VH区;任选地,其中VH区源自IgHV4-34-1种系;

[0138] b) 包含SEQ ID NOs:137,138和139的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOs:30,163和31的CDR1,CDR2和CDR3序列(091)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV4-34-01种系;以及

[0139] c) 包含分别地SEQ ID NOs:140,141和142的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:36,37和38的CDR1,CDR2和CDR3序列(129)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV3-30-01种系。

[0140] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:157,AAS,和SEQ ID No:164的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID Nos:27,AAS,和SEQ ID NO:28的CDR1,CDR2和CDR3序列(025);分别地,任选地,其中VL区源自IgKV1D-16-01种系。

[0141] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(b),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:33,AX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>(其中X<sub>1</sub>是A或T,优选A;X<sub>2</sub>是S或F,优选S),和SEQ ID No:158的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID Nos:33,AAS,和SEQ ID NO:34的CDR1,CDR2和CDR3序列(091);分别地,任选地,其中VL区源自IgKV1D-16-01种系。

[0142] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(c),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:40,DAS,和SEQ ID NO:41的CDR1,CDR2和CDR3序列(129),任选地,其中所述VL区源自IgKV3-11-01。

[0143] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:27,AAS,和SEQ ID NO:28的CDR1,CDR2和CDR3(025)。

[0144] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:30,163和31的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:33,AAS,和SEQ ID NO:34的CDR1,CDR2和CDR3(091)。

[0145] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分别地SEQ ID NOs:36,37和38的CDR1,CDR2和CDR3;所述VL区包含分别地SEQ ID NOs:40,DAS,和SEQ ID NO:41的

CDR1, CDR2和CDR3 (129)。

[0146] 在单独的实施方案中, 抗体包括:

[0147] a) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);

[0148] b) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);

[0149] c) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);

[0150] d) 包含序列SEQ ID NO:89的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:90的VL区(001);

[0151] e) 包含序列SEQ ID NO:91的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:92的VL区(143);

[0152] f) 包含序列SEQ ID NO:93的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:94的VL区(019);

[0153] g) 包含序列SEQ ID NO:95的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:96的VL区(021);

[0154] h) 包含序列SEQ ID NO:97的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:98的VL区(027);

[0155] i) 包含序列SEQ ID NO:99的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:100的VL区(032);

[0156] j) 包含序列SEQ ID NO:101的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:102的VL区(035);

[0157] k) 包含序列SEQ ID NO:103的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:104的VL区(036);

[0158] l) 包含序列SEQ ID NO:105的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:106的VL区(054);

[0159] m) 包含序列SEQ ID NO:106的VH区和, 优选地, 包含序列SEQ ID NO:108的VL区(094); 和/或

[0160] n) 所述抗体中任一种的变体, 其中所述变体优选地具有最多1, 2或3个氨基酸修饰, 更优选氨基酸取代, 如保守的氨基酸取代, 以及其中新的氨基酸是在图1或2中比对的序列的相同位置处, 尤其是在对应的共有序列中通过“X”表示的位置处的氨基酸的取代。

[0161] 交叉阻断组3的抗体

[0162] 在本发明的一个方面, 抗体与本文所述的交叉阻断组3的新的人抗体中的一种或多种结合HER2上的相同表位。

[0163] 在一个实施方案中, 当如实施例14中所述测定时, 抗体交叉阻断F5和/或C5与可溶性HER2的结合。

[0164] 在一个实施方案中, 抗体与含有包含序列SEQ ID NO:46的VH区和包含序列SEQ ID NO:49的VL区的参照抗体(127)结合相同的表位。

[0165] 在一个实施方案中, 抗体与含有包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID



NO:53的VL区的参照抗体(159)结合相同的表位。

[0166] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区的参照抗体(098)结合相同的表位。

[0167] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区的参照抗体(153)结合相同的表位。

[0168] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:70的VH区和包含序列SEQ ID NO:74的VL区的参照抗体(132)结合相同的表位。

[0169] 在一个实施方案中,抗体与包含选自如下的VH和VL区的参照抗体结合相同的表位:

[0170] k) 包含序列SEQ ID NO:109的VH区和包含序列SEQ ID NO:110的VL区(105);

[0171] l) 包含序列SEQ ID NO:111的VH区和包含序列SEQ ID NO:112的VL区(100);

[0172] m) 包含序列SEQ ID NO:113的VH区和包含序列SEQ ID NO:114的VL区(125);

[0173] n) 包含序列SEQ ID NO:115的VH区和包含序列SEQ ID NO:116的VL区(162);

[0174] o) 包含序列SEQ ID NO:117的VH区和包含序列SEQ ID NO:118的VL区(033);

[0175] p) 包含序列SEQ ID NO:119的VH区和包含序列SEQ ID NO:120的VL区(160)

[0176] q) 包含序列SEQ ID NO:121的VH区和包含序列SEQ ID NO:122的VL区(166);

[0177] r) 包含序列SEQ ID NO:123的VH区和包含序列SEQ ID NO:124的VL区(152);和

[0178] s) 包含序列SEQ ID NO:125的VH区和包含序列SEQ ID NO:126的VL区(167)。

[0179] 在本发明的抗体的另一个额外的或另外的方面,抗体结合HER2,包含与本文所述的新的抗体的序列相似或相同的VH CDR3,VH区和/或VL区序列。

[0180] 在一个实施方案中,抗体包含具有选自如下的序列的VH CDR3区:

[0181] SEQ ID NO:148,如SEQ ID NO:48的序列(127),任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系序列;

[0182] SEQ ID NO:52(159),任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系序列;

[0183] SEQ ID NO:145,如SEQ ID NO:59的序列(098),任选地,其中VH区源自IgHV3-23-01种系序列;

[0184] SEQ ID NO:154,如SEQ ID NO:66的序列(153),任选地,其中VH区源自IgHV3-30-03-01种系序列;和

[0185] SEQ ID NO:151,如SEQ ID NO:73的序列(132),任选地,其中VH区源自IgHV1-18-01种系序列。

[0186] 在一个实施方案中,抗体包含如图1中所示的抗体105,100,125或162中一种的VH CDR3区,任选地,其中VH区源自IgHV3-23-1种系。

[0187] 在一个实施方案中,抗体包含如图1中所示的抗体033,160,166,152或167中一种的VH CDR3区,任选地,其中VH区源自IgHV3-30-3-01种系。

[0188] 在一个实施方案中,抗体包含选自如下的VH区

[0189] a) 包含SEQ ID NOs:146,147和148的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:43,44和45的CDR1,CDR2和CDR3序列(127)的VH区;任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系;

[0190] b) 包含SEQ ID NOs:149,51和52的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:50,51和52的CDR1,CDR2和CDR3序列(159)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系;

[0191] c) 包含分别地SEQ ID NOs:143,144和145的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:57,58和59的CDR1,CDR2和CDR3序列的VH区(098),任选地,其中VH区源自IgHV3-23-01种系;

[0192] d) 包含SEQ ID NOs:152,153和154的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:64,65和66的CDR1,CDR2和CDR3序列的VH区(153),任选地,其中VH区源自IgHV3-30-03-01种系;和

[0193] e) 包含分别地SEQ ID NOs:71,150和151的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:71,72和73的CDR1,CDR2和CDR3序列的VH区(132),任选地,其中VH区源自IgHV1-18-01种系。

[0194] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:47,AAS,和SEQ ID NO:48的CDR1,CDR2和CDR3序列(127);分别地,任选地,其中所述VL区源自IgKV1D-8-01种系。

[0195] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(b),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:54,AAS,和SEQ ID NO:55的CDR1,CDR2和CDR3序列(159);分别地,任选地,其中所述VL区源自IgKV1D-16-01种系。

[0196] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(c),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:159,AAS,和SEQ ID No:160的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID Nos:61,AAS,和SEQ ID NO:62的VL CDR1,CDR2和CDR3序列(098),任选地,其中VL区源自IgKV1D-16-01。

[0197] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(d),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:161,XAS(其中X=D或A,优选D),和SEQ ID NO:162的CDR1,CDR2和CDR3序列(153),如SEQ ID NO:68,DAS和69的VL CDR序列,任选地,其中所述VL区源自IgKV1D-16-01。

[0198] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述实施方案(e),所述VL区包含SEQ ID NO:75,DAS,和SEQ ID NO:76的CDR1,CDR2和CDR3序列(132),分别地,任选地,其中所述VL区源自IgKV3-11-01。

[0199] 在一个实施方案中,抗体含有包含分别地SEQ ID NOs:43,44和45的CDR1,CDR2和CDR3的VH区;以及包含分别地SEQ ID NOs:47,AAS,和SEQ ID NO:48的CDR1,CDR2和CDR3的VL区(127)。

[0200] 在一个实施方案中,抗体含有包含分别地SEQ ID NOs:50,51和52的CDR1,CDR2和CDR3的VH区;以及包含分别地SEQ ID NOs:54,AAS,和SEQ ID NO:55的CDR1,CDR2和CDR3的VL区(159)。

[0201] 在一个实施方案中,抗体含有包含分别地SEQ ID NOs:57,58和59的CDR1,CDR2和CDR3的VH区;以及包含分别地SEQ ID NOs:60,AAS,和SEQ ID NO:61的CDR1,CDR2和CDR3的VL区(098)。

[0202] 在一个实施方案中,抗体含有包含分别地SEQ ID NOs:64,65和66的CDR1,CDR2和CDR3的VH区;以及包含分别地SEQ ID NOs:68,DAS,和SEQ ID NO:69的CDR1,CDR2和CDR3的VL区(153)。

[0203] 在一个实施方案中,抗体含有包含分别地SEQ ID NOs:71,72和73的CDR1,CDR2和CDR3的VH区;以及包含分别地SEQ ID NOs:75,DAS,和SEQ ID NO:76的CDR1,CDR2和CDR3的VL区(132)。

[0204] 在单独的实施方案中,抗体包括:

[0205] a) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127);

[0206] b) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:53的VL区(159);

[0207] c) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);

[0208] d) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153);

[0209] e) 包含序列SEQ ID NO:70的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:74的VL区(132);

[0210] f) 包含序列SEQ ID NO:109的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:110的VL区(105);

[0211] g) 包含序列SEQ ID NO:111的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:112的VL区(100);

[0212] h) 包含序列SEQ ID NO:113的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:114的VL区(125);

[0213] i) 包含序列SEQ ID NO:115的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:116的VL区(162);

[0214] j) 包含序列SEQ ID NO:117的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:118的VL区(033);

[0215] k) 包含序列SEQ ID NO:119的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:120的VL区(160)

[0216] l) 包含序列SEQ ID NO:121的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:122的VL区(166);

[0217] m) 包含序列SEQ ID NO:123的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:124的VL区(152);

[0218] o) 包含序列SEQ ID NO:125的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:126的VL区(167);和/或

[0219] p) 所述抗体中任一种的变体,其中所述变体优选地具有最多1,2或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守的氨基酸取代,以及其中新的氨基酸是在图1或2中比对的序列的相同位置处,尤其是在对应的共有序列中通过“X”表示的位置处的氨基酸的取代。

[0220] 双特异性抗体

[0221] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包含(i) 第一抗体,包含本文定义的抗体的抗原结合区,例如,交叉阻断1,2或3的抗体的抗原结合区,或包含序列(005)的VH和VL区,和(ii) 第二抗体,包含与CD3结合的抗体的抗原结合区。

[0222] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包含(i) 第一抗体,包含本文定义的抗体的抗原结合区或包含序列(005)的VH和VL区,和(ii) 第二抗体,包含本文定义的抗体的抗原结合区或包含序列(005)的VH和VL区,其中所述第一抗原结合区与所述第二抗原结合区

相比结合不同的表位。

[0223] 在一个实施方案中,第一抗体包含VH区,所述VH区包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体如SEQ ID NO:4,25或66(169,025或153)的CDR3序列,或SEQ ID NO:168(005)的CDR3序列。

[0224] 在一个实施方案中,第一抗体包含VH区,所述VH区包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR1,CDR2和CDR3序列,如SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2,和CDR3序列(169),或SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2和CDR3序列(025),或SEQ ID NOs:64,65和66的CDR1,CDR2和CDR3序列(153),或SEQ ID NOs:166,167和168的CDR1,CDR2和CDR3序列(005)。

[0225] 在一个进一步或另外的实施方案中,第一抗体包含VH区,所述VH区包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR3序列,如SEQ ID NO:11(050)或SEQ ID NO:18(084)的交叉阻断1的抗体的CDR3序列;或SEQ ID NO:31(091),或SEQ ID NO:38(129)的交叉阻断2的抗体的CDR3序列,或SEQ ID NO:45(127),或SEQ ID NO:52(159),或SEQ ID NO:59(098),或SEQ ID NO:73(132)的交叉阻断3的抗体的CDR3序列。

[0226] 在一个实施方案中,第一抗体包含VH区,所述VH区包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR1,CDR2和CDR3序列,如SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2,和CDR3序列(169),或SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2和CDR3序列(025),或SEQ ID NOs:64,65和66的CDR1,CDR2和CDR3序列(153),或SEQ ID NOs:166,167和168的CDR1,CDR2和CDR3序列(005)。

[0227] 在一个实施方案中,第一抗体含有包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VH区和包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VL区。

[0228] 在一个进一步或另外的实施方案中,第一抗体包含VH区,所述VH区包含本文定义的交叉阻断1,2或3的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列,如SEQ ID NOs:9,10和11(050),或SEQ ID NOs:16,17和18(084)的交叉阻断1的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列;或SEQ ID NOs:30,163和31(091),或SEQ ID NOs:36,37和38(129)的交叉阻断2的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列,或SEQ ID NOs:43,44和45(127),或SEQ ID NOs:50,51和52(159),或SEQ ID NOs:57,58和59(098),或SEQ ID NOs:71,72和73(132)的交叉阻断3的抗体的CDR1,CDR2,和CDR3序列。

[0229] 在一个实施方案中,第一抗体包含选自如下的VH区和VL区:

[0230] a) 分别地,包含SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VH区;和包含SEQ ID:6,GAS和SEQ ID NO:7的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VL区(169);

[0231] b) 分别地,包含SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VH区;和包含SEQ ID:27,AAS和SEQ ID NO:28的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VL区(025);

[0232] c) 分别地,包含SEQ ID NOs:64,65和66的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VH区;和包含SEQ ID:68,DAS和SEQ ID NO:69的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VL区(153);和

[0233] d) 分别地,包含SEQ ID NOs:166,167和168的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VH区;和包含SEQ ID:169,GAS和SEQ ID NO:170的CDR1,CDR2,和CDR3序列的VL区(005)。

[0234] 在一个进一步或另外的实施方案中,第一抗体包含选自如下的VH区和VL区:

[0235] a) 包含SEQ ID NOs:9,127和11的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:9,10和11的CDR1,CDR2和CDR3序列(050)的VH区;任选地,其中VH区源自IGHV3-23-1种系;

[0236] b) 包含SEQ ID NOs:128,129和130的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:

16,17和18的CDR1,CDR2和CDR3序列(084)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV1-69-04种系;和

[0237] c) 包含SEQ ID NOs:137,138和139的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:30,163和31的CDR1,CDR2和CDR3序列(091)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV4-34-01种系;和

[0238] d) 包含分别地SEQ ID NOs:140,141和142的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:36,37和38的CDR1,CDR2和CDR3序列(129)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV3-30-01种系。

[0239] e) 包含SEQ ID NOs:146,147和148的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:43,44和45的CDR1,CDR2和CDR3序列(127)的VH区;任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系;

[0240] f) 包含SEQ ID NOs:149,51和52的CDR1,CDR2和CDR3序列如分别地SEQ ID NOS:50,51和52的CDR1,CDR2和CDR3序列(159)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV5-51-01种系;

[0241] g) 包含分别地SEQ ID NOs:143,144和145的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:57,58和59的CDR1,CDR2和CDR3序列(098)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV3-23-01种系;

[0242] h) 包含分别地SEQ ID NOs:71,150和151的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOs:71,72和73的CDR1,CDR2和CDR3序列(132)的VH区,任选地,其中VH区源自IgHV1-18-01种系。

[0243] 在一个实施方案中,第二抗体是前面对于第一抗体所述的实施方案中的一种,但是其中,所述第二抗体与所述第一抗体相比结合不同的表位。

[0244] 在一个实施方案中,第二抗体是CD3抗体。在一个实施方案中,CD3抗体可以是含有包含序列SEQ ID NO:171的VH区(YTH12.5)和包含序列SEQ ID NO:172的VL区(YTH12.5)的抗体。CD3抗体的另一个例子是含有包含序列SEQ ID NO:173的VH区(huCLB-T3/4)和包含序列SEQ ID NO:174的VL区(huCLB-T3/4)的抗体。

[0245] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,所述抗体包含(005),(025),(153)或(169)的VH和VL区,所述抗体包含IgG1野生型Fc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu,和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,所述抗体包含(005),(025),(153)或(169)的VH和VL区,所述抗体包含IgG1野生型Fc区,其中CH3区包含409位的Arg。实施例公开了特定的实施方案。

[0246] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列(005),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0247] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(025),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列(005),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0248] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一

抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(025),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列(153),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0249] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(025),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0250] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列(153),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:164的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列(005),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0251] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列(153),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,其中CH3区包含350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg。

[0252] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列(153),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg,或297位的Gln,或409位的Arg和297位的Gln;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列(YTH12.5),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有297位的Gln,或405位的Leu,或297位的Gln和405位的Leu。

[0253] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有409位的Arg;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:171的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:172的氨基酸序列(YTH12.5),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1,κFc区,所述IgG1,κFc区具有297位的Gln,或405位的Leu,或297位的Gln和405位的Leu。

[0254] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:67的氨基

酸序列(153),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1, $\kappa$ Fc区,所述IgG1, $\kappa$ Fc区具有409位的Arg,或297位的Gln,或409位的Arg和297位的Gln;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列(huCLB-T3/4),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1, $\kappa$ Fc区,所述IgG1, $\kappa$ Fc区具有297位的Gln,或405位的Leu,或297位的Gln和405位的Leu。

[0255] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体,包括(i)具有Fc区和VH和VL序列的第一抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列(169),任选地,其中所述第一抗体包含IgG1, $\kappa$ Fc区,所述IgG1, $\kappa$ Fc区具有409位的Arg;和(ii)具有Fc区和VH和VL序列的第二抗体,其中所述VH区包含SEQ ID NO:173的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:174的氨基酸序列(huCLB-T3/4),任选地,其中所述第二抗体包含IgG1, $\kappa$ Fc区,所述IgG1, $\kappa$ Fc区具有297位的Gln,或405位的Leu,或297位的Gln和405位的Leu。

[0256] CD3抗体是具有包含序列SEQ ID NO:171的VH区(VH YTH12.5)和包含序列SEQ ID NO:172的VL区(VL YTH12.5)的抗体。另一个例子是具有包含序列SEQ ID NO:173的VH区(VH huCLB-T3/4)和包含序列SEQ ID NO:174的VL区(VL huCLB-T3/4)的CD3抗体。

[0257] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体可以选自:IgG1-005-ITL $\times$ IgG1-169-K409R,IgG1-025-ITL $\times$ IgG1-005-K409R,IgG1-025-ITL $\times$ IgG1-153-K409R,IgG1-025-ITL $\times$ IgG1-169-K409R,IgG1-153-ITL $\times$ IgG1-005-K409R;和IgG1-153-ITL $\times$ IgG1-169-K409R,其中IgG1-005-ITL意味着具有350位的Ile,370位的Thr和405位的Leu的005IgG1, $\kappa$ ,IgG1-005-K409R意味着具有409位的Arg的005IgG1, $\kappa$ ,IgG1-025-ITL意味着具有350位的Ile,370位的Thr,和405位的Leu的025IgG1, $\kappa$ ,IgG1-153-ITL意味着具有包含350位的Ile,370位的Thr和405位的Leu的153 IgG1, $\kappa$ ,IgG1-153-K409R意味着具有409位的Arg的153IgG1, $\kappa$ ,IgG1-169-K409R意味着具有409位的Arg的169IgG1, $\kappa$ ,并且其中的粗体数字是指本文所述的具有包含表1所示的序列的VH和VL区的抗体,对于实施例21中的005;即SEQ ID NOs:164和165。

[0258] 在一个实施方案中,双特异性抗体可以选自:IgG1-HER2-153-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-F405L,IgG1-HER2-153-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L,IgG1-HER2-153-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L,IgG1-HER2-153-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L,IgG1-HER2-153-N297Q-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-F405L,IgG1-HER2-153-N297Q-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L,IgG1-HER2-153-N297Q-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L,IgG1-HER2-153-N297Q-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L,IgG1-HER2-169-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L,IgG1-HER2-169-K409R $\times$ IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L,IgG1-HER2-169-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-F405L和IgG1-HER2-169-K409R $\times$ IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L。

[0259] 组1、2和3抗体和双特异性抗体的功能特性

[0260] 在本发明的抗体另一个方面,抗体与本文所述的新的组1,2或3抗体中的一种或多种结合相同的HER2表位,优选地,当如实施例14中所述测定时;以及其进一步特征在于,如实施例12,13,15,16,17,18和19中所述测定的一种或多种特性。

[0261] 在一个实施方案中,当如实施例12中所述测定时,HER2抗体在与A431细胞结合中

具有比曲妥珠单抗更低的 $EC_{50}$ 值(半数最大有效浓度),优选 $EC_{50}$ 值低于 $0.80\mu\text{g}/\text{ml}$ , $0.50\mu\text{g}/\text{ml}$ ,或 $0.30\mu\text{g}/\text{ml}$ ,优选地,所述HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

- [0262] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);
- [0263] b) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);
- [0264] c) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);
- [0265] d) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);
- [0266] e) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127);
- [0267] f) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID NO:53的VL区(159);
- [0268] g) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);
- [0269] h) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153);和
- [0270] i) 包含序列SEQ ID NO:70的VH区和包含序列SEQ ID NO:74的VL区(132)。

[0271] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例13中所述测定时,抗-HER2抗体特异性结合HER2阳性的猕猴上皮细胞,优选地,所述抗-HER2抗体与包含VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位,所述VH和VL区选自抗体169,050,084,025,091,129,127,159,098,153和132中任一种的VH和VL区。

[0272] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例15中所述测定时,抗-HER2抗体有效地诱导ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性),优选地实现至少30%,更优选至少40%的特异性的 $^{51}\text{Cr}$ -释放,优选地,所述抗-HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

- [0273] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);
- [0274] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050);
- [0275] c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);
- [0276] d) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);
- [0277] e) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);
- [0278] f) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);和
- [0279] g) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153)。

[0280] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例16中所述测定时,HER2抗体特异性地结合表达HER2的AU565细胞,但是与F5和C1中任一种相比,所述HER2抗体对细胞的配体非依赖性增殖的促进要弱,优选地,所述HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

- [0281] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);
- [0282] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050);
- [0283] c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);
- [0284] d) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);
- [0285] e) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);
- [0286] f) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);
- [0287] g) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127);



[0288] h) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID NO:53的VL区(159);

[0289] i) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);

[0290] j) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153);和

[0291] k) 包含序列SEQ ID NO:70的VH区和包含序列SEQ ID NO:74的VL区(132)。

[0292] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例16中所述测定时,HER2抗体特异性地结合表达HER2的AU565细胞并抑制细胞的配体非依赖性增殖,优选地至少20%,更优选至少25%地抑制增殖,优选地,所述HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

[0293] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);和

[0294] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050)。

[0295] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例17中所述测定时,HER2抗体特异性地结合表达HER2的AU565细胞但不明显影响或不促进细胞的配体诱导的增殖,优选地,不超过15%,更优选不超过25%地抑制增殖,所述HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

[0296] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);

[0297] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO:12的VL区(050);

[0298] c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);和

[0299] d) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098)。

[0300] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例17中所述测定时,HER2抗体特异性地结合表达HER2的MCF-7细胞并抑制细胞的配体诱导的增殖,例如,它可以完全抑制配体诱导的效果,或50%,例如60%或70%或80%地抑制总的增殖,所述HER2抗体与包含选自如下的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位:

[0301] a) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);

[0302] b) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);

[0303] c) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);和

[0304] d) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和,优选地,包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153)。

[0305] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例18中所述测定时,当直接或间接缀合于治疗部分如假单胞菌外毒素A的截短形式时,抗体在杀死AU565细胞,A431细胞,或AU565和A431细胞中比曲妥珠单抗更有效。

[0306] 在一个实施方案中,当如实施例18中所述测定时,缀合的抗体在杀死AU565细胞和/或A431细胞中具有小于70ng/ml,小于50ng/ml,或小于30ng/ml的 $EC_{50}$ 值,所述缀合的抗体与包含抗体的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位,所述抗体选自169,091,050,084,098,05,153,129,132,127和159;优选地选自抗体153,129,098,091和025。

[0307] 在一个实施方案中,当如实施例18中所述测定时,缀合的抗体具有或导致比曲妥珠单抗和帕妥珠单抗更高百分比地杀死AU565细胞,优选杀死至少49%,更优选至少60%的AU565细胞,所述缀合的抗体与包含抗体的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位,所述抗体选自169,091,050,084,098,025,153,129,132,127和159;优选地选自抗体153,132,127,129,159和025。

[0308] 在一个优选的实施方案中,缀合的抗体与含有包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID NO:53的VL区的参照抗体(159)结合相同的表位。

[0309] 在一个实施方案中,当如实施例18中所述测定时,缀合的抗体具有比曲妥珠单抗和帕妥珠单抗更高百分比地杀死AU565细胞,优选杀死至少50%,更优选至少70%,所述缀合的抗体与包含抗体的VH和VL区的至少一种参照抗体结合相同的表位,所述抗体选自025,084,091,098,129和153;优选地选自抗体025,091,098,129和153。

[0310] 在一个优选的实施方案中,缀合的抗体与含有包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区的参照抗体(098)结合相同的表位。

[0311] 在一个额外或另外的实施方案中,抗体被表达HER2的肿瘤细胞如AU565细胞内化,其程度高于曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,优选是内化的曲妥珠单抗的量的超过两倍或三倍,优选当根据实施例18测定时,所述抗体与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位:

[0312] a) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127);

[0313] b) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID NO:53的VL区(159);

[0314] c) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);

[0315] d) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153);和

[0316] e) 包含序列SEQ ID NO:70的VH区和包含序列SEQ ID NO:74的VL区(132)。

[0317] 优选地,抗体与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位

[0318] a) 包含序列SEQ ID NO:46的VH区和包含序列SEQ ID NO:49的VL区(127)和

[0319] b) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098)。

[0320] 在一个进一步的实施方案中,抗体结合HER2的结构域II或IV,优选地,其中所述抗体不显著促进表达HER2的细胞的增殖,并且比曲妥珠单抗或帕妥珠单抗更有效地内化,或以更高的程度内化进表达HER2的肿瘤细胞,优选地当如实施例中,例如,分别地实施例16和19中所述测定时。

[0321] 在进一步的实施方案中,当如实施例22中所述测定时,抗体比曲妥珠单抗更多地增强HER2下调,例如抗体以超过30%,如超过40%或超过50%地增强HER2下调,优选地,其中所述抗体与本发明的交叉阻断组3的抗体结合相同的表位,例如与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位的抗体:

[0322] a) 包含序列SEQ ID NO:56的VH区和包含序列SEQ ID NO:60的VL区(098);

[0323] b) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153)。

[0324] 在另一个或另外的实施方案中,当如实施例29中所述测定时,抗体比曲妥珠单抗更多地在体内降低肿瘤生长并改善生存,优选地,其中所述抗体与本发明的交叉阻断组1或交叉阻断组2的抗体结合相同的表位,例如与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位的抗体:

[0325] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5的VL区(169);

[0326] b) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19的VL区(084);和

[0327] c) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091)。

[0328] 在另一个或另外的实施方案中,当如实施例30中所述测定时,抗体比曲妥珠单抗更多地降低肿瘤生长并改善体内生存,优选地,其中所述抗体与本发明的交叉阻断组2或交

又阻断组3的抗体结合相同的表位,例如与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位的抗体:

[0329] a) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);

[0330] b) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091);

[0331] c) 包含序列SEQ ID NO:35的VH区和包含序列SEQ ID NO:39的VL区(129);和

[0332] d) 包含序列SEQ ID NO:63的VH区和包含序列SEQ ID NO:67的VL区(153)。

[0333] 更具体地,其中所述抗体与包含选自如下的VH和VL区的抗体结合相同的表位:

[0334] a) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26的VL区(025);和

[0335] b) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:32的VL区(091)。

[0336] 在一个实施方案中,抗体是双特异性抗体。

[0337] 在进一步的实施方案中,抗体是双特异性抗体,当如实施例22中所述测定时,其增强HER2下调,尤其比它们的单特异性对应物更多地增强,例如所述抗体多于20%如多于30%或多于40%地增强HER2下调,优选地,其中所述抗体与选自如下的双特异性抗体结合相同的表位:IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R,IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R;和IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R。

[0338] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例24中所述测定时,双特异性抗体特异性结合表达HER2的AU565细胞并抑制细胞的配体诱导的增殖,所述双特异性抗体与至少一种选自如下的双特异性抗体结合相同的表位:IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R,IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R,IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R;和IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R。尤其地,双特异性抗体比它们的单特异性对应物更多地抑制AU565细胞的增殖,所述双特异性抗体选自IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R和IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R。

[0339] 在一个额外或另外的实施方案中,双特异性抗体是HER2×CD3双特异性抗体,如实施例25中所述,其诱导AU565的T细胞介导的细胞毒性,所述双特异性抗体与选自如下的至少一种双特异性抗体结合相同的表位:Duo huCLB-Q/153-Q,Duo huCLB-Q/B12-Q,Duo YTH12.5/153-Q和Duo YTH12.5/B12-Q(Duo表示双特异性抗体)。

