



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114507282 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 16

(21) 申请号 202111595551.3

(22) 申请日 2013.10.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114507282 A

(43) 申请公布日 2022.05.17

(30) 优先权数据
61/709731 2012.10.04 US
61/779969 2013.03.13 US

(62) 分案原申请数据
201380063513.0 2013.10.04

(73) 专利权人 达纳—法伯癌症研究所公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W.A. 马拉斯科 J. 隋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 初明明

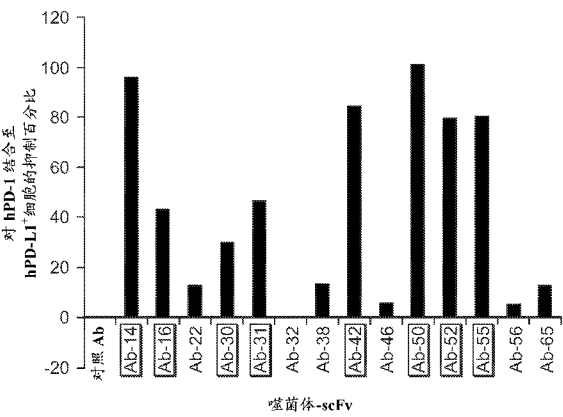
(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101248089 A, 2008.08.20
审查员 王浩铭

权利要求书1页 说明书40页
序列表46页 附图11页

(54) 发明名称
人单克隆抗-PD-L1抗体和使用方法

(57) 摘要
本发明包括结合至PD-L1 (也被称为程序化死亡配体1或B7H1) 的人单克隆抗体。本发明的抗体与PD-L1的结合抑制对它的受体PD1 (程序化死亡1) 的结合和配体-介导的活性, 并可用于治疗癌症和慢性病毒感染。



1. 一种分离的人源化单克隆抗体,其包含:

具有分别由氨基酸序列SYGIS (SEQ ID NO:58)、WISAYNGNTNYAQLQG (SEQ ID NO:71)和ALPSGTILVGGWFDP (SEQ ID NO:86)组成的CDR1、CDR2和CDR3的重链;和具有分别由氨基酸序列TRSSGNIASNYVQ (SEQ ID NO:101)、EDNQRPS (SEQ ID NO:115)和QSYDSSNLWV (SEQ ID NO:127)组成的CDR1、CDR2和CDR3的轻链;

其中所述抗体结合人PD-L1。

2. 一种分离的单克隆抗体,其包含:

由SEQ ID NO: 1的核苷酸序列编码的V_H氨基酸序列和由SEQ ID NO: 3的核苷酸序列编码的V_L氨基酸序列。

3. 一种分离的单克隆抗体,其包含:

SEQ ID NO: 2的V_H氨基酸序列和SEQ ID NO: 4的V_L氨基酸序列。

4. 权利要求1-3的任一项的抗体,其中所述抗体是单价的或二价的。

5. 权利要求1的抗体,其中所述抗体为单链抗体。

6. 权利要求1-3的任一项的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体,其还结合至肿瘤-相关抗原、细胞因子或细胞表面受体。

7. 权利要求6的抗体,其中所述肿瘤-相关抗原是CAIX。

8. 权利要求6的抗体,其中所述细胞因子是IL-10。

9. 权利要求6的抗体,其中所述细胞表面受体是CCR4、IL21R、BTLA、HVEM或TIM3。

10. 权利要求1-3的任一项的抗体,其连接至治疗剂。

11. 权利要求10的抗体,其中所述治疗剂是毒素、放射性标记、siRNA或细胞因子。

12. 权利要求10的抗体,其中所述治疗剂是小分子。

13. 产生权利要求1-12的任一项的抗体的细胞。

14. 权利要求1-12的任一项的抗体在制备用于治疗或缓解癌症的症状的药物中的用途,其中所述癌症是肾细胞癌或乳腺癌。

人单克隆抗-PD-L1抗体和使用方法

[0001] 本申请是申请日为2013年10月4日,中国国家申请号为201380063513.0,发明名称为“人单克隆抗-PD-L1抗体和使用方法”的发明申请的分案申请(中国国家申请号为201711156800.2)的继续分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求提交于2012年10月4日的美国临时申请号61/709,731和提交于2013年3月13日的美国临时申请号61/779,969的优先权和利益,其内容通过引用各自以其整体结合到本文中。

发明领域

[0004] 本发明主要涉及抗-PD-L1(也称为程序化细胞死亡1配体1或B7H1)抗体及其使用方法。

发明背景

[0005] 免疫系统必须实现在有效应答以清除致病体和保持耐受以防止自身免疫疾病之间的平衡。T细胞对于保持这种平衡是关键,并且它们的适当的调节主要通过B7-CD28家族的分子协调。B7家族成员(其行使配体的功能)和CD28家族成员(其行使受体的功能)之间的相互作用提供了关键的正信号,其不仅发起、提高和维持T细胞应答,而且在适当时还促进限制、终止和/或削弱T细胞应答的关键负信号。CD28家族的一个成员,称为PD-1(也称为程序化细胞死亡-1)在活化的T细胞、B细胞和单核细胞上被增量调节。PD-1在B7家族中有两个鉴定出的配体,PD-L1(也称为B7H1或程序化细胞死亡-1配体1)和PD-L2。虽然主要在活化的抗原呈递细胞(APC)上发现PD-L2的表达倾向于为更受限的,但PD-L1的表达为更普遍的,包括造血谱系(其包括活化的T细胞、B细胞、单核细胞、树突细胞和巨噬细胞)和外周非淋巴组织(其包括心、骨骼、肌肉、胎盘、肺、肾和肝组织)的细胞。PD-L1的普遍表达暗示它在调节PD-1/PD-L1-介导外周耐受中的重要作用。

[0006] PD-L1和PD-1之间的结合对于T细胞应答的调节具有意义深远的作用。具体而言,PD-L1/PD-1相互作用抑制T细胞增殖和效应子细胞因子(其介导T细胞活性和免疫应答,例如IL-2和IFN- γ)的产生。此负调节功能对于阻止T细胞-介导的自身免疫和免疫病理学是重要的。然而,还已表明,PD-1/PD-L1轴在T细胞衰竭中发挥作用,由此负调节功能抑制T细胞对宿主的危害的应答。对T细胞的长期或慢性抗原刺激可诱导负免疫反馈机制,其抑制抗原特异性应答并导致病原体的免疫逃避。T细胞衰竭还可导致抗原-特异性T细胞自身的渐进性物理缺失(progressive physical deletion)。PD-1的T细胞表达在慢性抗原刺激期间被增量调节,并且其与PD-L1的结合导致在CD4⁺(T辅助细胞)和CD8⁺(细胞毒性T淋巴细胞或CTL) T细胞两者中效应子功能的阻断,因此暗示在T细胞衰竭的诱导中PD-1/PD-L1相互作用。

[0007] 最近,已表明一些慢性病毒感染和癌症发展了免疫逃避策略,其通过引起PD-1/PD-L1-介导的T细胞衰竭而特别地利用PD-1/PD-L1轴。多种人肿瘤细胞和肿瘤相关抗原呈

递细胞表达高水平的PD-L1,这暗示所述肿瘤诱导T细胞衰竭以逃避抗-肿瘤免疫应答。在慢性HIV感染期间,HIV-特异性CD8+T细胞在功能上被损害,表现为产生细胞因子和效应子分子的能力降低和增殖能力降低。研究已表明PD-1在HIV感染个体的HIV-特异性CD8+T细胞上高表达,这表明阻断PD-1/PD-L1通路对于HIV感染和AIDS患者的治疗可具有治疗潜能。综合在一起,阻断PD-1/PD-L1通路的作用剂将为多种癌症、HIV感染和/或与T-细胞衰竭相关的其它疾病和病况提供新的治疗方法。因此,对可阻断或阻止PD-1/PD-L1相互作用的作用剂存在迫切的需要。

发明简述

[0008] 本发明基于结合PD-L1的单克隆抗体的发现。所述单克隆抗体为全人抗体。所述抗体结合PD-L1。所述抗体在本文中被称为huPD-L1抗体。

[0009] PD-L1也被称为程序化细胞死亡1配体1、程序化死亡配体1、PDCD1配体1、PDCD1L1、PDL1、B7同系物1、B7H1、B7-H、CD274和CD274抗原。

[0010] 本发明提供分离的人源化单克隆抗体,其具有:具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SYGIS(SEQ ID NO:58)、WISAYNGNTNYAQKLQG(SEQ ID NO:71)和ALPSGTILVGGWFDP(SEQ ID NO:86))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGNIASNYVQ(SEQ ID NO:101)、EDNQRPS(SEQ ID NO:115)和QSYDSSNLWV(SEQ ID NO:127))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SYALS(SEQ ID NO:59)、AISGGGGSTYYADSVKD(SEQ ID NO:72)和DVFPETFSMNYGMDV(SEQ ID NO:87))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列QGDSLRSYYAS(SEQ ID NO:102)、GKNNRPS(SEQ ID NO:116)和NSRDSSGNHYV(SEQ ID NO:128))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列DYAMH(SEQ ID NO:60)、LISGDGGSTYYADSVKD(SEQ ID NO:73)和VLLPCSSTSCYGSVGAFDI(SEQ ID NO:88))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列GGSDIGRKS VH(SEQ ID NO:103)、SDRDRPS(SEQ ID NO:117)和QVWDNNSDHYV(SEQ ID NO:129))的轻链;具有三个CDR(其包含氨基酸序列NYDMS(SEQ ID NO:61)、RVNWNNGGSTTYADAVKD(SEQ ID NO:74)和EFVGAYDL(SEQ ID NO:89))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TGTSSDVGGINYVS(SEQ ID NO:104)、DVSNRPS(SEQ ID NO:118)和SSYTSSTLP(SEQ ID NO:130))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列GLYIH(SEQ ID NO:62)、WIPIFGTANYAQKFED(SEQ ID NO:75)和GLRWGIWGFDP(SEQ ID NO:90))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列RASQSIGNSLA(SEQ ID NO:105)、GASSRAT(SEQ ID NO:119)和QQHTIPTFS(SEQ ID NO:131))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列DNAIS(SEQ ID NO:63)、WIPIFGKPNYAQKFED(SEQ ID NO:76)和TMVRGFLGVMDV(SEQ ID NO:91))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列RASQGIGSYLA(SEQ ID NO:106)、AASLTQS(SEQ ID NO:120)和QQLNNYPIT(SEQ ID NO:132))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SYAMS(SEQ ID NO:64)、AISGSGGSTYYADSVKD(SEQ ID NO:77)和DQFVTIFGVPRYGMDV(SEQ ID NO:92))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SGDKLG NKYAY(SEQ ID NO:107)、QDIKRPS(SEQ ID NO:121)和QTWDNSV(SEQ ID NO:133))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SYAIS(SEQ ID NO:57)、WIPIFGTANYAQKFED(SEQ ID NO:78)和GRQMFGAGIDF(SEQ ID NO:93))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGSIDSNYVQ(SEQ ID NO:108)、EDNQRPS(SEQ ID NO:115)和QSYDSNNRHVI(SEQ ID

NO:134))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TYALN(SEQ ID NO:65)、RIVPLIGLVNYAHNFED(SEQ ID NO:79)和EVYGGNSDY(SEQ ID NO:94))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGNIGTNYVQ(SEQ ID NO:109)、EDYRRPS(SEQ ID NO:122)和QSYHSSGWE(SEQ ID NO:135))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SHGIT(SEQ ID NO:66)、WISAHNGHASNAQKVED(SEQ ID NO:80)和VHAALYYGMDV(SEQ ID NO:95))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列GGNIGSKGVH(SEQ ID NO:110)、DDSDRPS(SEQ ID NO:123)和QVWDSSSDHWV(SEQ ID NO:136))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列RHGMH(SEQ ID NO:67)、VISHDGSVKYYADSMKD(SEQ ID NO:81)和GLSYQVSGWFDP(SEQ ID NO:96))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGSIASNYVQ(SEQ ID NO:111)、EDNQRPS(SEQ ID NO:115)和QSYDSTTPSV(SEQ ID NO:137))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列SYGIS(SEQ ID NO:58)、WTSPHNGLTAFQAILED(SEQ ID NO:82)和VHPVFSYALDV(SEQ ID NO:97))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGSIASNYVQ(SEQ ID NO:112)、EDNQRPS(SEQ ID NO:115)和QSYDGITVI(SEQ ID NO:138))的轻链;具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TYAFS(SEQ ID NO:68)、RIIPILGIANYAQKFED(SEQ ID NO:83)和DGYGSDPVL(SEQ ID NO:98))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TRSSGSIASHYVQ(SEQ ID NO:113)、EDNKRPS(SEQ ID NO:124)和QSYDSSNRWV(SEQ ID NO:139))的轻链;或具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列NYGIS(SEQ ID NO:69)、WISAYNGNTNYAQKVED(SEQ ID NO:84)和GDFRKPFDDY(SEQ ID NO:99))的重链和具有三个CDR(其分别包含氨基酸序列TLRSGLNVGSIYRIY(SEQ ID NO:114)、YKSDSNKQAS(SEQ ID NO:125)和MIWYSSAVV(SEQ ID NO:140))的轻链;其中所述抗体结合人PD-L1。

[0011] 在一个方面,抗体为单价的或二价的。在另一方面中,抗体为单链抗体。

[0012] 本发明提供单链抗体,其包括:含SEQ ID NO:1的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:3的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:5的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:7的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:9的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:11的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:13的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:15的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:17的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:19的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:21的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:23的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:25的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:27的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:29的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:31的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:33的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:35的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:37的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:39的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:41的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:43的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:45的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:47的V_L核苷酸序列;含SEQ ID NO:49的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:51的V_L核苷酸序列;或含SEQ ID NO:53的V_H核苷酸序列和含SEQ ID NO:55的V_L核苷酸序列。