[0340] 抗体形式

[0341] 本发明提供了HER2抗体,所述HER2抗体有效结合并内化进表达HER2的肿瘤细胞,通常没有显著促进细胞的配体非依赖性增殖。根据用于特定用途的期望的功能特性,特定抗体可以选自本发明中提供的抗体组和/或可以如下面所述调整它们的形式以改变这些特性。

[0342] 本发明抗体可以是任何同种型。同种型的选择典型地遵从期望的效应物功能,例如ADCC诱导。示例性的同种型是IgG1,IgG2,IgG3,和IgG4。可以使用人轻链恒定区, $\kappa$ 或 $\lambda$ ,的任一个。如果期望,可以通过已知方法转换本发明的HER2抗体的类型。例如,可以将初始为IgM的本发明的抗体类型转换为本发明的IgG抗体。进一步地,可以使用类型转换技术将一种IgG亚类转化为另一种,例如从IgG1至IgG2。因此,可以通过同种型转换为例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgD,IgA,IgE,或IgM抗体而改变本发明的抗体的效应物功能而用于各种治疗用途。在一个实施方案中,本发明的抗体是IgG1抗体,例如IgG1, $\kappa$ 。

[0343] 在进一步的实施方案中,将本发明的抗体糖工程化以减少岩藻糖并因此增强ADCC,例如,通过如US2009317869中所述或如van Berkel等.(2010)Biotechnol.Bioeng.105:350中所述在抗体生产期间将化合物加入培养基,或者通过,例如,如Yamane-Ohnuki等(2004)Biotechnol.Bioeng 87:614中所述使用FUT8敲除细胞。或者可以使用Umaña等.(1999)Nature Biotech 17:176中所述的方法优化ADCC。

[0344] 在进一步的实施方案中,已经将本发明的抗体工程化以增强补体活化,例如,如Natsume等.(2009)Cancer Sci.100:2411中所述。

[0345] 在一个实施方案中,本发明的抗体是全长抗体,优选IgG1抗体,尤其是IgG1, $\kappa$ 抗体。在另一个实施方案中,本发明的抗体是抗体片段或者单链抗体。

[0346] 可以例如用常规技术通过片段化获得抗体片段,以本文所述的完整抗体的相同的方式基于用途筛选片段。例如,可以通过用胃蛋白酶(pepsin)处理抗体产生F(ab')<sub>2</sub>片段。可以用还原剂如二硫苏糖醇处理产生的F(ab')<sub>2</sub>片段以还原二硫键而产生Fab'片段。可以通过用木瓜蛋白酶处理抗体而获得Fab片段。还可以通过硫醚键或二硫键结合Fab'片段来产生F(ab')<sub>2</sub>片段。还可以通过在重组细胞中表达编码这种片段的核酸来产生抗体片段(见例如Evans等,J.Immunol.Meth.184,123-38(1995))。例如,编码F(ab')<sub>2</sub>片段的一部分的嵌合基因可以包括:编码H链的C<sub>H</sub>1结构域和铰链区的DNA序列,随后是用于产生这种截短的抗体片段分子的翻译终止密码子。

[0347] 如上所解释的,在一个实施方案中,本发明的HER2抗体是二价抗体,即能够结合两种抗原或相同抗原上的两种表位的抗体。

[0348] 在另一个实施方案中,本发明的HER2抗体是单价抗体。

[0349] 在一个实施方案中,本发明的抗体是Fab片段或单臂的抗体,如US20080063641(Genentech)中所述的,或其他单价抗体,例如如W02007048037(Amgen)中所述的。

[0350] 在一个优选的实施方案中,单价抗体具有如W02007059782(Genmab)(通过引用并入本文)所述的具有铰链区缺失的结构。因此,在一个实施方案中,抗体是单价抗体,其中通过如下方法构建所述HER2抗体,该方法包括:

[0351] i) 提供编码所述单价抗体的轻链的核酸构建体,所述构建体包含编码选择的抗原特异性HER2抗体的VL区的核苷酸序列和编码Ig的恒定CL区的核苷酸序列,其中所述编码选择的抗原特异性抗体的VL区的核苷酸序列和所述编码Ig的CL区的核苷酸序列可操作地连接在一起,并且其中,在IgG1亚型的情况下,编码CL区的核苷酸序列已经修饰,使得CL区不包含任何如下氨基酸:在多克隆人IgG存在的情况下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸能够与包含相同的CL区的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价键;

[0352] ii) 提供编码所述单价抗体的重链的核酸构建体,所述构建体包含编码选择的抗原特异性抗体的VH区的核苷酸序列和编码人Ig的恒定CH区的核苷酸序列,其中编码CH区的核苷酸序列已经修饰,使得对应于铰链区的区域,以及如Ig亚型所要求的,CH区的其他区域,如CH3区,不包含任何如下氨基酸残基:在多克隆人IgG存在的情况下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸残基参与和包含相同的人Ig的CH区的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或者共价的或稳定的非共价的重链间键,其中所述编码选择的抗原特异性抗体的VH区的核苷酸序列和所述编码所述Ig的CH区的核苷酸序列可操作地连接在一起;

[0353] iii) 提供用于产生所述单价抗体的细胞表达系统;

[0354] iv) 通过在 (iii) 的细胞表达系统的细胞中共表达 (i) 和 (ii) 的核酸构建体而产生所述单价抗体。

[0355] 类似地, 在一个实施方案中, HER2 抗体是单价抗体, 其包含

[0356] (i) 如本文所述的本发明的抗体的可变区或所述区的抗原结合部分, 和

[0357] (ii) 免疫球蛋白的 C<sub>H</sub> 区或其包含 C<sub>H</sub>2 和 C<sub>H</sub>3 区的片段, 其中所述 C<sub>H</sub> 区或其片段已经修饰, 使得对应于铰链区的区域, 以及, 如果免疫球蛋白不是 IgG4 亚型, C<sub>H</sub> 区的其他区域, 如 C<sub>H</sub>3 区, 不包含任何如下氨基酸残基: 在多克隆人 IgG 存在的情况下, 所述氨基酸残基能够与相同的 C<sub>H</sub> 区形成二硫键或者与相同的 C<sub>H</sub> 区形成其他共价的或稳定的非共价重链间键。

[0358] 在其进一步的实施方案中, 单价 HER2 抗体的重链已经修饰, 使得整个铰链缺失。

[0359] 在另一个进一步的实施方案中, 上述步骤 ii) 中所指的免疫球蛋白是 IgG4 亚型的。

[0360] 在另一个进一步的实施方案中, 所述单价抗体是 IgG4 亚型的, 但 C<sub>H</sub>3 区已经修饰, 使得产生下列氨基酸取代中的一种或多种:

[0361] CH3 突变的编号

	KABAT*	EU 索引 G4*	突变
	E378	E357	E357A 或 E357T 或 E357V 或 E357I
	S387	S364	S364R 或 S364K
	T389	T366	T366A 或 T366R 或 T366K 或 T366N
[0362]			L368A 或 L368V 或 L368E 或 L368G 或 L368S 或
	L391	L368	L368T
	D427	D399	D399A 或 D399T 或 D399S
			F405A 或 F405L 或 F405T 或 F405D 或 F405R 或
	F436	F405	F405Q 或 F405K 或 F405Y
	Y438	Y407	Y407A 或 Y407E 或 Y407Q 或 Y407K 或 Y407F
[0363]	F436 和 Y438	F405 和 Y407	(F405T 和 Y407E) 或 (F405D 和 Y407E)
			(D399S 和 Y407Q) 或 (D399S 和 Y407K) 或 (D399S
	D427 和 Y438	D399 和 Y407	和 Y407E)

[0364] \*KABAT 表示根据 Kabat 的氨基酸编号 (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). EU 索引表示根据如 Kabat (同上) 所述的 EU 索引的氨基酸编号。

[0365] 在另一个进一步的实施方案中, 所述单价抗体的序列已经修饰, 使得它不包含任何用于 N-连接的糖基化的受体位点。

[0366] 本发明的 HER2 抗体还包括单链抗体。单链抗体是其中重链和轻链 Fv 区被连接的肽。在一个实施方案中, 本发明提供了单链 Fv (scFv), 其中在单肽链中用柔性肽接头 (典型地约 10、12、15 或更多个氨基酸残基) 将本发明的 HER2 抗体的 Fv 中的重链和轻链连接起来。下列文献中描述了生产这种抗体的方法: 例如, US 4,946,778, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg 和 Moore eds. Springer-

Verlag, New York, Pp. 269-315 (1994), Bird等, Science 242, 423-426 (1988), Huston等, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 和 McCafferty等, Nature 348, 552-554 (1990)。单链抗体可以是单价的, 如果仅使用单一的 $V_H$ 和 $V_L$ , 可以是二价的, 如果使用两个 $V_H$ 和 $V_L$ , 或者是多价的, 如果使用多于两个 $V_H$ 和 $V_L$ 。

[0367] 在一个实施方案中, 本发明HER2抗体是效应物功能缺陷抗体。在一个实施方案中, 效应物功能缺陷的HER2抗体是人稳定化的IgG4抗体, 其已经修饰以防止Fab-臂交换 (van der Neut Kolfshoten等, (2007) Science 317 (5844): 1554-7)。合适的人稳定化的IgG4抗体的例子是如下抗体, 其中用赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸, 优选赖氨酸 (如 W02006033386 (Kirin) 中所述) 取代人IgG4重链恒定区409位的精氨酸 (如Kabat等在EU索引中表示), 和/或其中铰链区已经修饰以包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0368] 在一个实施方案中, 稳定化的IgG4 HER2抗体是包含重链和轻链的IgG4抗体, 其中所述重链包含人IgG4恒定区, 所述恒定区在对应于409的位置处具有选自Lys, Ala, Thr, Met和Leu的残基, 和/或在对应于405的位置处具有选自Ala, Val, Gly, Ile和Leu的残基, 并且其中所述抗体任选地包含一个或多个进一步的取代、缺失和/或插入, 但在铰链区不包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。优选地, 所述抗体在对应于409的位置处包含Lys或Ala残基, 或者抗体的CH3区已经被人IgG1、人IgG2或人IgG3的CH3区所替代。还可参见W02008145142 (Genmab)。

[0369] 在甚至进一步的实施方案中, 稳定化的IgG4 HER2抗体是包含重链和轻链的IgG4抗体, 其中所述重链包括人IgG4恒定区, 所述人IgG4恒定区在对应于409的位置处具有选自Lys, Ala, Thr, Met和Leu的残基, 和/或在对应于405的位置处具有选自Ala, Val, Gly, Ile和Leu的残基, 并且其中所述抗体任选地包含一个或多个进一步的取代、缺失和/或插入, 并且其中所述抗体在铰链区包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。优选地, 所述抗体在对应于409的位置处包含Lys或Ala残基, 或者抗体的CH3区已经被人IgG1、人IgG2或人IgG3的CH3区所替代。

[0370] 在进一步的实施方案中, 效应物功能缺陷的HER2抗体是非IgG4型例如IgG1, IgG2或IgG3的抗体, 其已经突变, 使得介导效应物功能如ADCC的能力已经降低或者甚至去除。例如Dall'Acqua WF等, J Immunol. 177 (2): 1129-1138 (2006) 和Hezareh M, J Virol.; 75 (24): 12161-12168 (2001) 中已经描述了这种突变。

#### [0371] 缀合物

[0372] 在进一步的实施方案中, 本发明提供了与治疗部分如细胞毒素、化疗药物、细胞因子、免疫抑制剂或放射性同位素连接或缀合的HER2抗体或HER2双特异性抗体。这种缀合物在本文被称作“免疫缀合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物称作免疫毒素 (immunotoxins)。

[0373] 细胞毒素或细胞毒剂包括任何对细胞有害 (例如杀死细胞) 的试剂。用于形成本发明免疫缀合物的合适治疗剂包括紫杉醇 (taxol)、细胞松弛素B (cytochalasin B)、短杆菌肽D (gramicidin D)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、丝裂霉素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、鬼臼噻吩苷 (teniposide)、长春新碱 (vincristine)、长春花碱 (vinblastine)、秋水仙碱 (colchicin)、多柔比星 (doxorubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、二羟蒽醌二酮 (dihydroxy anthracin dione)、美登素I (maytansine) 或其类似物或衍生物、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神霉素 (mithramycin)、放线菌素D (actinomycin D)、1-去氢睾酮 (1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素

(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin);卡里奇霉素(calicheamicin)或其类似物或衍生物;抗代谢物(如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine)、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨),烷化剂(如氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氮芥(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物,如卡铂;以及duocarmycin A、duocarmycin SA、CC-1065(又名雷查霉素(rachelmycin)),或CC-1065的类似物或衍生物)、抗生素(如放线菌素D(以前称作放线菌素)、博来霉素、柔红霉素(以前称作道诺霉素)、阿霉素、伊达比星、光神霉素(mithramycin)、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素(AMC))、抗有丝分裂剂(例如,微管蛋白抑制剂)如monomethyl auristatin E、monomethyl auristatin F或多拉司他汀10的其他类似物或衍生物;白喉毒素和相关分子(如白喉A链及其活性片段和杂合分子);蓖麻毒蛋白毒素(例如蓖麻毒蛋白A或脱糖基化蓖麻毒蛋白A链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素(SLT-I,SLT-II,SLT-IIIV)、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、alorin、皂苷、蒴藋素、gelatin、相思豆毒蛋白A链、蒴藋素A链、 $\alpha$ -帚曲霉素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(Phytolacca Americana)蛋白(PAPI,PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、mitogellin、局限曲霉素(restrictocin)、酚毒素和依诺霉素毒素。其他合适的缀合分子包括抗菌/裂解肽,如CLIP、蛙皮素2、蜂毒肽、天蚕抗菌肽和P18;核糖核酸酶(RNase)、DNase I、葡萄球菌内毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素和假单胞菌内毒素。见例如Pastan等,Cell 47,641(1986)和Goldenberg,Calif.A Cancer Journal for Clinicians 44,43(1994)。可以与如本文其他部分所述的本发明的HER2抗体组合施用的治疗剂,如抗癌细胞因子或趋化因子,也是可用于与本发明的抗体缀合的治疗部分的候选。

[0374] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体包括缀合的核酸或核酸相关分子。在一个这种实施方案中,缀合的核酸是细胞毒性核糖核酸酶、反义核酸、抑制性RNA分子(例如,siRNA分子)或免疫刺激性核酸(例如,免疫刺激性的包含CpG基序的DNA分子)。在另一个实施方案中,本发明的HER2抗体缀合于适配子或核酶。

[0375] 在一个实施方案中,提供了包含一个或多个放射性标记的氨基酸的HER2抗体。放射性标记的HER2抗体可以用于诊断和治疗目的(与放射性标记的分子缀合是另一种可能的特征)。用于多肽的标记的非限制性例子包括 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bs}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 和 $^{227}\text{Th}$ 。

[0376] 在一个实施方案中,抗体与放射性同位素或包含放射性同位素螯合物的缀合。例如,抗体可以与螯合剂接头,例如DOTA,DTPA或tiuxetan缀合,这允许抗体与放射性同位素形成复合物。抗体也可以或另外包含或缀合于一个或多个放射性标记的氨基酸,或其他放射性标记的分子。放射性标记的CD74 Ab可以用于诊断和治疗目的。放射性同位素的非限制性例子包括 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bs}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 和 $^{227}\text{Th}$ 。

[0377] 还可以通过与聚合物共价缀合而化学修饰HER2抗体,以便例如增加它们的循环半衰期。在例如US 4,766,106、US 4,179,337、US 4,495,285和US 4,609,546中例举了示例性

聚合物和将它们与肽连接的方法。其他聚合物包括聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇 (PEG) (例如分子量为约1,000-约40,000如约2,000-约20,000的PEG)。

[0378] 可以使用任何本领域已知的用于将HER2抗体与缀合的分子如上文所述的那些相缀合的方法,包括在下列文献中描述的方法:Hunter等,Nature 144,945 (1962),David等,Biochemistry 13,1014 (1974),Pain等,J.Immunol.Meth.40,219 (1981) 和Nygren,J.Histochem.and Cytochem.30,407 (1982)。可以通过将其他部分与HER2抗体或其片段(例如HER2抗体H或L链)的N-末端侧或C-末端侧化学地缀合而产生这种抗体(见例如Osamu Kanemitsu编辑的Antibody Engineering Handbook,由Chijin Shokan出版(1994))。还可以通过在合适的内部残基或糖处缀合而产生这种缀合的抗体衍生物。

[0379] 可以直接或间接地将该试剂与本发明的HER2抗体偶联。第二种试剂的间接偶联的一个例子是通过间隔部分与抗体中的半胱氨酸或赖氨酸残基偶联。在一个实施方案中,将HER2抗体与前药分子缀合,所述前药分子在体内可以通过间隔子或接头被活化为治疗性药物。施用后,通过肿瘤细胞相关的酶或其他肿瘤特异性的条件裂解间隔子或接头,由此形成活性药物。Syntarga BV等在W002083180,W02004043493,W02007018431,W02007089149,和W02009017394中描述了这种前药技术和接头的例子。美国专利号6,989,452 (Medarex) 中也可以发现合适的抗体-前药技术和duocarmycin类似物。

[0380] 在一个实施方案中,将本发明的HER2抗体与螯合剂接头(例如tiuxetan)连接,这允许将抗体缀合于放射性同位素。

#### [0381] 双特异性抗体

[0382] 在进一步的方面,本发明涉及双特异性分子,所述双特异性分子包含来自本文上面所述的本发明的HER2抗体的第一抗原结合位点和具有不同的结合特异性(如对于人效应物细胞、人Fc受体、T细胞受体、B细胞受体的结合特异性,或者对于HER2的非重叠表位的结合特异性)的第二抗原结合位点,即其中例如当如实施例14中所述测试时,所述第一和第二抗原结合位点对于和HER2的结合不彼此交叉阻断的双特异性抗体。

[0383] 本发明的示例性的双特异性抗体分子包括(i) 缀合在一起的两种抗体,一种具有对HER2的特异性,另一种具有对第二种目标的特异性,(ii) 单一抗体,其具有对HER2特异性的一条链或臂以及对第二种分子特异性的第二条链或臂,(iii) 单链抗体,其具有对HER2和第二种分子的特异性,例如,经由通过一个额外的肽接头串联连接的两个scFv;(iv) 双可变结构域抗体(DVD-Ig),其中每条轻链和重链包含通过短肽连接串联的两个可变结构域(Wu等,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule,In:Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg (2010));(v) 化学连接的双特异性(Fab')<sub>2</sub>片段;(vi) Tandab,这是两种单链双抗体的融合体,其产生四价的双特异性抗体,其具有两个针对每一种目标抗原的结合位点;(vii) flexibody,这是scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(viii) 基于蛋白激酶A中“二聚化和锚结构域”的所谓的“锚和锁(dock and lock)”分子,当应用于Fabs时,其可以产生由两个相同的Fab片段和与之连接的不同的Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白;(ix) 所谓的蝎子分子(Scorpion molecule),其包含,例如,融合于人Fc区的两个末端的两个scFv;和(x) 双抗体。在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是通过控制的Fab臂交换获得的双抗体、交叉体或双特异性抗体,如本发明中描述的那些。



[0384] 可用于制备双特异性抗体的平台的例子包括但不限于BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、Fcab和Mab<sup>2</sup> (F-star)、Fc-工程化的IgG1 (Xencor) 或DuoBody (基于Fab臂交换, Genmab, 本申请)。

[0385] 不同类型的双特异性抗体的例子包括但不限于

[0386] • 不对称的IgG-样分子, 其中分子的一侧包含至少一种抗体的Fab区或部分Fab区, 分子的另一侧包含至少一种其他抗体的Fab区或部分Fab区; 在这种类型中, Fc区中也可以存在不对称, 并且可用于分子的两个部分的特定连接;

[0387] • 对称的IgG样分子, 其中分子的两侧每个包含至少两种不同的抗体的Fab区或部分Fab区;

[0388] • IgG融合分子, 其中全长IgG抗体与额外的Fab区或部分Fab区融合;

[0389] • Fc融合分子, 其中单链Fv分子或稳定化的双抗体与Fc  $\gamma$  区或其部分融合;

[0390] • Fab融合分子, 其中不同的Fab片段融合在一起;

[0391] • 基于ScFv和双抗体的分子, 其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体彼此融合或与另一种蛋白或载体分子融合。

[0392] 不对称的IgG样分子的例子包括但不限于Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), the Knobs-into-Holes (Genentech), CrossMAbs (Roche) 和the electrostatically-matched (Amgen), the LUZ-Y (Genentech), the Strand Exchange Engineered Domain body (EMD Serono), the Biclonic (Merus) 和the DuoBody (Genmab A/S)。

[0393] 对称的IgG样分子的例子包括但不限于Dual Targeting (DT) -Ig (GSK/Domantis), Two-in-one Antibody (Genentech), Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb<sup>2</sup> (F-Star) 和CovX-body (CovX/Pfizer)。

[0394] IgG融合分子的例子包括但不限于Dual Variable Domain (DVD) -Ig (Abbott), IgG-like Bispecific (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) 和BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) 以及TvAb (Roche)。

[0395] Fc融合分子的例子包括但不限于ScFv/Fc Fusions (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) 和Dual (ScFv)<sub>2</sub>-Fab (National Research Center for Antibody Medicine-China)。

[0396] V类双特异性抗体的例子包括但不限于F(ab)<sub>2</sub> (Medarex/AMGEN), Dual-Action或Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) 和Fab-Fv (UCB-Celltech)。

[0397] 基于ScFv和双抗体的分子的例子包括但不限于Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet9, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogiCs), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) 和COMBODY (Epigen Biotech)。

[0398] 在一个实施方案中, 第二种分子是癌抗原/肿瘤相关抗原, 如癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原 (PSA)、RAGE (肾抗原)、 $\alpha$ -甲胎蛋白、CAMEL (黑色素瘤上的CTL-识别的抗原)、

CT抗原(如MAGE-B5,-B6,-C2,-C3,和D;MAGE12;CT10;NY-ESO1,SSX2,GAGE,BAGE,MAGE,和SAGE)、粘蛋白抗原(例如MUC1,粘蛋白-CA125等)、神经节苷脂抗原、酪氨酸酶、gp75、c-Met、C-myc、Mart1、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7、Ep-CAM或癌症相关的整合素如 $\alpha 5\beta 3$ 整合素。在另一个实施方案中,第二种分子是T细胞和/或NK细胞抗原,如CD3或CD16。在另一个实施方案中,第二种分子是血管生成因子或其他癌症相关生长因子,如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子受体、血管生成素或这些中任一种的受体,尤其地,与癌症进展相关的受体(例如HER受体中的另一种;HER1、HER3或HER4)。在一个实施方案中,第二抗原结合位点结合HER2上与本发明的抗体结合的位点不同的,优选非阻断的位点。例如,第二种分子可以源自,或交叉阻断曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、F5或C1的HER2结合。

[0399] 制备双特异性抗体的方法包括W0 2008119353 (Genmab) 中描述的并且van der Neut-Kolfschoten等. (Science.2007 Sep 14;317 (5844):1554-7) 报道的那些,可以例如如本发明的实施例20中所述进行。

[0400] 核酸序列、载体和宿主细胞

[0401] 在进一步的方面,本发明涉及编码本发明的抗体的重链和轻链的核酸序列如DNA序列。

[0402] 在一个实施方案中,核酸序列编码选自如下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,5,8,12,15,19,22,26,29,32,35,39,42,46,49,53,56,60,,63,67,70,74,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125和126。

[0403] 在另一个特定实施方案中,核酸序列编码选自如下的VH氨基酸序列:SEQ ID NO:1,8,15,22,29,35,42,49,56,63,70,77,79,81,83,85,87,89,91,93,95,97,99,101,103,105,107,109,111,113,115,117,119,121,123和125。

[0404] 在另一个特定实施方案中,核酸序列编码选自如下的VL氨基酸序列:SEQ ID NO:5,12,19,26,32,39,46,53,60,67,74,78,80,82,84,86,88,90,92,94,96,98,100,102,104,106,108,110,112,114,116,118,120,122,124和126。

[0405] 在甚至进一步的方面,本发明涉及编码本发明的抗体的表达载体,或一组表达载体。抗体的重链和轻链可以由相同载体或由不同载体编码。

[0406] 这种表达载体可用于重组产生本发明的抗体。

[0407] 在一个实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的氨基酸序列中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:1,5,8,12,15,19,22,26,29,32,35,39,42,46,49,53,56,60,,63,67,70,74,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125和126。

[0408] 在另一个特定实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的VH氨基酸序列中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:1,8,15,22,29,35,42,49,56,63,70,77,79,81,83,85,87,89,91,93,95,97,99,101,103,105,107,109,111,113,115,117,119,121,123和125。

[0409] 在另一个特定实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的VL氨基酸序列

中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:5,12,19,26,32,39,46,53,60,67,74,78,80,82,84,86,88,90,92,94,96,98,100,102,104,106,108,110,112,114,116,118,120,122,124和126。

[0410] 在进一步的实施方案中,表达载体进一步包含编码抗体,例如人抗体的轻链恒定区、重链恒定区、或轻链和重链恒定区二者的核苷酸序列。

[0411] 本发明上下文中的表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体、合成的核酸载体(包含一组合适的表达控制元件的核酸序列)。这种载体的例子包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、源自质粒和噬菌体DNA组合的载体和病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方案中,编码HER2抗体的核酸被包含在裸DNA或RNA载体内,包括例如线性表达元件(例如在Sykes和Johnston,Nat Biotech 17,35559(1997)中所述的),紧凑的核酸载体(例如在US 6,077,835和/或WO 00/70087中所述的),质粒载体如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119,“侏儒(midge)”尺寸最小化核酸载体(例如在Schakowski等,Mol Ther 3,793-800(2001)中所述的),或者作为沉淀的(precipitated)核酸载体构建体,例如CaP04-沉淀构建体(如在例如WO 00/46147,Benvenisty和Reshef,PNAS USA 83,9551-55(1986),Wigler等,Cell 14,725(1978),以及Coraro和Pearson,Somatic Cell Genetics 7,603(1981)中所述的)。这种核酸载体及其使用是本领域公知的(见例如US 5,589,466和US 5,973,972)。

[0412] 实施例2和3中也描述了本发明的抗体的示例性的表达载体。

[0413] 在一个实施方案中,载体适合用于在细菌细胞中表达HER2抗体。这种载体的例子包括表达载体,如BlueScript(Stratagene),pIN载体(Van Heeke&Schuster,J Biol Chem 264,5503-5509(1989),pET载体(Novagen,Madison WI)等)。

[0414] 表达载体还可以是,或者可选择地是适合用于在酵母系统中表达的载体。可以采用任何适合用于在酵母系统中表达的载体。适合的载体包括,例如,包含组成型或诱导型启动子如 $\alpha$ 因子、醇氧化酶和PGH的载体(综述见:F.Ausubel等,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley InterScience New York(1987),和Grant等,Methods in Enzymol 153,516-544(1987))。

[0415] 表达载体还可以是,或者可选择地是适合用于在哺乳动物细胞中表达的载体,例如包含作为可选择标记的谷氨酰胺合成酶的载体,如Bebbington(1992)Biotechnology (NY) 10:169-175中所述的载体。

[0416] 核酸和/或载体还可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,其可以将多肽,如新生的多肽链,靶向至周质空间(periplasmic space)或者细胞培养基内。这种序列是本领域中已知的,并包括分泌前导或信号肽。

[0417] 在本发明的表达载体中,编码HER2抗体的核酸可以包含任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件或者与任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件相关。这种元件的例子包括强表达启动子(例如人CMV IE启动子/增强子以及RSV,SV40,SL33,MMTV,和HIV LTR启动子),有效的聚(A)终止序列,大肠杆菌中质粒产物的复制起点,作为选择标记的抗生素抗性基因,和/或便利的克隆位点(例如多接头)。核酸也可以包含诱导型启动子而不是组成型启动子,如CMV IE。

[0418] 在一个实施方案中,编码HER2抗体的表达载体可以通过病毒载体置于或者递送至

宿主细胞或宿主动物中。

[0419] 在甚至进一步的方面,本发明涉及重组的真核或原核宿主细胞,例如转染瘤,其产生如本文所定义的本发明的抗体。宿主细胞的例子包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,如CHO或HEK细胞。例如,在一个实施方案中,本发明提供了包含核酸的细胞,所述核酸稳定整合到细胞基因组内并且包含用于表达本发明的HER2抗体的编码序列。在另一个实施方案中,本发明提供了细胞,所述细胞包含非整合的核酸,如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件,所述非整合的核酸包含用于表达本发明的HER2抗体的编码序列。

[0420] 在进一步的方面,本发明涉及产生如本文所定义的本发明的抗体的杂交瘤。在甚至进一步的方面,本发明涉及转基因非人动物或植物,其包括编码人重链和人轻链的核酸,其中所述动物或植物产生本发明的抗体。

[0421] 在进一步的方面,本发明涉及用于产生本发明的HER2抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0422] a) 培养如本文上面所述的本发明的杂交瘤或宿主细胞,和

[0423] b) 从培养基纯化本发明的抗体。

[0424] 组合物

[0425] 在进一步的主要方面,本发明涉及药物组合物,其包含:

[0426] -如本文所定义的HER2抗体,和

[0427] -药学上可接受的载体。

[0428] 本发明的药物组合物可以包含本发明的抗体或者本发明的不同抗体的组合。

[0429] 可以根据常规技术如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些配制药组合物。本发明的药物组合物可以,例如,包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去垢剂(例如非离子去垢剂,如吐温-20或吐温-80)、稳定剂(例如糖类或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂、和/或适合用于包含在药物组合物中的其他材料。