[0013] 在另一个方面中,本发明提供单链抗体,其包括:含SEQ ID NO:2的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:4的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:6的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:8的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:10的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:12的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:14的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:16的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:18的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:20的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:22的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:24的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:26的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:28的V_L氨基酸序列;含SEQ

ID NO:30的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:32的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:34的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:36的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:38的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:40的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:42的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:44的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:46的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:48的V_L氨基酸序列;含SEQ ID NO:50的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:52的V_L氨基酸序列;或含SEQ ID NO:54的V_H氨基酸序列和含SEQ ID NO:56的V_L氨基酸序列。

[0014] 在一些方面中,抗体具有在 10^{-5}M - 10^{-12}M 的范围内的结合亲和力。

[0015] 在另一方面中,抗体是双特异性抗体,其还结合至肿瘤-相关抗原、细胞因子或细胞表面受体。例如,所述肿瘤-相关抗原是CAIX。例如,所述细胞因子是IL-10。例如,所述细胞表面受体是CCR4、IL21R、BTLA、HVEM或TIM3。

[0016] 本发明提供连接至治疗剂的抗体。例如,所述治疗剂是毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

[0017] 本发明提供产生任何上述抗体的细胞。

[0018] 本发明还提供选择性杀伤肿瘤细胞的方法,其包括将所述细胞与任何上述抗体接触。在一方面中,通过抗体-依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)产生选择性杀伤。在另一方面中,所述肿瘤细胞表达PD-L1。

[0019] 本发明还提供阻止或逆转T细胞衰竭的方法,其包括向有需要的受试者给予含任何上述抗体的组合物。

[0020] 本发明还提供提高对抗原的免疫应答的方法,其包括向有需要的受试者给予含任何上述抗体的组合物。在一方面中,抗原是病毒抗原、细菌抗原或肿瘤相关抗原。在另一方面中,所述病毒抗原是HIV。在另外的方面中,所述肿瘤相关抗原是CAIX。在另一方面中,抗体在暴露于抗原之前或之后被给予。在另一方面中,所述抗体的给予引起抗原特异性T细胞活性增加。在另一方面中,T-细胞是效应子T细胞。

[0021] 本发明还提供治疗或缓解癌症的症状的方法,其包括向有需要的受试者给予含任何上述抗体的组合物。例如,所述癌症是肾细胞癌或乳腺癌。例如,所述癌症是其中过量表达PD-L1的癌症。在另一实例中,所述癌症是诱导T细胞衰竭的癌症。

[0022] 本发明还提供治疗或缓解慢性病毒感染的症状的方法,其包括向有需要的受试者给予含任何上述抗体的组合物。例如,所述慢性病毒感染是HIV感染。例如,所述慢性病毒感染是诱导T细胞衰竭的病毒感染。

[0023] 本发明提供核酸序列,其包括SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53或55的核酸序列。

[0024] 在另一方面中,本发明提供核酸序列,其编码SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54或56的多肽。

[0025] 在另一方面中,本发明提供多肽,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54或56的氨基酸序列。

[0026] 在另一方面中,本发明提供载体,其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53或55的核酸序列。本发明提供载体,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54或56的核酸序列。本发明另外提供细胞,其包含上述载体的任一种。

[0027] 本公开的任何方法中的给予途径包括但不限于肠胃外(例如,静脉内)、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、经皮(即,局部)、经粘膜和直肠给予。

[0028] 本公开的任何方法中的受试者是,例如,哺乳动物。所述哺乳动物是,例如,人。

[0029] 本发明的其它特征和优势依据以下详述的说明书和权利要求将显而易见,并且包含在其中。

附图简述

[0030] 图1.抗-PD-L1 scFv-噬菌体克隆(14个克隆)的氨基酸序列。展示了对于IGHV和IGLV/IGKV两者的构架区1-4(FW1-4)、互补决定区1-3(CDR1-3)和家族命名。使用Kabat编号。检索表:“.”与共有区匹配的AA、“X”非共有区AA和“-”为空白(即没有AA)。

[0031] 图2.通过FACS进行的huPD-L1抗体与人PD-L1(hPD-L1)表达细胞的结合分析。测试四种类型的细胞,其包括亲本细胞系300.9和hPD-L1、hPD-L2或人C型凝集素结构域家族2成员(hCLEC2D)转染的300.9细胞。GF1538是抗hPD-L1的人源化抗体。GF1757是抗hPD-L2的人源化抗体。第二抗体是PE-山羊抗-人IgG。

[0032] 图3.在竞争性FACS分析中通过抗-PD-L1噬菌体-抗体对hPD-1结合至hPD-L1的抑制。测试呈噬菌体-scFv形式的所有抗-hPD-L1抗体对hPD1-hFc融合蛋白与hPD-L1表达293T细胞的结合的抑制。将 10^{12} pfu的噬菌体-scFv与约0.25 μ g/mL的可溶性hPD1-hFc混合并加入至hPD-L1表达质粒转染的293T细胞。在洗涤之后,将细胞与FITC-抗-人IgG抗体一起孵育以测量hPD1-hFc与细胞表面上的hPD-L1的结合。

[0033] 图4.在竞争性FACS分析中通过抗-PD-L1可溶性抗体对hPD-1结合至hPD-L1的抑制。将所有抗-hPD-L1抗体以所示浓度与hPD-L1表达质粒转染的300.9细胞预孵育30分钟,随后将0.125 μ g的hPD-1-小鼠IgG2a加入各反应物中并孵育另外30分钟。在洗涤之后,将PE-山羊-抗-小鼠IgG2a Ab加入并接着洗涤和FACS分析。GF1538是抗hPD-L1的人源化Ab。GF1757为抗hPD-L2的人源化Ab。

[0034] 图5.双特异性抗体的设计和形成。

[0035] 图6.双特异性抗体(bsAb)构建体的确定。A)识别CAIX和PD-L1的双特异性抗体的图示和连接CH3结构域的“结进孔(knob into hole)”方法。B)三种类型的bsAb构建体的图示,其在CH2结构域中具有不同的突变以改变ADCC活性。

[0036] 图7.双特异性抗体的生成及其功能。A)展示与缀合的(非还原)对照IgG、亲本G37(WT)和双特异性(G37 KIHA+PD-L1 KIHb)抗体比较,在还原条件下工程改造的(G37KIHA)抗体的解离的蛋白凝胶。B)展示与对照IgG、亲本PDL-1(WT)和双特异性(G37 KIHA+PD-L1 KIHb)抗体比较,在还原条件下工程改造的(PD-L1 KIHb)抗体的解离的蛋白凝胶。C)通过流式细胞术进行的双特异性抗体与CAIX⁺PDL-1⁺SKRC-52细胞的结合的分析。

[0037] 图8.PD-L1特异性mAb42的功能表征。将来自四个健康供体(D1-D4)的PBMC在 α PDL1(mAb42)或对照同种型抗体的存在下培养,用0.1 μ g/ml SEB刺激48小时,并通过MSD装置测量TNF α 的生成。数据以一式三份的方式呈现*, $p<0.0005$ 。

[0038] 详述

[0039] 本发明提供特异性抗PD-L1的人源化单克隆抗体,也称为B7H1。所述抗体通过噬菌体展示抗体文库选择的方法通过使用脂蛋白体偶联的-PD-L1作为文库选择靶而鉴定。这些

抗体代表新一类的抗PD-L1的人单克隆抗体。

[0040] 这些抗-PD-L1人单克隆抗体在本文中被称为“huPD-L1抗体”。

[0041] PD-L1与PD-1的结合负调节T细胞抗原-特异性应答,这对自身免疫和免疫病理学的耐受和预防是极重要的。然而,过度的PD-L1/PD-1相互作用(其可由慢性抗原刺激引起)可导致T细胞抗原-特异性应答的抑制和T细胞的缺失(其为T细胞衰竭的特征)。T细胞衰竭是T细胞功能异常的状态,其可在慢性感染和癌症中产生。它定义为:弱效应子功能、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应子或记忆T细胞的转录状态的转录状态。衰竭阻止感染和肿瘤进展的管理。

[0042] 已经在不同的癌症中检测到PD-L1过量表达。例如,在乳腺癌中,PD-L1被过量表达并与高风险预后因子相关。在肾细胞癌中,PD-L1被增量调节并且在肿瘤浸润的白细胞中也已发现PD-1表达增加。抗-PD-L1和抗-PD-1抗体在I期临床试验中对肾细胞癌已经表现出一些临床功效。可结合至PD-1或PD-L1的治疗剂可用于特异性靶向肿瘤细胞。能够阻断PD-1/PD-L1相互作用的作用剂在治疗已经诱导T细胞衰竭以逃避抗-肿瘤T细胞活性的癌症中可能甚至更有用。这类作用剂的使用(单独使用或与其它抗-癌症疗法组合使用)可有效靶向过量表达PD-L1的肿瘤细胞并增加抗-肿瘤T细胞活性,由此提高对靶肿瘤细胞的免疫应答。

[0043] 在慢性抗原刺激(例如,通过慢性感染)后,PD-1和PD-L1还可被T细胞增量调节。在慢性HIV感染期间,HIV-特异性CD8+T细胞功能上被损害,表现出降低的产生细胞因子和效应子分子的能力和减弱的增殖能力。PD-1在HIV感染个体的HIV-特异性CD8+T细胞上高表达。因此,阻断此通路可增强HIV-特异性T细胞在响应HIV肽刺激时增殖和产生细胞因子的能力,由此提高针对HIV的免疫应答。其它慢性感染也可从PD-1/PD-L1阻断剂的使用中受益,例如慢性病毒感染、细菌感染或寄生虫感染。

[0044] 本发明提供特异性结合PD-L1蛋白的人单克隆抗体。本发明的抗体与PD-L1的结合干扰配体结合至它的受体PD1的能力。通过多种机制,huPD-L1抗体阻止抑制T细胞应答的负反馈机制。在一些情况下,huPD-L1抗体阻止、抑制或逆转T细胞衰竭。huPD-L1抗体的给予可导致T细胞增殖增加,抗原-特异性T细胞活性增加和效应子细胞因子的产生增加。在一些实例中,huPD-L1抗体促进或提高抗原-特异性免疫应答。此免疫应答可通过效应子T细胞介导。

[0045] huPD-L1抗体是单价的或二价的并包括单链或双链。功能上,huPD-L1抗体的结合亲和力在 10^{-5}M - 10^{-12}M 的范围内。例如,huPD-L1抗体的结合亲和力为 10^{-6}M - 10^{-12}M 、 10^{-7}M - 10^{-12}M 、 10^{-8}M - 10^{-12}M 、 10^{-9}M - 10^{-12}M 、 10^{-5}M - 10^{-11}M 、 10^{-6}M - 10^{-11}M 、 10^{-7}M - 10^{-11}M 、 10^{-8}M - 10^{-11}M 、 10^{-9}M - 10^{-11}M 、 10^{-10}M - 10^{-11}M 、 10^{-5}M - 10^{-10}M 、 10^{-6}M - 10^{-10}M 、 10^{-7}M - 10^{-10}M 、 10^{-8}M - 10^{-10}M 、 10^{-9}M - 10^{-10}M 、 10^{-5}M - 10^{-9}M 、 10^{-6}M - 10^{-9}M 、 10^{-7}M - 10^{-9}M 、 10^{-8}M - 10^{-9}M 、 10^{-5}M - 10^{-8}M 、 10^{-6}M - 10^{-8}M 、 10^{-7}M - 10^{-8}M 、 10^{-5}M - 10^{-7}M 、 10^{-6}M - 10^{-7}M 或 10^{-5}M - 10^{-6}M 。

[0046] 此外,本发明的抗体包含治疗剂,其包括但不限于毒素、放射性标记、siRNA或细胞因子。

[0047] huPD-L1抗体能够诱导细胞死亡。细胞死亡通过直接或间接的机制诱导。例如,PD-L1通过huPD-L1抗体的结合可导致补体依赖性细胞毒性(CDC)。备选地,huPD-L1抗体结合PD-L1,并导致第二细胞类型的募集,其会杀伤PD-L14-表达的靶细胞。范例性机制(通过该机制huPD-L1抗体通过募集第二细胞类型介导细胞死亡)包括但不限于:抗体-依赖性细胞

毒性 (ADCC) 和抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)。靶PD-L1-表达细胞类型包括肿瘤细胞和T细胞 (例如活化的T细胞)。

[0048] 十四种独特的单克隆huPD-L1抗体被鉴定出。这些包括Ab-14、Ab-16、Ab-22、Ab-30、Ab-31、Ab-32、Ab-38、Ab-42、Ab-46、Ab-50、Ab-52、Ab-55、Ab-56和Ab-65。

[0049] 单克隆huPD-L1抗体的核酸和氨基酸序列提供如下：

表 1A. Ab-14 可变区核酸序列
Ab-14 的 V _H 链(SEQ ID NO:1)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCT TACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGAC CACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCTCTACCTAGTGGGACTATACTGG TCGGAGGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-14 的 V _L 链(SEQ ID NO:3)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTA ACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAACATTGCCAGCAATTATGTGCAGTGG TACCAACAGCGCCCGGGCAGTGGCCCCACCACTGTGATCTATGAGGATAACCAA AGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAA TCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTAC TGTCAGTCTTATGATAGCAGCAATCTTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTA

[0050]

表 1B. Ab-14 可变区氨基酸序列
Ab-14 的 V _H 链(SEQ ID NO:2)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARALPSGTILVGG WFDPWGQGTLVTVSS
Ab-14 的 V _L 链(SEQ ID NO:4)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGNIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQR SGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNLWVFGGGTKLTVL

表 2A. Ab-16 可变区核酸序列
Ab-16 的 V _H 链(SEQ ID NO:5)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCCTGAGCTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTG GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGACGTGTTTCCAGAGACTTTTTTCGATG AACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-16 的 V_L 链(SEQ ID NO:7)