[0430] 药学上可接受的载体包括任何和全部合适的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和吸收延迟剂,以及与本发明的化合物生理上相容的类似物。本发明的药物组合物中可以采用的合适的水性和非水性载体的例子包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、及其合适的混合物、植物油、羧甲基纤维素胶体溶液、黄蓍胶和可注射的有机酯,如油酸乙酯,和/或各种缓冲剂。药学上可接受的载体包括用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌水溶液或分散体和无菌粉末。可以通过使用包衣材料,如卵磷脂,在分散体情况下通过保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂而保持合适的流动性。

[0431] 本发明的药物组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁羟甲苯、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0432] 本发明的药物组合物在组合物中还可以包括等渗剂,如糖,多元醇,如甘露醇、山梨醇、甘油或氯化钠。

[0433] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种适合用于选择的给药途径的佐剂,如

防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂,其可以提高药物组合物的保存期限或有效性。可以用保护化合物免于快速释放的载体制备本发明的化合物,所述载体如控释剂型,包括植入体、经皮贴片和微胶囊化的递送系统。这种载体可以包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的、生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸,单独地或者与蜡一起,或者其他本领域公知的材料。用于制备这种制剂的方法是本领域技术人员通常已知的。

[0434] 可以通过将所需量的活性化合物与根据需要的组分(例如,如上面所列举的)的一种或组合并入适合的溶剂中,随后通过无菌微量过滤而制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物并入含有基础分散介质和所需的其它成分(例如来自上面列举的那些)的无菌媒介中而制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的例子是真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述方法从先前无菌过滤的其溶液产生活性成分加上任何额外的期望组分的粉末。

[0435] 药物组合物中活性组分的实际剂量水平可以变化,以获得在对患者没有毒性的情况下对于特定患者、组合物或施用模式有效地实现期望的治疗应答的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括采用的本发明的特定组合物或其酰胺的活性,施用途径,施用时间,采用的特定化合物的排泄速度,治疗的持续时间,与采用的特定组合物联合使用的其它药物、化合物和/或材料,治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康状况和以前的医疗史,以及医学领域公知的类似因素。

[0436] 可以通过任何合适的途径和模式施用药物组合物。在一个实施方案中,肠胃外施用本发明的药物组合物。如本文所使用的,术语“肠胃外施用”是指除肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,包括表皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、腱内、经气管、皮下、表皮下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、颅内、胸内、硬脑膜外和胸骨内注射和输注。

[0437] 在一个实施方案中,通过静脉内或皮下注射或输注施用药物组合物。

#### [0438] 用途

[0439] 在进一步的主要方面,本发明涉及本发明的HER2抗体,其用作药物。

[0440] 本发明的HER2抗体可以用于多种目的。具体而言,本发明的抗体可用于治疗各种形式的癌症,包括转移性癌症和难治性癌症。

[0441] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于治疗乳腺癌,包括原发性、转移性和难治性乳腺癌。

[0442] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于治疗选自如下的癌症形式,前列腺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠直肠癌,食道癌,头部和颈部的鳞状细胞癌,子宫颈癌,胰腺癌,睾丸癌,恶性黑色素瘤和软组织癌(如滑膜肉瘤)。

[0443] 类似地,本发明涉及用于杀死表达HER2的肿瘤细胞的方法,包括将有效量的本发明的抗体如抗体药物缀合物(ADC)施用于需要其的个体。

[0444] 在一个实施方案中,所述肿瘤细胞参与如下的癌症形式:乳腺癌,前列腺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠直肠癌,食道癌,头部和颈部的鳞状细胞癌,子宫颈癌,胰腺癌,睾丸癌,恶性黑色素瘤和软组织癌(例如滑膜肉瘤)。

[0445] 在一个实施方案中,所述肿瘤细胞是共表达HER2和至少一个EGFR家族的其他成

员,优选EGFR、HER3、或EGFR和HER3两者的肿瘤细胞,是参与乳腺癌,结肠直肠癌,子宫内膜/子宫颈癌,肺癌,恶性黑色素瘤,卵巢癌,胰腺癌,前列腺癌,睾丸癌,软组织肿瘤(例如,滑膜肉瘤)或膀胱癌的肿瘤细胞。

[0446] 在一个方面,本发明涉及用于在受试者中治疗癌症的方法,包括选择患有包含共表达HER2和EGFR和/或HER3的肿瘤细胞的癌症的受试者,以及将任选地以缀合细胞毒性剂或药物的抗体的形式的本发明的抗体施用于受试者。在一个实施方案中,受试者患有选自如下的癌症:乳腺癌,结肠直肠癌,子宫内膜/子宫颈癌,肺癌,恶性黑色素瘤,卵巢癌,胰腺癌,前列腺癌,睾丸癌,软组织肿瘤(例如,滑膜肉瘤)或膀胱癌。

[0447] 而且,本发明涉及结合人HER2的单克隆抗体在制备用于治疗癌症(如上面提到的特定癌症适应症中的一种)的药物中的用途。

[0448] 本发明进一步涉及单克隆抗体,其用于治疗癌症,如上面提到的癌症适应症中的一种。

[0449] 在本发明的治疗方法的进一步的实施方案中,通过确定肿瘤负担或相关肿瘤细胞上的HER2表达水平而在治疗期间,例如,在预定的时间点监测治疗的效力。

[0450] 对上述治疗方法和用途中的剂量方案进行调节,以提供最佳的期望的应答(例如治疗性应答)。例如,可以施用单次大剂量(bolus),可以随时间施用若干分开的剂量,或者可以根据治疗情形的迫切情况如指示成比例地减少或增加剂量。胃肠外组合物可以配制为单位剂量形式,以便于施用并保持剂量均匀性。

[0451] HER2抗体的有效剂量和给药方案取决于待治疗的疾病或状况,并可以由本领域技术人员确定。本发明的化合物的治疗有效量的示例性的非限制性范围是约0.1-100mg/kg,如约0.1-50mg/kg,例如约0.1-20mg/kg,如约0.1-10mg/kg,例如约0.5,约0.3,约1,约3,约5,或约8mg/kg。

[0452] 具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定并处方有效量的所需药物组合物。例如,医师或兽医可以从低于实现期望的治疗效果所需水平的水平开始药物组合物中采用的HER2抗体的剂量,并逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。通常,本发明组合物的合适的每日剂量是化合物有效产生治疗效果的最低剂量的量。施用可以,例如,是肠胃外的,如静脉内的、肌内的或皮下的。在一个实施方案中,可以通过以10-500mg/m<sup>2</sup>,如200-400mg/m<sup>2</sup>的每周剂量输注而施用HER2抗体。这种施用可以重复进行,例如1-8次,如3-5次。可以通过在2-24小时,如2-12小时的期间连续输注而进行施用。在一个实施方案中,可以通过在长时间期间,如超过24小时,缓慢连续输注而施用HER2抗体以降低毒副作用。

[0453] 在一个实施方案中,可以以250mg-2000mg,如300mg,500mg,700mg,1000mg,1500mg或2000mg的每周剂量施用HER2抗体,当每周一次给予时,最多达8次,如4-6次。必要时,这种方案可以,例如在6个月或12个月后,重复1次或多次。可以通过例如取出生物样品测定施用后血液中本发明的化合物的量并使用针对本发明的HER2抗体的抗原结合区的抗-独特型抗体来确定或调整剂量。

[0454] 双特异性抗体的有效剂量和给药方案取决于待治疗的疾病或状况,并且可以由本领域技术人员确定。本发明的双特异性抗体的治疗有效量的示例性的非限制性范围是约0.1-100mg/kg,如约0.1-50mg/kg,例如约0.1-20mg/kg,如约0.1-10mg/kg,例如约0.5,约0.3,约1,约3,约5,或约8mg/kg。

[0455] 在一个实施方案中,可以通过维持疗法施用HER2抗体,例如在6个月或更长的期间每周1次。

[0456] 还可以预防性地施用HER2抗体,以降低发生癌症的风险、延迟癌症进程中事件发生的开始和/或在癌症减轻过程中降低复发的风险。

[0457] 还可以在组合疗法中施用HER2抗体,即与其他与待治疗疾病或状况相关的治疗剂组合。因此,在一个实施方案中,包含抗体的药物用于和一种或多种进一步的治疗剂如细胞毒性剂、化疗剂或抗血管生成剂组合。

[0458] 这种组合的施用可以同时、分别或顺次进行。对于同时施用,可以合适地作为一种组合物或者作为分开的组合物施用药物。因此,本发明还提供了用于治疗上述涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括施用与一种或多种如下所述的额外治疗剂组合的本发明的HER2抗体。

[0459] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明的HER2抗体和任选地至少一种额外的治疗剂或结合与所述HER2抗体不同的表位的抗体施用于需要其的受试者。

[0460] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明HER2抗体和至少一种额外的化疗剂施用于需要其的受试者。

[0461] 在一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自抗代谢物,例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、decarbazine、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨。

[0462] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自烷基化试剂,如氮芥、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氯芥(BSNU)、环己亚硝脲(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链唑霉素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物,如卡铂。

[0463] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自抗有丝分裂剂,如紫杉烷类(taxanes),例如多西紫杉醇(docetaxel)和紫杉醇,和长春花生物碱,例如长春地辛、长春新碱、长春花碱和长春瑞滨。

[0464] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自拓扑异构酶抑制剂,如托泊替康或伊立替康,或抑制细胞生长的药物,如依托泊苷和替尼泊苷。

[0465] 在另一实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自生长因子抑制剂,如ErbB1(EGFR)的抑制剂(如EGFR抗体,例如zalutumumab,西妥昔单抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗,或其他EGFR抑制剂,如吉非替尼或埃罗替尼),另一种ErbB2的抑制剂(HER2/neu)(如HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)或EGFR和HER2两者的抑制剂,如拉帕替尼)。

[0466] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自酪氨酸激酶抑制剂,如伊马替尼(Glivec, Gleevec STI571)或拉帕替尼,PTK787/ZK222584。

[0467] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明的HER2抗体和至少一种血管生成、新血管化和/或其他血管化的抑制剂施用于需要其的受试者。

[0468] 这种血管生成抑制剂的例子是尿激酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂(如马立马司他、新伐司他、BAY 129566、AG 3340、BMS275291和类似药物)、内皮细胞迁移和增殖的抑

制剂(如TNP470、角鲨胺、2-甲氧雌二醇、考布他汀类(combretastatins)、内皮他丁、血管抑素、青霉胺、SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) 和类似药物)、血管生成生长因子的拮抗剂(如ZD6474、SU6668、针对血管生成剂和/或它们的受体(如VEGF(例如贝伐单抗), bFGF, 和血管生成素1)的抗体、沙利度胺、沙利度胺类似物(如CC5013)、Sugen 5416、SU5402、抗血管生成核酶(如angiozyme)、干扰素 $\alpha$ (如干扰素 $\alpha$ 2a)、苏拉明和类似药物)、VEGF-R激酶抑制剂和其他抗血管生成酪氨酸激酶抑制剂(如SU011248)、内皮特异性整合素/生存信号传递抑制剂(如vitaxin和类似药物)、铜拮抗剂/螯合剂(如四硫钼酸盐、卡托普利和类似药物)、羧胺三唑(carboxyamido-triazole, CAI)、ABT627、CM101、白介素12(IL-12)、IM862、PNU145156E以及抑制血管生成的核苷酸分子(如反义-VEGF-cDNA、编码血管抑素的cDNA、编码p53的cDNA和编码缺陷型VEGF受体2的cDNA)。

[0469] 这种血管生成、新血管化和/或其他血管化的抑制剂的其他例子是抗血管生成肝素衍生物(如肝素酶III (heparinase III))、替莫唑胺、NK4、巨噬细胞迁移抑制因子、环氧合酶-2抑制剂、缺氧诱导因子1的抑制剂、抗血管生成的大豆异黄酮、奥替普拉、烟曲霉素及其类似物、生长抑素类似物、戊聚糖多硫酸酯、替可加兰钠、达肝素、肿瘤抑素(tumstatin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、NM-3、combrestatin、血管能抑素(canstatin)、阿伐他汀(avastatin)、针对其他相关目标的抗体,如抗- $\alpha$ -v/ $\beta$ -3整合素和抗-kininostatin抗体。

[0470] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌免疫原,如癌抗原/肿瘤相关抗原(例如上皮细胞粘附分子(EpCAM/TACSTD1)、粘蛋白1(MUC1)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤相关的糖蛋白72(TAG72)、gp100、Melan-A、MART1、KDR、RCAS1、MDA7、癌症相关的病毒疫苗(例如人乳头瘤病毒疫苗)、或肿瘤来源的热休克蛋白。

[0471] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌细胞因子、趋化因子或其组合。合适的细胞因子和生长因子的例子包括IFN $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN $\alpha$ (例如, IFN $\alpha$ 2b)、IFN $\beta$ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF $\alpha$ 。合适的趋化因子可以包括Glu-Leu-Arg (ELR) -阴性趋化因子,如来自人CXC和C-C趋化因子家族的IP10、MCP3、MIG和SDF-1 $\alpha$ 。合适的细胞因子包括细胞因子衍生物、细胞因子变体、细胞因子片段和细胞因子融合蛋白。

[0472] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是细胞周期控制/细胞凋亡调节子(或“调节剂”)。细胞周期控制/细胞凋亡调节子可以包括针对并调节细胞周期控制/凋亡调节子的分子,例如(i) cdc-25(如NSC 663284), (ii) 过度刺激细胞周期的细胞周期蛋白依赖的激酶(如夫拉平度(flavopiridol) (L868275, HMR1275), 7-羟基星孢素(7-hydroxystaurosporine) (UCN-01, KW2401) 和roscovitine (R-roscovitine, CYC202)), 和(iii) 端粒酶调节子(如BIBR1532, SOT-095, GRN163和在例如US 6,440,735和US 6,713,055中所述的组合物)。干扰细胞凋亡途径的分子的非限制性例子包括TNF相关的细胞凋亡诱导配体(TRAIL)/细胞凋亡-2配体(Apo-2L)、激活TRAIL受体的抗体、IFN和反义Bcl-2(anti-sense Bcl-2)。

[0473] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是激素调节剂,如用于抗雄激素和抗雌激素疗法的药物。这种激素调节剂的例子是他莫昔芬、碘昔



芬、氟维司群、屈洛昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、己烯雌酚、乙炔雌二醇/炔雌醇、抗雄激素 (antiandrogene) (如氟他米特 (flutaminde)/氟他胺 (eulexin))、孕酮 (如己酸羟孕酮、甲羟孕酮/普维拉、甲地孕酮醋酸酯/梅格施)、肾上腺皮质类固醇 (如氢化可的松、泼尼松)、黄体化激素释放激素 (及其类似物或其他LHRH激动剂如布舍瑞林和戈舍瑞林)、芳香酶抑制剂 (如阿那曲唑/瑞宁得、氨鲁米特/cytraden、依西美坦) 或激素抑制剂 (例如奥曲肽/善得定)。

[0474] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗无反应性剂 (anti-anergic agent),这种ascompounds是阻断CTLA-4活性的分子,例如 ipilimumab。

[0475] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌核酸或抗癌抑制性RNA分子。

[0476] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是分化诱导剂、视黄酸类似物 (如全反式视黄酸、13-顺视黄酸和类似药物)、维生素D类似物 (如西奥骨化醇和类似药物)、如下物质的抑制剂:ErbB3、ErbB4、IGF-IR、胰岛素受体、PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON (如抗-RON抗体)、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7和类似药物。

[0477] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是雌莫司汀和表柔比星。

[0478] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是HSP90抑制剂,如17-烯丙基氨基格尔德霉素,针对肿瘤抗原如PSA、CA125、KSA、整合素如整合素B1的抗体或VCAM抑制剂。

[0479] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是钙调磷酸酶 (calcineurin) 抑制剂 (如伐司朴达、PSC 833和其他MDR-1或p-糖蛋白抑制剂)、TOR抑制剂 (如西罗莫司、依维莫司和雷帕霉素),和“淋巴细胞归巢 (lymphocyte homing)”机制的抑制剂 (如FTY720),和对细胞信号传递具有影响的试剂如粘附分子抑制剂 (如抗-LFA)。

[0480] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于和一种或多种其他的治疗性抗体组合使用,如ofatumumab、zanolimumab、daratumumab、兰尼单抗、尼妥珠单抗、帕尼单抗、hu806、达利珠单抗 (Zenapax)、巴利昔单抗 (Simulect)、英夫利昔单抗 (Remicade)、阿达木单抗 (Humira)、那他珠单抗 (Tysabri)、奥马珠单抗 (Xolair)、依法利珠单抗 (Raptiva) 和/或利妥昔单抗。

[0481] 在另一个实施方案中,组合使用两种或更多种不同的本文所述的本发明的抗体用于治疗疾病。特别感兴趣的组合包括两种或更多种非阻断性抗体。这种组合疗法可以导致结合增加数量的抗体分子/每个细胞,这可以提供增加的效力,例如通过激活补体介导的裂解。

[0482] 除上以外,本发明的组合疗法的其他实施方案包括如下:

[0483] 对于乳腺癌的治疗,HER2抗体或其治疗性缀合物,与氨甲喋呤、紫杉醇、阿霉素、卡铂、环磷酰胺、柔红霉素、表阿霉素、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、伊沙匹隆、密吐霉素、米托蒽醌、长春瑞滨、多西他赛、噻替派、长春新碱、卡培他滨、EGFR抗体 (例如, zalutumumab、西妥昔单

抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗)或其他EGFR抑制剂(如吉非替尼或埃罗替尼)、另一种HER2抗体或缀合物(如,例如,曲妥珠单抗,曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)、EGFR和HER2两者的抑制剂(如拉帕替尼)组合,和/或与HER3抑制剂组合。

[0484] 对于非小细胞肺癌的治疗,HER2抗体与EGFR抑制剂,如EGFR抗体,例如 zalutumumab、西妥昔单抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗或其他EGFR抑制剂(如吉非替尼或埃罗替尼)组合,或与另一种HER2药物(如HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)组合或与EGFR和HER2两者的抑制剂如拉帕替尼组合,或与HER3抑制剂组合。

[0485] 对于结肠直肠癌的治疗,HER2抗体与选自如下的一种或多种化合物组合:吉西他滨、贝伐单抗、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、奥沙利铂、伊立替康、5-FU/LV、卡培他滨、UFT、EGFR靶向剂如西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗(zalutumumab);VEGF抑制剂、或酪氨酸激酶抑制剂如舒尼替尼。

[0486] 对于前列腺癌的治疗,HER2抗体与选自如下的一种或多种化合物组合:激素/抗激素治疗剂;如抗雄激素、黄体化激素释放激素(LHRH)激动剂,和化疗剂如紫杉烷类、米托蒽醌、雌莫司汀、5FU、长春花碱和伊沙匹隆。

#### [0487] 放射疗法-手术

[0488] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的HER2抗体如本发明的HER2抗体和放射疗法施用于需要其的受试者。

[0489] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括将治疗有效量的HER2抗体如本发明的HER2抗体和放射疗法施用于需要其的受试者。

[0490] 在一个实施方案中,本发明提供了HER2抗体,如本发明的HER2抗体在制备用于和放射疗法组合施用以治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0491] 放射疗法可以包括放射或者提供了将放疗药物施用于患者的相关施用方法。放射源可以在待治疗患者的体外或者体内(放射治疗可以例如是外部射束放射疗法(EBRT)或近程放射治疗(BT)的形式)。可用于实施这些方法的放射活性元素包括例如镭、铯-137、铱-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131和铟-111。

[0492] 在进一步的实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括与手术组合将治疗有效量的HER2抗体,如本发明的HER2抗体施用于需要其的受试者。

#### [0493] 诊断用途

[0494] 本发明的HER2抗体还可以用于诊断目的。因此,在进一步的方面,本发明涉及包含如本文定义的HER2抗体的诊断组合物。

[0495] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体可以用于通过检测HER2的水平或在细胞膜表面上包含HER2的细胞的水平而在体内或体外诊断疾病,在该疾病中激活的表达HER2的细胞在疾病发生中发挥活跃作用。可以通过例如在允许抗体和HER2之间形成复合物的条件下将待测样品,任选地与对照样品一起,与HER2抗体接触而实现这一点。

[0496] 因此,在进一步的方面,本发明涉及用于检测样品中HER2抗原或表达HER2的细胞的存在的方法,包括:

[0497] -在允许抗体与HER2之间形成复合物的条件下,将样品与本发明的HER2抗体接触;和

[0498] -分析是否形成了复合物。

[0499] 在一个实施方案中,该方法在体外实施。

[0500] 更具体地,本发明提供了用于鉴别、诊断侵袭性细胞和组织,以及本发明的HER2抗体针对的其他细胞的方法,以及用于监测治疗性处理的进展、治疗后状态、发生癌症的风险、癌症进程等的方法。

[0501] 用于这种技术中使用的HER2抗体和/或二级抗体的合适的标记是本领域中公知的。

[0502] 在进一步的方面,本发明涉及用于检测样品中HER2抗原或表达HER2的细胞的存在试剂盒,包括

[0503] -本发明的HER2抗体或本发明的双特异性分子;和

[0504] -试剂盒的使用说明书。

[0505] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,包括容器,所述容器包含HER2抗体和一种或多种用于检测HER2抗体与HER2结合的试剂。试剂可以包括例如荧光标签、酶标签、或其他可检测的标签。试剂还可以包括用于酶反应的二级或三级抗体或试剂,其中酶反应产生可以被可视化的产物。

[0506] 抗-独特型抗体

[0507] 在进一步的方面,本发明涉及抗-独特型抗体,其与如本文所述的本发明的HER2抗体结合。

[0508] 抗-独特型(Id)抗体是如下抗体,其识别一般与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇。可以通过用要制备抗-Id的mAb免疫动物而制备Id抗体,其中所述动物的物种和遗传类型与HER2 mAb的来源的物种和遗传类型相同。被免疫的动物通常可以识别免疫的抗体的独特型决定簇,并且通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id抗体)而对其应答。

[0509] 还可以使用抗-Id抗体作为“免疫原”而在另一个动物内诱导免疫应答,产生所谓的抗-抗-Id抗体。抗-抗-Id可能和诱导抗-Id的最初mAb在表位上相同。因此,通过使用针对mAb的独特型决定簇的抗体,可能鉴别出表达具有相同特异性的抗体的其他克隆。

[0510] 本发明进一步通过如下实施例进行举例说明,但它们不应视为对本发明范围的进一步限制。

[0511] 本发明进一步通过如下实施例进行举例说明,但它们不应视为对本发明范围的进一步限制。

[0512] 实施例

[0513] 实施例1-HER2和HER2变体的表达构建体

[0514] 产生用于表达全长HER2(1255aa,Swissprot P04626)、HER2的胞外结构域(ECD)(Her2-ECDHis,具有C-末端的His6标签的aa 1-653)、天然存在的HER2剪接变体(Her2-delex16,产生外显子16缺失并缺乏aa633-648)和HER2受体的截短形式(HER2-粗短的(Her2-stumpy),aa648-1256)的完全密码子优化的构建体。该构建体包含用于克隆的合适的限制性位点和最优的Kozak序列(Kozak,M.,Gene1999;234(2):187-208.)。将构建体克隆进哺乳动物表达载体pEE13.4(Lonza Biologics;Bebbington,C.R.,等,Biotechnology(NY)1992;10(2):169-75)中,并完全测序以验证构建体的正确性。

[0515] 实施例2-帕妥珠单抗C1和F5的表达构建体

[0516] 产生了用于在HEK细胞中表达IgG1抗体帕妥珠单抗、C1和F5的重链(HC)和轻链(LC)的完全密码子优化构建体。这些构建体编码的可变区与在美国专利号6,949,245对于帕妥珠单抗重链和轻链以及美国专利号7,244,826对于C1和F5重链和轻链描述的那些是相同的。对于C1和F5,使用分别包含人IgG1重链(同种异型f)、人 $\kappa$ 轻链或人 $\lambda$ 轻链的完全密码子优化的恒定区的哺乳动物表达载体p33G1f和p33K或p33L(pcDNA3.3(Invitrogen))。对于帕妥珠单抗,使用分别包含人IgG1重链(同种异型f)和人 $\kappa$ 轻链的完全密码子优化的恒定区的哺乳动物表达载体pG1f(pEE12.4(Lonza Biologics)和pKappa(pEE6.4(Lonza Biologics))。

[0517] 使用,例如,美国专利号7,632,924中所述的重链和轻链序列,可以以相同的方式产生曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)。

[0518] 实施例3-在HEK-293或CHO细胞中瞬时表达

[0519] 从Invitrogen获得Freestyle<sup>™</sup> 293-F(一种适应悬浮生长和化学确定的Freestyle培养基的HEK-293亚克隆,(HEK-293F))细胞,并根据制造商的说明书使用293fectin(Invitrogen)以适当的质粒DNA进行转染。在抗体表达的情况下,共表达适当的重链和轻链表达载体。

[0520] 使用Freestyle MAX转染试剂(Invitrogen)将pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16和pEE13.4Her2-stumpy瞬时转染进Freestyle<sup>™</sup> CHO-S(Invitrogen)细胞系。通过如下文所述的FACS分析,检测HER2和Her2-delex16的表达。

[0521] 实施例4-NS0中稳定的多克隆合并物的表达

[0522] 通过核转染(nucleofection,Amaxa)将pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16和pEE13.4Her2-stumpy稳定转染进NS0细胞。基于整合的谷氨酰胺合成酶筛选标记在谷氨酰胺依赖性生长选择后,建立稳定转染的细胞的合并物(Barnes,L.M.,等.,Cytotechnology2000;32(2):109-123)。

[0523] 实施例5-His标签的HER2的纯化

[0524] 在HEK-293F细胞中表达Her2ECDHis。Her2ECDHis中的His-标签帮助固定化金属亲和色谱的纯化,因为His-标签的蛋白与树脂珠粒强烈结合,而培养上清液中存在的其他蛋白则不会强烈结合。

[0525] 在该过程中,使固定在色谱树脂上的螯合剂带上Co<sup>2+</sup>阳离子。将包含Her2ECDHis的上清液与树脂以分批模式(即溶液)孵育。孵育之后,从上清液中回收珠粒,并填充进柱子中。清洗柱子以除去弱结合的蛋白。然后用包含咪唑的缓冲液洗脱强结合的Her2ECDHis蛋白,其中咪唑与His竞争结合Co<sup>2+</sup>。通过在脱盐柱上进行缓冲液交换而从蛋白中除去洗脱液。

[0526] 实施例6-转基因小鼠的免疫操作

[0527] 从下列免疫获得抗体001,019,021,025,027,032,033,035,036,049,050,051,054,055,084,091,094,098,100,105,123和124:通过以腹膜内(IP)的Her2ECDHis瞬时转染的5×10<sup>6</sup>NS0细胞和在尾部皮下(SC)20μg偶联于半抗原钥孔血蓝蛋白(KLH)的Her2ECDHis交替进行(间隔14天)而免疫三只雌性HCo12小鼠,一只雄性和两只雌性HCo12-Balb/C小鼠,一只雄性HCo17小鼠和一只雄性HCo20小鼠(Medarex,San José,CA,USA)。每只小鼠最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,

MI,USA) 中完成使用细胞的第一次免疫。对于所有其他免疫,IP注射PBS中的细胞,而用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,USA) SC注射KLH偶联的Her2ECD。

[0528] 从下列免疫获得抗体125,127,129,132,152,153和159:通过以IP Her2delex16 IP瞬时转染的 $5 \times 10^6$  NS0细胞和在尾部SC 20 $\mu$ g偶联于半抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的Her2ECDHis蛋白交替进行(间隔14天)而免疫一只雄性和两只雌性HCo12-Balb/C小鼠,一只雌性HCo20小鼠和一只雌性HCo12小鼠(Medarex)。每只小鼠最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,USA)中完成使用细胞的第一次免疫。对于所有其他免疫,IP注射PBS中的细胞,而用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,USA) SC注射KLH偶联的Her2ECD。

[0529] 从下列免疫获得抗体143,160,161,162,166和169:通过以20 $\mu$ g偶联于半抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的Her2ECDHis蛋白IP和在尾部SC交替进行(间隔14天)而免疫一只雌性和一只雄性HCo12小鼠,一只雌性HCo12-Balb/C小鼠,一只雌性HCo17小鼠和一只雄性HCo20小鼠(Medarex)。每只小鼠最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,USA)中IP完成第一次免疫。使用不完全弗氏佐剂(IFA;Difco Laboratories,Detroit,MI,USA)注射其他免疫。

[0530] 在抗原特异性FMAT筛选测定(如实施例7中所述)中具有针对TC1014-Her2、TC1014-Her2delex16或TC1014-Her2stumpy的至少两个连续的滴度的小鼠被认为是阳性的并且融合。

[0531] 实施例7-同种抗原特异性筛选测定

[0532] 使用荧光微体积测定技术(Fluorometric Micro volume Assay Technology, FMAT;Applied Biosystems,Foster City,CA,USA)通过同种抗原特异性筛选测定(四分式)测定免疫的小鼠的血清或HuMab(人单克隆抗体)杂交瘤或转染瘤培养物上清液中HER2抗体的存在。为此,使用4个基于细胞的测定的组合。测定与TC1014-Her2(瞬时表达HER2受体的HEK-293F细胞;如上所述产生)、TC1014-Her2delex16(瞬时表达Her2-delex的胞外结构域(HER2受体的16个氨基酸缺失的突变体;如上所述产生)的HEK-293F细胞和TC1014-Her2stumpy(瞬时表达HER2受体的胞外粗短结构域的HEK-293F细胞;如上所述产生)以及HEK293野生型细胞(不表达HER2的阴性对照细胞)的结合。将样品添加至细胞以允许与HER2结合。随后,用荧光缀合物(山羊抗-人IgG-Cy5;Jackson ImmunoResearch)检测HuMab的结合。使用TH1014-帕妥珠单抗(在HEK-293F细胞中产生的)作为阳性对照,使用HuMab-小鼠合并的血清和HuMab-KLH作为阴性对照。使用Applied Biosystems 8200细胞检测系统(8200 CDS)扫描样品,并使用‘计数 $\times$ 荧光(counts  $\times$  fluorescence)’作为读出。当计数高于50并且计数 $\times$ 荧光比阴性对照至少3倍更高时,样品被规定为阳性的。