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTC
 AGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATGTTAAACAAACCGGC
 CCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCT
 TGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCC
 GGGACAGCAGTGGTAACCATTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTC
 CTA

表 2B. Ab-16 可变区氨基酸序列

Ab-16 的 V_H 链(SEQ ID NO:6)

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSAISGGG
 GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDVPETFSMNYG
 MDVWGQGTLVTVSS

Ab-16 的 V_L 链(SEQ ID NO:8)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSG
 IPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHYVFGTGKVTVL

表 3A. Ab-22 可变区核酸序列

Ab-22 的 V_H 链(SEQ ID NO:9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGG
 GTCCGTCAAGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTTATTAGTGGGGAT
 GGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
 GACAACAGCAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGA
 CACCGCCTTGATTACTGTGCAAAAGTGCTCCTCCCCTGTAGTAGTACCAGCTG
 CTATGGAAGCGTCGGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT
 CTCCTCA

Ab-22 的 V_L 链(SEQ ID NO:11)

TAGGACGATGAGCTCGGTCCCAGCTCCGAAGACATAATGATCACTATTATTATCC
 CACACCTGACAGTAATAATCGGCCTCATCACCGGCTTCGACCCTGCTGATGGTC
 AGGGTGGCCGTGTTCCAGAGTTGGAGCCAGAGAATCGCTCAGAGATCCCTGA
 GGGCCGGTCCCTATCAGAGTAGATGACCAACGCAGGGGCTGGCCTGGCTTCT
 GCTGGTACCAGTGACACTCTTCCTTCCAATGTCGCTTCCCCACAGGTAATCC
 TGGCCGTCTTCTGGGGCCACTGACACTGAGGGTGCCTGAGTCAGCACAGGC
 AG

表 3B. Ab-22 可变区氨基酸序列

Ab-22 的 V_H 链(SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGGGVVPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISGD
 GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKVLLPCSSTSCYG
 SVGAFDIWGQGTITVTVSS

Ab-22 的 V_L 链(SEQ ID NO:12)

LPVLTQAPSVSVAPGKTARITCGGSDIGRKSVMHWYQQKPGQAPALVIYSDRDRPSGI
 SERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDNNSDHYVFGAGTELIVL

表 4A. Ab-30 可变区核酸序列

Ab-30 的 V_H 链(SEQ ID NO:13)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAAGTGTGGTACGGCCTGGGGAATCCCT
 CAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTACCTTTGATAATTATGACATGAGTTGG

[0051]

GTCCGCCAAGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTCGTGTTAATTGGAA
TGGTGGTAGCACAACTTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG
AGACAACACCAAGAACTCCCTGTATCTACAAATGAACAACCTGAGAGCCGAAG
ACACGGCCGTGTATTACTGTGTGCGCGAGTTTGTGCGGTGCTTATGATCTCTGGG
GCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-30 的 V_L 链(SEQ ID NO:15)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATC
ACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC
TGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAACTCATGATTTATGATGTCAGT
AATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACG
GCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGC
AGCTCATATACAAGCAGCACTCTGCCGTTTCGGCGGA_gGGACCAAGCTGACCGTC
CTA

表 4B. Ab-30 可变区氨基酸序列

Ab-30 的 V_H 链(SEQ ID NO:14)

QVQLVQSGGSVVRPGESLRLSCVASGFIFDNYDMSWVRQVPGKGLEWVSRVNW
GGSTTYADAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNNLRAEDTAVYYCVREFVGAYDLWG
QGTITVTVSS

Ab-30 的 V_L 链(SEQ ID NO:16)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNR
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLPFGGGTKLTVL

[0052]

表 5A. Ab-31 可变区核酸序列

Ab-31 的 V_H 链(SEQ ID NO:17)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCCACAG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTTGGAGACACCTCCGCGGCCTCTATATACACT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCT
ATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTAC
CACGGACGAATCCACGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCGGACTACGTTGGGGGATCTGGGGC
TGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-31 的 V_L 链(SEQ ID NO:19)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCAACAGCTTAGCCTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATGTATGGTGCATCCAGCA
GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGGCTGGGACAGACTTC
ACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAACGTATTACTGTGAG
CAGCATACTATCCCAACATTCTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGAAGTCAAA

表 5B. Ab-31 可变区氨基酸序列

Ab-31 的 V_H 链(SEQ ID NO:18)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSVCKVFGDTFRGLYIHVVRQAPQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITDESTSTAYMELSSLRSED_TAVYYCASGLRWGIWGWFD_P
WGQGLTVTVSS

Ab-31 的 V_L 链(SEQ ID NO:20)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGNSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRATG
IPDRFSGSGAGTDFTLTISSELEPEDFATYYCQHQHTIPTFSFGPGTKVEVK

表 6A. Ab-32 可变区核酸序列

Ab-32 的 V_H 链(SEQ ID NO:21)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTTTGGAGGCACCTTCAGTGACAATGCTATCAGCTG
GGTGCAGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTGAGTGGATGGGGGGCATCATTCTTA
TCTTTGAAAAACCAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACC
GCGGACGAATCCACGAGCACTGCCTACATGGTCCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAACTATGGTTCGGGGCTTTCTTGGGGT
TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA

Ab-32 的 V_L 链(SEQ ID NO:23)

GATATTGTGATGACCCAGACTCCATCCTTCCTGTCCGCATCCATAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTGGCAGTTATTTAGCCTGGTAT
CAGCAAAGACCAGGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCGACTTTG
CAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGACTTCAC
TCTCACAATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GCTTAATAATTACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

表 6B. Ab-32 可变区氨基酸序列

Ab-32 的 V_H 链(SEQ ID NO:22)

EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCAFGGTFSDNAISWVRQAPGQGPPEWMGGIPIFG
KPNYAQKFQGRVTITADESTAYMVLSSLRSEDTAVYYCARTMVRGFLGVM DV
WGQGT TVTVSS

Ab-32 的 V_L 链(SEQ ID NO:24)

DIVMTQTSPSFLSASIGDRVITICRASQGIGSYLAWYQQRPGAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFGSGSGDFTLTISNLQPEDFATYYCQQLNNYPITFGQGRLEIK

[0053]

表 7A. Ab-38 可变区核酸序列

Ab-38 的 V_H 链(SEQ ID NO:25)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA
GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCA
GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATCAGTTCGTTACGATTTTGGAGTG
CCAAGATACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTC
A

Ab-38 的 V_L 链(SEQ ID NO:27)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGC
CAACATCCCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAAATATGCTTACTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTACTGCTCATCTATCAAGATATCAAGCGGCCC
TCAAGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGCGGACACAGCCACTCTG
ACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGACAGCTGG
GACAACAGCGTGGTCTTCGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTCCTC

表 7B. Ab-38 可变区氨基酸序列

Ab-38 的 V_H 链(SEQ ID NO:26)

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDQFVTIFGVPRY
GMDVWGQGT TVTVSS

Ab-38 的 V_L 链(SEQ ID NO:28)

QSALTQPPSVSVSPGQTANIPCSGDKLGNKYAYWYQQKPGQSPVLLIYQDIKRPSRI
PERFSGSNSADTATLTISGTQAMDEADYYCQTWDNSVVFGGGKLTVL

表 8A. Ab-42 可变区核酸序列

Ab-42 的 V_H 链(SEQ ID NO:29)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTG
GGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTA
TCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACC
GCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGGGCGTCAAATGTTTCGGTGCGGGAA
TTGATTCTGGGGCCCGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-42 的 V_L 链(SEQ ID NO:31)

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTA
ACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGACAGCAACTATGTGCAGTG
GTACCAGCAGCGCCCGGGCAGCGCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACC
AAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCA
ACTCTGCCTCCCTACCCTCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACT
ACTGTCAGTCTTATGATAGCAACAATCGTCATGTGATATTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA

表 8B. Ab-42 可变区氨基酸序列

Ab-42 的 V_H 链(SEQ ID NO:30)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRQMFGAGIDFWG
PGTLVTVSS

Ab-42 的 V_L 链(SEQ ID NO:32)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRP
S GVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSNNRHVIFGGGKLTVL

表 9A. Ab-46 可变区核酸序列

Ab-46 的 V_H 链(SEQ ID NO:33)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAAGTAAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAAGTCTCCTGCAAGTTTCAGGAGGCACATTCGGCACCTATGCTCTCAACTG
GGTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCGTCCCTC
TCATTGGTCTAGTAACTACGCACATAACTTTGAGGGCAGAATCTCGATTACCGC
GGACAAGTCCACGGGCACAGCCTACATGGAAGTGAAGCAACCTGAGATCTGACG
ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGTCTACGGTGGTAACTCCGACTACT
GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-46 的 V_L 链(SEQ ID NO:35)

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCAGTGTGCGAGTCTCCGGGGAAGACGGTA
ACCATCTCCTGCACTCGCAGTAGTGGCAACATTGGCACCAACTATGTGCAGTGG
TACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCCGTCGCTTTGATCTACGAGGATTATCGA
AGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAAC
TCTGCCTCCCTCATCATCTCTGGACTGAAGCCTGAGGACGAGGCTGACTACTAC
TGTCAGTCTTATCATAGCAGCGTTGGGAATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC
CGTCCTC

表 9B. Ab-46 可变区氨基酸序列

Ab-46 的 V_H 链(SEQ ID NO:34)

[0054]

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKVSGGTFGTALNWVRQAPGQGLEWMGRIVPL IGLVNYAHNFEGRISITADKSTGTAYMELSNLRSDDTAVYYCAREVYGGNSDYWG QGTLLTVSS
Ab-46 的 V _L 链(SEQ ID NO:36)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGNIGTNYVQWYQQRPGSAPVALIYEDYRRP SGVPDRFSGSIDSSNSASLIISGLKPEDEADYYCQSYHSSGWEFGGGTKLTVL

表 10A. Ab-50 可变区核酸序列
Ab-50 的 V _H 链(SEQ ID NO:37)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGTGAGGTGAAGAAGCCGGGGCCTCAG TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGAGCAGTCATGGTATAACCT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCT CACAATGGTCACGCTAGCAATGCACAGAAGGTGGAGGACAGAGTCACTATGAC TACTGACACATCCACGAACACAGCCTACATGGAAGTGGAGGAGCCTGACAGCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTACATGCTGCCCTCTACTATGGTAT GGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-50 的 V _L 链(SEQ ID NO:39)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGC CAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGGTGTGCACTGGTATC AGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGGTCTCTATGATGATAGTGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCC TGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTG TGGGATAGTAGTAGTGATCATTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC CTA

[0055]

表 10B. Ab-50 可变区氨基酸序列
Ab-50 的 V _H 链(SEQ ID NO:38)
QVQLVQSGGEVKKPGASVKVSKASGYTLSSHGITWVRQAPGQGLEWMGWISA HNGHASNAQKVEDRVTMTTDTSTNTAYMELRSLTADDTAVYYCARVHAALYYG MDVWGQGTLTVSS
Ab-50 的 V _L 链(SEQ ID NO:40)
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKGVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVL

表 11A. Ab-52 可变区核酸序列
Ab-52 的 V _H 链(SEQ ID NO:41)
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGAGGTCCC TGAGACTCTCCTGTTACGCCTCTGGATTACCTTCAGCAGACATGGCATGCACT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATCACAT GATGGAAGTGTAATACTATGCAGACTCCATGAAGGGCCGATTACAGCATCTCC AGAGACAATTCCAACAACACACTGTATCTCAAATGGACAGCCTGAGAGCTGA CGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGGACTGTCGTACCAGGTGTCGGGGT GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-52 的 V _L 链(SEQ ID NO:43)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTA ACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGG TACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACCAA AGACCCTCTGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAAC TCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTAC TGTCAGTCTTATGATAGCACCACCCCTTCGGTGTTCGGCGGCGGGACCAAGCTG

ACCGTCCTA

表 11B. Ab-52 可变区氨基酸序列

Ab-52 的 V_H 链(SEQ ID NO:42)

QVQLQESGGGVVQPGRLRLSCSASGFTFSRHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHD
GSVKYYADSMKGRFSISRDNSENNTLYLQMDSLRADDTAVYYCARGLSYQVSGWF
DPWGQGLTVTVSS

Ab-52 的 V_L 链(SEQ ID NO:44)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRP
GVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSTTPSVFGGGTKLTVL

表 12A. Ab-55 可变区核酸序列

Ab-55 的 V_H 链(SEQ ID NO:45)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGACCAGCCCT
CATAATGGTCTCACAGCATTTGCACAGATCCTAGAGGGCCGAGTCACCATGACC
ACAGACACATCCACGAACACAGCCTACATGGAATTGAGGAACCTGACATTTGAT
GACACGGCCGTTATTTCTGTGCGAAAGTACATCCTGTCTTCTTATGCGTTGG
ACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-55 的 V_L 链(SEQ ID NO:47)

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCCCCGGGGAAGACGGTA
ACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTACAGTGG
TACCAGCAGCGCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCTATGAAGATAACCAA
AGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACACCTCCTCCAAC
TCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTAAGGACGAGGCGGACTACTAC
TGTCAGTCTTATGATGGCATCACTGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACC
GTCCTA

[0056]

表 12B. Ab-55 可变区氨基酸序列

Ab-55 的 V_H 链(SEQ ID NO:46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWTS
P HNGLTAFQILEGRVTMTTDTSTNTAYMELRNLTFFDDTAVYFCAKVHPVFSYALDV
WGQGLTVTVSS

Ab-55 的 V_L 链(SEQ ID NO:48)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP
GVPDRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTKDEADYYCQSYDGITVIFGGGKLTVL

表 13A. Ab-56 可变区核酸序列

Ab-56 的 V_H 链(SEQ ID NO:49)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGATGAACCCTGGGTCTCCTCGGT
GAGGGTCTCCTGCAGGGGTTCTGGAGGCGACTTCAGTACCTATGCTTTCAGCTG
GGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTA
TCCTTGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCG
CGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAC
GATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGCTATGGTTTCGGACCCGGTGCTAT
GGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-56 的 V_L 链(SEQ ID NO:51)

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGGGTCTCCGGGGAAGACGGTA

ACCCTCCCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCCACTATGTCCAGTGG
TACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAACAA
GAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCAA
CTCTGCCTCCCTCAGCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTA
CTGTCAGTCTTATGATAGCAGCAATCGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCT
GACCGTCCTA

表 13B. Ab-56 可变区氨基酸序列

Ab-56 的 V_H 链(SEQ ID NO:50)

EVQLVESGAEVMNPGSSVRVSCRSGGDFSTYAFSWVRQAPGQGLEWMGRIIPIL
GIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDGYGSDPVLWGQ
GTLVTVSS

Ab-56 的 V_L 链(SEQ ID NO:52)

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTLPCRSSGSIASHYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNKR
SGVPDRFSGSIDSSNSASLSISGLKTEADYYCQSYDSSNRWVFGGGTKLTVL

表 14A. Ab-65 可变区核酸序列

Ab-65 的 V_H 链(SEQ ID NO:53)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCT
TACAATGGTAAACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGAC
CACAGACACATCCACGAGCACAGGCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG
ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGATTTTCGGAAACCCTTTGACT
ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Ab-65 的 V_L 链(SEQ ID NO:55)

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCCCCGGAGCATCAGCC
AGTCTCACCTGCACCTTACGCAGTGGCCTCAATGTTGGTTCCTACAGGATATACT
GGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCGTCCCCAGTATCTCCTGAACCTACAAATCA
GACTCAAATAAACAGCAGGCCTCTGGAGTCCCCAGCCGCTTCTCTGGATCCAA
GGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATTTTACTCATCTCCGGGCTCCAGTCTGAGGA
TGAGGCTGACTATTACTGTATGATTTGGTACAGCAGCGCTGTGGTATTCGGCGGA
GGGACCAAGCTGACCGTCCTA

表 14B. Ab-65 可变区氨基酸序列

Ab-65 的 V_H 链(SEQ ID NO:54)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY
NGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTGYMELRSLRSDDTAVYYCARGDFRKPFDYW
GQGLTVTVSS

Ab-65 的 V_L 链(SEQ ID NO:56)

LPVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSLNVGSYRIYWYQQKPGSRPQYLLNYKSDS
NKQQASGVPSRFSKSDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWYSSAVVFGGGTK
LTVL

[0058] huPD-L1抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸序列在下表15A和15B中显示。

[0059] 表15A. 重链互补决定区的氨基酸序列。

[0060]

抗体	CDR 1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
----	----------	------------------	------	------------------	------	------------------

[0061]

共有区	SYAIS	57	WISPIGGSTNYA QKVQG	70	GLXXXXXXXXXX XXXXXDV	85
Ab-14	SYGIS	58	WISAYNGNTNYA QKLQG	71	ALPSGTILVGGWFD P	86
Ab-16	SYALS	59	AISGGGGSTYYA DSVKD	72	DVFPETFSMNYGM DV	87
Ab-22	DYAMH	60	LISGDGGSTYYA DSVKD	73	VLLPCSSTSCYGSV GAFDI	88
Ab-30	NYDMS	61	RVNWNGGSTTYA DAVKD	74	EFVGAYDL	89
Ab-31	GLYIH	62	WIIPIFGTANYAQ KFED	75	GLRWGIWGWFD	90
Ab-32	DNAIS	63	WIIPIFGKPNYAQ KFED	76	TMVRGFLGVMDV	91
Ab-38	SYAMS	64	AISGSGGSTYYA DSVKD	77	DQFVTIFGVPRYG MDV	92
Ab-42	SYAIS	57	WIIPIFGTANYAQ KFED	78	GRQMFGAGIDF	93
Ab-46	TYALN	65	RIVPLIGLVNYAH NFED	79	EVYGGNSDY	94
Ab-50	SHGIT	66	WISAHNGHASNA QKVED	80	VHAALYYGMDV	95
Ab-52	RHGMH	67	VISHDGSVKYYA DSMKD	81	GLSYQVSGWFD	96
Ab-55	SYGIS	58	WTSPHNGLTAF AILED	82	VHPVFSYALDV	97
Ab-56	TYAFS	68	RIIPILGIANYAQ KFED	83	DGYGSDPVL	98
Ab-65	NYGIS	69	WISAYNGNTNYA QKVED	84	GDFRKPFYD	99

[0062] 表15B.轻链互补决定区的氨基酸序列。

[0063]

抗体	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
共有区	TRSSGSIGSNY VQ	100	EDNQRPS	115	QSYDSSTWV	126
Ab-14	TRSSGNIASNY VQ	101	EDNQRPS	115	QSYDSSNLWV	127
Ab-16	QGDSLRSYYAS	102	GKNNRPS	116	NSRDSSGNHY V	128
Ab-22	GGSDIGRKS VH	103	SDRDRPS	117	QVWDNNSDH YV	129
Ab-30	TGTSSDVGGYN YVS	104	DVSNRPS	118	SSYTSSTLP	130
Ab-31	RASQSIGNSLA	105	GASSRAT	119	QQHTIPTFS	131
Ab-32	RASQGIGSYLA	106	AATLQS	120	QQLNNYPIT	132
Ab-38	SGDKLGNKYAY	107	QDIKRPS	121	QTWDNSV V	133
Ab-42	TRSSGSIDS NYV Q	108	EDNQRPS	115	QSYDSNNRHVI	134
Ab-46	TRSSGNIGTNY VQ	109	EDYRRPS	122	QSYHSSGWE	135
Ab-50	GGNNIGSKGVH	110	DDSDRPS	123	QVWDSSSDHW V	136
Ab-52	TRSSGSIASNYV	111	EDNQRPS	115	QSYDSTTPSV	137

[0064]

	Q					
Ab-55	TRSSGSIASNYV Q	112	EDNQRPS	115	QSYDGITVI	138
Ab-56	TRSSGSIASHYV Q	113	EDNKRPS	124	QSYDSSNRWV	139
Ab-65	TLRSGLNVGSY RIY	114	YKSDSNK QQAS	125	MIWYSSAVV	140

[0065] 本文描述的huPD-L1抗体与PD-L1结合。在一方面中,huPD-L1抗体对PD-L1具有高亲和力和高特异性。在另一方面中,huPD-L1抗体可结合PD-1受体并阻止、抑制或阻断配体PD-L1结合其受体PD-1。在一些实例中,huPD-L1抗体可具有一些与PD-L2的交叉反应性。在一些实例中,huPD-L1抗体不显示任何与PD-L2的交叉反应性。在一些实例中,huPD-L1抗体以与结合至PD-L2相比更高的亲和力和/或更高的特异性结合至PD-L1。

[0066] 本发明还描述以下抗体的特征,其与本文描述的huPD-L1抗体的氨基酸或核苷酸序列具有特定百分比的同一性或相似性。例如,当与本文描述的huPD-L1抗体的任一种的特定区域或全长作比较时,所述抗体可具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性。与本发明的核酸和蛋白的序列同一性或相似性可通过本领域已知的方法进行的序列比较和/或比对而确定。例如,可利用序列比较算法(即BLAST或BLAST 2.0)、手动比对或目测确定对本发明的核酸和蛋白的百分比序列同一性或相似性。

[0067] 对于氨基酸序列,本领域技术人员将容易地认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单个替代、缺失或添加(其在编码序列中变更、添加、缺失或替代单个氨基酸或小百分比的氨基酸)在本文中被统称为“保守性修饰变体”。在一些实施方案中,所述变更导致将氨基

酸用化学上类似的氨基酸替代。提供功能上类似的氨基酸的保守性替代代表在本领域为周知的。与未修饰的huPD-L1抗体相比,本文公开的huPD-L1抗体的这类保守性修饰变体可展示出增强的对PD-L2的交叉反应性。

[0068] 抗体

[0069] 本文使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即,含特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与……免疫反应”意指抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应和不与其它多肽反应。抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、dAb(结构域抗体)、单链抗体、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 和 $F_{(ab')_2}$ 片段、scFv和 F_{ab} 表达文库。

[0070] 单链Fv(“scFv”)多肽分子是共价连接的 $V_H:V_L$ 杂二聚体,其可自包含通过肽编码的接头连接的 V_H -和 V_L -编码基因的基因融合物表达(参见Huston等人(1988)Proc Nat Acad SciUSA 85(16):5879-5883)。许多方法已被描述以分辨化学结构,用于将天然聚集的、但化学上分隔开的来自抗体V区的轻多肽链和重多肽链转变成scFv分子(其可折叠成与抗原-结合位点的结构大体上类似的三维结构)。参见,例如,美国专利号5,091,513、5,132,405和4,946,778。

[0071] 已经并且可以创建非常大的天然人scFv文库以提供抗大量靶分子的重排抗体基因的大来源。可从患有传染性疾病的个体中构建较小的文库以便分离疾病-特异性抗体。(参见Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:9339-43(1992);Zebedee等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3175-79(1992))。

[0072] 通常,从人获得的抗体分子涉及种类IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任一种,它们在分子中存在的重链的性质上彼此不同。某些种类还具有亚类,例如IgG₁、IgG₂以及其它。此外,在人中,轻链可为 κ 链或 λ 链。术语“抗原-结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子的一部分,该部分参与抗原结合。抗原结合位点由重(“H”)链和轻(“L”)链的N-末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。在重链和轻链的V区内被称为“高变区”的三个高度差异的伸展区(stretch)被插入在被称为“构架区”或“FR”的更保守的侧翼伸展区之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间并邻接于免疫球蛋白中的高变区的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此排列以形成抗原-结合表面。抗原-结合表面与结合的抗原的三维表面互补,并且重链和轻链的每一个的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在图2中显示了scFv抗体的VH和VL区的CDR。

[0073] 本文使用的术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白、scFv或T-细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学上有活性的表面集簇组成,且通常具有特定的三维结构特征,和特定的电荷特征。例如,抗体可针对多肽的N-末端或C-末端肽而产生。

[0074] 本文使用的术语“免疫结合”和“免疫结合性质”是指这样类型的非共价相互作用,其发生在免疫球蛋白分子和抗原(对于该抗原而言免疫球蛋白为特异性的)之间。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以相互作用的解离常数(K_d)表示,其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。所选多肽的免疫结合性质可使用本领域中周知的方法定量。一种这类方法牵涉测量抗原-结合位点/抗原复合物形成和解离的速度,其中那些速度取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力和几何参数,所述参数同等地在两个方向上影响速度。因此,“结合速

率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})两者都可通过浓度与缔合和解离的实际速度的计算而确定。(参见Nature 361:186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率使得与亲和力不相关的所有参数的删除成为可能,并且等于解离常数 K_d (通常参见Davies等人(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。当平衡结合常数(K_d)为 $\leq 10\mu M$,优选为 $\leq 10nM$,更优选为 $\leq 10nM$,和最优选为 $\leq 100pM$ -约 $1pM$ 时(如通过测定例如放射配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定所测量),本发明的抗体被认为特异性地结合至PD-L1表位。

[0075] 可将本发明的PD-L1蛋白或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物用作抗体(其免疫上特异性结合这些蛋白组分)的产生中的免疫源。可将与脂蛋白体偶联的PD-L1蛋白或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物用作抗体(其免疫上特异性结合这些蛋白组分)的产生中的免疫源。

[0076] 本领域技术人员将认识到,通过弄清是否一种人单克隆抗体阻止本发明的人单克隆抗体结合至PD-L1,有可能确定(不需要过度的实验)是否前者具有与后者一样的特异性。如果所述受测试的人单克隆抗体与本发明的人单克隆抗体竞争(如通过由本发明的人单克隆抗体产生的结合中的减少所示),那么有可能两种单克隆抗体结合至相同的或密切相关的表位。

[0077] 确定是否一种人单克隆抗体具有本发明的人单克隆抗体的特异性的另一方法是将本发明的人单克隆抗体与PD-L1蛋白(它通常是与PD-L1蛋白有反应的)预孵育,并随后加入受测试的人单克隆抗体以确定是否受测试的人单克隆抗体在其结合PD-L1的能力上被抑制。如果所述受测试的人单克隆抗体被抑制,那么很有可能,它具有与本发明的单克隆抗体相同或功能上同等的表位特异性。本发明的人单克隆抗体的筛选还可通过使用PD-L1并确定是否该测试单克隆抗体能够中和PD-L1而实施。

[0078] 本领域内已知的多种方法可用于制备定向抗本发明的蛋白或抗其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物的多克隆或单克隆抗体。(参见,例如,Antibody: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册),Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 通过引用并入本文)。

[0079] 抗体可通过周知的技术,例如使用蛋白A或蛋白G的亲合层析(其主要提供免疫血清的IgG流分)纯化。随后或备选地,可将特异性抗原(其为寻求的免疫球蛋白的靶)或其表位固定在柱上以通过免疫亲和层析而纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化例如由D. Wilkinson论述(The Scientist, 由The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (2000年4月17日), 25-28页公布)。

[0080] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“MAb”或“单克隆抗体组合物”是指含有仅一种分子种类的抗体分子的抗体分子群体,所述抗体分子由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。尤其地,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在该群体的所有分子中为一致的。MAb含有能够与特定抗原表位免疫反应的抗原结合位点(其表征为对抗原表位独特的结合亲和性)。

[0081] 单克隆抗体可使用杂交瘤法,例如由Kohler和Milstein, Nature, 256:495 (1975)描述的那些杂交瘤法而制备。在杂交瘤法中,通常将小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物用免疫剂免疫以引出产生或能够产生抗体的淋巴细胞,所述抗体与免疫剂特异性结合。备选地,淋巴细胞可在体外被免疫。