[0533] 实施例8-HuMab杂交瘤产生

[0534] 处死具有足够抗原特异性滴度产生(如上定义)的HuMab小鼠,收集脾脏和腹主动脉和腔静脉侧翼的淋巴结。基本上根据制造商的说明书使用CEEF 50电融合系统(Cyto Pulse Sciences,Glen Burnie,MD,USA)通过电融合进行脾细胞和淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞系的融合。接下来,使用ClonePix系统(Genetix,Hampshire,UK)对初始孔进行亚克隆。为此,将特定的初始孔杂交瘤接种于由40%CloneMedia(Genetix,Hampshire,UK)和60%HyQ 2 $\times$ 完全培养基(Hyclone,Waltham,USA)制备的半固体培养基中。如实施例7中所

述在抗原特异性结合测定中重新测试亚克隆,使用Octet (Fortebio, Menlo Park, USA) 测定IgG水平以选择每个初始孔最特异并且最佳的生产克隆用于进一步的扩增。基于标准方案进行产生的HuMab杂交瘤的进一步扩增和培养(例如,如在Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. 和 Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006 中所述)。将通过这个过程产生的克隆命名为PC1014。

[0535] 实施例9-纯化的抗体的质谱

[0536] 使用包含蛋白G树脂的PhyTip柱 (PhyNexus Inc., San Jose, USA) 在Sciclone ALH 3000工作站 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA) 上纯化来自6孔或Hyperflask阶段的0.8mL包含抗体的上清液的小份。根据制造商的说明书使用PhyTip柱, 尽管用结合缓冲液PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands) 和洗脱缓冲液0.1M甘氨酸-HCl pH 2.7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany) 替代缓冲液。纯化后, 用2M Tris-HCl pH 9.0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands) 中和样品。或者, 在一些情况下, 使用MabSelect SuRe纯化更大体积的培养上清液。

[0537] 纯化后, 将样品置于384-孔板 (Waters, 100μl方孔板, part#186002631) 中。用N-糖苷酶F (Roche目录号11365177001在37℃将样品去糖基化过夜。加入DTT (15mg/mL) (1μL/孔) 并在37℃孵育1h。样品 (5或6μL) 在Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) 上用BEH300 C18, 1.7μm, 2.1×50mm柱在60℃进行脱盐。使用都包含0.1%甲酸 (Fluka, 目录号56302, Buchs, Germany) 的MQ水和LC-MS级乙腈 (Biosolve, 目录号01204101, Valkenswaard, The Netherlands) 分别作为洗脱液A和B。在以阳离子模式操作的micrOTOF™质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 上在线记录飞行时间电喷雾离子化质谱。分析之前, 用ES调节混合物 (ES tuning mix) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 校准900-3000m/z刻度。使用搜索5-80kDa之间的分子量的最大熵值算法 (Maximal Entropy algorithm), 以DataAnalysis™软件v.3.4 (Bruker) 对质谱去卷积。

[0538] 去卷积之后, 将获得的全部样品的重链和轻链质量进行比较, 以发现重复的抗体。这有时是由于额外轻链的存在, 但是在重链的比较中, 也考虑可能存在C-末端赖氨酸变体。这导致了一系列独特的抗体, 即, 特定重链和轻链的独特组合。在发现重复抗体的情况下, 基于来自其他测试的结果选择独特的抗体。

[0539] 实施例10-HER2抗体可变结构域的序列分析并克隆于表达载体中

[0540] 从 $5 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞制备HER2 HuMabs的总RNA, 根据制造商的说明书使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒 (Clontech) 从100ng总RNA制备5' -RACE-互补DNA (cDNA)。通过PCR扩增VH和VL编码区并通过不依赖于连接的克隆 (Aslanidis, C. 和 P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18 (20):6069-74) 将所述VH和VL编码区直接同框地 (in frame) 克隆进pGlf和pKappa表达载体。将通过这个过程产生的克隆命名为TH1014。对于每种抗体, 对16个VL克隆和8个VH克隆进行测序。选择预测的重链和轻链质量与相同抗体的杂交瘤来源的材料的质量 (如通过质谱法所测定的) 一致的克隆用于进一步研究和表达。

[0541] 获得的序列如图1和2以及序列表中所示。下文也更详细地描述了选择的序列。根据IMGT定义CDR序列 (Lefranc MP. 等, Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 和 Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008))。表1、表2和表3给出了抗体序列信息或种系序列的概述, 而表4显示了共有序列。

[0542] 表1:HuMabs 169、050、084、025、091、129、127、159、098、153和132的重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)和CDR序列。

[0543]

SEQ ID No:1	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISW VRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMT TDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:2	VH 169, CDR1	GYTFTNYG
SEQ ID No:3	VH 169, CDR2	LSAYSGNT
SEQ ID No:4	VH 169, CDR3	ARDRIVVRPDYFDY
SEQ ID No:5	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:6	VL 169, CDR1	QSVSSY
	VL 169, CDR2	DAS
SEQ ID No:7	VL 169, CDR3	QQRSNWPRT
SEQ ID No:8	VH 050	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No:9	VH 050, CDR1	GFTFSSYA
SEQ ID No:10	VH 050, CDR2	ISGRGGTT
SEQ ID No:11	VH 050, CDR3	AKARANWDYFDY
SEQ ID No:12	VL 050	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No:13	VL 050, CDR1	QGISSW
	VL 050, CDR2	AAS
SEQ ID No:14	VL 050, CDR3	QQANSFPIT

[0544]

SEQ ID No:15	VH 084	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRITYAINW VRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHAQKFQGRVTITA DKSTNTAYMELNSLRSEDTAVYYCAREKGVDDYYGIE VWGQGTITVTVSS
SEQ ID No:16	VH 084, CDR1	GGTFRITYA
SEQ ID No:17	VH 084, CDR2	INTVLGIV
SEQ ID No:18	VH 084, CDR3	AREKGVDDYYGIEV
SEQ ID No:19	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No:20	VL 084, CDR1	QGISSW
	VL 084, CDR2	VAS
SEQ ID No:21	VL 084, CDR3	QQANSFPLT
SEQ ID No:22	VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWN WIRQPPGKGLEWIGEIHHSNSTNYPNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYFDY WAQGTLTVTVSS
SEQ ID No:23	VH 025, CDR1	GGSFSDYY
SEQ ID No:24	VH 025, CDR2	IHHSNST
SEQ ID No:25	VH 025, CDR3	ARGYYDSGVYFDY
SEQ ID No:26	VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No:27	VL 025, CDR1	QGISRW
	VL 025, CDR2	AAS
SEQ ID No:28	VL 025, CDR3	QQYNSYPIT
SEQ ID No:29	VH 091	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWT WIRQPPGKGLEWIGEIHSGDTNYPNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDY WGQGTITVTVSS
SEQ ID No:30	VH 091, CDR1	GGSFSGYY
SEQ ID No:163	VH 091, CDR2	IYHSGDT
SEQ ID No:31	VH 091, CDR3	ARLYFGSGIYYLDY
SEQ ID No:32	VL 091	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLWVY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:33	VL 091, CDR1	QGISSW
	VL 091, CDR2	AAS
SEQ ID No:34	VL 091, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID No:35	VH 129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTFAIHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGWVGAFD YWGQGTITVTVSS
SEQ ID No:36	VH 129, CDR1	GFTFSTFA



[0545]

SEQ ID No:37	VH 129, CDR2	ISYDGGHK
SEQ ID No:38	VH 129, CDR3	ARGLGVWGAFDY
SEQ ID No:39	VL 129	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLT SSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:40	VL 129, CDR1	QSVSSY
	VL 129, CDR2	DAS
SEQ ID No:41	VL 129, CDR3	QQRSNWWT
SEQ ID No:42	VH 127	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRH WYFDLWGRGTLTVSS
SEQ ID No:43	VH 127, CDR1	GYSFSIYW
SEQ ID No:44	VH 127, CDR2	IFPGDSDI
SEQ ID No:45	VH 127, CDR3	ARQPGDWSPRHWYFDL
SEQ ID No:46	VL 127	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWY QKPGKAPELLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFLT TISYQSEDFATYYCQYYSFPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No:47	VL 127, CDR1	QGISSY
	VL 127, CDR2	AAS
SEQ ID No:48	VL 127, CDR3	QYYSFPLT
SEQ ID No:49	VH 159	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIPGDSDTRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILT GFNWFDPWGQGTTLTVSS
SEQ ID No:50	VH 159, CDR1	GYNFTSYW
SEQ ID No:51	VH 159, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No:52	VH 159, CDR3	ARWGTYYDILTYFN
SEQ ID No:53	VL 159	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQYYIYPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:54	VL 159, CDR1	QGISSW
	VL 159, CDR2	AAS
SEQ ID No:55	VL 159, CDR3	QYYIYPWT
SEQ ID No:56	VH 098	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYY TLFDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID No:57	VH 098, CDR1	GFTFSNYG
SEQ ID No:58	VH 098, CDR2	ISGSAYST
SEQ ID No:59	VH 098, CDR3	AKAHYHGSGSYYTLFDY

[0546]

SEQ ID No:60	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:61	VL 098, CDR1	QGISSW
	VL 098, CDR2	AAS
SEQ ID No:62	VL 098, CDR3	QQYNSYPYT
SEQ ID No:63	VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHW VRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVF DYWGQGTTLTVSS
SEQ ID No:64	VH 153, CDR1	GFTFSDYV
SEQ ID No:65	VH 153, CDR2	ISYDGSNK
SEQ ID No:66	VH 153, CDR3	ARGGITGTTGVFDY
SEQ ID No:67	VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGYGTDFSL TISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPTFGQGTTRLEIK
SEQ ID No:68	VL 153, CDR1	QGISSW
	VL 153, CDR2	DAS
SEQ ID No:69	VL 153, CDR3	QQYKSYPT
SEQ ID No:70	VH 132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGNSNYVQKFQGRVTM TTDTTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAREYSYDSGT FYGMDEVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No:71	VH 132, CDR1	GYTFTSYG
SEQ ID No:72	VH 132, CDR2	ISAYNGNS
SEQ ID No:73	VH 132, CDR3	AREYSYDSGTFFYGMDEV
SEQ ID No:74	VL 132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:75	VL 132, CDR1	QSVSSY
	VL 132, CDR2	DAS
SEQ ID No:76	VL 132, CDR3	QQRSNWPMYT

[0547] 表2:选择的HuMabs的小鼠来源和重链和轻链序列同源物

[0548]

HuMab:	小鼠:	品系:	种系VH:	种系VL:
169	361494	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
050	350633	HCo12	IgHV3-23-01	IgKV1-12-01
084	350615	HCo12-BalbC	IgHV1-69-04	IgKV1-12-01
025	350631	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
091	350630	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
129	359783	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV3-11-01
127	359783	HCo12-BalbC	IgHV5-51-01	IgKV1D-8-01
159	363503	HCo12	IgHV5-51-01	IgKV1D-16-01
098	350659	HCo17	IgHV3-23-01	IgKV1D-16-01
153	359785	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV1D-16-01
132	361487	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01

[0549] 表3:HuMabs 049、051、055、123、161、124、001、143、019、021、027、032、035、036、

054、094的重链可变区 (VH) ,轻链可变区 (VL) 序列。对于VH和VL序列,各自的CDRs分别对应于图1和2中下划线表示的那些序列。

[0550]

SEQ ID No: 77	VH 049	EVQLLES <sup>GGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG</sup> KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 78	VL 049	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKGPK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 79	VH 051	EVQLLES <sup>GGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG</sup> KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 80	VL 051	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKGPK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 81	VH 055	EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWSVRQAPG</sup> KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 82	VL 055	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKGPK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 83	VH 123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QALEWMGWITTYSSNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 84	VL 123	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSHWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 85	VH 161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 86	VL 161	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 87	VH 124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWITTYNGNTIYAQRFQDRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 88	VL 124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK

[0551]

SEQ ID No: 89	VH 001	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGNYGSGYYFDLWGRGTQVTVSS
SEQ ID No: 90	VL 001	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYISFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 91	VH 143	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSANYPNPSLMSRVITISVDTSKNQFSLQLSSV TAADTAVYYCARGYYGSGYYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 92	VL 143	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 93	VH 019	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHVHGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKSQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYDSGVYFDYWAQGLTVTVSS
SEQ ID No: 94	VL 019	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISRWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 95	VH 021	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYASGVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 96	VL 021	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 97	VH 027	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLNLSSVT AADTAVYYCARGLIGSGYYFDYWDQGLTVTVSS
SEQ ID No: 98	VL 027	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 99	VH 032	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRVITISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYSGGIYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 100	VL 032	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 101	VH 035	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRVITISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYSGGIYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 102	VL 035	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 103	VH 036	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLYYSGSYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 104	VL 036	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLTWYQQKPEKA PKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 105	VH 054	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLWYSGSYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 106	VL 054	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGGGTKVEIK

[0552]

SEQ ID No: 107	VH 094	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPG KGLEWIGEIYHSGDTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLYSVT AADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 108	VL 094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLWVYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 109	VH 105	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLWLQMN LRAEDTAVYYCAKAHYHSGSYTLFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 110	VL 105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 111	VH 100	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPG KGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYTLFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 112	VL 100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 113	VH 125	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWVRQAPG KGLEWVSTISGSGYATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCAKHTLGSGSYTLFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 114	VL 125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 115	VH 162	EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPG GKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGYHSGSYTSFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 116	VL 162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPLTFGGGKVEIK
SEQ ID No: 117	VH 033	QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGDYISSSGVFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 118	VL 033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 119	VH 160	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMN SLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 120	VL 160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 121	VH 166	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 122	VL 166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 123	VH 152	QVQVVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 124	VL 152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPENFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 125	VH 167	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 126	VL 167	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK

[0553] 表4:基于图1和2中所示的序列比对的共有CDRs。

[0554]

SEQ ID No: 9 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSSYA	
SEQ ID No: 127 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR2	ISGX1GGX2T	其中X1=R或S, 以及X2=T或S; 优选地, 其中X1=R以及X2=T
SEQ ID No: 11 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKARANWDYFD Y	
SEQ ID No: 128 084	IgHV1-69-04	VH CDR1	GGTFX1X2YA	其中X1=R或S, 以及X2=T或S; 优选地, 其中X1=R以及X2=T
SEQ ID No: 129 084	IgHV1-69-04	VH CDR2	IX2X3X3LGIX4	其中X1=N或I, X2=T或P, X3=V或I, 以及X4=V或A, 优选地, 其中X1=N, X2=T, X3=V, 以及X4=V
SEQ ID No: 130 084	IgHV1-69-04	VH CDR3	AREKGVDYYG X1X2	其中X1=I或M, X2=E或D; 优选地, 其中X1=I, X2=E
SEQ ID No: 131 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	其中X=N或S, 优选地N
SEQ ID No: 132 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR2	IX1X2YX3GNT	其中X1=S, T, 或I; X2=A或T; X3=S或N; 优选地, 其中X1=S, X2=A, 以及X3=S

[0555]

SEQ ID No: 133 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARDRX1X2VRP DYFDY	其中X1=I或V, X2=V或I; 优选地, 其中X1=I以及X2=V
SEQ ID No: 134 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSF SX1YX2	其中X1=D或G以及X2=Y或F; 优选地, 其中X1=D以及X2=Y
SEQ ID No: 135 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HX2GSX3	其中X1=H或N, X2=S或V, 以及X3=T或A; 优选地, 其中X1=H, X2=S, 以及X3=T
SEQ ID No:136 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARGX1X2X3SG X4YYFDX5	其中X1=Y, N或L; X2=Y或I, X3=D, G或A; X4=V或Y; 以及X5=Y或L; 优选地, 其中X1=Y, X2=Y, X3=D, X4=V, 以及X5=Y
SEQ ID No:137 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSF SX1YY	其中X1=G或D, 优选地G
SEQ ID No:138 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HSGX2T	其中X1=Y, N或H; 以及X2=D或S; 优选地, 其中X1=Y以及X2=D
SEQ ID No:139 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARLX1X2GSGX 3YYX4DY	其中X1=Y, F或W; X2=F或Y; X3=I, T或S; 以及X4=L或F; 优选地, 其中X1=Y, X2=F, X3=I, 以及X4=L
SEQ ID No:140 129	IgHV3-30-01	VH CDR1	GFTFSX1X2A	其中X1=T或F, X2=F或Y; 优选地, 其中X1=T以及X2=F
SEQ ID No:141 129	IgHV3-30-01	VH CDR2	ISYDGX1X2K	其中X1=G或S, X2=H或N; 优选地, 其中X1=G以及X2=H
SEQ ID No:142 129	IgHV3-30-01	VH CDR3	ARGLGVWGX1F DY	其中X1=A或Y, 优选地A

[0556]

SEQ ID No:143 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR1	GFTFX1X2YX3	其中X1=S, N或T; X2=N, D或S;以及X3=G或A; 优选 地, 其中X1=S, X2=N以及 X3=G
SEQ ID No:144 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR2	ISGX1X2X3X4T	其中X1=S或T, X2=A或G, X3=Y或G, X4=S或A; 优选 地, 其中X1=S, X2=A, X3=Y, X4=S
SEQ ID No:145 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR3	AKX1X2X3X4G SGSYTX5FDY	其中X1=A或G; X2=H或Y; X3=Y或T; X4=H, F或L; X5=L或S; 优选地, 其中 X1=A; X2=H; X3=Y; X4=H; X5=L
SEQ ID No:146 127	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYSFX1X2YW	其中X1=S或T, X2=I或S; 优 选地, 其中X1=S, X2=I
SEQ ID No:147 127	IgHV5-51-01	VH CDR2	IX1PGDSDX2	其中X1=F或Y, X2=I或T; 优选地, 其中X1=F, X2=I
SEQ ID No:148 127	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARQPGDWSPR HWYFDL	
SEQ ID No:149 159	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYXFTSYW	其中X=N或S, 优选地N
SEQ ID No:51 159	IgHV5-51-01	VH CDR2	IYPGDSDT	
SEQ ID No:52 159	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARWGTYDILT GYFN	
SEQ ID No:71 132	IgHV1-18-01	VH CDR1	GYTFTSYG	
SEQ ID No:150 132	IgHV1-18-01	VH CDR2	ISAYNGNX	其中X=S或T, 优选地S
SEQ ID No:151 132	IgHV1-18-01	VH CDR3	AREYSYDSGT FYGM DV	
SEQ ID No:152 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR1	GFTFSX1X2X3	其中X1=D或S, X2=Y或H, X3=V或A; 优选地, 其中 X1=D, X2=Y, X3=V



[0557]

SEQ ID No:153 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR2	ISYDGSX1X2	其中X1=N或Y, X2=K或E, 优选地其中X1=N以及X2=K
SEQ ID No:154 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR3	ARGX1X2X3X4 X5X6GX7FDY	其中X1=G, D或S; X2=I或 Y; X3=T或I; X4=G或S; X5=T或S; X6=T或S; X7=Y 或V; 优选地, 其中X1=G; X2=I; X3=T; X4=G; X5=T; X6=T;以及X7=V
SEQ ID No:13 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR1	QGISSW	
050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR2	XAS	其中X=A或V
SEQ ID No:155 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR3	QQANSFPXT	其中X=I或L
SEQ ID No:6 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR2	DXS	其中X=A或T, 优选地A
SEQ ID No:156 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRXWPRT	其中X=N或H, 优选地N
SEQ ID No:157 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISXW	其中X=R或S, 优选地R
025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:164 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR3	QQYNSXPIT	其中X=Y或F, 优选地Y
SEQ ID No:33 091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISSW	

[0558]

091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AX1X2	其中X1=A或T, 以及X2=S或F; 优选地, 其中X1=A以及X2=S
SEQ ID No:158 091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSFPPT	
SEQ ID No:159 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIXSW	其中X=S或N, 优选地S
098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:160 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSYPXT	其中X=Y或L, 优选地Y
SEQ ID No:161 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIX1X2W	其中X1=S或N; X2=S或N; 优选地, 其中X1=X2=S
153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR2	XAS	其中X=D或A, 优选地D
SEQ ID No:162 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYXSYPT	其中X=K或N, 优选地K

[0559] 实施例11-抗体的纯化

[0560] 将培养上清液通过0.2 $\mu$ m盲端过滤器(dead-end filter)过滤,上样至5ml MabSelect SuRe柱(GE Health Care)上,用0.1M柠檬酸钠-NaOH,pH 3洗脱。立即用2M Tris-HCl,pH 9中和洗脱物,并过夜透析至12.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,140mM NaCl,pH 7.4 (B.Braun)。或者,纯化之后,将洗脱物上样至HiPrep脱盐柱,将抗体交换进12.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,140mM NaCl,pH 7.4 (B.Braun)缓冲液中。缓冲液透析或交换之后,样品通过0.2 $\mu$ m盲端过滤器无菌过滤。通过SDS-PAGE确定纯度,并通过比浊法和280nm吸光度测量浓度。将纯化的抗体保存在4℃。进行质谱法来鉴别由如实施例9所述杂交瘤表达的抗体重链和轻链的分子量。

[0561] 实施例12-通过FACS分析测定HER2克隆与表达膜结合的HER2的肿瘤细胞的结合

[0562] 使用流式细胞仪(FACS Canto II,BD Biosciences)测试HER2抗体与AU565细胞(购于ATCC,CRL-2351)和A431细胞(购于ATCC,CRL-1555)的结合。Qifi分析(Dako,Glostrup,Denmark)表明,AU565细胞表达平均1,000,000拷贝的HER2蛋白/细胞,而A431细胞表达平均15,000拷贝/细胞。使用藻红蛋白(PE)缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson)检测HER2抗体的结合。使用曲妥珠单抗(临床级Herceptin<sup>®</sup>)作为阳性对照抗体,使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software,San Diego,CA,USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S型剂量-应答)测定EC<sub>50</sub>值。

[0563] 如图3中所示,所有测试的HER2抗体都以剂量依赖的方式结合AU565和A431细胞两

者上表达的HER2。结合的 $EC_{50}$ 值对于AU565细胞在0.336-2.290 $\mu\text{g/mL}$ 之间变化,对于A431细胞在0.068-1.135 $\mu\text{g/mL}$ 之间变化。尤其在A431细胞上,在测试的抗体之间观察到 $EC_{50}$ 值的较大差异。然而,抗体098在两种类型的细胞上都具有最佳(即最低)的 $EC_{50}$ 值。在AU565和A431细胞上,在不同抗体之间也观察到最大结合水平的一些差异。测试的抗体中,抗体098在AU565细胞上也具有最高的最大结合水平,而抗体025在A431细胞上具有最高的最大结合水平。

[0564] 实施例13-通过FACS分析测定HER2抗体与猕猴上皮细胞上表达的膜结合的HER2的结合

[0565] 为了测定与猕猴HER2的交叉反应性,使用流式细胞仪(FACS Canto II, BD Biosciences)测试HER2抗体与HER2-阳性猕猴上皮细胞(购于ATCC的4MBr-5)的结合。使用藻红蛋白缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson)作为二级缀合物。使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。

[0566] 如图4中所示,所有测试的HER2抗体都与猕猴HER2交叉反应。在两个测试的浓度(1 $\mu\text{g/mL}$ 和10 $\mu\text{g/mL}$ ),HER2抗体都能够特异性结合猕猴HER2。抗体127在1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度表现出较差的结合,但在10 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度表现出良好的结合。抗体098在两个抗体浓度都具有最高的结合水平。没有观察到与同种型对照抗体的任何结合。

[0567] 实施例14-在夹心-ELISA中测定HER2抗体竞争与可溶性Her2ECDHis的结合

[0568] 以下列方式确定测试的HER2抗体的最佳包被浓度和最佳Her2ECDHis浓度:以在PBS中系列稀释的HER2 HuMabs (2倍稀释中0.125-8 $\mu\text{g/mL}$ ) 在4 $^{\circ}\text{C}$ 将ELISA孔包被过夜。接下来,用PBST(补充0.05%吐温-20[Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands]的PBS)洗涤ELISA孔,用PBSTC(补充2% [v/v] 鸡血清[Gibco,Paisley,Scotland]的PBS)在室温(RT)封闭1小时。然后用PBST洗涤ELISA孔,并用PBSTC中系列稀释的Her2ECDHis (2倍稀释中0.25-2 $\mu\text{g/mL}$ ) 在RT孵育1小时。用PBST洗去未结合的Her2ECDHis,用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 生物素化的兔-抗-6xhis-biot (Abcam,Cambridge,UK) 在RT下孵育结合的Her2ECDHis 1小时。其后,用PBST洗涤该板,用PBST中稀释的0.1 $\mu\text{g/mL}$ 链霉亲和素-聚-HRP (Sanquin,Amsterdam,The Netherlands) 孵育1小时。洗涤后,通过避光在RT与2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS:在50ml ABTS缓冲液中稀释的ABTS片剂(Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands))) 孵育15分钟而使反应可视化。通过加入等体积的草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands) 终止显色。在微量滴定板读数器(Biotek Instruments,Winooski,USA) 上测定405nm处的荧光。测定导致每种抗体的次最佳结合的抗体浓度并用于以下的交叉阻断实验。

[0569] 以如上所述测定的次最佳剂量将每种HER2抗体包被至ELISA孔。ELISA孔封闭后,在过量的第二(竞争剂)HER2抗体存在或不存在的条件下,以预定浓度的1 $\mu\text{g/mL}$ 生物素化的Her2ECDHis孵育孔。然后如上所述进行ELISA。将Her2ECDHis与包被的抗体的残余结合表示为相对于不存在竞争剂抗体的情况下观察的结合的百分比。然后,百分比竞争确定为100减去抑制百分比。75%竞争被视为完全的交叉阻断,而25-74%竞争被视为部分交叉阻断,0-24%竞争被视为未阻断。

[0570] 如表5中所示,发现所有HER2抗体都能够,至少部分地,阻断它们自身与Her2ECDHis的结合。将抗体分为3个主要的交叉阻断组之后,测试所有抗体与来自每个组的

至少一种代表性抗体的竞争。

[0571] 第一组包括曲妥珠单抗和抗体169、050和084,其彼此阻断与Her2ECDHis的结合,但不交叉阻断来自其他组的抗体。

[0572] 第二组包括帕妥珠单抗和抗体025、091和129,其彼此阻断与Her2ECDHis的结合,除了抗体129和091都交叉阻断帕妥珠单抗和025,但彼此不阻断。没有任何第2组的抗体阻断来自其他组的抗体。

[0573] 第三组包括抗体C1、F5、127、098、132、153和159,其没有交叉阻断来自其他组的任何抗体。在该第3组中,观察到一些变化。抗体127是能够交叉阻断该组中所有其他抗体结合Her2ECDHis的唯一抗体;抗体159交叉阻断该组中所有其他抗体,除了132;克隆098交叉阻断第3组中所有抗体,除了132和153;抗体153交叉阻断127、132和159结合Her2ECDHis,但不能交叉阻断098、C1或F5;克隆132交叉阻断127、132和153。当作为竞争剂抗体加入时,F5和C1仅仅表明彼此的交叉阻断。然而,相反的反应还表明与抗体127、098和159,但不是153和132的竞争。可能地,这些差异可能是由于抗体C1和F5对于Her2ECDHis的低亲和力导致的。

[0574] 可以通过亲合力效应和包含两种非竞争抗体的抗体-Her2ECDHis复合物的形成解释高于100%的值。

[0575] 表5:HER2抗体对于与Her2ECDHis的结合的竞争和交叉阻断

[0576]

固定化的 mAb ↓	竞争性 mAb →														
	曲妥珠 单抗	169	050	084	pert	025	091	129	C1	F5	127	159	098	153	132
曲妥珠单抗	5	15	6	51	100	107	100	85	103	99	115	90	101	101	101
TH1014-169	19	45	21	73	101	98	105	106	ND	ND	ND	ND	105	102	ND
TH1014-050	13	30	12	74	95	104	98	110	ND	ND	ND	ND	102	104	ND
TH1014-084	74	73	76	20	101	106	104	104	ND	ND	ND	ND	109	98	ND
TH1014-pert	104	100	94	95	9	20	19	39	106	125	116	81	103	100	109
TH1014-025	98	98	100	104	8	18	21	15	ND	ND	ND	ND	102	99	ND
TH1014-091	99	99	95	100	5	13	15	78	ND	ND	ND	ND	98	98	ND
TH1014-129	93	99	97	92	22	55	76	12	ND	ND	ND	ND	106	98	ND
TH1014-C1	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	58	73	53	58	77	90
TH1014-F5	197	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	21	62	15	16	80	125
TH1014-127	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	112	88	11	8	58	21	44
TH1014-159	111	ND	ND	ND	112	ND	ND	ND	96	86	15	6	11	40	79
TH1014-098	107	102	100	103	104	108	104	107	125	96	21	9	17	110	142
TH1014-153	134	111	103	107	121	97	102	106	257	96	27	23	115	28	33
TH1014-132	353	ND	ND	ND	288	ND	ND	ND	422	379	30	131	309	41	32
交叉阻断组	1	1	1	1	2	2	2	2b	3a	3a	3a	3a	3a	3b	3b