[0082] 免疫剂通常包括蛋白抗原、其片段或其融合蛋白。通常,如果需要人源细胞则使用外周血淋巴细胞,或如果需要非人哺乳动物源则使用脾细胞或淋巴结细胞。随后使用合适的融合剂,例如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化的细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: principles and Practice (单克隆抗体:原理和实施), Academic Press, (1986年) 59-103页)。永生化的细胞系通常为转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。可将杂交瘤细胞在合适的培养基中培养,所述培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞的生长或存活物质。例如,如果亲本细胞缺乏酶——次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),所述物质防止HGPRT-缺陷型细胞的生长。

[0083] 优选的永生化的细胞系是有效地融合、支持由选定的抗体产生细胞产生的抗体的稳定高水平表达和对诸如HAT培养基等培养基敏感的那些细胞系。更优选的永生化的细胞系为鼠骨髓瘤系,其可例如从Salk Institute cell Distribution Center,圣地亚哥,加利福尼亚和American Type Culture Collection,马纳萨斯,维吉尼亚获得。人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系也已被描述用于人单克隆抗体的产生。(参见Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (单克隆抗体的产生技术和应用), Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 51-63页)。

[0084] 杂交瘤细胞在其中培养的培养基可随后针对定向抗抗原的单克隆抗体的存在而测定。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定,例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)而确定。这类技术和测定在本领域中是已知的。单克隆抗体的结合亲和力可例如通过Munson和Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的Scatchard分析而确定。此外,在单克隆抗体的治疗应用中,重要的是鉴定出对靶抗原具有高度特异性和高结合亲和力的抗体。

[0085] 在所需杂交瘤细胞被鉴定出之后,可通过有限稀释步骤将克隆亚克隆并通过标准方法让其生长。(参见Goding, 单克隆抗体:原理和实施 (Monoclonal Antibodies: principles and Practice), Academic Press, (1986) 59-103页)。为此目的的合适的培养基包括,例如, Dulbecco's Modified Eagle's Medium和RPMI-1640培养基。备选地,可让杂交瘤细胞作为哺乳动物的腹水在体内生长。

[0086] 由亚克隆分泌的单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化方法例如, A蛋白琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基或腹水流体中分离或纯化。

[0087] 单克隆抗体也可通过重组DNA法(例如在美国专利号4,816,567中描述的那些)而进行。编码本发明的单克隆抗体的DNA可容易地使用常规方法(例如,通过使用能够特异性地结合至编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡聚核苷酸探针)分离并测序。本发明的杂交瘤细胞作为这类DNA的优选来源。一旦被分离出来,该DNA就可被放入表达载体,其随后被转染入宿主细胞例如猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞(其不另外产生免疫球蛋白),以获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体的合成。DNA也可例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠序列(参见美国专利号4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994))或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分共价

连接至免疫球蛋白编码序列而修饰。这类非免疫球蛋白多肽可取代本发明的抗体的恒定结构域,或可取代本发明的抗体的抗原-结合位点的可变结构域,以产生嵌合二价抗体。

[0088] 全人抗体是抗体分子,其中轻链和重链二者的整个序列(包含CDR)由人基因产生。本文中这类抗体被称为“人源化抗体”、“人抗体”或“全人抗体”。人单克隆抗体可通过使用三源杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor等人,1983Immunol Today 4:72)和用以制备人单克隆抗体的EBV杂交瘤技术(参见Cole等人,1985In:单克隆抗体和癌治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),Alan R.Liss,Inc.,77-96页)而制备。人单克隆抗体通过使用人杂交瘤(参见Cote等人,1983.Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030)或通过体外用Epstein Barr病毒转化人B细胞(参见Cole等人,1985In:单克隆抗体和癌治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),Alan R.Liss,Inc.,77-96页)可被利用和可被制备。

[0089] 此外,人抗体也可使用另外的技术(其包括噬菌体展示文库)而制备。(参见Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991))。类似地,人抗体可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如,其中内源免疫球蛋白基因被部分地或完全地失活的小鼠)制得。在激发时,观察到人抗体产生,其与在人中包括基因重排、装配和抗体库(antibody repertoire)的所有方面中观察到的密切相似。此方法在例如,美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016和Marks等人,Bio/Technology 10,779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368856-859(1994);Morrison,Nature 368,812-13(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14,845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14,826(1996);以及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.1365-93(1995)中描述。

[0090] 人抗体可另外使用转基因非人动物而制备,所述动物被修饰以便在响应抗原的激发时产生全人抗体而非该动物的内源抗体。(参见PCT公开W094/02602)。在非人宿主中编码重和轻免疫球蛋白链的内源基因已经被失能,并且编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性的基因座被插入宿主的基因组。人基因例如使用含所需人DNA片段的酵母人工染色体而被掺入。随后通过将中间转基因动物(其含有少于全部修饰补充)杂交作为子代获得提供全部所需修饰的动物。这类非人动物的优选实施方案是小鼠,并被称为XenomouseTM(如在PCT公布W0 96/33735和W0 96/34096中公开)。此动物产生分泌全人免疫球蛋白的B细胞。抗体可在用目的免疫源免疫之后直接从动物(例如,作为多克隆抗体的制备)或备选地从来源于该动物的永生化的B细胞(例如产生单克隆抗体的杂交瘤)获得。另外,编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因可被回收并表达以直接获得抗体,或可被进一步修饰以获得抗体的类似物,例如,单链Fv(scFv)分子。

[0091] 产生缺乏内源免疫球蛋白重链的表达的非人宿主(例如小鼠)的方法的实例在美国专利号5,939,598中公开。它可以通过以下方法获得,所述方法包括:从胚胎干细胞中的至少一个内源重链基因座中删除J片段基因以阻止基因座的重排和阻止重排的免疫球蛋白重链基因座的转录物的形成,所述删除通过含编码可选择标志物的基因的靶向载体而实现;和从胚胎干细胞产生转基因小鼠,其体细胞和生殖细胞含有编码可选择标志物的基因。

[0092] 用于制备目的抗体(例如人抗体)的一种方法在美国专利号5,916,771中公开。此方法包括将含有编码重链的核苷酸序列的表达载体引入培养中的一种哺乳动物宿主细胞

中,将含编码轻链的核苷酸序列的表达载体引入另一哺乳动物宿主细胞,并将两种细胞融合以形成杂交细胞。该杂交细胞表达含重链和轻链的抗体。

[0093] 在对此方法的进一步改进中,用于鉴定免疫源上的临床相关表位的方法和用于选择以高亲和力免疫特异性地结合至相关表位的抗体的相关方法在PCT公布W0 99/53049中公开。

[0094] 抗体可通过含编码上面描述的单链抗体的DNA片段的载体表达。

[0095] 这些可包括载体、脂质体、裸DNA、佐剂-辅助的DNA、基因枪、导管等。载体包括例如在W0 93/64701中描述的化学缀合物(其具有靶向部分(例如,细胞表面受体的配体)和核酸结合部分(例如,多聚赖氨酸))、病毒载体(例如DNA或RNA病毒载体)、在例如PCT/US 95/02140(W0 95/22618)中描述的融合蛋白(其为含靶向部分(例如对靶细胞特异的抗体)和核酸结合部分(例如鱼精蛋白))、质粒、噬菌体等。所述载体可为染色体的、非染色体的或人造的。

[0096] 优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病病毒。DNA病毒载体是优选的。这些载体包括痘载体例如正痘或禽痘载体、疱疹病毒载体例如单纯疱疹病毒I(HSV)载体(参见Geller,A.I.等人,J.Neurochem,64:487(1995);Lim,F.等人,in DNA Cloning:Mammalian Systems(在DNA克隆中:哺乳动物系统),D.Glover编辑(Oxford Univ.Press,Oxford England)(1995);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.90:7603(1993);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci USA 87:1149(1990))、腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等人,Science,259:988(1993);Davidson等人,Nat.Genet 3:219(1993);Yang等人,J.Virol.69:2004(1995))和腺相关病毒载体(参见Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.8:148(1994))。

[0097] 痘病毒载体将基因引入细胞胞质。禽痘病毒载体仅导致核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体对于将核酸引入神经细胞是优选的。腺病毒载体(约2个月)导致与腺相关病毒(约4个月)相比更短期限的表达,所述腺相关病毒又比HSV载体的表达期限更短。选择的具体载体将取决于靶细胞和被处理的条件。所述引入可通过标准技术,例如感染、转染、转导或转化进行。基因转移的模式实例包括例如,裸DNA、CaPO₄沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂质转染法、细胞显微注射和病毒载体。

[0098] 可使用载体以靶向基本上任何所需的靶细胞。例如,立体定位注射可用于将载体(例如腺病毒,HSV)指引至所需位置。另外,颗粒可通过脑室内(icv)灌注使用微泵灌注系统(例如SynchroMed灌注系统)递送。基于总体流动(bulk flow)的方法(被称为对流(convection))也被证明在递送大分子至脑的扩展区域的情况下是有效的,并可在递送载体至靶细胞中是有用的。(参见Bobo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2076-2080(1994);Morrison等人,Am.J.Physiol.266:292-305(1994))。可使用的其它方法包括导管、静脉内、肠胃外、腹膜内和皮下注射,以及口服或其它已知的给予途径。

[0099] 这些载体可用于表达大量的抗体,其可以多种方式使用。例如,在样品中检测PD-L1的存在。抗体也可用于尝试结合并干扰PD-L1活性。

[0100] 可修改技术以制备对本发明的抗原蛋白特异的单链抗体(参见例如,美国专利号4,946,778)。此外,可修改方法以构建F_{ab}表达文库(参见例如,Huse等人,1989Science 246:1275-1281),以允许快速和有效鉴定对蛋白或其衍生物、片段、类似物或同系物具有所需特

异性的单克隆 F_{ab} 片段。含针对蛋白抗原的独特型的抗体片段可通过本领域已知的技术制备,其包括但不限于:(i)通过胃蛋白酶消化抗体分子制备的 $F_{(ab')_2}$ 片段;(ii)通过将 $F_{(ab')_2}$ 片段的二硫键还原产生的 F_{ab} 片段;(iii)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而产生的 F_{ab} 片段和(iv) F_v 片段。

[0101] 杂缀合物抗体也在本发明的范围内。杂缀合物抗体由两个共价连接的抗体组成。这类抗体已例如被提议将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(参见美国专利号4,676,980)和用于HIV感染的治疗(参见WO 91/00360;WO 92/200373;EP 03089)。预期所述抗体可使用合成蛋白化学中的已知方法(包括包含交联剂的那些)在体外制备。例如,免疫毒素可使用二硫化物交换反应(disulfide exchange reaction)或通过形成硫醚键而构建。针对此目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇酯(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸酯和例如在美国专利号4,676,980中公开的那些。

[0102] 对于效应子功能,为了增强例如抗体在治疗癌症中的效果,修饰本发明的抗体可能为合乎需要的。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区,由此允许在此区中链间二硫键的形成。由此生成的同源二聚抗体可增强内化能力和/或增加补体-介导的细胞杀伤和抗体-依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。(参见Caron等人,J.Exp Med.,176:1191-1195(1992)和Shopes,J.Immunol.,148:2918-2922(1992))。备选地,抗体可经工程改造以具有双Fc区,并且可由此具有增强的补体裂解和ADCC能力。(参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design(抗癌药物设计),3:219-230(1989))。

[0103] 本发明还涉及免疫缀合物,其包含与细胞毒性剂例如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合的抗体。

[0104] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 α -八叠球菌(α -sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白(*Phytolacca americana* proteins)(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制因子、泻果素、巴豆毒素、石碱草抑制因子、白树毒素、丝林霉素、局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(neomycin)和单端孢霉烯族毒素类(tricothecenes)。多种放射性核素对于制备放射性缀合抗体是可利用的。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0105] 抗体和细胞毒性剂的缀合物使用多种双功能蛋白-偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚胺基硫代环戊烷(IT)、亚胺酯的双功能衍生物(例如己二亚胺酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(例如辛酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对-叠氮苯甲酰)己二胺)、双-重氮衍生物(例如双-(对-重氮苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯基2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(例如1,5-二氟代-2,4-二硝基苯)制造。例如,蓖麻毒素免疫毒素可按在Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中描述而制备。碳-14-标记的1-异硫氰酰基苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射核苷酸缀合至抗体的范例性的螯合剂。(参见W094/11026)。

[0106] 本领域的普通技术人员将认识到,种类繁多的可能的部分可偶联至所得抗体或本发明的其它分子。(参见,例如,“Conjugate Vaccins”,Contributions to Microbiology and Immunology(“缀合物疫苗”,对微生物和免疫学的贡献),J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编辑),Carger Press,NewYork,(1989),其全部内容通过引用并入本文)。

[0107] 偶联可通过任何化学反应实施,所述化学反应结合两个分子,只要抗体和其它部分保持它们各自的活性。此连接可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和结合、插层、配位结合和络合。然而,优选的结合是共价结合。共价结合可通过存在的侧链的直接缩合或通过外部的桥接分子的掺入而完成。许多二价的或多价的连接剂在将蛋白分子(例如本发明的抗体)偶联至其它分子中是有用的。例如,代表性的偶联剂可包括有机化合物例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和环己二胺

(hexamethylenediamines)。该列表不意图为本领域已知多种种类的偶联剂的穷举,而是较常见的偶联剂的范例。(参见Killen和Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen等人, *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); 和Vitetta等人, *Science* 238:1098 (1987))。优选的连接物在以下文献中描述(参见,例如, Ramakrishnan, S. 等人, *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), 其描述MBS (M-马来亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯) 的使用)。还参见, 美国专利号5,030,719, 其描述通过寡肽连接物的方式偶联至抗体的卤化乙酰基酰肼衍生物的使用。特别优选的连接物包括: (i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基) 碳二亚胺盐酸盐); (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)-甲苯 (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)); (iii) SPDP (琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶基二硫代) 丙酰氨基] 己酸酯 (Pierce Chem. Co., Cat#21651G)); (iv) 磺基-LC-SPDP (磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺] 己酸酯 (Pierce Chem. Co. Cat.#2165-G); 和 (v) 缀合至EDC的磺基-NHS (N-羟基磺基-琥珀酰亚胺: Pierce Chem. Co., Cat.#24510)。

[0108] 上面描述的连接物含有具有不同性质的组分, 由此导致具有不同生理化学特性的缀合物。例如, 烷基羧酸酯的磺基-NHS酯与芳香羧酸酯的磺基-NHS酯相比为更稳定的。含连接物的NHS-酯与磺基-NHS酯相比为更不可溶的。另外, 连接物SMPT含空间阻碍性二硫键并可形成具有增加的稳定性的缀合物。二硫键通常与其它键相比更不稳定, 因为二硫键在体外被裂解开, 导致可获得较少的缀合物。磺基-NHS尤其可增强碳二亚胺偶联的稳定性。碳二亚胺偶联(例如EDC), 当联合磺基-NHS使用时, 比单独的碳二亚胺偶联反应, 形成对水解更有抗性的酯。

[0109] 本文公开的抗体还可配制为免疫脂质体。含抗体的脂质体通过本领域已知的方法(例如在Epstein等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); 和美国专利号4,485,045和4,544,545中描述) 制备。具有增加的循环时间的脂质体在美国专利号5,013,556中公开。

[0110] 特别有用的脂质体可通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷酸酯乙醇胺(PEG-PE) 的脂质组合物生成。将脂质体挤压通过确定的孔径的滤器以产生具有所需直径的脂质体。本发明抗体的Fab' 片段可如在Martin等人, *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982) 中描述通过二硫互换反应缀合至脂质体。

[0111] 抗PD-L1的抗体的用途

[0112] 本发明的特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其片段可被给予用于癌症或其它增殖性病症的治疗。许多癌症过量表达PD-L1和PD-L1的增量调节与高风险预后因子相关。在肿瘤细胞中PD-L1的过量表达也可指示肿瘤细胞逃避抗-肿瘤免疫的机制, 例如通过诱导T细胞衰竭。这类癌症包括肾细胞癌和乳腺癌。其它范例性的癌症是与T细胞衰竭相关或利用T细胞衰竭以逃避抗-肿瘤T细胞活性的那些癌症。本发明抗体的使用可增强在响应用肿瘤抗原

肽刺激时肿瘤抗原-特异性T细胞增殖和产生细胞因子的能力,由此提高T细胞活性或抗-肿瘤免疫应答。

[0113] 本发明的特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其片段可被给予用于慢性感染的治疗。这类慢性感染包括,例如,病毒感染、细菌感染和寄生虫感染。范例性的慢性病毒感染是HIV。在慢性HIV感染期间,HIV-特异性CD8+T细胞功能上被损害,表现出产生细胞因子和效应分子的能力降低和增殖能力减弱。PD-1在HIV感染个体的HIV-特异性CD8+T细胞上高表达。本发明抗体的使用可增强在响应HIV肽刺激时HIV-特异性T细胞增殖和产生细胞因子的能力,由此提高T细胞活性或抗-病毒免疫应答。

[0114] 可将本发明的抗体(其包括双特异性、多克隆、单克隆、人源化和全人抗体)用作治疗剂。这些药剂可通常用于在受试者中治疗或预防癌症,增加疫苗功效或提高天然免疫应答。将抗体制剂(优选地对其靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体制剂)给予受试者并且通常因其与靶标的结合而具有效果。抗体的给予可消除或抑制或干扰PD-L1蛋白的活性。

[0115] 本发明的抗体能够诱导细胞死亡。细胞死亡通过直接或间接的机制诱导。例如,PD-L1被huPD-L1抗体结合可导致补体依赖性细胞毒性(CDC)。备选地,huPD-L1抗体结合PD-L1,并导致第二细胞类型的募集,其会杀伤PD-L14-表达的靶细胞。范例性的机制(依据该机制huPD-L1抗体通过第二细胞类型的募集介导细胞死亡)包括但不限于抗体-依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)。靶PD-L1-表达的细胞类型包括肿瘤细胞和T细胞,例如,活化的T细胞。

[0116] 本发明的特异性结合PD-L1蛋白的抗体或其片段可以药物组合物的形式给予用于癌症或慢性感染的治疗。涉及制备治疗组合物(其包含抗体)的原理和考虑,以及选择组分的指南提供于例如Remington:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等人编著)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.,1995;Drug Absorption Enhancement: Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends(药物吸收促进:概念、可能性、限制和趋势),Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;和Peptide And protein Drug Delivery (肽和蛋白药物递送)(Advances In Parenteral Sciences,Vol.4),1991,M.Dekker,NewYork中。

[0117] 本发明抗体的治疗上有效的量通常涉及实现治疗目标所需的量。如上指出,这可以是抗体和它的靶抗原之间的结合相互作用,在某些情况下,这干扰靶的机能。此外,给予所需量取决于抗体对它的特异性抗原的结合亲和力,并也取决于给予的抗体从给予了该抗体的自由体积的其它受试者中耗尽的速率。本发明抗体或抗体片段的治疗上有效的剂量给药的常用范围(以非限制实例的方式)可为约0.1mg/kg体重-约50mg/kg体重。常用给药频率可在例如从每天两次至一周一次的范围。

[0118] 在使用抗体片段的情况下,特异性结合至靶蛋白的结合结构域的最小的抑制性片段是优选的。例如,基于抗体的可变区序列,可设计肽分子,其保持结合靶蛋白序列的能力。这类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术制备。(参见,例如,Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。制剂还可根据治疗的特定适应症的需要而含有超过一种活性化合物,优选相互间无不利影响的具有互补活性的那些。备选地或另外,组合物可包含增强它的作用剂,例如,细胞毒性剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。这类分子合适以对于意图目的有效的量组合存在。

[0119] 活性成分也可截留在微胶囊(例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备,分别例如,羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(异丁烯酸甲酯)微胶囊)中、胶质药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米-颗粒和纳米胶囊)中或大乳剂(macroemulsions)中。

[0120] 用于体内给予的制剂必须是无菌的。这通过穿过无菌过滤膜过滤容易地实现。

[0121] 可制备持续释放的制剂。持续释放的制剂的合适实例包括含抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品的形式,例如,薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括多元酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物例如LUPRON DEPOTTM(可注射微球体,其由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物(例如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸)使分子的释放能够持续超过100天,但某些水凝胶释放蛋白持续较短时间。

[0122] 可将本发明的抗体用作在样品中检测PD-L1(或蛋白或其蛋白片段)的存在的作用剂。优选地,抗体含可检测的标记。抗体可为多克隆的或更优选为单克隆的。可使用完整抗体或其片段(例如, F_{ab} 、scFv或 $F_{(ab)_2}$)。关于探针或抗体的术语“标记的”,意图包括通过偶联(即,物理连接)可检测的物质至探针或抗体直接标记探针或抗体,以及通过与另一直接标记的试剂的反应性间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体和用生物素末端标记DNA探针使得它可用荧光标记的链霉亲和素检测。术语“生物样品”意图包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及存在于受试者中组织、细胞和流体。因此,血液和血液的流分或组分(其包含血清、血浆或淋巴)包含于术语“生物样品”的使用中。即,本发明的检测方法可用于在体外的生物样品中或在体内检测分析物mRNA、蛋白或基因组DNA。例如,用于检测分析物mRNA的体外技术包括Northern杂交和原位杂交。用于检测分析物蛋白的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括Southern杂交。用于指导免疫测定的方法描述于例如“ELISA:Theory and Practice:methods in Molecular Biology(ELISA:理论与实践:分子生物学方法)”,Vol.42,J.R.Crowther(主编)Human Press,Totowa,NJ,1995;“Immunoassay(免疫测定)”,E.Diamandis和T.Christopoulos,Academic Press,Inc.,San Diego,CA,1996;和“Practice and Theory of Enzyme Immunoassay(酶免疫测定的实践与理论)”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985。此外,用于检测分析物蛋白的体内技术包括向受试者引入标记的抗-分析物蛋白抗体。例如,所述抗体可用放射性标记物标记,所述放射性标记物在受试者中的存在和位置可通过标准成像技术检测。

[0123] 定向抗PD-L1蛋白的抗体(或其片段)可用于本领域已知的方法,其涉及PD-L1蛋白的定位和/或定量(例如,用于测量在合适的生理学样品中PD-L1蛋白的水平、用于诊断方法、用于蛋白成像等)。在给定的实施方案中,对PD-L1蛋白特异的抗体或其衍生物、片段、类似物或同系物(其含抗体衍生的抗原结合结构域)被利用作为药理活性化合物(在下文中被称为“治疗药”)。

[0124] 本发明的对PD-L1蛋白特异的抗体可用于通过标准技术,例如免疫亲和、层析或免疫沉淀分离PD-L1多肽。定向抗PD-L1蛋白的抗体(或其片段)可作为临床试验程序的一部分诊断性地用于监测组织中蛋白的水平,例如,确定给定治疗方案的功效。检测可通过将所述

抗体偶联(即,物理连接)至可检测的物质而促进。可检测的物质的实例包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、氯化丹酰或藻红素;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母素;以及合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0125] 治疗组合物

[0126] 本发明的抗体或作用剂(本文也称为“活性化合物”),及其衍生物、片段、类似物 and 同系物可被掺入适合于给予的药物组合物。这类组合物通常包括抗体或作用剂和药学上可接受的载体。本文使用的术语“药学上可接受的载体”意图包括任何和所有与药物给予相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。合适的载体描述于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences,其为本领域中标准参考文本,其通过引用并入本文。这类载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介(例如固定油)。药物活性物质的这样的媒介和作用剂的使用在本领域是周知的。除了任何常规媒介或作用剂与活性化合物不相容的情况之外,其在组合物中的使用为预期的。补充活性化合物也可掺入该组合物。

[0127] 本发明的药物组合物被配制为与其意图的给予途径相容。给予途径的实例包括肠胃外(例如,静脉内、皮内、皮下)、口服(例如,吸入)、透皮(即,表面)、透粘膜和直肠给予。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或混悬液可包括以下组分:无菌稀释剂(例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂);抗细菌剂(例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯);抗氧化剂(例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠);螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲液(例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐),以及用于调节张力的作用剂(例如氯化钠或葡萄糖)。可用酸或碱(例如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可将肠胃外制剂封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0128] 适合于可注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(在水溶的情况下)或分散液和用于无菌可注射溶液或分散液的临时配制的无菌粉末。对于静脉内给予,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须为无菌的且应该为流动性的,达到容易可注射性存在的程度。它必须在制造和储存条件下稳定并且必须保持抗微生物(例如细菌和真菌)的污染活动。载体可为溶剂或分散介质,其包含例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。合适的流动性可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过在分散液的情况下保持所需粒度和通过使用表面活性剂而保持。预防微生物的活动可通过多种抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)而实现。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂(例如,糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇、氯化钠)。可注射组合物的延长吸收可通过将延迟吸收的作用剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)包含入组合物而发生。

[0129] 无菌可注射溶液可通过将活性化合物以所需量掺入带有上面列举的一种成分或成分的组合的合适溶剂,根据需要,随后过滤灭菌而制备。通常,分散液通过将活性化合物

掺入含有基础分散介质和来自上述列举的那些的所需其它成分的无菌媒介而制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备的方法为真空干燥和冻干,其产生来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外所需成分的粉末。

[0130] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可以被封装于明胶胶囊中或压制成片剂。为了口服治疗给予的目的,活性化合物可与赋形剂掺合并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可使用流体载体制备以用作漱口剂,其中在流体载体中的化合物被口腔施用和漱口并吐出或吞下。药学上相容的结合剂和/或佐药材料可被包括作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有任何以下成分或类似性质的化合物:粘合剂(例如微晶纤维素、黄芪树胶或明胶);赋形剂(例如淀粉或乳糖);崩解剂(例如藻酸、Primogel或玉米淀粉);润滑剂(例如硬脂酸镁或Sterotes);助流剂(例如胶质二氧化硅);甜味剂(例如蔗糖或糖精);或矫味剂(例如薄荷、水杨酸甲酯或桔子调味料)。

[0131] 对于通过吸入给予,化合物以来自压力容器或分配器(其含有合适的推进剂,例如,诸如二氧化碳等气体)或喷雾器的气雾剂喷雾的形式递送。

[0132] 全身给予也可通过透粘膜的或透皮的方式。对于透粘膜的或透皮的给予,适合于待渗透的屏障的渗透剂被用于制剂。这类渗透剂在本领域中为普遍已知的,并对于透粘膜给予,包括例如去垢剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。透粘膜的给予可通过使用鼻喷雾或栓剂完成。对于透皮的给予,活性化合物被配制成如本领域普遍已知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0133] 化合物也可以栓剂(例如,用常规栓剂基例如可可脂和其它甘油酯)或用于直肠递送的滞留型灌肠剂的形式制备。

[0134] 在一个实施方案中,活性化合物用保护化合物以防从体内快速消除的载体(例如控释制剂,其包括植入物和微囊包封递送系统)制备。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的方法对于本领域技术人员是显而易见的。所述材料也可从Alza Corporation和NovaPharmaceuticals, Inc. 商购获得。脂质体混悬液(其包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向至被感染的细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法(例如,描述于美国专利号4,522,811中的方法)而制备。

[0135] 特别有利的是,以容易给予和剂量均匀的剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物。本文使用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量(unitary dosages)的生理上分离单位;各单位含有预定量的活性化合物(其经计算以与所需的药物载体联合产生所需治疗效果)。本发明的剂量单位形式的规格受控于并直接取决于活性化合物的独特的特征和待达到的特定治疗效果,以及在配制这类活性化合物用于个体治疗的领域中固有的限制。