75 - 100% 竞争

25 - 74% 竞争

0 - 24% 竞争

[0577] 示出的值是两个独立的实验中相对于在竞争抗体不存在的情况下观察到的结合的平均百分比。进行一次用HEK产生的TH1014-C1和TH1014-F5的竞争实验。还检测了曲妥珠单抗(临床级Herceptin<sup>®</sup>)和HEK产生的帕妥珠单抗(TH1014-pert)。

[0578] 实施例15-抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0579] 收获SK-BR-3细胞(购于ATCC HTB-30) ( $5 \times 10^6$ 细胞), 洗涤(在PBS中洗涤2次, 1500rpm, 5min), 并收集在补充10%加强型小牛血清(CCS) (HyClone, Logan, UT, USA) 的1ml RPMI 1640培养基中, 其中添加200 $\mu$ Ci  $^{51}$ Cr(铬-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands)。将混合物在振荡水浴中37 $^{\circ}$ C孵育1.5小时。洗涤细胞(PBS中洗涤2次, 1500rpm, 5min)后, 将细胞重悬于补充10%CCS的RPMI 1640培养基中, 通过台盼蓝排斥计数并稀释至 $1 \times 10^5$ 细胞/mL的浓度。

[0580] 同时, 根据制造商的说明书使用标准Ficoll密度离心(淋巴细胞分离介质; Lonza, Verviers, France)从新鲜棕黄层(buffy coat) (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) 分离外周血单核细胞(PBMCs)。将细胞重悬在补充10%CCS的RPMI 1640培养基中后, 通过台盼蓝排斥计数细胞, 并浓缩至 $1 \times 10^7$ 细胞/mL。

[0581] 在CHO细胞中生产曲妥珠单抗, 导致12.4%的(增加的)非核心岩藻糖基化级别, 而在HEK细胞中产生其他HER2抗体, 导致平均4%的非核心岩藻糖基化。

[0582] 对于ADCC实验, 50 $\mu$ L  $^{51}$ Cr-标记的SK-BR-3细胞(5,000细胞)与15 $\mu$ g/mL HER2抗体(IgG1,  $\kappa$ ) 在96-孔微量滴定板中补充10%CCS的100 $\mu$ L RPMI培养基的总体积中预先孵育。在RT 15min后, 加入50 $\mu$ L PBMCs(500,000细胞), 产生100:1的效应物与目标的比例。通过将50 $\mu$ L  $^{51}$ Cr-标记的SK-BR-3细胞(5000细胞)与100 $\mu$ L 5% Triton-X100孵育而测定细胞裂解的最大数量。通过没有任何抗体或效应物细胞的情况下在150 $\mu$ L培养基中孵育5000  $^{51}$ Cr-标记的SK-BR-3细胞而测定自发裂解的量。通过在没有抗体的情况下将5000SK-BR-3细胞与500,000PBMCs孵育而测定抗体非依赖性细胞裂解的水平。随后, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>孵育细胞4hr。为了确定细胞裂解的量, 将细胞离心(1200rpm, 3min)并将75 $\mu$ L上清液转移至细微管(micronic tubes), 其后用 $\gamma$ 计数器计数释放的 $^{51}$ Cr。如下使用测得的每分钟计数(cpm)来计算抗体介导的裂解的百分比:

[0583] 
$$(\text{cpm样品} - \text{cpm抗体非依赖性裂解}) / (\text{cpm最大裂解} - \text{cpm自发裂解}) \times 100\%$$

[0584] 如图5中所示, 来自交叉阻断组1和2的HER2抗体通过ADCC诱导SK-BR-3细胞的有效裂解。组3中, 抗体153是诱导有效的ADCC的唯一的抗体, 抗体132诱导约10%ADCC, 克隆098、159和127没有诱导ADCC。

[0585] 实施例16-AU565细胞的配体非依赖性增殖的抑制

[0586] 测试HER2抗体体外抑制AU565细胞的增殖的能力。由于AU565细胞上的高HER2表达水平(如实施例12中所述的 $\sim 1,000,000$ 拷贝/细胞), HER2在这些细胞中具有组成型活性, 因此不依赖于配体诱导的异源二聚化。

[0587] 在96孔组织培养板(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)中, 在10 $\mu$ g/mL HER2抗体存在的条件下在无血清的细胞培养基中每孔接种9000AU565细胞。作为对照, 在没有抗体的情况下在无血清的培养基中接种细胞。3天后, 根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International, San Francisco, US) 定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Finland) 监测荧光。将抗体处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相对于未处理的细胞的百分比。应用Dunnett's检验用于统计学分析。

[0588] 结果如图6中所示, 表示HER2抗体处理后的AU565细胞相比于未处理的细胞(设置为100%)的百分比增殖。在测试的第1组抗体中, 曲妥珠单抗、050和169表现出AU565细胞增

殖的显著抑制 ( $P < 0.05$ )，而084没有任何影响。来自第2组的测试的抗体 (帕妥珠单抗、025、092和129) 中没有一种能够抑制AU565细胞增殖。来自第3组的测试的抗体 (098和153) 没有抑制AU565增殖。与此相反，两种抗体都诱导了相比于未处理的细胞的AU565细胞的增强的增殖 (098超过153)。增强增殖在ADC-缀合物的一些治疗应用中可以是有利的，例如，当药物的细胞毒性作用依赖于细胞增殖，或被细胞增殖增强时。对于曲妥珠单抗和帕妥珠单抗，这与Juntilla等 (Cancer Cell 2009;15 (5):353-355) 所述的结果相一致。

[0589] 实施例17-MCF-7细胞的配体诱导的增殖的抑制

[0590] 由于HER2是孤儿受体，其信号主要依赖于其他ErbB家族成员如EGFR和Her3的活化。配体结合后，这两种受体可以结合并活化HER2受体，导致，例如增殖。各种出版物描述了帕妥珠单抗有效地抑制调蛋白- $\beta 1$ 诱导的增殖 (Franklin MC. Cancer Cell 2004/Landgraf R. BCR2007)。对于曲妥珠单抗，已经描述了它对于调蛋白- $\beta 1$ 诱导的HER2/HER3异源二聚化和增殖的影响很小 (Larsen SS., 等, Breast Cancer Res Treat 2000;58:41-56; Agus DB., 等, Cancer Cell 2002;2:127-137; Wehrman等 (2006), 同上)。

[0591] 为了研究本发明的人HER2抗体干扰调蛋白- $\beta 1$ 诱导的HER2/HER3异源二聚体的能力，进行调蛋白- $\beta 1$ 诱导的增殖测定。因此，在96孔组织培养板 (Greiner bio-one) 中在完全细胞培养基中接种表达 $\sim 20,000$ HER2分子/细胞的MCF7细胞 (购于ATCC, HTB-22) (2,500细胞/孔)。4小时后，用包含1%加强型小牛血清 (CCS) 和 $10\mu\text{g/mL}$  HER2抗体的饥饿培养基替代细胞培养基。接下来，将在包含1% CCS的饥饿培养基中稀释的调蛋白- $\beta 1$  (PeproTech, Princeton Business Park, US) 加入孔中至 $1.5\text{ng/mL}$ 的终浓度。4天孵育后，根据制造商的说明书以阿尔玛蓝 (BioSource International) 定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer) 监测荧光。将HER2抗体处理的配体诱导的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相比于没有HER2抗体的情况下孵育的配体诱导的细胞的百分比信号。应用Dunnett's检验用于统计学分析。

[0592] 图7显示了相对于在不存在HER2抗体的情况下以调蛋白- $\beta 1$ 刺激后的活细胞 (设置为100%)，以调蛋白- $\beta 1$ 刺激并用指定的HER2抗体处理的活MCF7细胞的百分比。还描述了在调蛋白- $\beta 1$ 和抗体两者都不存在的情况下MCF-7的增殖 (没有增殖)。抗体025、091、129、153和帕妥珠单抗 (TH1014-pert) 表明了调蛋白- $\beta 1$ 诱导的MCF-7增殖的显著抑制 ( $P < 0.05$ )。曲妥珠单抗也显示MCF-7细胞的调蛋白- $\beta 1$ 诱导的增殖的一些抑制，尽管没有和其他测试的HER2抗体一样有效。已经报道了HER2的结构域IV参与稳定EGFR/HER2异源二聚体，但没有关于其对HER2/HER3异源二聚体的贡献的详细信息 (Wehrman等, 同上)。抗体050、084、169和098对于MCF-7细胞的调蛋白- $\beta 1$ 诱导的增殖没有统计学显著的影响。不局限于理论，这表明这些抗体没有抑制配体诱导的HER2/HER3异源二聚化。

[0593] 实施例18-抗- $\kappa$ -ETA' 测定

[0594] 为了研究HER2抗体对于抗体-药物缀合物方法的适用性，开发了使用 $\kappa$ -定向的假单胞菌-外毒素A (抗- $\kappa$ -ETA') 的通用体外基于细胞的杀死测定法。该测定使用高亲和力的缀合于假单胞菌-外毒素A的截短形式的抗- $\kappa$ 结构域抗体。内化后，抗- $\kappa$ -ETA' 结构域抗体经历蛋白水解和二硫键还原，使催化结构域与结合结构域分离。催化结构域经由KDEL保留基序从高尔基体运送至内质网，随后转位至胞质溶胶，其中它抑制了蛋白合成并诱导细胞凋亡 (参见Kreitman RJ. BioDrugs 2009;23 (1):1-13)。在该测定中，为了鉴别能够内化并且

通过毒素杀死的HER2受体,在与HER2-阳性细胞孵育之前将HER2抗体与抗- $\kappa$ -ETA'预先缀合。

[0595] 首先,对于每种细胞系测定抗- $\kappa$ -ETA'的最佳浓度,即,不会导致诱导非特异性的细胞死亡的最大耐受剂量。在96孔组织培养板(Greiner bio-one)中正常细胞培养基中接种AU565细胞(7500细胞/孔)和A431细胞(2500细胞/孔)并允许粘附至少4小时。接下来,细胞与正常的细胞培养基中100,10,1,0.1,0.01,0.001和0 $\mu$ g/mL抗- $\kappa$ -ETA'稀释液孵育。3天后,根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International, San Francisco, US)定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Finland)监测荧光。使用不能自身杀死细胞的最高浓度的抗- $\kappa$ -ETA'用于下列实验(对于AU565为0.5 $\mu$ g/mL,对于A431为1 $\mu$ g/mL)。

[0596] 接下来,对于不同的HER2抗体测试抗体介导的内化和通过毒素的杀死。如上所述接种细胞。将系列稀释的HER2抗体与预定浓度的抗- $\kappa$ -ETA'预先孵育30分钟,然后将它们加入细胞。孵育3天后,如上所述定量活细胞的量。将抗- $\kappa$ -ETA'缀合的抗体处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相比于仅用抗体处理的细胞的百分比。使用23.4 $\mu$ g/mL星形孢菌素作为细胞杀死的阳性对照。使用同种型对照抗体作为阴性对照。

[0597] 如图8A、B和图6中所示,所有抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体能够以剂量依赖的方式杀死AU565细胞。与抗- $\kappa$ -ETA'缀合的曲妥珠单抗和抗- $\kappa$ -ETA'缀合的帕妥珠单抗(TH1014-pert)两者相比,所有测试的抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体表现出AU565细胞的更好的杀死。而且,与抗- $\kappa$ -ETA'缀合的曲妥珠单抗(31.9%)和抗- $\kappa$ -ETA'缀合的帕妥珠单抗(47.51%)相比,抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体的杀死的AU565细胞的百分比更高(70.3-49.9%),并且EC<sub>50</sub>值增加了。与抗- $\kappa$ -ETA'缀合的曲妥珠单抗(78.49ng/mL)和抗- $\kappa$ -ETA'缀合的帕妥珠单抗(117.8ng/mL)相比,抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体的EC<sub>50</sub>值的范围为12.12ng/mL和46.49ng/mL之间。抗体159具有最高百分比的细胞杀死,098具有最低的EC<sub>50</sub>。

[0598] 表6:显示的数据是一次代表性实验中测定的以抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体处理的AU565细胞的EC<sub>50</sub>值和最大百分比细胞杀死。将星形孢菌素诱导的细胞杀死设置为100%,将未处理的细胞的MFI设置为0%。Ndet=未检测到。

[0599]

抗体	%杀死的细胞	EC50ng/mL
PC1014-159	70.3	34.93
PC1014-127	69.0	34.46
PC1014-132	61.6	39.35
PC1014-129	60.8	30.85
PC1014-153	60.3	32.26
PC1014-025	60.0	16.71
PC1014-098	58.7	12.12
PC1014-084	58.1	26.97
PC1014-050	52.4	12.71
PC1014-091	50.6	46.49
PC1014-169	49.9	35.62
TH1014-pert	47.5	117.8

曲妥珠单抗	31.9	78.49
同种型对照	Ndet	Ndet

[0600] 如图8C、D和表7中所示,抗体025、091、098、129和153能够诱导A431细胞的有效杀死( $\geq 75\%$ )。抗体098显示了最高百分比的细胞杀死和最低的 $EC_{50}$ 。当缀合于抗- $\kappa$ -ETA'时,曲妥珠单抗和同种型对照抗体没有诱导A431细胞的杀死。抗体169、084和帕妥珠单抗诱导了不超过约50%的百分比的细胞杀死。用未缀合的HER2抗体没有观察到任何细胞杀死。

[0601] 表7:显示的数据是一次代表性实验中测定的以抗- $\kappa$ -ETA'缀合的HER2抗体处理的A431细胞的 $EC_{50}$ 值和最大百分比细胞杀死。将星形孢菌素诱导的细胞杀死设置为100%,将未处理的细胞的MFI设置为0%。“Ndet”意味着未检测到。

[0602]	抗体	%杀死的细胞	$EC_{50}ng/mL$
	PC1014-025	86.7	~9.77
	PC1014-084	50.5	ND
	PC1014-091	83.3	~9.86
	PC1014-098	87.2	1.65
	PC1014-129	75.9	~10.60
	PC1014-153	82.4	~10.11
	PC1014-169	34.0	ND
	TH1014-pert	37.0	61.58
	曲妥珠单抗	Ndet	Ndet
	同种型对照	Ndet	Ndet

[0603] 实施例19-用基于FMAT的fab-CypHer5E分析测定HER2抗体的内化

[0604] 为了研究前面实施例中所述的 $\kappa$ -毒素-ETA'测定中观察的AU565细胞的增强的杀死是否与HER2抗体的增强的内化相关,进行基于fab-CypHer5E的内化测定。CypHer5E是pH敏感性染料,在碱性pH(胞外:培养基)无荧光,在酸性pH值(细胞内:溶酶体)有荧光,酸解离常数(pKa)为7.3。

[0605] 在384-孔组织培养板(Greiner bio-one)中在补充240ng/mL fab-CypHer5E(根据制造商的说明书进行山羊-fab-抗-人IgG[Jackson]与CypHer5E[GE Healthcare, Eindhoven, The Netherlands]的缀合)的正常细胞培养基中以3000细胞/孔的密度接种AU565细胞。接下来,在正常的细胞培养基中系列稀释HER2抗体,加入细胞,并置于室温9小时。使用8200 FMAT(Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, The Netherlands)测定胞内CypHer5E的平均荧光强度(MFI),并使用'计数x荧光'作为读出。使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S型剂量-应答)测定 $EC_{50}$ 值和最大MFI。

[0606] 结果显示于表8中,描述了在用AU565细胞的CypHer5E内化测定中对于所有测试的HER2抗体的 $EC_{50}$ 和最大MFI值。最大MFI值表明在抗体结合后多少HER2受体被内化。与曲妥珠单抗(35,000)和帕妥珠单抗(TH1014-pert)(32,366)相比,所有HER2抗体显示更高的最大MFI值(137,904-38,801),表明测试的HER2抗体诱导了增强的受体内化。尤其地,和与曲妥珠单抗或TH1014-pert竞争的受体相比,不与曲妥珠单抗或TH1014-pert竞争的抗体诱导更多的受体内化,其中抗体098和127获得了最高的MFI。不局限于理论,这可能对于没有抑制



HER2异源二聚化的能力是固有的。

[0607] 表8:HER2抗体的基于Cypher-5的内化测定。显示的数据是使用以fab-CypHer5E-标记的HER2抗体处理的AU565细胞的两次实验中一次代表性实验的MFI和EC<sub>50</sub>值。不能计算一些EC<sub>50</sub>值 (ND)。

Cypher 5			
抗体	EC <sub>50</sub> ng/ mL	最大的MFI	
PC1014-025	30.05	63428	与Herceptin竞争的mAbs
PC1014-091	32.99	50711	
PC1014-129	7.15	60302	
TH1014-pert	530	32366	与TH1014-pert竞争的mAbs
PC1014-169	ND	38801	
PC1014-084	30.51	71059	
曲妥珠单抗	21.70	35000	与TH1014-F5竞争的mAbs
PC1014-098	13.77	134575	
PC1014-127	~9.68	137904	
PC1014-159	ND	92427	非竞争性mAbs
TH1014-F5	22.65	113116	
PC1014-132	11.42	112270	
PC1014-153	~14.91	87531	

[0609] 实施例20:通过2-MEA-诱导的Fab-臂交换产生双特异性抗体

[0610] WO 2008119353 (Genmab) 中描述了并且van der Neut-Kolfshoten等. (Science.2007 Sep 14;317(5844):1554-7) 中报道了用于产生双特异性抗体的体外方法。本文中,通过在轻度还原条件下孵育后两种单特异性IgG4-或IgG4-样抗体之间的“Fab-臂”或“半分子”交换(重链和结合的轻链的交换(swapping))而形成双特异性抗体。这种Fab-臂交换反应是二硫键的异构化反应的结果,其中还原单特异性抗体的铰链区中的重链间的二硫键,产生的游离半胱氨酸与具有不同特异性的另一种抗体分子的半胱氨酸残基形成新的重链间二硫键。产生的产物是具有序列不同的两个Fab臂的双特异性抗体。

[0611] 在新的发明中,调整这种自然的IgG4 Fab-臂交换的知识以产生生产稳定的基于IgG1的双特异性抗体的方法。通过下面描述的这种方法产生的双特异性抗体产物将不再参与IgG4 Fab-臂交换。这种方法的基础是使用互补的(complimentary)CH3结构域,其在特定测定条件下促进异源二聚体的形成。为了实现通过这种方法生产双特异性抗体,产生在CH3结构域中携带某些突变的IgG1分子:在一种母体IgG1抗体中,T350I,K370T和F405L突变,在另一种母体IgG1抗体中,F405L突变。

[0612] 为了产生双特异性抗体,将这两种母体抗体,每种抗体的最终浓度为0.5mg/mL(等摩尔浓度),与100μL TE总体积中的25mM 2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)在37℃孵育90分钟。根据制造商的方案,当通过使用离心柱(Microcon离心过滤器,30k,Millipore)去除还原剂2-MEA时,还原反应终止。

[0613] 实施例21-在体外κ-定向的ETA'杀死测定中测试HER2×HER2双特异性抗体

[0614] 本实施例显示,在使用κ-定向的假单胞菌-外毒素A(抗-κ-ETA')的通用体外基于细胞的杀死测定中,在内化后,HER2×HER2双特异性抗体可以将细胞毒性剂递送进入肿瘤细胞。该测定使用缀合于假单胞菌-外毒素A的截短形式的高亲和力抗-κ结构域抗体。以前已经报道了抗体结合蛋白(来自链球菌蛋白A或蛋白G的IgG结合基序)和白喉毒素或假单胞菌外毒素A的类似融合蛋白(Mazor Y.等,J.Immunol.Methods 2007;321:41-59);Kuo SR.等,2009Bioconjugate Chem.2009;20:1975-1982)。与抗-κ-ETA'相反,这些分子结合完整抗体的Fc部分。内化和内吞分选(endocytic sorting)后,抗-K-ETA'结构域抗体经历蛋白水解和二硫键还原,使催化结构域与结合结构域分离。然后催化结构域经由KDEL保留基序从高尔基体运送至内质网,随后转位至胞质溶胶,其中它抑制蛋白合成并诱导细胞凋亡(Kreitman RJ.等,BioDrugs 2009;23:1-13)。

[0615] 本实施例中使用的抗-HER2抗体是025、153和169。此外,使用下列序列的完全人单克隆的IgG1,κ抗体005:

[0616] 005:

[0617]	SEQ ID NO:164	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWM GSIYPGDS DTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWTS LKASDTAIYYCAR QRGDYYYFYGMDVWGQGT TTVTVSS
	SEQ ID NO:165	VL 005	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGG GTKVEIK
	SEQ ID NO:166	VH CDR1	GYSFHFYW
	SEQ ID NO:167	VH CDR2	YPGDSDT
	SEQ ID NO:168	VH CDR3	ARQRGDYYYFYGMDV
	SEQ ID NO:169	VL CDR1	QSVSSSY
		VL CDR2	GAS
	SEQ ID NO:170	VL CDR3	QQYGSSLT

[0618] 使用下列抗体作为初始材料:

[0619] IgG1-005-ITL=005IgG1,κ,其在350位具有Ile,在370位具有Thr以及在405位具有Leu

[0620] IgG1-005-K409R=005IgG1,κ,其在409位具有Arg

[0621] IgG1-025-ITL=025IgG1,κ,其在350位具有Ile,在370位具有Thr以及在405位具有Leu

[0622] IgG1-153-ITL=153IgG1,κ,其在350位具有Ile,在370位具有Thr以及在405位具有Leu

[0623] IgG1-153-K409R=153IgG1,κ,其在409位具有Arg

[0624] IgG1-169-K409R=169IgG1,κ,其在409位具有Arg

[0625] 以下面的操作类似地产生下列双特异性抗体。

[0626] IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R

[0627] IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R

[0628] IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R

[0629] IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R

[0630] IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R

[0631] IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R

[0632] 根据实施例20中描述的操作生产双特异性抗体。

[0633] 将包含最终浓度为0.5mg/mL的每种抗体的抗体混合物与100μL TE总体积中的25mM 2-巯基乙胺HCl (2-MEA) 在37℃孵育90分钟。为了终止还原反应,根据制造商的推荐通过使用离心柱(Microcon离心过滤器,30k,Millipore)将样品脱盐而去除还原剂2-MEA。

[0634] 将HER2×HER2双特异性抗体与抗-κ-ETA'预先孵育,然后与A431细胞孵育。A431细胞表达~15,000HER2抗体/细胞(通过Qifi分析确定)并对'裸'HER2抗体处理不敏感。

[0635] 首先,对于每种细胞系测定抗-κ-ETA'的最佳浓度,即,不会导致诱导非特异性的细胞死亡的最大耐受剂量。在96孔组织培养板(Greiner bio-one)中正常细胞培养基中接种A431细胞(2500细胞/孔)并允许粘附至少4小时。这些细胞与正常的细胞培养基中100,10,1,0.1,0.01,0.001和0μg/mL抗-κ-ETA'系列稀释液孵育。3天后,根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International, San Francisco, US)定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Finland) 监测荧光。使用不能自身杀死细胞的最高浓度的抗-κ-ETA' (对于A431细胞为1μg/mL) 用于下列实验。

[0636] 接下来,测试与抗-κ-ETA'预先孵育的HER2×HER2双特异性抗体和HER2单特异性抗体的效果以分析它们诱导细胞杀死的能力。如上所述接种A431细胞。制备HER2特异性抗体的稀释系列(单特异性和双特异性抗体)并与预定浓度的抗-κ-ETA'预先孵育30分钟,然后将它们加入细胞。在37℃孵育3天后,如上所述定量活细胞的量。将与抗体预先孵育的抗-κ-ETA'处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相比于在没有抗体处理的情况下处理的细胞的百分比。使用GraphPad Prism 5软件计算EC<sub>50</sub>值和最大的细胞死亡。使用星形孢菌素(23.4μg/mL)作为细胞杀死的阳性对照。使用同种型对照抗体(IgG1/κ; IgG1-3G8-QITL)作为阴性对照。

[0637] 图9和表9显示,所有与HER2双特异性抗体预先孵育的抗-κ-ETA'都能够以剂量依赖的方式杀死A431细胞。这些结果表明,在抗-κ-ETA'测定中,大多数测试的HER2双特异性抗体比组合中存在的单特异性抗体更有效。此外,双特异性抗体005×169,025×169和153×169的效力显示,可以通过与另一种HER2特异性抗体的双特异性组合增加在这种体外κ-定向的ETA'杀死中缺乏活性的单特异性抗体,HER2特异性抗体(169)的效力。

[0638] 表9:以抗-κ-ETA'缀合的HER2×HER2双特异性抗体处理的AU565细胞的EC<sub>50</sub>值和最大百分比细胞杀死。“Ndet”意味着未检测到。

[0639]

抗体	百分比杀死	EC50 [ng/mL]
Herceptin	2.79	Ndet
IgG1-005-ITL	79.34	2.57
IgG1-005-K409R	79.83	2.87
IgG1-025-ITL	69.81	3.76
IgG1-153-ITL	70.66	12.45
IgG1-153-K409R	72.84	15.47

IgG1-169-K409R	16.45	3.45
IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R	59.94	4.28
IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R	63.45	4.27
IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R	80.82	7.66
IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R	45.88	7.97
IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R	80.05	4.51
IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R	84.68	29.14

[0640] 实施例22-通过与针对不同HER2表位的双特异性抗体的孵育下调HER2受体

[0641] HER2×HER2双特异性抗体可以结合两个空间上不同的HER2受体上的两个不同的表位。这允许其他HER2×HER2双特异性抗体结合这些受体上的剩余的表位。这可以导致多价受体交联(与通过单价抗体诱导的二聚化相比),并因此增强受体下调。为了研究HER2×HER2双特异性抗体是否诱导HER2的增强的下调,将AU565细胞与抗体和双特异性抗体孵育3天。测定HER2的总水平和抗体结合的HER2的水平。

[0642] 将AU565细胞接种于24孔组织培养板(100,000细胞/孔)中的正常细胞培养基中,并在10μg/mL具有ITL或K409R突变的HER2抗体或HER2×HER2双特异性抗体存在的情况下在37℃培养3天。作为对照,还测试了终浓度为10μg/mL的两种具有未修饰的IgG1骨架的单特异性HER2抗体的组合(1:1)。用PBS洗涤后,通过在室温下用25μL Surefire裂解缓冲液(Perkin Elmer,Turku,Finland)孵育细胞30min而裂解细胞。根据制造商的方案使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂(Pierce)定量总蛋白水平。使用HER2特异性夹心ELISA分析裂解物中的HER2蛋白水平。使用兔-抗-人HER2胞内结构域抗体(Cell Signaling)来捕获HER2,使用生物素化的山羊-抗人HER2多克隆抗体R&D systems,Minneapolis,USA)以及随后的链霉亲和素-聚-HRP来检测结合的HER2。使用2,2'-连氮基-双3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(在50ml ABTS缓冲液中稀释的ABTS片剂[Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands])使反应可视化并用草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands)终止。在微量滴定板读数器(Biotek Instruments,Winooski,USA)上测定405nm处的荧光,HER2的量表示为相对于未处理的细胞的百分比。

[0643] 结果如图10和表10中所示,其中显示了所有测试的HER2×HER2双特异性抗体诱导≥40%的HER2下调。有趣的是,所有HER2×HER2双特异性抗体显示了与它们的单特异性对应物相比的增加的HER2下调。

[0644] 表10:表示为与未处理的细胞相比的百分比HER2的HER2×HER2双特异性诱导的HER2的下调。

抗体	与未处理的细胞相比的HER2的%
Herceptin	71
IgG1-005-ITL	54
IgG1-005-K409R	50
IgG1-025-ITL	64
IgG1-153-ITL	43
IgG1-153-K409R	40
IgG1-169-K409R	64

IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R	29
IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R	38
IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R	29
IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R	34
IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R	23
IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R	28
IgG1-005+IgG1-169	28
IgG1-025+IgG1-005	28
IgG1-025+IgG1-153	23
IgG1-025+IgG1-169	25
IgG1-153+IgG1-005	23
IgG1-153+IgG1-169	23
同种型对照	108

[0646] 实施例23-通过共聚焦显微镜分析HER2×HER2双特异性抗体与溶酶体标记LAMP1的共定位

[0647] 如实施例22中描述的HER2下调测定表明,HER2×HER2双特异性抗体能够增加HER2的溶酶体降解。为了验证这些发现,应用共聚焦显微镜技术。使AU565细胞在玻璃盖玻片(厚度为1.5微米,Thermo Fisher Scientific,Braunschweig,Germany)上的标准组织培养基中在37℃生长3天。将细胞与50μg/mL亮抑酶肽(Sigma)预先孵育1小时以阻断溶酶体活性,其后加入10μg/mL HER2单特异性抗体或HER2×HER2双特异性抗体。还测试了终浓度为10μg/mL的两种单特异性IgG1抗体的组合(1:1)。将细胞在37℃孵育额外的3或18小时。此后用PBS洗涤细胞,用4%甲醛(Klinipath)在室温孵育30分钟。用封闭缓冲液(补充0.1%皂苷[Roche]和2%BSA[Roche]的PBS)洗涤载玻片,用包含20mM NH<sub>4</sub>Cl的封闭缓冲液孵育20分钟以淬灭甲醛。用封闭缓冲液再次洗涤载玻片,与小鼠-抗-人CD107a(LAMP1)(BD Pharmingen)在室温孵育45min以染色/鉴别溶酶体。用封闭缓冲液洗涤之后,用二级抗体;山羊-抗-小鼠IgG-Cy5(Jackson)和山羊-抗-人IgG-FITC(Jackson)的鸡尾酒在室温孵育玻片30min。用封闭缓冲液再次洗涤玻片,用20μL封固介质(将6克甘油[Sigma]和2.4克Mowiol 4-88[Omnilabo]溶解于6mL蒸馏水中,其中加入12mL 0.2M Tris[Sigma]pH8.5,随后在50-60℃孵育10分钟。将封固介质等分并存储在-20℃)在显微玻片上封固过夜。用配备63×1.32-0.6浸油物镜和LAS-AF软件的Leica SPE-II激光共聚焦显微镜(Leica Microsystems)对玻片成像。为了允许定量重叠的像素强度,应该避免像素的饱和。因此,将FITC激光强度下降至10%,将smart gain设置在830V,将smart offset设置在-9.48%。通过使用这些设置,在没有像素饱和的情况下清晰地显示双特异性抗体,但是单特异性抗体有时难以检测。为了比较单特异性和双特异性抗体之间的溶酶体共定位,对于所有分析的共聚焦玻片将这些设置保持相同。

[0648] 使用MetaMorph<sup>®</sup>次件(版本Meta Series 6.1,Molecular Devices Inc,Sunnyvale California,USA)对12位灰度TIFF图像分析共定位。将FITC和Cy5图像作为堆栈(stacks)导入,减去背景。对于所有FITC图像和所有Cy5图像使用相同的阈值设置(手动设定)。共定位表示为在重叠区域(ROI)中的FITC像素强度,其中ROI由所有Cy5阳性区域构成。

为了比较用数种HER2抗体、HER2 x HER2双特异性抗体或两种不同的单特异性抗体的组合染色的不同的玻片,用Cy5的像素强度对图像进行归一化。使用山羊-抗-小鼠IgG-Cy5来染色溶酶体标记LAMP1 (CD107a)。在测试的各种HER2抗体或HER2 x HER2双特异性抗体之间的LAMP1的像素强度不应该不同(一个细胞具有约200.000的Cy5像素强度)。

[0649] 对于FITC和Cy5的共定位的均一化的值=

[0650] 
$$[(TPI-FITC \times \text{百分比FITC-Cy5共定位}) / 100] \times [200.000 / TPI-Cy5]$$

[0651] 在此公式中,TPI代表总的像素强度。

[0652] 图11和表11表示通过与Cy5重叠的FITC像素强度测定的各种单特异性HER2抗体和HER2 x HER2双特异性抗体的活细胞的百分比。对于表示的每种抗体或双特异性分子,从一个玻片分析三个不同的包含~1、3或>5个细胞的图像。在每个玻片内的不同图像之间观察到显著的差异。然而,显然,当与所有HER2 x HER2双特异性抗体的单特异性对应物相比时,所有HER2 x HER2双特异性抗体显示出与溶酶体标记LAMP1的共定位。这些结果表明,一旦内化,HER2 x HER2双特异性抗体有效地向溶酶体区室分选,使它们适合用于双特异性抗体药物缀合方法。

[0653] 表11:描述为任意单位的与Cy5重叠的平均FITC像素强度

抗体	溶酶体中的FITC像素强度[任意单位]
Herceptin	0.218
IgG1-005-ITL	0.070
IgG1-025-ITL	0.268
IgG1-153-ITL	0.102
IgG1-169-K409R	0.220
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	0.531
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	0.347
IgG1-025-ITL x IgG1-153-κ409R	0.582
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	0.439
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	0.494
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	0.604
IgG1-025+IgG1-169	0.576
IgG1-153+IgG1-005	0.636
IgG1-153+IgG1-169	0.626

[0655] 实施例24-与HER2单特异性或HER2 x HER2双特异性抗体孵育后,AU565细胞的增殖的抑制

[0656] 测试HER2 x HER2双特异性抗体体外抑制AU565细胞的增殖的能力。由于AU565细胞上的高HER2表达水平(用Qifi-试剂盒测定的~1.000.000拷贝/细胞),HER2在这些细胞中具有组成型活性,因此不依赖于配体诱导的异源二聚化。在96孔组织培养板(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)中,在10μg/mL HER2抗体或HER2 x HER2双特异性抗体存在的情况下在无血清的细胞培养基中每孔接种9.000AU565细胞。作为对照,在没有抗体或双特异性抗体的情况下在无血清的培养基中接种细胞。3天后,根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International, San Francisco, US)定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设

置使用EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Finland) 监测荧光。将抗体处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相对于未处理的细胞的百分比。

[0657] 图12和表12描述了在与HER2抗体和HER2×HER2双特异性抗体孵育之后AU565细胞的阿尔玛蓝的荧光强度。包括 **Herceptin®** (曲妥珠单抗) 作为阳性对照, 显示出如 Juntilla TT. 等, Cancer Cell 2009;15:429-440中所述的增殖的抑制。所有HER2×HER2双特异性抗体能够抑制AU565细胞的增殖。双特异性抗体: 在该测定中, 与单特异性抗体对应物相比, IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R和IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R更有效。

[0658] 表12: 在HER2×HER2双特异性抗体处理之后的百分比活AU565细胞。

抗体	百分比活的细胞
Herceptin	62
IgG1-005-ITL	91
IgG1-005-K409R	96
IgG1-025-ITL	79
IgG1-153-ITL	98
IgG1-153-K409R	97
IgG1-169-K409R	63
IgG1-005-ITL×IgG1-169-K409R	49
IgG1-025-ITL×IgG1-005-K409R	61
IgG1-025-ITL×IgG1-153-K409R	74
IgG1-025-ITL×IgG1-169-K409R	76
IgG1-153-ITL×IgG1-005-K409R	71
IgG1-153-ITL×IgG1-169-K409R	77
同种型对照	95

[0660] 实施例25-在体外细胞毒性测定中测试Her2×CD3双特异性抗体

[0661] CD3是成熟T细胞上表达的T细胞受体复合物中的共受体。双特异性抗体中CD3特异性抗体Fab-臂与肿瘤抗原特异性抗体Fab-臂的组合会导致T细胞特异性靶向至肿瘤细胞, 导致T细胞介导的肿瘤细胞裂解。同样, CD3阳性T细胞可以靶向至体内其他出轨的 (derailed) 细胞, 靶向至被感染的细胞, 或直接靶向至病原体。

[0662] 产生HER2×CD3双特异性抗体。对于HER2特异性Fab-臂的重链和轻链可变区序列如实施例21中对于抗体153和169所述指明的。使用下列CD3特异性Fab-臂的重链和轻链可变区序列:

[0663] YTH12.5 (Routledge等, Eur J Immunol. 1991, 21 (11) : 2717-25所述的序列)

[0664]	SEQ ID NO: 171	VH YTH12.5	EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTI STSGGRITYYRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYS GGFDYWGGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 172	VL YTH12.5	DIQLTQPN SVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDD DKRPDGV PDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFN VFGGGT KLTVL

[0665] huCLB-T3/4 (Parren等, Res Immunol. 1991, 142 (9) : 749-63所述的序列。引入较少

的氨基酸取代使序列类似于最接近的人种系。)

[0666]	SEQ ID NO: 173	VH huCLB- T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAT ISRYSRYYIPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO: 174	VL huCLB- T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTSK LASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYCFQSGGYPLTFGSGTKLEM R

[0667] 如下将所有抗体表示为在它们的Fc区被修饰的IgG1, κ: IgG1-HER2-153-K409R和IgG1-HER2-153-N297Q-K409R, IgG1-HER2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L和IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L和IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L。

[0668] 如实施例20中所述从这些HER2和CD3特异性抗体产生双特异性抗体并使用AU565细胞在体外细胞毒性测定中测试。培养AU565细胞至接近汇合。用PBS两次洗涤细胞,在37℃胰蛋白酶消化5分钟。加入12mL培养基以失活胰蛋白酶,800rpm 5 min离下细胞。细胞重悬浮于10mL培养基,通过将细胞传递通过细胞过滤器而制备单细胞悬浮液。将100μL  $5 \times 10^5$  细胞/mL悬浮液加入96孔培养板的每个孔中,在37℃,5%CO<sub>2</sub>培养细胞至少3小时以允许粘附至板。根据制造商的方案(Greiner Bio-one)使用Leucosep 30mL管从健康志愿者的血液分离外周血单核细胞(PBMC)。使用Untouched Human T-cells Dynabead试剂盒(Dynal)通过阴性选择从PBMC制备物分离T细胞。将分离的细胞重悬浮于培养基中至终浓度为约 $7 \times 10^6$  细胞/mL。

[0669] 从粘附的AU565细胞除去培养基,用50μL/孔2x浓缩的抗体稀释液和50μL/孔 $7 \times 10^6$  T细胞/mL替代(效应物:目标比例=7:1)。平板在37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育3天。除去上清液,用PBS洗涤平板两次。将150μL培养基和15μL阿尔玛蓝溶液加入每个孔中。平板在37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育4天并测定吸光度(Envision, Perkin Elmer)。

[0670] 图13和表13显示,尽管对照抗体(HER2单特异性的IgG1-Herceptin<sup>®</sup>, CD3单特异性的IgG1-YTH12.5和单特异性的IgG1-huCLB-T3/4,不相关的抗原单特异性IgG1-b12和CD3×b12双特异性抗体)没有诱导T细胞介导的细胞毒性,双特异性(Duo) Her2×CD3抗体 huCLB/Her2-153、huCLB/Her2-169、YTH12.5/Her2-153和YTH12.5/Her2-169诱导了AU565细胞的剂量依赖性的T细胞介导的细胞毒性。包含Her2-169的双特异性抗体比包含Her2-153的那些抗体更有效。

[0671] 制备包含N297Q突变的IgG1-hu-CLB-T3/4、IgG1-YTH12.5和Her2-153的突变体以除去糖基化位点;在该位点的糖基化对于IgG-Fc γ受体相互作用是关键的(Bolt S等, Eur J Immunol 1993, 23:403-411)。图13显示, Her2×CD3双特异性抗体YTH12.5/Her2-153和 huCLB/Her2-153的N297Q突变和因此不存在Fc糖基化不影响诱导AU565细胞的剂量依赖性T细胞介导的细胞毒性的能力。

[0672] 表13: HER2×CD3双特异性抗体诱导的细胞杀死的EC<sub>50</sub>值。“Ndet”意味着未检测到。

[0673]	抗体	EC50 [ng/mL]
	Herceptin	Ndet
	Duo huCLB-Q/153-Q	10.55



Duo huCLB-Q/B12-Q	Ndet
huCLB-Q	Ndet
B12-Q	Ndet
Duo YTH12.5-Q/153-Q	10.73
Duo YTH12.5-Q/B12-Q	Ndet
YTH12.5-Q	Ndet
B12-Q	Ndet

[0674] 实施例26-HER2下调

[0675] 为了研究第3组抗体098和153诱导的增强的HER2内化是否也导致增强的受体下调,将AU565细胞与HER2抗体孵育3天并分析HER2的存在。将AU565细胞接种于24孔组织培养板(100,000细胞/孔)中的正常细胞培养基中,并在10 $\mu$ g/mL HER2抗体存在的情况下在37 $^{\circ}$ C培养3天。用PBS洗涤后,通过在室温下用25 $\mu$ L Surefire裂解缓冲液(Perkin Elmer,Turku,Finland)孵育30min而裂解细胞。根据制造商的方案使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂(Pierce)定量总蛋白水平。使用HER2特异性夹心ELISA分析裂解物中的HER2蛋白水平。使用兔-抗-人HER2胞内结构域抗体(Cell Signaling)来捕获HER2,使用生物素化的山羊-抗-人HER2多克隆抗体(R&D)以及随后的链霉亲和素-聚-HRP来检测结合的HER2。使用2,2'-连氮基-双3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS;在50ml ABTS缓冲液中稀释ABTS片剂[Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands])使反应可视化并用草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands)终止。在微量滴定板读数器(Biotek Instruments,Winooski,USA)上测定405nm处的荧光,HER2的量表示为相对于未处理的细胞的百分比。

[0676] 图14和表14中所示的结果表明,两种第3组抗体(098和153)都诱导了超过50%的HER2下调。与此相反,抗体025、169和Herceptin勉强地诱导了下调(未处理的细胞的约20%)。这与抗体098和153观察到的增强的内化相一致。

[0677] 表14:表示为与未处理的细胞相比的百分比HER2的抗体诱导的HER2的下调。

抗体	与未处理的细胞相比的HER2的%
Herceptin	80
IgG1-1014-169	82
IgG1-1014-025	85
IgG1-1014-098	44
IgG1-1014-153	50
同种型对照	108

[0679] 实施例27-通过共聚焦显微镜分析HER2抗体与溶酶体标记LAMP1的共定位

[0680] 实施例26中所述的HER2下调和实施例19中所述的基于CypHer-5E的内化测定表明,与来自第1和2组的抗体相比,第3组的HER2抗体更有效地内化并靶向至溶酶体。然而,在这些实验中,进行共聚焦成像,其设置允许区分单特异性和双特异性抗体,但不能区分不同的单特异性抗体,事实上,使用这些设置,几乎不能检测单特异性抗体。为了能够在不同的单特异性抗体之间比较,使用增加的增益设置(increased gain)再次测定共聚焦玻片以增加荧光强度。该操作的所有步骤都是和实施例23中所述的相同。

[0681] 结果如图15和表15中所示,其显示了对于各种单特异性HER2抗体的与Cy5重叠的

FITC像素强度。分析每个玻片中包含~1、3或>5个细胞的三个不同的图像。在每个玻片内的不同图像之间观察到显著的差异。仍然显然的是,与025、帕妥珠单抗、169和Herceptin相比,抗体098和153更有效地靶向至溶酶体区室。这与这些抗体诱导的增强的内化和受体降解很好地相关。

[0682] 表15:描述为任意单位的与Cy5重叠的平均FITC像素强度

[0683]	抗体	溶酶体中的FITC像素强度[任意单位]
	TH1014-098	0.522
	TH1014-153	0.409
	TH1014-025	0.248
	TH1014-pert	0.214
	TH1014-169	0.255
	Herceptin	0.236

[0684] 实施例28-HER2胞外结构域改组,人至鸡

[0685] 为了进一步定义来自四个不同的交叉竞争组的抗体识别的HER2结合区域,进行HER2胞外结构域改组实验(extracellular domain shuffle experiment)。为此,产生具有5个构建体的小基因合成文库,将人HER2的胞外结构域的结构域I、II、III或IV的序列交换至鸡HER2的对应序列(原鸡属原鸡同种型B NCBI:NP\_001038126.1):1)完整的人HER2(Uniprot P04626),以下命名为hu-HER2,2)具有鸡结构域I的hu-HER2(用对应的鸡Her2区域替换人Her2的氨基酸(aa)1-203),以下命名为hu-HER2-ch(I),3)具有鸡结构域II的hu-HER2(用对应的鸡Her2区域替换人Her2的氨基酸(aa)204-330),以下命名为hu-HER2-ch(II),4)具有鸡结构域III的hu-HER2(用对应的鸡Her2区域替换人Her2的aa331-507),以下命名为hu-HER2-ch(III),5)具有鸡结构域IV的hu-HER2(用对应的鸡Her2区域替换人Her2的aa508-651),以下命名为hu-HER2-ch(IV)。人和鸡HER2直向同源物(orthologs)显示它们的胞外结构域中67%同源性,其中结构域I中62%同源性,结构域II中72%同源性,结构域III中63%同源性以及结构域IV中68%同源性。根据制造商的说明书,使用Freestyle MAX转染试剂(Invitrogen)将构建体瞬时转染进Freestyle™ CHO-S(Invitrogen)细胞系,培养转染的细胞20小时。通过流式细胞仪分析HER2抗体与转染的细胞的结合:收获转染的CHO-S细胞,用FACS缓冲液洗涤,并用10μg/mL HER2抗体孵育(在冰上30分钟)。使用藻红蛋白(PE)-缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson)检测HER2抗体的结合。为了检查不同批次之间的表达是否相同,固定细胞并根据制造商的说明书用Cytotfix/Cytoperm溶液(BD)通透,使用与兔-抗-人胞内HER2抗体(DAKO)组合的二级的PE-缀合的山羊-抗-兔抗体(Jackson)染色。使用同种型对照抗体作为阴性对照。在FACSCanto-II(BD)上测定荧光,使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S型剂量-应答)制作结合曲线。使用结合的损失作为读出,以鉴别不同的抗体识别哪些HER2结构域。

[0686] 抗体153的示例性结合曲线如图16中所示。所有的结合结果如表16中所示。第1组HER2抗体050、084、169和Herceptin显示与Hu-HER2-ch(IV)的结合的损失,但没有显示与具有剩余的改组的结构域之一的蛋白的结合的损失,表明第1组mAbs的表位位于HER2结构域IV中。第2组抗体025、091、129和帕妥珠单抗仅显示与Hu-HER2-ch(II)的结合的损失,表明

表位位于HER2结构域II中。抗体098和153在交叉竞争中都被定义至第3组,但是在改组实验中却显示一些变化。抗体098清楚地显示与Hu-HER2-ch (I) 的结合的损失以及与Hu-HER2-ch (II) 的结合的轻微下降,而153仅显示与Hu-HER2-ch (II) 的结合的损失。这些数据提示,第3组mAbs 098和153也可以,至少部分地,与HER2结构域II结合,该结构域具有可能延伸至HER2结构域I的表位,正如098的情况一样。

[0687] 表16:HER2抗体与不同的HER2ECD受体构建体的结合的总结。FL;hu-HER2,I;hu-HER2-ch (I),II;hu-HER2-ch (II),III;hu-HER2-ch (III),IV;hu-HER2-ch (IV)。+++表示正常结合,++表示与hu-HER2观察的结合相比降低的 $EC_{50}$ 但相似的最大结合,+表示与hu-HER2观察的结合相比降低的 $EC_{50}$ 和降低的最大结合,-表示没有结合。

抗体	组	改组的HER2结构域				
		FL	I	II	III	IV
Herceptin	1	+++	+++	+++	+++	-
050	1	+++	+++	+++	+++	-
084	1	+++	+++	+++	+++	-
169	1	+++	+++	+++	+++	+
帕妥珠单抗	2	+++	+++	+	+++	+++
025	2	+++	+++	-	+++	+++
091	2	+++	+++	-	+++	+++
129	2	+++	+++	-	+++	+++
153	3	+++	+++	-	+++	+++
098	3	+++	-	++	+++	+++

[0689] 实施例29-在SCID小鼠中的NCI-N87人胃癌异种移植物中HER2 HuMabs 091、084和169的体内效力

[0690] 测定HER2-HuMabs 091 (交叉竞争组2)、084和169 (都是交叉竞争组1) 对雌性CB.17严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中的NCI-N87人胃癌异种移植物模型中肿瘤生长和生存的体内作用。将在50%基质胶中的 $10 \times 10^6$  NCI-N87肿瘤细胞s.c注射进雌性SCID小鼠,每组10只小鼠。肿瘤接种后8天,开始用HER2-HuMabs 091、084和169或对照抗体HuMab-HepC的静脉处理。在图17 (A) 中,这表示为第1天,即处理开始的当天。首次剂量为40mg/kg,随后在处理开始后4、8、11、15、18、22和25天为10mg/kg。

[0691] 每周至少2次测定肿瘤体积。从卡尺 (PLEXX) 测量值计算体积 ( $mm^3$ ): (宽度<sup>2</sup> × 长度) / 2。结果如图17A和17B中所示,这表明,与接受阴性对照抗体HuMab-HEPC的小鼠相比, HuMab 084、169和091施用的小鼠显示更慢的肿瘤生长 (A) 和更好的生存 (B)。所有处理都耐受性良好。

[0692] 实施例30-Balb/C裸鼠中的BT-474乳腺肿瘤异种移植物的治疗性处理

[0693] 测定五种不同的HER2 HuMabs的治疗性处理对Balb/C裸鼠中的人皮下的BT-474乳腺肿瘤异种移植物的影响。用 $\gamma$ -源 (1.8Gy, Co60, BioMep, France) 的全身辐射后24-72小时注射BT-474肿瘤细胞。将200 $\mu$ l包含基质胶的RPMI 1640 (50:50, v:v; BD Biosciences) 中的 $2 \times 10^7$  BT-474细胞皮下注入雌性Balb/C裸鼠的右侧。每周两次记录小鼠的体重和肿瘤体积。从卡尺 (PLEXX) 测量值计算肿瘤体积 ( $mm^3$ ): (宽度<sup>2</sup> × 长度) / 2。

[0694] 当肿瘤达到100-200mm<sup>3</sup>的平均体积时,开始用HER2 HuMabs处理。将具有肿瘤的小鼠随机化进8只小鼠的组中。一组接受对照mAb HuMab-HepC的每周两次的静脉内(i.v.)注射。其他四组接受HER2HuMab 025、129、153和091的每周两次的i.v.注射,首次剂量为20mg/kg,随后9次剂量为5mg/kg。

[0695] 结果如图18A和18B中所示,其显示,用HuMab 129和HuMab 153处理部分抑制了BT-474肿瘤生长(与HuMab-HepC对照处理相比约30和50%的抑制)。HuMab-025和HuMab-091强烈抑制BT-474肿瘤生长,这些抗体显著延迟了达到800mm<sup>3</sup>的肿瘤体积的时间。在接受HER2HuMAb的小鼠中也改善了生存。

## 序列表

&lt;110&gt; Genmab A/S

&lt;120&gt; 针对HER2的单克隆抗体

&lt;130&gt; P/62.W0

&lt;160&gt; 174

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
           50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
           100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 2

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
1           5

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 3

Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr

1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 4

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 6

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 7

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 8

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 10

Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr

1 5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 11

Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 13

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 14

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr



1 5  
 <210> 15  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 15  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Arg Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val Asn His Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 16  
 Gly Gly Thr Phe Arg Thr Tyr Ala  
 1 5  
 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 17  
 Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val  
 1 5  
 <210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 18

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val

1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 20

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 21

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 22

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr  
                     20                      25                      30  
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                     50                      55                      60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                     85                      90                      95  
 Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Gln  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 23

Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr  
 1                      5

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 24

Ile His His Ser Gly Ser Thr  
 1                      5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 25

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1	5	10
<210> 26		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 26		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp		
	20	25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
	35	40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile		
	85	90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
	100	105
<210> 27		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 27		
Gln Gly Ile Ser Arg Trp		
1	5	
<210> 28		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 28		
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile Thr		
1	5	
<210> 29		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 29		

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                     20                      25                      30  
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                     50                      55                      60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Lys Leu Tyr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                     85                      90                      95  
 Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr  
 1                      5

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Ala Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr  
 1                      5                      10

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
                     20                      25                      30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 36  
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Ala  
 1 5  
 <210> 37  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 37  
 Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys  
 1 5  
 <210> 38  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 38  
 Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Ala Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 39  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Trp Thr		80
	85	90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105
<210> 40		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 40		
Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
1	5	
<210> 41		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 41		
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Trp Thr		
1	5	
<210> 42		
<211> 123		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 42		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Tyr		15
	20	25
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		30
	35	40
Gly Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe		45
50	55	60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu		95



	100		105		110
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	43				
<211>	8				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	43				
Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Tyr Trp					
1		5			
<210>	44				
<211>	8				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	44				
Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Ile					
1		5			
<210>	45				
<211>	16				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	45				
Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu					
1		5		10	15
<210>	46				
<211>	107				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	46				
Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr Gly					
1		5		10	15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Gln Ser					
65		70		75	80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 47  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 47  
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 48  
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 49  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 49  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Trp Gly Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Phe Asn Trp  
 100 105 110  
 Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 50

Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 51

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr

1 5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 52

Ala Arg Trp Gly Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Phe Asn

1 5 10 15

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
<210> 54	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 54	
Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
1 5	
<210> 55	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 55	
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Trp Thr	
1 5	
<210> 56	
<211> 124	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 56	
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Trp	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Lys Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp	
100 105 110	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	
<210> 57	
<211> 8	
<212> PRT	

<213> 智人

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Ile Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Thr

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

Ala Lys Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 61

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 61  
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 1 5  
 <210> 62  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 62  
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 63  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 63  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Ser Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 64  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 66

Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

&lt;400&gt; 68

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 69

Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Ile Thr

1 5

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Ser Asn Tyr Val Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Thr Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1 5

&lt;210&gt; 72



<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Ser

1 5

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Ala Arg Glu Tyr Ser Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 74

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5  
 <210> 76  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 76  
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr  
 1 5 10  
 <210> 77  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 77  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 78  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 78  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
100	105	

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 79

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp		
20	25	30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 81

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 81

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

	20		25		30										
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35						40				45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Ile
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
	100							105							

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 83

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25				30			
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
	35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Thr	Thr	Tyr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asp	Arg	Val	Val	Val	Arg	Pro	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
	115						120								

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 84

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser His Trp Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 86

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 87

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Ile Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe			
	50	55	60
Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Arg Ile Ile Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 88

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55				60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 89

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1			5				10						15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
			20				25					30			
Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
			50				55				60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75				80	
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg
			100					105					110		
Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人



&lt;400&gt; 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
                     20                      25                      30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
                     35                      40                      45  
 Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                     50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Ser Phe Pro Ile  
                     85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
                     100                      105

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 91

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                     20                      25                      30  
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Met  
                     50                      55                      60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                     85                      90                      95  
 Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 93

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile His His Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 94

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp
			20					25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
			35				40							45	
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Ile
				85						90					95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100							105					

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 95

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10						15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40							45	
Gly	Glu	Ile	His	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
			50				55					60			
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85						90					95
Arg	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Gly	Val	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100							105					110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 96

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
           100           105

```

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 97

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
           20           25           30
Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
           50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
           85           90           95
Arg Gly Leu Ile Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Asp Gln
           100           105           110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115           120

```

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 98

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
           100           105

```

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 99

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
           20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr
           50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
           85           90           95
Arg Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
           100           105           110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

```

	115		120
<210>	100		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	100		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Thr Phe Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	101		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	101		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Leu Phe Tyr Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 102

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Thr Phe Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 103

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 103

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Leu Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 104			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 104			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp			
20	25	30	
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 105			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 105			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
50	55	60	
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	



Arg Leu Trp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 106

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 107

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 107

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

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

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Tyr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

				85					90					95			
Arg	Leu	Tyr	Phe	Gly	Ser	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
				100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115					120								
<210>	108																
<211>	107																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<400>	108																
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp		
				20					25					30			
Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile		
				35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
				50					55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65						70				75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Phe	Pro	Pro		
						85				90					95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
				100					105								
<210>	109																
<211>	124																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<400>	109																
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr		
				20					25					30			
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
				35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
				50					55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Trp		
65						70				75					80		

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 110  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 110  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 111  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 111  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Thr Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Lys Ala His Tyr Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr	Leu Phe Asp		
	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	112		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	112		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	113		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	113		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Gly His Thr Leu Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 114  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 114  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 115  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 115  
 Glu Val Gln Leu Trp Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60															
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90						95		
Ala	Lys	Gly	Tyr	Tyr	His	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Phe	Asp		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115						120										
<210>	116																
<211>	107																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<400>	116																
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp		
			20					25					30				
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile		
			35				40					45					
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50						55			60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu		
				85					90						95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
			100					105									
<210>	117																
<211>	121																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<400>	117																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Thr	Gly	Arg		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	His		
			20						25				30				
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
			35				40						45				

Ala	Ala	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
50						55						60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								
<210>	118														
<211>	107														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	118														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
		20						25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Ile
			85						90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
		100						105							
<210>	119														
<211>	121														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	119														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1			5						10				15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	His
		20							25				30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

35	40	45
Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Met Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Cys Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210>	120	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	120	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210>	121	
<211>	121	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	121	
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30



Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Gly Ser Ile Ile Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly		
	100	105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120
<210>	122	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	122	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp		
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
	35	40
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile		
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
	100	105
<210>	123	
<211>	121	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	123	
Gln Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		

	20						25						30					
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
	35						40					45						
Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
	50						55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
65					70					75					80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
			85						90					95				
Ala	Arg	Gly	Ser	Ile	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly			
	100						105					110						
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
	115						120											
<210>	124																	
<211>	107																	
<212>	PRT																	
<213>	智人																	
<400>	124																	
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly			
1				5				10					15					
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Asn	Ser	Trp			
	20						25					30						
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile			
	35						40					45						
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly			
	50						55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asn	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Ile			
			85						90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys								
	100						105											
<210>	125																	
<211>	121																	
<212>	PRT																	
<213>	智人																	
<400>	125																	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg			
1				5				10					15					

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 126

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Arg或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Thr或Ser  
<400> 127  
Ile Ser Gly Xaa Gly Gly Xaa Thr  
1 5  
<210> 128  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Arg或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Thr或Ser  
<400> 128  
Gly Gly Thr Phe Xaa Xaa Tyr Ala  
1 5  
<210> 129  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2) .. (2)  
<223> Xaa是Asn或Ile  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Thr或Pro  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)

<223> Xaa是Val或Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Val或Ala

<400> 129

Ile Xaa Xaa Xaa Leu Gly Ile Xaa

1 5

<210> 130

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa是Ile或Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa是Glu或Asp

<400> 130

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Xaa Xaa

1 5 10

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是Asn或Ser

<400> 131

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly

1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa是Ser, Thr或Ile  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa是Ala或Thr  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa是Ser或Asn  
 <400> 132  
 Ile Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Asn Thr  
 1 5  
 <210> 133  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa是Ile或Val  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa是Ile或Val  
 <400> 133  
 Ala Arg Asp Arg Xaa Xaa Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 134  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa是Asp或Gly  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Tyr或Phe  
<400> 134  
Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Xaa  
1 5  
<210> 135  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2) .. (2)  
<223> Xaa是His或Asn  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ser或Val  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Thr或Ala  
<400> 135  
Ile Xaa His Xaa Gly Ser Xaa  
1 5  
<210> 136  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Tyr, Asn或Leu  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Tyr或Ile  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是Asp, Gly或Ala  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> Xaa是Val或Tyr  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14) .. (14)  
 <223> Xaa是Tyr或Leu  
 <400> 136  
 Ala Arg Gly Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Tyr Tyr Phe Asp Xaa  
 1 5 10  
 <210> 137  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa是Gly或Asp  
 <400> 137  
 Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Tyr  
 1 5  
 <210> 138  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa是Tyr, Asn或His  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa是Asp或Ser  
 <400> 138  
 Ile Xaa His Ser Gly Xaa Thr  
 1 5  
 <210> 139