[0136] 药物组合物可与用于给予的使用说明书一起包含于容器、包装或分配器中。

[0137] 诊断测定

[0138] 本发明的huPD-L1抗体,当连接至可检测的部分时,提供用于检测“癌性组织”或趋向于异常的细胞增殖并由此处于癌风险中的组织的方法。除因原位新生物所致而变为癌性的组织之外,例如,抗体-可检测部分缀合物还提供检测存在于远端器官和/或组织中的癌性转移组织的方法。因此这类组织可通过如下检测:将怀疑为癌性的组织与抗体-可检测部分在合适的条件下接触以引起可检测部分在癌性组织中被检测,由此检测癌性组织的存

在。

[0139] 本发明的huPD-L1抗体,当连接至可检测部分时,提供在罹患癌症或慢性感染的受试者中检测T细胞衰竭的方法。例如,huPD-L1抗体可用于在受试者中检测PD-L1的水平,其中与参考水平相比该水平可表明是否受试者正罹患T细胞衰竭。因此,此方法也可用于确定是否治疗(其使用huPD-L1抗体通过逆转或抑制T细胞衰竭以提高免疫应答)会对受试者有益。

[0140] 可检测部分可直接缀合至抗体或片段,或间接地通过使用例如荧光第二抗体而缀合。直接缀合可通过例如荧光团至抗体或抗体片段的标准化学偶联或通过遗传工程改造完成。可构建嵌合体或融合蛋白,其含有偶联至荧光或生物发光蛋白的抗体或抗体片段。例如,Casadei等人描述了制备能够在哺乳动物细胞中表达水母素和抗体基因的融合蛋白的载体构建体的方法。

[0141] 本文使用的关于探针或抗体的术语“标记的”,意图包括通过将可检测的物质偶联(即,物理连接)至探针或抗体而直接标记探针或抗体,以及通过与直接标记的另一试剂的反应性而间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体和用生物素末端标记DNA探针使得它可用荧光标记的链霉亲和素检测。术语“生物样品”意图包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体(例如活检样品),以及存在于受试者中的组织、细胞和流体。即,本发明的检测方法可用于在体外的生物样品中和在体内检测癌症、癌细胞或癌-相关细胞(例如与肿瘤或癌细胞相关的基质细胞)。例如,用于检测PD-L1的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。此外,用于检测PD-L1的体内技术包括向受试者引入标记的抗-PD-L1抗体。例如,抗体可用放射性标记物标记,所述放射性标记物在受试者中的存在和位置可通过标准成像技术检测。在实施方案中,本发明提供在受试者中检测肿瘤或癌细胞的非侵入式方法。受试者被给予本发明的抗体或scFv抗体,在将所述抗体连接至可检测部分(即,任何能够通过例如,荧光、化学、化学发光、放射性或本领域已知的其它方法检测的部分)时,抗体被允许定位于肿瘤,随后通过观察可检测部分而检测。

[0142] 在“靶向的”缀合物,即,含有靶向部分(设计用以在受试者或动物中在一个或多个特定定位点上定位缀合物的分子或特征)的缀合物的情况下,定位是指当在受试者内结合的“定位的”实体和未结合的“自由”实体之间的平衡已经基本上达到时的状态。这类平衡达到的速率取决于给予途径。例如,通过静脉内注射给予以定位血栓的缀合物在注射几分钟内可实现定位或累积于血栓。另一方面,口服给予以定位肠内的感染的缀合物可花费数小时以实现定位。备选地,定位可仅仅指在给予实体之后在选定的时间期限内该实体在受试者或动物中的位置。通过另一实例的方式,当部分在给予之后变得分散时实现定位。

[0143] 在所有以上情况下,对实现定位的时间的合理估计可由本领域技术人员作出。此外,作为时间函数的定位状态可根据本发明的方法(例如用光检测设备)通过对可检测部分(例如,光-发射缀合物)成像而追踪(follow)。使用的“光检测设备”应该具有足够高的灵敏性以能够在合理数量的时间内对来自哺乳动物内的微弱的光成像,并且使用来自这类设备的信号构建图像。

[0144] 在其中有可能使用特别亮的光-产生部分和/或检测定位在被成像的受试者或动物的表面附近的光-产生融合蛋白的情况下,可使用一副“夜视”护目镜或标准高灵敏性视

频照相机,例如Silicon Intensified Tube(SIT)照相机(例如,来自Hamamatsu Photonic Systems,Bridgewater,N.J.)。然而,更通常,需要更灵敏的光检测方法。

[0145] 在极低的光水平下,每单位面积的光子通量变得低,以至于成像得到的景物不再表现为连续的。替代地,它表示为时间上和空间上都相距很远的单独的光子。在显示器上观看,这类图像看起来和闪烁的光点一样,各自代表单个检测出的光子。通过这些检测出的光子随时间推移在数字图像处理器中被积累,可获得和构建图像。与其中每一个像点的信号都被赋予了强度值的传统相机相反,在光子计数成像中信号的振幅不带有任何意义。目标在于仅检测信号(光子)的存在并计数随时间推移关于它的位置的信号的出现。

[0146] 至少两种类型的光检测设备(下面描述)可检测单独的光子并产生可由图像处理器分析的信号。降噪光子检测设备通过降低光子检测器中的背景噪声,而不是放大光子信号实现灵敏性。噪音主要通过冷却检测器阵列而降低。设备包括电荷耦合设备(CCD)照相机,其被称为“后薄化的”、冷却的CCD照相机。在更灵敏的装置中,冷却使用例如,液氮(其将CCD阵列的温度带到约-120℃)而实现。“后薄化的”是指超薄的后板,其缩短了路径长度(光子沿其前进而被检测),由此增强量子效率。特别灵敏的后薄化的低温CCD照相机为“TECH 512”,从Photometrics,Ltd.(Tucson,Ariz.)可得的系列200照相机。

[0147] “光子放大设备”在光子撞击检测屏之前放大光子。这类包括带有增强仪的CCD照相机,例如微通道增强仪。微通道增强仪通常含有与照相机检测屏垂直的和同延的金属通道阵列。将微通道阵列放在待成像的样品、受试者或动物与照相机之间。进入该阵列的通道的大多数光子在离开之前接触通道的一侧。横跨阵列施用的电压导致来自光子碰撞的许多电子的释放。来自这类碰撞的电子以“散弹枪”的方式离开它们起点的通道,并通过照相机检测。

[0148] 甚至更强的灵敏性可通过如下实现:增强型微通道阵列串联放置,使得在第一阶段产生的电子依次在第二阶段中导致电子的放大信号。然而,灵敏性的增强以空间解析度(其随着每一级额外放大而降低)为代价实现。范例性的基于微通道增强器的单光子检测设备为从Hamamatsu可得的C2400系列。

[0149] 图像处理器处理由光检测设备产生的信号,所述光检测设备计数光子以构建图像(其可例如在显示器上展示或在图像打印机上打印)。这类图像处理器通常作为系统(其包括上面描述的灵敏光子计数照相机)的一部分出售,并因此从相同来源可得。所述图像处理器通常连接至个人电脑(例如IBM-兼容PC或Apple Macintosh(Apple Computer,Cupertino,Calif.)),其可以或可以不被包括作为购买的成像系统的一部分。一旦图像呈数字文件的形式,它们就可通过多种图像处理程序操作(例如“ADOBE PHOTOSHOP”,Adobe Systems,Adobe Systems,Mt.View,Calif.)和打印。

[0150] 在一个实施方案中,生物样品含有来自测试受试者的蛋白分子。一种优选的生物样品是外周血白细胞样品,其通过常规方法从受试者分离。

[0151] 本发明还包括用于在生物样品中检测PD-L1或PD-L1-表达的细胞的存在试剂盒。例如,试剂盒可包括:能够在生物样品中检测癌或肿瘤细胞的标记的化合物或作用剂(例如,抗-PD-L1 scFv或单克隆抗体)、用于在样品中检测PD-L1的量的工具和用于将样品中PD-L1的量与标准作比较的方法。在一些实施方案中,所述标准是非癌细胞或其细胞提取物。化合物或作用剂可包装在合适的容器中。试剂盒可进一步包括使用试剂盒以在样品中

检测癌症的说明书。

[0152] 双特异性抗体

[0153] 双特异性抗体 (bsAb) 是抗体,其包含两个可变结构域或scFv单位使得所得抗体识别两种不同抗原。本发明提供识别PD-L1和第二抗原的双特异性抗体。范例性的第二抗原包括肿瘤相关抗原、细胞因子和细胞表面受体。在一些实施方案中,所述第二抗原可以是CAIX (碳酸酐酶IX或G250)、IL-10或CCR4。在一些实施方案中,所述第二抗原可以是细胞表面受体,其中所述细胞表面受体是CCR4、IL21R、BTLA、HVEM或TIM3。

[0154] 本发明的双特异性抗体包括本文公开的huPD-L1抗体的重链和轻链组合或scFv。

[0155] 双特异性抗体的构建

[0156] 本发明的双特异性抗体可使用本领域已知方法构建。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是单个多肽,其中两个scFv片段通过长接头多肽 (其长度足以允许两个scFv单位之间的分子内缔合) 连接以形成抗体。在其它实施方案中,双特异性抗体是通过共价或非共价键连接的一个以上的多肽。

[0157] 在另一实施方案中,双特异性抗体使用“结进孔”法 (Ridgway等人,Protein Eng 7: 617-621 (1996)) 构建。在此方法中,将两个不同可变结构域的Ig重链还原以选择性地破坏重链配对同时保留重链-轻链配对。将识别两个不同抗原的两个重链-轻链杂二聚体混合以促进杂连接配对,所述杂连接配对通过CH3结构域的工程改造的“结进孔”介导 (如在图5和6A中所示)。

[0158] 在另一实施方案中,双特异性抗体可通过如下构建:交换来自两个或更多个不同抗体的重链-轻链二聚体以产生杂交抗体,其中第一重链-轻链二聚体识别PD-L1和第二重链-轻链二聚体识别第二抗原。重链-轻链二聚体的机制与人IgG4 (其也发挥双特异性分子的功能) 的形成类似。IgG重链的二聚化受分子内的力 (例如配对每条重链的CH3结构域和二硫桥的分子内的力) 的驱动。在CH3结构域中特定氨基酸的存在 (R409) 已经表现出促进IgG4分子的构建和二聚体交换。重链配对也通过在抗体的铰链区中的重链间的二硫桥而进一步稳定。具体地,在IgG4中,铰链区在氨基酸226-230含有氨基酸序列Cys-Pro-Ser-Cys (与含有序列Cys-Pro-Pro-Cys的稳定的IgG1铰链区相比)。此229位的丝氨酸的序列差异已经与IgG4在铰链区形成新链内二硫键的倾向关联起来 (Van der Neut Kolfshoten, M.等人, 2007, Science 317:1554-1557和Labrijn, A.F.等人, 2011, Journal of immunol 187:3238-3246)。

[0159] 因此,本发明的双特异性抗体可通过如下产生:在识别PD-L1或第二抗原的抗体的CH3结构域中引入R409残基和铰链区中引入Cys-Pro-Ser-Cys序列,使得重链-轻链二聚体交换以产生抗体分子,所述抗体分子具有识别PD-L1的一个重链-轻链二聚体和识别第二抗原的第二重链-轻链二聚体,其中所述第二抗原是本文公开的任何抗原。优选地,双特异性抗体含有与一个抗-CAIX (碳酸酐酶IX或250) 重链-轻链二聚体缀合的一个抗-PD-L1重链-轻链二聚体,如实施例3和4中讨论。重链-轻链二聚体交换也可用还原剂 (例如还原型谷胱甘肽) 的加入而增强,以促进。还可改变已知的IgG4分子使得重链和轻链如本文公开识别PD-L1或第二抗原。将此方法用于构建本发明的双特异性抗体可为有利的,原因是IgG4分子的内在特性,其中Fc区与其它IgG亚型不同之处在于:它与免疫应答的效应子系统 (例如由某种白血细胞所表达的Fc受体和补体) 相互作用差。此特性使得这些基于IgG4的双特异性

抗体对于治疗应用(其中需要抗体结合靶并功能上改变与靶相关的信号转导通路,但不触发效应子的活性)而言为吸引人的。

[0160] 在一些实施方案中,将突变引入bsAb的恒定区以便改变bsAb的抗体依赖性细胞-介导的细胞毒性(ADCC)活性。这类实例描述于图6B中。例如,突变是在CH2结构域中的LALA突变。在一方面中,bsAb含有在杂二聚体型bsAb的一个scFv单位上的突变,其降低ADCC活性。在另一方面中,bsAb在杂二聚体型bsAb的两条链上都含有突变,其完全消除ADCC活性。例如,bsAb的一个或两个scFv单位引入的突变是在CH2结构域中的LALA突变。可将具有可变ADCC活性的这些bsAb优化使得所述bsAb对表达被bsAb识别的一个抗原的细胞展示出最大的选择性杀伤,但对被bsAb识别的第二抗原展示出最小的杀伤。

[0161] 范例性的第二抗原

[0162] 本发明提供识别PD-L1和第二抗原的双特异性抗体。

[0163] 在一些实施方案中,第二抗原为肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原为碳酸酐酶IX(CAIX)。例如,可构建CAIX/PD-L1双特异性抗体,其包含本文描述的huPD-L1抗体的一条重链和一条轻链的组合和识别CAIX的一条重链和一条轻链的组合(图6A)。CAIX已经被描述为针对疾病进展的预后标志物和使用IL-2的免疫疗法的靶。CAIX为在癌症(例如肾细胞癌)中高表达的肿瘤-相关抗原。在一些情况下,通过肿瘤细胞的PD1/PD-L1轴的活化可诱导针对某些肿瘤-特异性抗原(例如CAIX)的T细胞衰竭,由此表达CAIX的肿瘤细胞逃避通过免疫系统的识别。靶向CAIX和PD-L1两者的bsAb作为新的癌治疗剂。使用CAIX/PD-L1 bsAb的治疗会抑制或逆转针对CAIX的PD-1/PD-L1-介导的T-细胞衰竭,并促进肿瘤监测和抗CAIX-表达肿瘤细胞的免疫应答。例如,用CAIX/PD-L1 bsAb的治疗会促进抗肿瘤细胞的抗原-特异性免疫应答,其中所靶向的抗原是CAIX。