<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa是Tyr, Phe或Trp  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa是Tyr或 Phe  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> Xaa是Ile, Thr或Ser  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Xaa是Leu或Phe  
 <400> 139  
 Ala Arg Leu Xaa Xaa Gly Ser Gly Xaa Tyr Tyr Xaa Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 140  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa是Thr或Phe  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa是Phe或Tyr  
 <400> 140  
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Ala  
 1 5  
 <210> 141  
 <211> 8

<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Gly或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是His或Asn  
<400> 141  
Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Xaa Lys  
1 5  
<210> 142  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa是Ala或Tyr  
<400> 142  
Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Xaa Phe Asp Tyr  
1 5 10  
<210> 143  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Ser, Asn或Thr  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Asn, Asp或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Gly或Ala  
<400> 143  
Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa  
1 5  
<210> 144  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ser或Thr  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Ala或Gly  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Tyr或Gly  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Ser或Ala  
<400> 144  
Ile Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr  
1 5  
<210> 145  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Ala或Gly  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是His或Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa是Tyr或Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是His, Phe或Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa是Leu或Ser

<400> 145

Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Xaa Phe Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa是Ser或Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是Ile或Ser

<400> 146

Gly Tyr Ser Phe Xaa Xaa Tyr Trp

1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa是Phe或Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Ile或Thr

<400> 147

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Asp Xaa

1 5

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 148

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa是Asn或Ser

<400> 149

Gly Tyr Xaa Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Ser或Thr

<400> 150

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Xaa

1 5

<210> 151

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 151

Ala Arg Glu Tyr Ser Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是Asp或Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa是Tyr或His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Val或Ala

<400> 152

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa是Asn或Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa是Lys或Glu

<400> 153

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Xaa

1 5

<210> 154  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Gly, Asp或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Ile或Tyr  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Thr或Ile  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Gly或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Thr或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa是Thr或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11) .. (11)  
<223> Xaa是Tyr或Val  
<400> 154  
Ala Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Phe Asp Tyr  
1 5 10  
<210> 155  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Ile或Leu  
<400> 155  
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Xaa Thr  
1 5  
<210> 156  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Asn或His  
<400> 156  
Gln Gln Arg Ser Xaa Trp Pro Arg Thr  
1 5  
<210> 157  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Arg或Ser  
<400> 157  
Gln Gly Ile Ser Xaa Trp  
1 5  
<210> 158  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人  
<400> 158  
Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr  
1 5  
<210> 159  
<211> 6  
<212> PRT



<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ser或Asn  
<400> 159  
Gln Gly Ile Xaa Ser Trp  
1 5  
<210> 160  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Tyr或Leu  
<400> 160  
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr  
1 5  
<210> 161  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ser或Asn  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Ser或Asn  
<400> 161  
Gln Gly Ile Xaa Xaa Trp  
1 5  
<210> 162  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人  
<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa是Lys或Asn

<400> 162

Gln Gln Tyr Xaa Ser Tyr Pro Ile Thr

1 5

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 163

Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr

1 5

<210> 164

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 164

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 165

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 165

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                     20                      25                      30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu  
                     35                      40                      45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
                     50                      55                      60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu  
                     85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                     100                      105

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 166

Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr Trp  
 1                      5

<210> 167

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 167

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 1                      5

<210> 168

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 168

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val  
 1                      5                      10                      15

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 169

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 170

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 171

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 171

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 172

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 172

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Ser Leu Gly Ser

1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn

145

---

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Tyr	Val
20				25				30							
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
35				40				45							
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50				55				60							
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
65				70				75				80			
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	Thr
85				90				95							
Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Met	Arg						
100				105											

IgHV3-23-01 / IGHJ4-02 – VH 比对(组1)

IgHV1-23-01 EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
**TH1014-050** EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG~~  
 VH1014-049 EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
 VH1014-051 EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
 VH1014-055 EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
 共有 EVQLLES~~GG~~GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
 IgHV1-23-01 RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGT~~LVT~~VSS  
**TH1014-050** RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT~~LVT~~VSS  
 VH1014-049 RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT~~LVT~~VSS  
 VH1014-051 RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT~~LVT~~VSS  
 VH1014-055 RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT~~LVT~~VSS  
 共有 RFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT~~LVT~~VSS

图1A

IgHV1-69-04 / IGHJ6-02 – VH 比对(组1)

IgHV1-69-04 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAI~~SWVRQAPGQGLEWMGR~~IIPILGIANYAQKFQG  
**TH1014-084** QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF~~SSYAI~~SWVRQAPGQGLEWMGRIN~~TVLGI~~NYAQKFQG  
 共有 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF~~SSYAI~~SWVRQAPGQGLEWMGRIN~~TVLGI~~NYAQKFQG  
 IgHV1-69-04 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR-----GMDVWGQGT~~TVT~~VSS  
**TH1014-084** RVTITADKST~~STAYMEL~~SLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYG~~IE~~VWGQGT~~TVT~~VSS  
 共有 RVTITADKST~~STAYMEL~~SLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYG~~IE~~VWGQGT~~TVT~~VSS

图1B

IgHV1-18-01 / IGHJ4-02 - VH 比对(组1)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG  
**TH1014-169** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGNTIYAQKLQG  
 VH1014-123 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYSGNTIYAQKLQG  
 VH1014-161 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQG  
 VH1014-124 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYNGNTIYAQRFQD  
 共有 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYSGNTIYAQXXQG  
 IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS  
**TH1014-169** RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-123 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-161 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-124 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS  
 共有 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS

图1C

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 - VH 比对(组2.No.1)

IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
**TH1014-025** QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-001 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-143 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-019 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-021 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-027 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 共有 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS  
**TH1014-025** VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-001 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGSGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-143 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYGSGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-019 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-021 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYASGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 VH1014-027 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGLIISGYYFDYWGQGLTVTVSS  
 共有 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGXXXSGYYFDYWGXXGTVTVSS

图1D



IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组2, No. 2)

IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
**TH1014-091** QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-032 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-035 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-036 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-054 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 VH1014-094 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 共有 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR  
 IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGTLLTVSS  
**TH1014-091** VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 VH1014-032 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 VH1014-035 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 VH1014-036 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 VH1014-054 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 VH1014-094 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS  
 共有 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYGSGYYFDYWGQGTLLTVSS

图1E

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 – VH 比对 (组2)

IgHV1-30-... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR  
**TH1014-129** QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSFAHWVRQAPGKLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGR  
 共有 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSFAHWVRQAPGKLEWVAVISYDGGKKFYADSVKGR  
 IgHV3-30-... FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----YFDYWGQGTLLTVSS  
**TH1014-129** FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAYYCARGLGWGAFDYWGQGTLLTVSS  
 共有 FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAYYCARGLGWGAFDYWGQGTLLTVSS

图1F

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 - VH 比对 (组3a)

IgHV3-23-1 EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
**TH1014-098** EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
 VH1014-105 EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
 VH1014-100 EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
 VH1014-125 EVQLLES~~GGGLVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
 VH1014-162 EVQL~~LES~~GGG~~SVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
 共有 EVQL~~LES~~GGG~~SVQ~~PGGSLRLSCAASGFTFSSY~~AM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSA~~STYY~~ADSVKG  
  
 IgHV3-23-1 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
**TH1014-098** RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
 VH1014-105 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
 VH1014-100 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
 VH1014-125 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
 VH1014-162 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~  
 共有 RFTISRDN~~SKNTLYLQ~~MNSLRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGT~~LVTVSS~~

图1G

IgHV5-51-01 / IGHJ2-01 - VH 比对 (组3a. No. 1)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
**TH1014-127** EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
 共有 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
  
 IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----YFDLWGRGTL~~TVTVSS~~  
**TH1014-127** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWS~~PRHWYFDLWGRGTLTVTVSS~~  
 共有 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWS~~PRHWYFDLWGRGTLTVTVSS~~

图1H

IgHV5-51-01-01 / IGHJ5-02 - VH 比对 (组3a. No. 2)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
**TH1014-159** EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY~~FTSY~~WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
 共有 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY~~FTSY~~WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~TRYSPSFQ~~  
  
 IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----NWFDPWGQGT~~LVTVSS~~  
**TH1014-159** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDIL~~TGYFNWFDPWGQGT~~LVTVSS  
 共有 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDIL~~TGYFNWFDPWGQGT~~LVTVSS

图1I

IgHV1-18-01 / IGHJ6-02 - VH 比对(组3b)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG  
**TH1014-132** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN~~NYAQKLQG~~  
 共有 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN~~NYAQKLQG~~  
 IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----GMDVWGQGTITVTVSS  
**TH1014-132** RVTMTTDT~~ST~~STAYMELRSL~~R~~SDDTAVYYCAREYSYDSGTFFYYGMDVWGQGTITVTVSS  
 共有 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSYDSGTFFYYGMDVWGQGTITVTVSS

图1J

IgHV3-30-01 / IGHJ4-02 - VH 比对(组3b)

IgHV3-30... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
**TH1014-153** QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS~~YAMHWVRQAPGKGLEWVA~~VISYDGSNKYYADSVKG  
 VH1014-033 QVQLVESGGGVVQ~~GR~~SLRLSCAASGFTFSS~~YAMHWVRQAPGKGLEWVA~~ISYDGSNKYYADSVKG  
 VH1014-160 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS~~YAMHWVRQAPGKGLEWVA~~ISYDGSNKYYADSVKG  
 VH1014-166 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
 VH1014-152 QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
 VH1014-167 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY~~AMHWVRQAPGKGLEWVA~~ISYDGSNKYYADSVKG  
 共有 QVQLVESGGGVVQ~~GR~~SLRLSCAASGFTFSS~~XXXX~~HWVRQAPGKGLEW~~V~~ISYDGS~~NY~~YADSVKG  
 IgHV3-30... RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----FDYWGQGTITVTVSS  
**TH1014-153** RFTISRDN SKNTLYLQMNSL~~RAEDTAMYYCARGGITG~~TVFDYWGQGTITVTVSS  
 VH1014-033 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~DISS~~GVFDYWGQGTITVTVSS  
 VH1014-160 RFTISRDN SKNT~~MY~~LQMNSLRAEDTAM~~CY~~CARG~~SITG~~STGVFDYWGQGTITVTVSS  
 VH1014-166 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~SIIG~~STGVFDYWGQGTITVTVSS  
 VH1014-152 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~SITG~~STGVFDYWGQGTITVTVSS  
 VH1014-167 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG~~SITG~~STGVFDYWGQGTITVTVSS  
 共有 RFTISRDN SKNT~~XY~~LQMNSL~~RAEDTAXX~~YARG~~XXXXXX~~G~~X~~FDYWGQGTITVTVSS

图1K

IgKV1-12-01 / IGKJ5-01 - VL 比对(组1)

IgKV1-12-01 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-050** DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-084** DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYASILQSGVPSRFSGSG  
VL1014-049 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG  
VL1014-051 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG  
VL1014-055 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG  
共有 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYASILQSGVPSRFSGSG

IgKV1-12-01 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGTRLEIK  
**VL1014-050** SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGTRLEIK  
**VL1014-084** SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGGQTKVEIK  
VL1014-049 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGTRLEIK  
VL1014-051 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGTRLEIK  
VL1014-055 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGTRLEIK  
共有 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPITFGGQTKVEIK

图2A

IgKV3-11-01 / IGKJ1-01 - VL 比对(组1)

IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG  
**VL1014-169** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG  
VL1014-124 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG  
VL1014-161 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG  
VL1014-123 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG  
共有 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG

IgKV3-11-01 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK  
**VL1014-169** SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK  
VL1014-124 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK  
VL1014-161 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK  
VL1014-123 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK  
共有 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGQTKVEIK

图2B

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01- VL 比对(组2, No. 1)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-025** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-001 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-019 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-143 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-021 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-027 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 共有 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
  
 IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
**VL1014-025** SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
 VL1014-001 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYISFPITFGQGRLEIK  
 VL1014-019 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
 VL1014-143 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
 VL1014-021 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
 VL1014-027 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGRLEIK  
 共有 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPITFGQGRLEIK

图2C

IgKV1D-16-01 / IGKJ1-01- VL 比对(组2, No. 2)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-091** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-032 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-035 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-036 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-054 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-094 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 共有 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
  
 IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK  
**VL1014-091** SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 VL1014-032 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 VL1014-035 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 VL1014-036 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 VL1014-054 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 VL1014-094 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK  
 共有 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK

图2D

IgKV1D-16-01 / IGKJ2-01 – VL 比对 (组3a)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-098** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-100 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-105 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-125 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-162 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 共有 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
  
 IgKV1D-16 ... SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
**VL1014-098** SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
 VL1014-100 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
 VL1014-105 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
 VL1014-125 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
 VL1014-162 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK  
 共有 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTKLEIK

图2E

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 – VL 比对 (组3b)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
**VL1014-153** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-152 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-166 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-167 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-160 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 VL1014-033 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
 共有 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG  
  
 IgKV1D-16 ... SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
**VL1014-153** SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 VL1014-152 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 VL1014-166 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 VL1014-167 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 VL1014-160 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 VL1014-033 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK  
 共有 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK

图2F

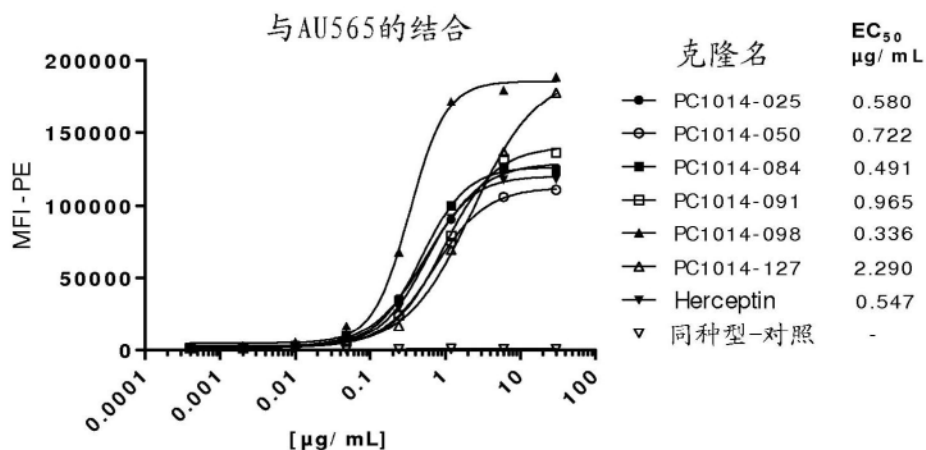


图3A

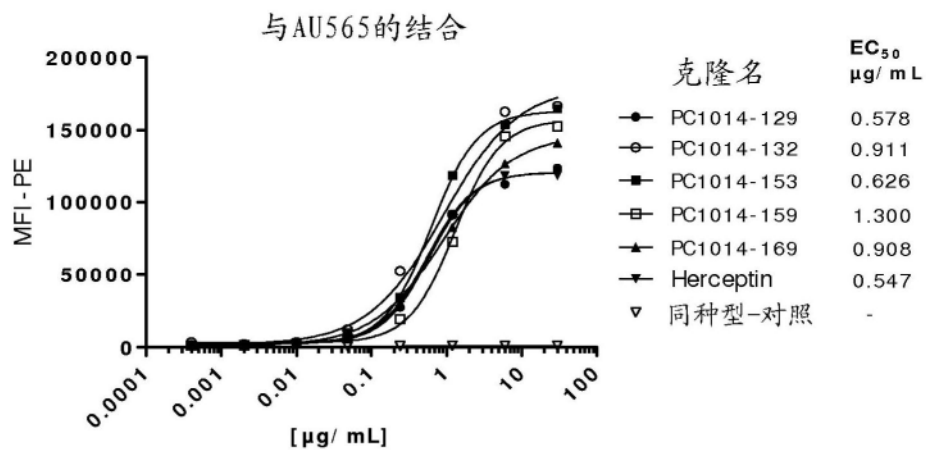


图3B

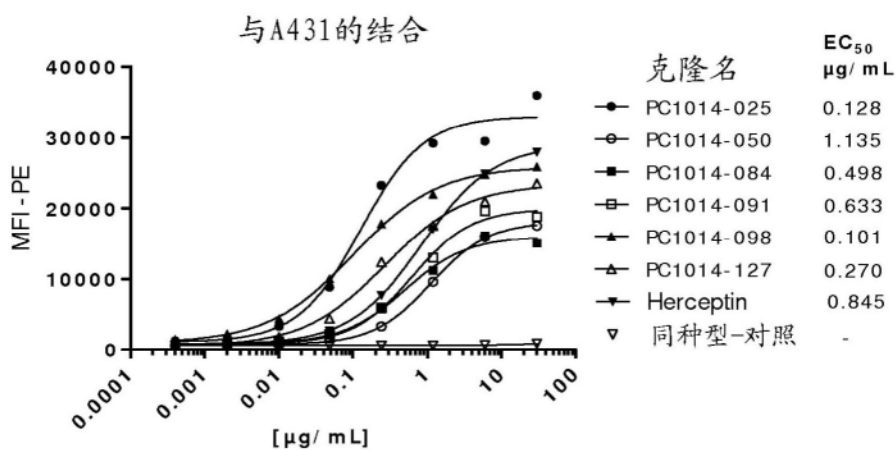


图3C

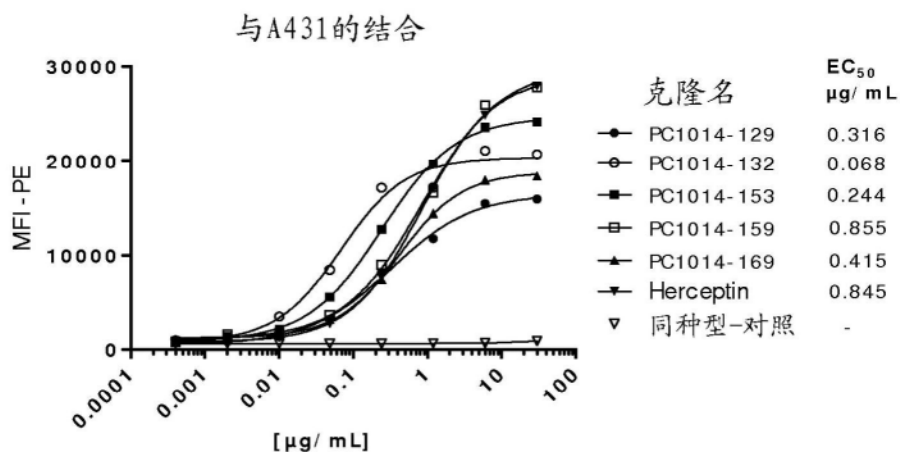


图3D

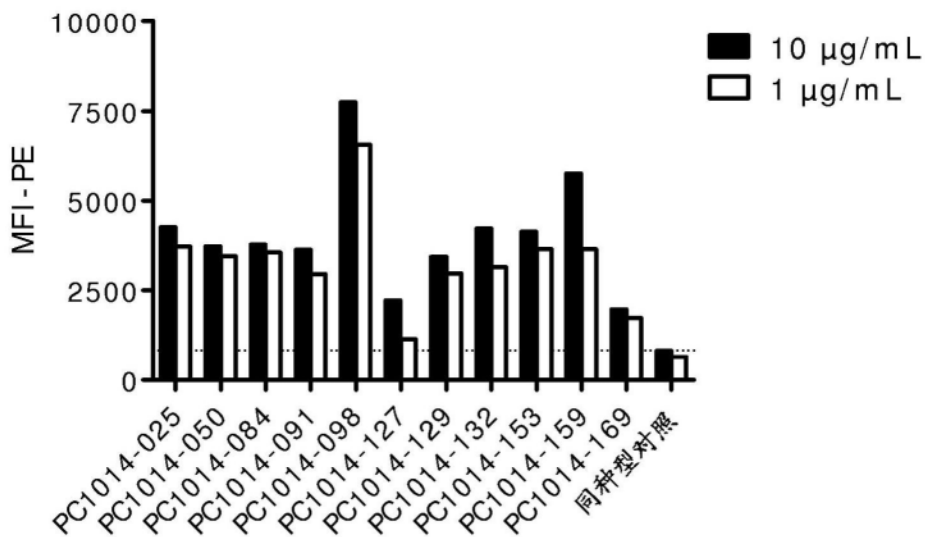


图4



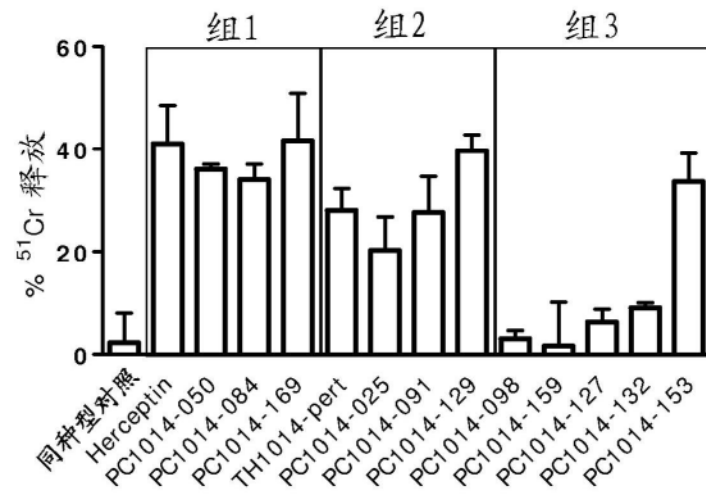


图5

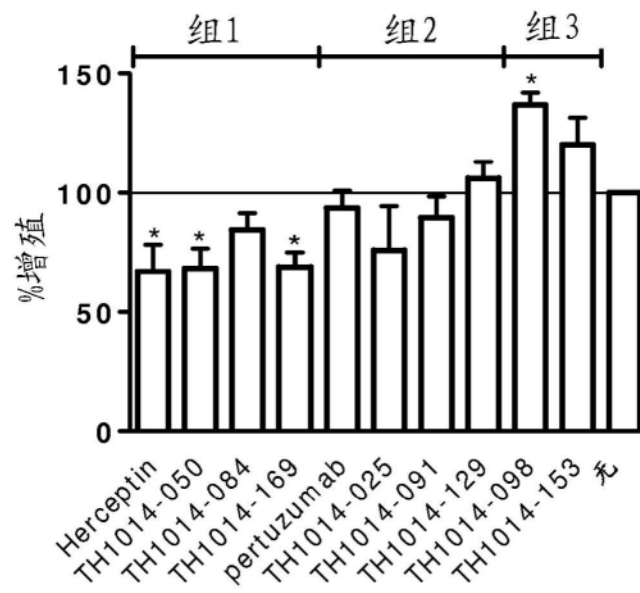


图6

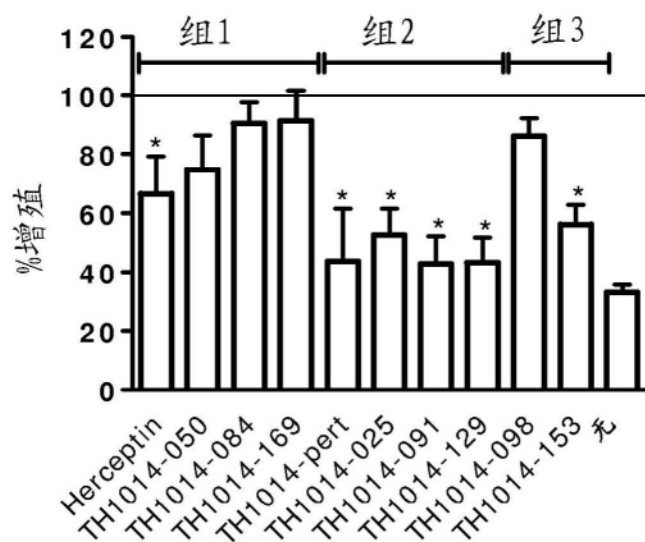


图7

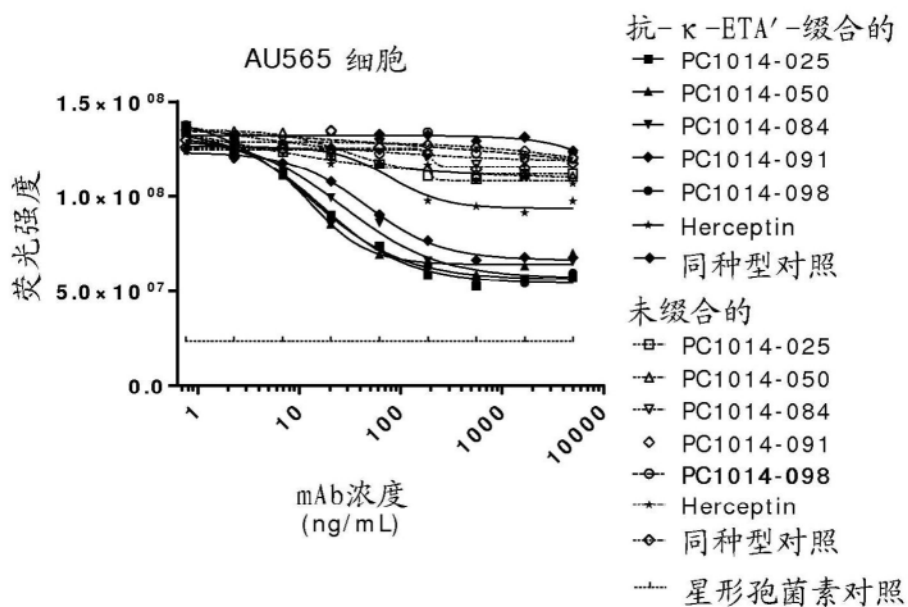


图8A

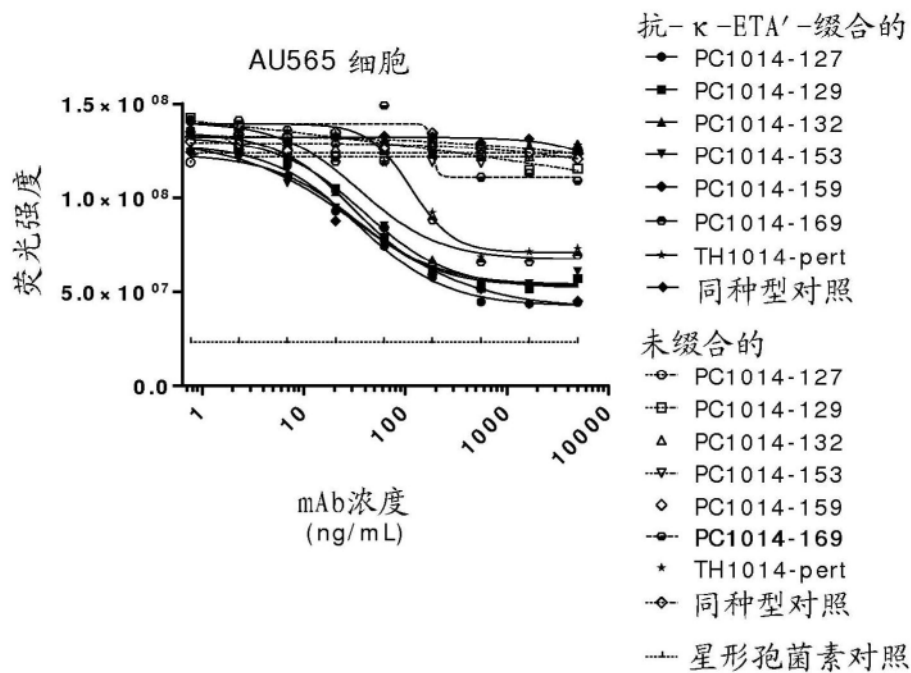


图8B

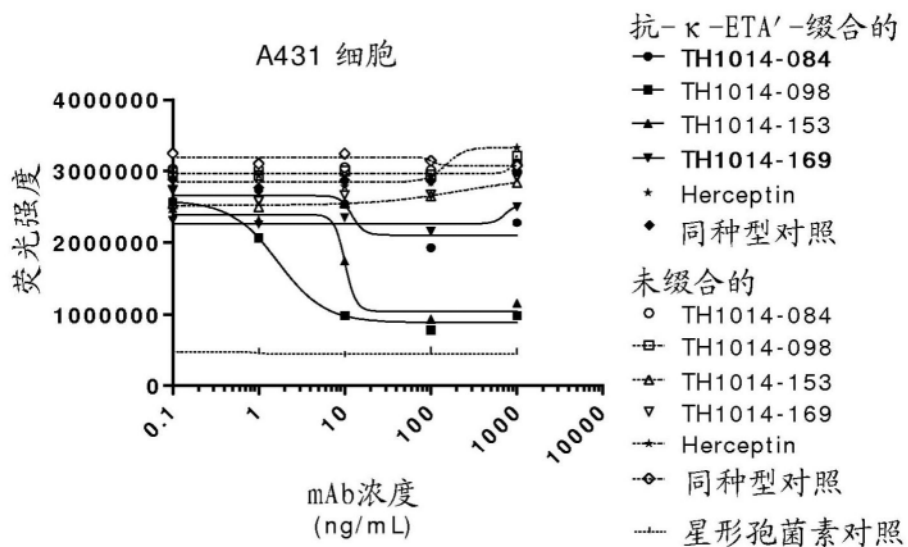


图8C

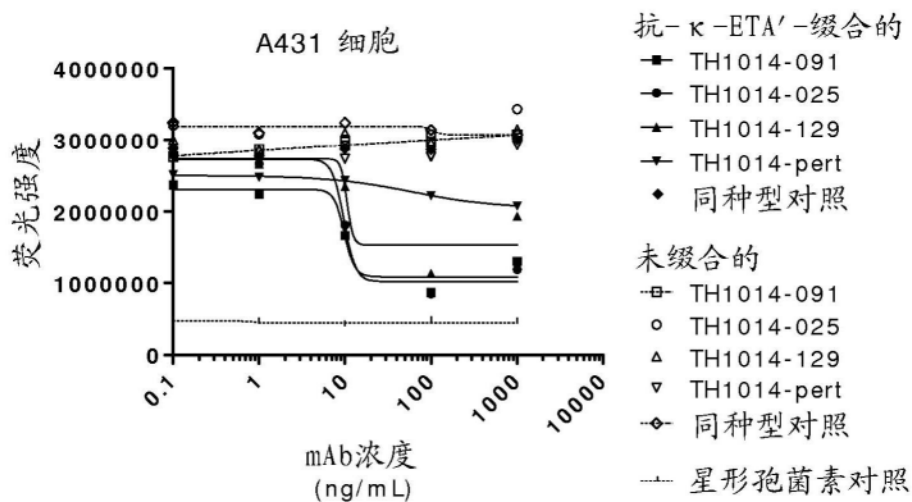


图8D

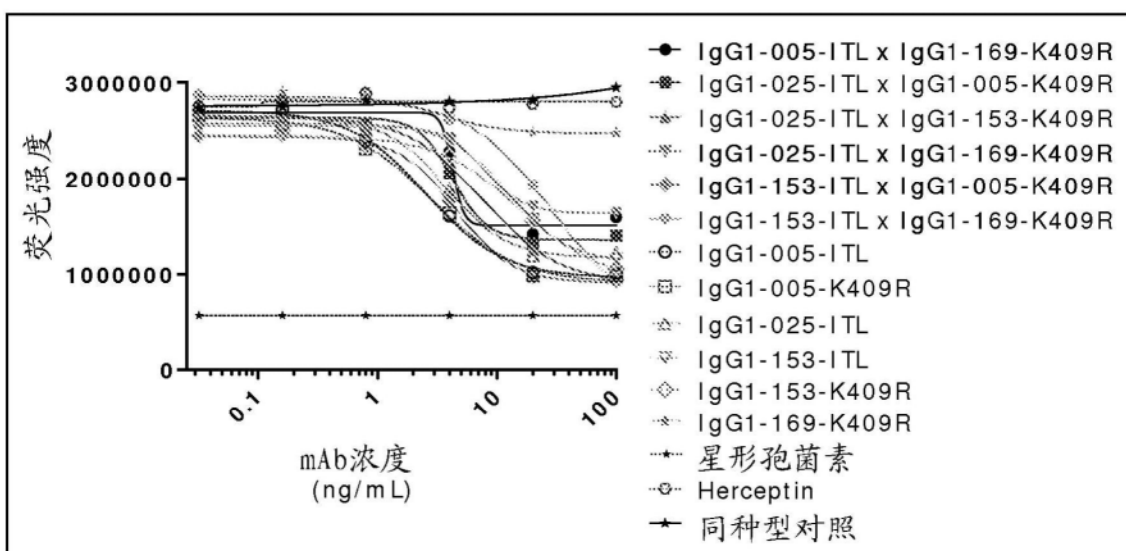


图9

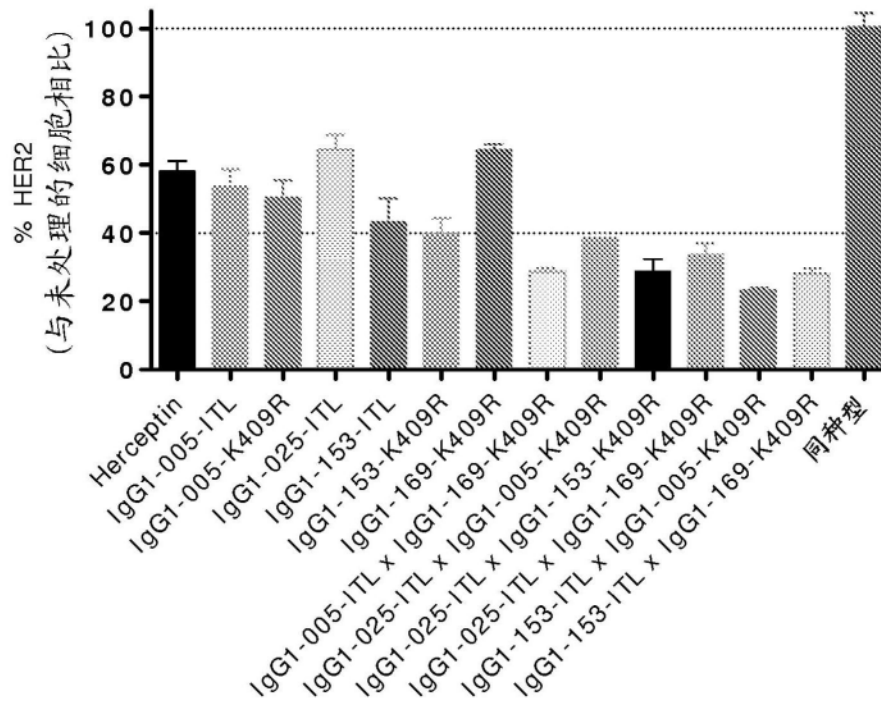
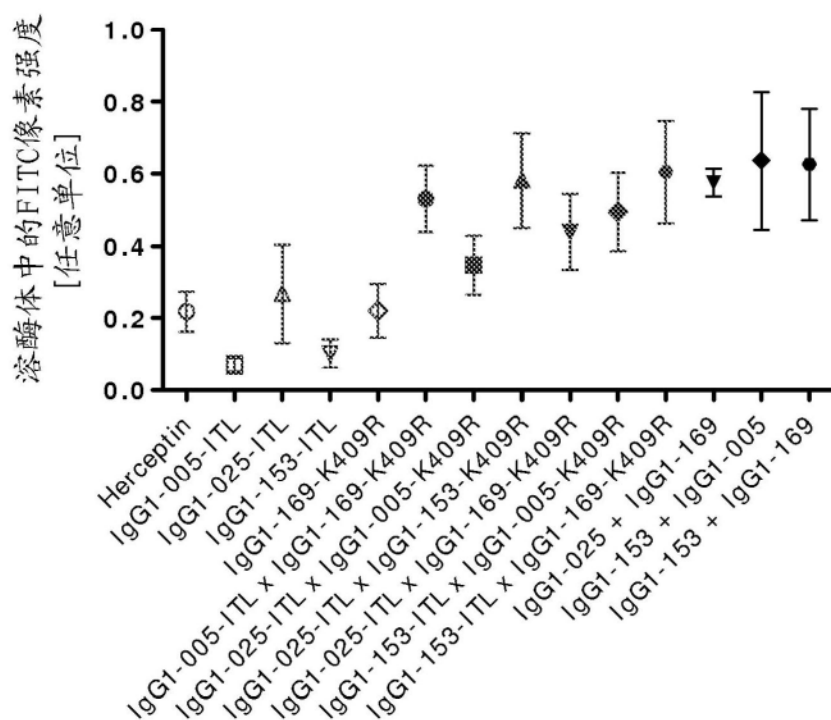


图10

A



B

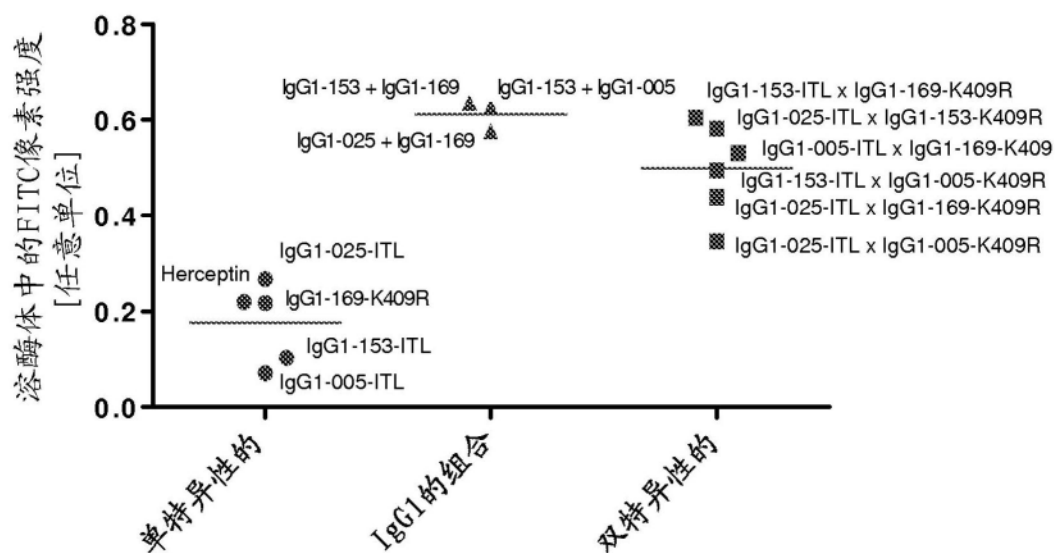


图11

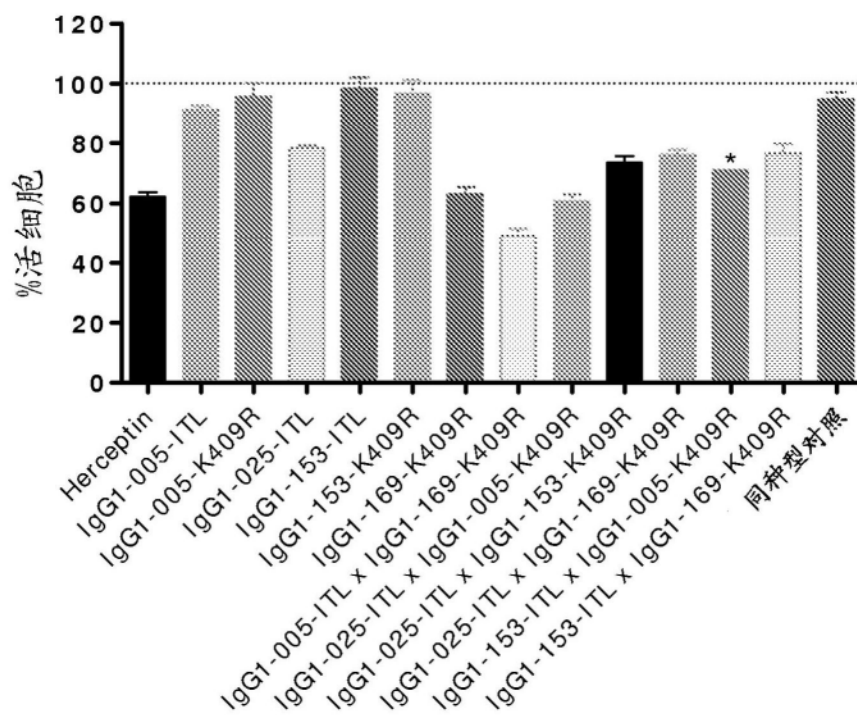


图12

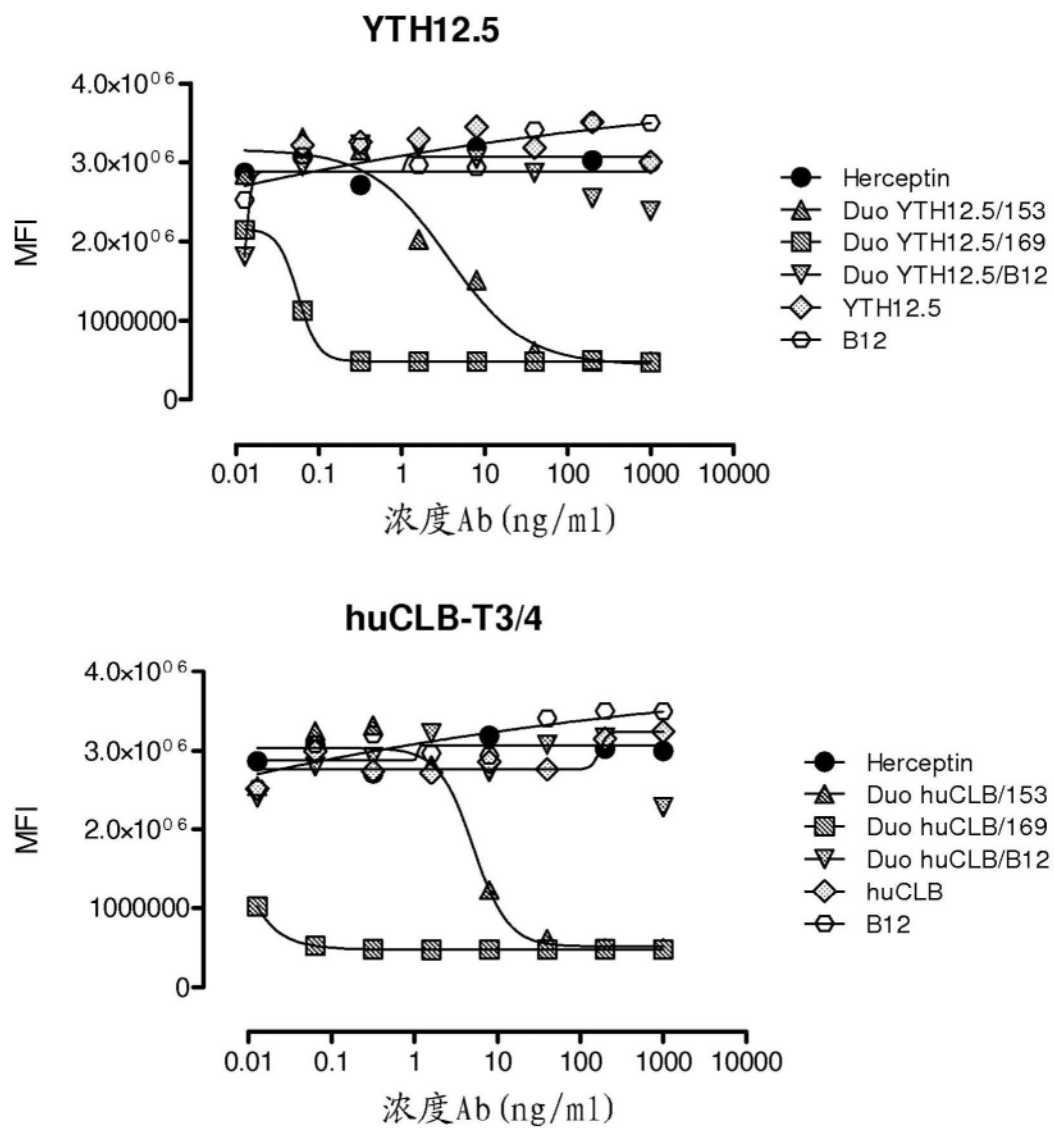


图13



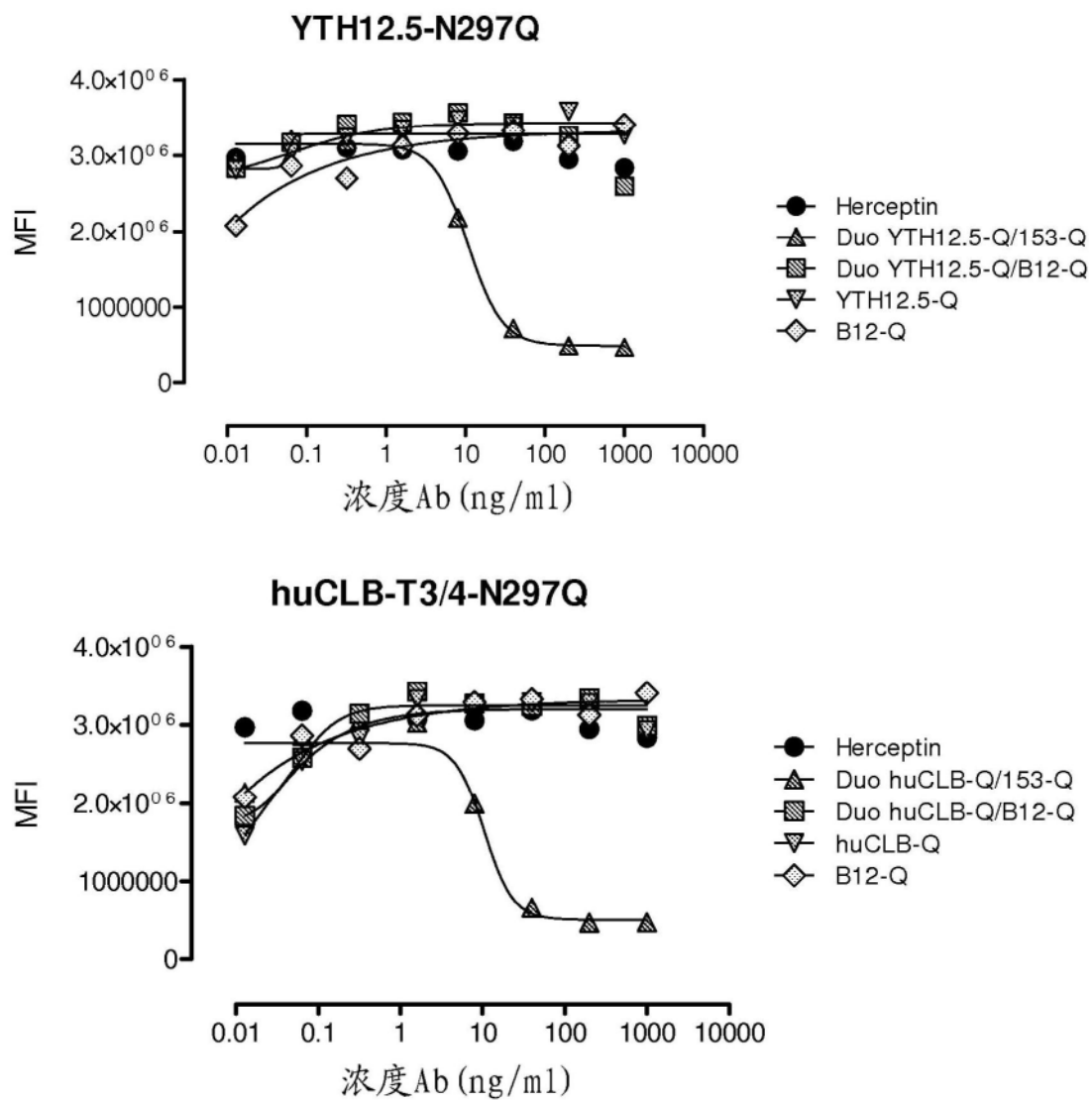


图13 (续)

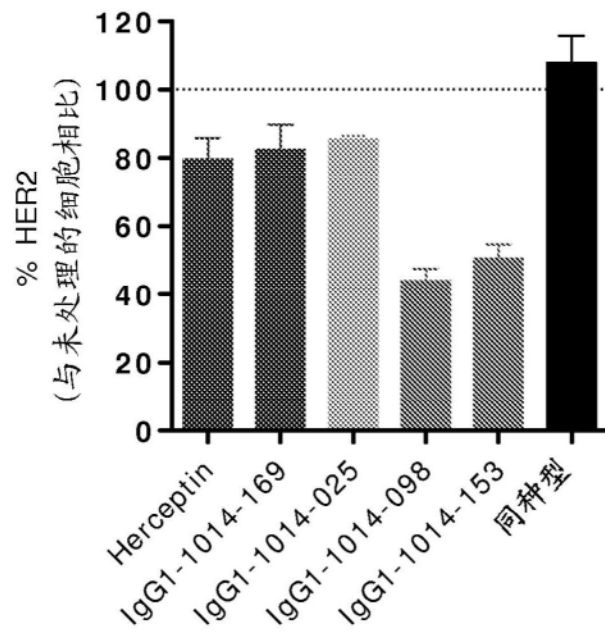


图14

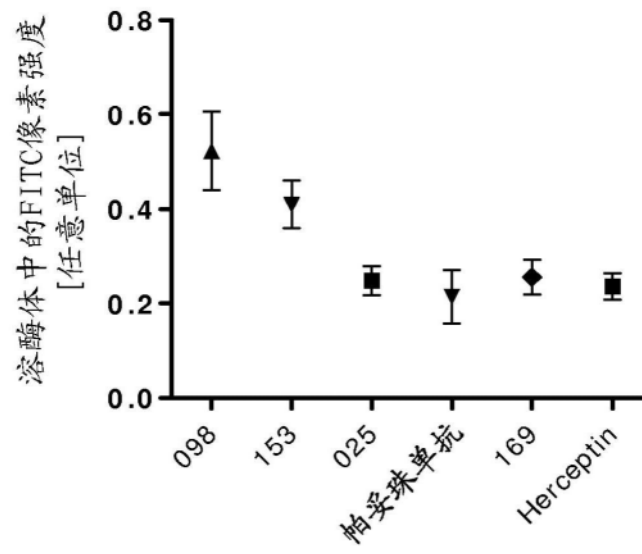


图15

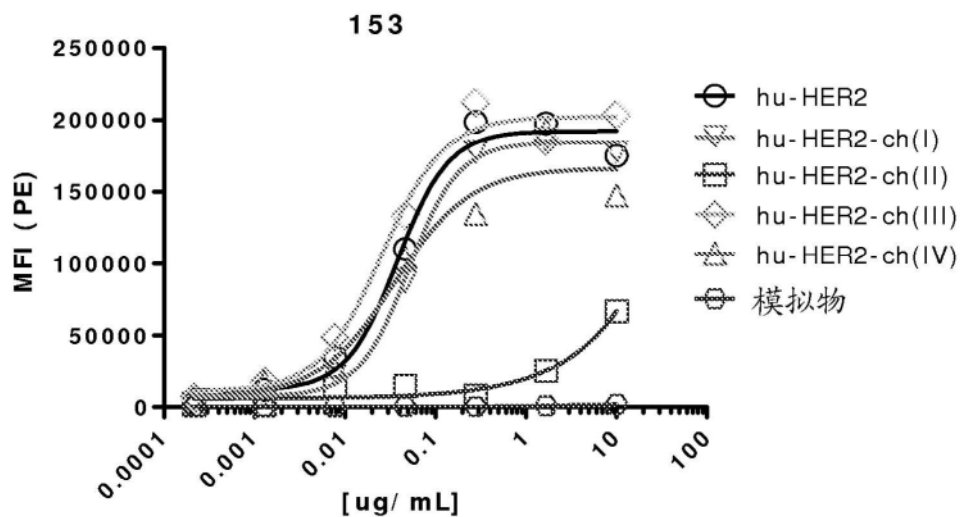


图16

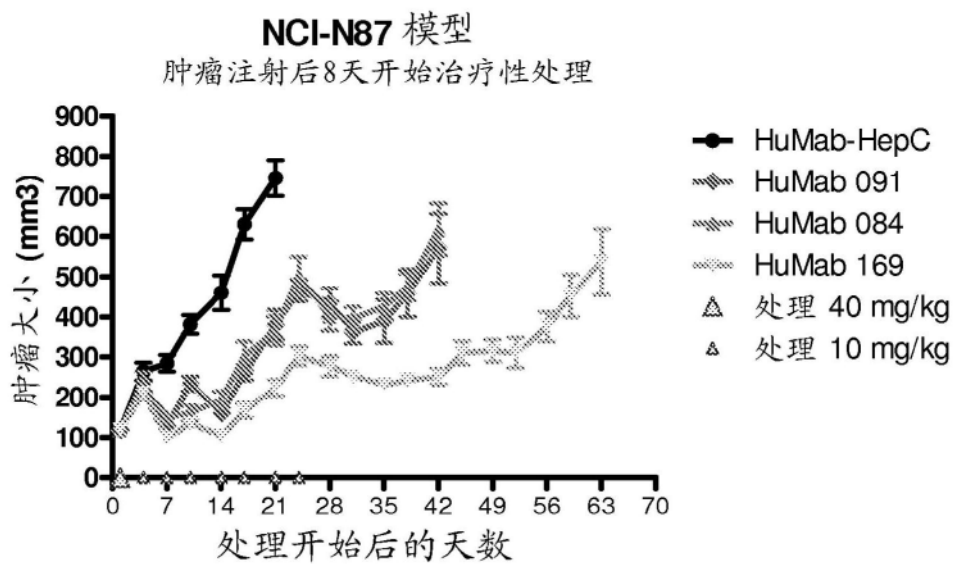


图17A

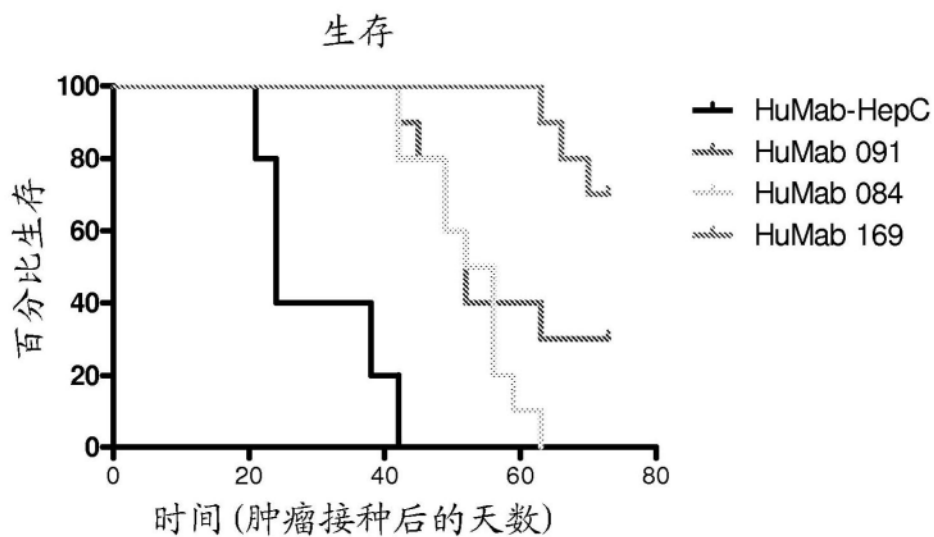


图17B

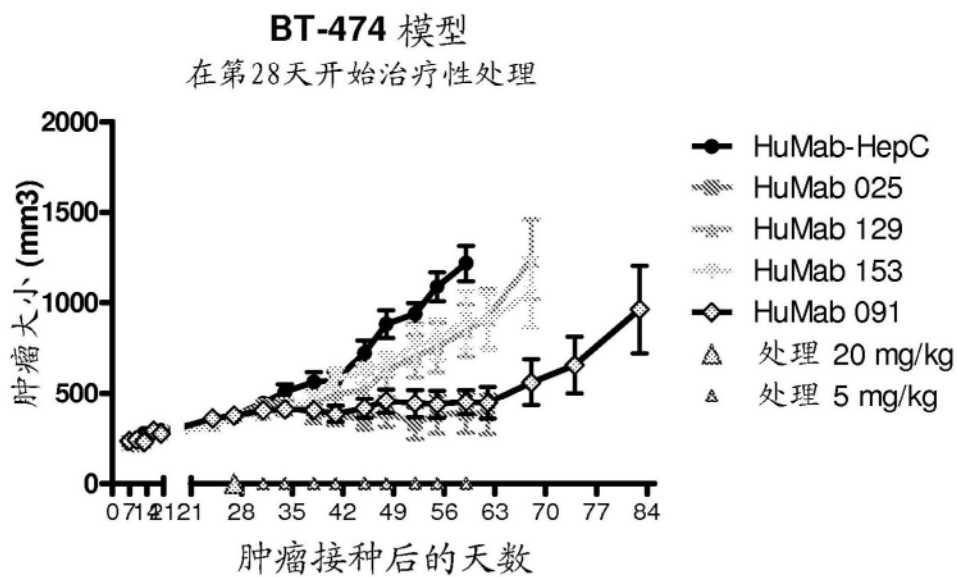


图18A

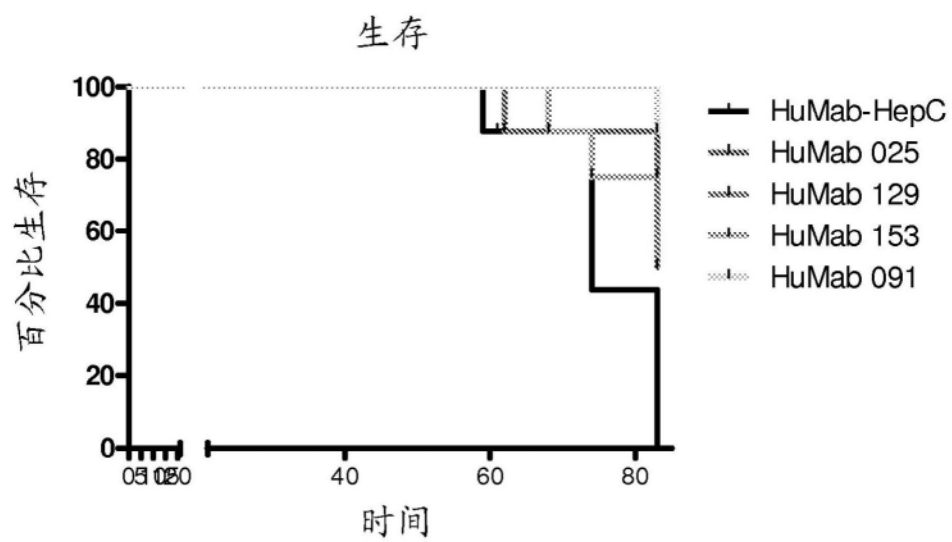


图18B