[0164] 在一些实例中,可将突变引入至CAIX或PD-L1链恒定区中(例如,CH2结构域)以降低ADCC活性(图6B)。在一些实例中,可将突变同时引入至CAIX和PD-L1链恒定区中以完全消除ADCC活性。具有可变ADCC活性的突变的bsAb可针对它们杀伤肿瘤细胞的特异性通过本领域已知的方法测定。优选地,CAIX/PD-L1 bsAb展现出对CAIX-表达肿瘤细胞的最大选择性杀伤,但仅展现出对PD-L1-表达内源外周血单核细胞(PBMC)的最小杀伤。

[0165] 在一些实施方案中,第二抗原是细胞表面受体,其中所述细胞表面受体是白介素21受体(IL21R)。例如,可构建IL21R/PD-L1双特异性抗体,其包括本文描述的huPD-L1抗体的一条重链和一条轻链的组合和以竞争的方式结合IL21R的一条重链和一条轻链的组合。细胞因子IL21由CD4⁺T辅助细胞分泌并结合至IL21R以促进多种免疫活化通路,特别是,促进CTL的抗原-特异性细胞毒性和NK细胞的成熟、增殖和细胞毒性(Sondergaard, H等人, 2009 *Tissue antigens* 74:467-479; Kasaian, M.T.等人, 2002 *Immunity* 16:559-569; 和 Coquet, J.M.等人, 2008 *J Immunol* 178:2827-2834)。特别地,IL21已被显示促进抗黑色素瘤抗原的活化和细胞毒性能力(Li, Y.等人, 2005, *J Immunol* 175:2261-2269)。全身给予IL21已被探究用于治疗癌症并已经显示一些功效(Schmidt, H.等人, 2010 *Clinical cancer research*, 16:5312-5319),但是,一些数据也已显示有害的和期望的副作用(Grunwald, V.等人, 2011, *Acta Oncol* 50:121-126)。

[0166] 本发明的IL21R/PD-L1 bsAb以竞争的方式结合至IL21R,由此作为细胞因子IL21的模拟物或替代物起作用。通过IL21R/PD-L1 bsAb的结合可导致IL21R-介导的通路的活化

和随后的对抗肿瘤细胞(其已诱导PD-L1-介导的T-细胞衰竭)的抗原-特异性细胞毒性免疫应答的促进。用本发明的双特异性抗体治疗的一个具体的益处是将IL21R活化定位至其中已经发生PD-1/PD-L1-介导的T细胞衰竭的区域(例如,在肿瘤微环境中,例如在已经诱导T细胞衰竭以逃避抗-肿瘤免疫应答的肿瘤附近或之内)。以此方式,ILR/PD-L1 bsAb以以下双重机制促进抗-肿瘤免疫应答:1)通过逆转或抑制PD-1/PD-L1-介导的T细胞衰竭,和2)通过促进IL21/IL21R-介导的细胞毒性免疫应答的活化,由此诱导抗原-特异性或抗-肿瘤免疫应答和细胞毒性。

[0167] IL21R/PD-L1双特异性抗体也可用于对受试者免疫接种的疫苗中,或用作疫苗佐剂。在生发中心反应(GCR)(其中产生高-亲和性抗体-分泌浆细胞和记忆B细胞,其确保持续的免疫保护和抗先前遇到的外来抗原的快速记忆应答)中,PD1由滤泡T辅助细胞(TFH)表达同时PDL1由生发中心B细胞表达(Crotty,S.等人,2011,Annual review of Immunology,29:621-623)。PD1或PD-L1的过量表达抑制抗体-产生B细胞的扩充。IL21R/PD-L1双特异性抗体(其中所述抗体的PD-L1部分抑制PD1/PD-L1轴)的使用会导致仅高亲和性抗体的优先扩充。由于IL-21强烈地促进抗原-特异性B细胞至抗体-分泌浆细胞的转变,和TFH活性的形成和持续(Crotty,S.等人,2011,Annual review of Immunology,29:621-623),抗PDL1具有IL21替代或竞争活性的bsAb可充当关于促进抗特定抗原(例如通过疫苗给予的抗原或感染物质的抗原)的高亲和性抗体产生的GCR-特异性佐剂。

[0168] 在一些实施方案中,第二抗原是BTLA(B和T淋巴细胞弱化子蛋白)或HVEM(疱疹病毒进入中介体,也称为TNFRSF14)。例如,可构建BTLA/PD-L1双特异性抗体,其包括本文描述的huPD-L1抗体的一条重链和一条轻链的组合和结合BTLA的一条重链和一条轻链的组合。例如,可构建HVEM/PD-L1双特异性抗体,其包括本文描述的huPD-L1抗体的一条重链和一条轻链的组合和结合HVEM(优选地,结合至介导与BTLA的结合的HVEM的那些区域)的一条重链和一条轻链的组合。BTLA至HVEM的结合导致T细胞抑制,这类似于PD1/PD-L1相互作用。本发明的BTLA/PD-L1或HVEM/PD-L1双特异性抗体会抑制或阻止BTLA与HVEM之间的缔合,和阻止BTLA/HVE-介导的T细胞抑制。BTLA抑制促进肿瘤-特异性T细胞应答。因此,使用本发明的双特异性抗体的治疗导致限制T细胞活性的两条不同的抑制因子通路的同时阻断。

[0169] 在一些实例中,HVEM/PD-L1 bsAb抗体还阻止HVEM与另一HVEM配体,CD160(其已被表明是针对B细胞慢性淋巴细胞白血病(BCLL)细胞的存活的激动剂,并且强烈地抑制CD4+T-细胞活化和功能)之间的缔合。使用本发明的HVEM/PD-L1双特异性抗体(其也阻止HVEM/CD160结合)的治疗导致两条抑制因子通路(其限制T细胞活性和抑制CD160-介导的肿瘤存活通路)的同时阻断。

[0170] 在一些实施方案中,第二抗原为TIM3(T-细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3)。例如,可构建TIM3/PD-L1双特异性抗体,其包括本文描述的huPD-L1抗体的一条重链和一条轻链的组合和结合TIM3的一条重链和一条轻链的组合。在一方面中,本发明的抗体阻止或抑制TIM3与半乳糖-9(GAL9)的结合。TIM3与GAL9之间的相互作用导致巨噬细胞的活化和T细胞功能的抑制(Sakuishi,K.等人,2010,The Journal of experimental medicine,207:2187-2194和Zhang,Y.等人,2012,Journal of leukocyte biology,91:189-196)。TIM3也已被表明促进骨髓衍生的抑制因子细胞(MDSC)的活性(Dardalhon,V.等人,2012,Journal of leukocyte biology,185:1383-1392)。因此,使用本发明的双特异性抗体(例如TIM3/PD-L1

bsAb)的治疗会逆转和阻止T-细胞衰竭,促进肿瘤监测和抑制MDSC的生成。TIM3/PD-L1 bsAb的使用可特别有益于罹患具有TIM3多态性的癌症(例如肾细胞癌和转移性肾细胞癌)的受试者的治疗。

[0171] 本文公开的双特异性抗体可在疾病或医学病况(例如,癌症)的治疗中是有用的。本发明的双特异性抗体可在与T细胞衰竭相关的疾病或医学病况中是特别有用的。在一些情况下,可将本文公开的双特异性抗体用作用于促进抗原-特异性免疫应答的疫苗。本发明的双特异性抗体靶向抑制T-细胞衰竭的肿瘤。

[0172] 治疗方法

[0173] 本发明提供治疗处于(或易感于)癌症或其它细胞增殖-相关疾病或病症的风险中的受试者的预防和治疗方案。这类疾病或病症包括但不限于,例如,与PD-L1的异常表达相关的那些疾病或病症。例如,所述方法被用于治疗、预防或缓解肾细胞癌或乳腺癌的症状。备选地,所述方法被用于治疗、预防或缓解癌症(其中PD-L1在T细胞应答中发挥负调节作用)的症状。备选地,所述方法被用于治疗、预防或缓解实体肿瘤(例如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌或胃癌)的症状。备选地,所述方法被用于治疗、预防或缓解已转移的癌症的症状。

[0174] 本发明提供治疗处于(或易感于)慢性病毒感染、细菌感染或寄生虫感染风险中的受试者的预防和治疗方案。特别是,本发明提供治疗处于(或易感于)HIV感染或AIDS的风险中的受试者的预防和治疗方案。

[0175] 本发明还提供用于治疗处于与T-细胞衰竭相关的疾病或病症或病况的风险中的或发展T-细胞衰竭的风险中的受试者的预防和治疗方案的治疗方法。本发明还提供用于治疗处于与T-细胞衰竭相关的疾病或病症或病况的风险中或发展T-细胞衰竭的风险中的受试者的预防和治疗方案的治疗方法。这类疾病或病症包括但不限于HIV、AIDS和慢性的细菌感染、病毒感染或寄生虫感染。其它这类慢性感染包括由例如,乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)、单纯疱疹病毒1(HSV-1)、幽门螺杆菌(*H. pylori*)或弓形虫(*Toxoplasma gondii*)引起的那些。

[0176] 因此,在一方面中,本发明提供通过将本发明的单克隆抗体或scFv抗体给予受试者用于在受试者中预防、治疗或缓解癌症或细胞增殖性疾病或病症的症状的方法。例如,huPD-L1抗体可以治疗上有效的量给予。

[0177] 处于癌症或细胞增殖-相关疾病或病症风险中的受试者包括具有癌症家族史的患者或暴露于已知或怀疑致癌的物质的受试者。预防药物的给予可发生在癌症的表现之前,使得疾病被预防或,备选地,在其进展中被延缓。

[0178] 在另一方面中,通过将细胞与本发明的PD-L1抗体接触而抑制肿瘤细胞的生长或减弱抑制因子T细胞活性。所述细胞是表达PD-L1的任何细胞。例如所述细胞是T细胞。

[0179] 增加或增强对抗原的免疫应答的方法也包含在本发明中。免疫应答通过对受试者给予本发明的单克隆抗体或scFv抗体而增加或增强。免疫应答例如通过提高抗原特异性T效应子功能而被提高。抗原是病毒(例如HIV)抗原、细菌抗原、寄生虫抗原或肿瘤抗原。免疫应答是天然免疫应答。天然免疫应答是指其为感染的结果的免疫应答。感染是慢性感染。增加或增强对抗原的免疫应答可通过本领域已知的多种方法测量。例如,免疫应答可通过测量以下任一项而测量:T细胞活性、T细胞增殖、T细胞活化、效应子细胞因子的产生和T细胞

转录特征。

[0180] 备选地,免疫应答是由于接种疫苗诱导的应答。因此,在另一方面中,本发明提供通过对受试者给予本发明的单克隆抗体或scFv抗体和疫苗而增加疫苗功效的方法。所述抗体和所述疫苗被序贯或同时给予。所述疫苗是肿瘤疫苗、细菌疫苗或病毒疫苗。

[0181] 组合方法

[0182] 本发明提供通过给予两种抗体在患者中治疗癌症,所述两种抗体结合至PD-L1蛋白的相同表位或,备选地,PD-L1蛋白的两个不同表位。备选地,癌症通过给予结合至PD-L1的第一抗体和结合至除PD-L1之外的蛋白的第二抗体而治疗。例如,除PD-L1之外的其它蛋白可包括但不限于CAIX、CCR4和IL-10。例如,所述除PD-L1之外的其它蛋白是肿瘤-相关抗原。

[0183] 在一些实施方案中,本发明提供huPD-L1抗体单独或与另外的抗体(其识别除PD-L1之外的另一蛋白)一起给予,其中细胞能够实现或提高免疫应答。例如,这些细胞可为外周血单核细胞(PBMC)或存在于PBMC中的任何细胞类型,例如,细胞毒性T细胞、巨噬细胞和天然杀伤(NK)细胞。

[0184] 另外,本发明提供结合至PD-L1蛋白的抗体和抗-肿瘤剂,例如小分子、生长因子、细胞因子或其它治疗剂(其包括生物分子例如肽、肽模拟物、类肽、聚核苷酸、脂质-衍生的介质、小生物来源的胺、激素、神经肽和蛋白酶)的给予。小分子包括但不限于无机分子和小有机分子。合适的生长因子或细胞因子包括IL-2、GM-CSF、IL-12和TNF- α 。小分子文库是本领域已知的。(参见Lam, Anticancer Drug Des., 12:145, 1997.)。

[0185] 本发明将在以下实施例中进一步描述,所述实施例不限制描述于权利要求中的本发明的范围。

实施例

[0186] 实施例1:抗PD-L1的人mAb的产生

[0187] 抗人PD-L1的人mAb通过对270亿个成分的人scFv噬菌体展示文库淘选而产生。使用呈顺磁性的脂蛋白体(PMPL)形式的全长PD-L1(这确保用于展示于文库的PD-L1的细胞外结构域的正确定向),鉴定出14个独特的结合PD-L1的scFv-噬菌体。针对这些14个独特的scFv-噬菌体构建人IgG构建体:Ab-14、Ab-16、Ab-22、Ab-30、Ab-31、Ab-32、Ab-38、Ab-42、Ab-46、Ab-50、Ab-52、Ab-55、Ab-56和Ab-65。

[0188] 实施例2:结合至PD-L1的huPD-L1 mAb的表征

[0189] huPD-L1抗体的结合分析使用PD-L1-表达细胞进行。测试了四种类型的细胞,其包括亲本细胞系300.19和经转染表达人PD-L1(hPD-L1)、人PD-L2(hPD-L2)和人C-型凝集素结构域家族2成员(hCLEC2D)的细胞系。结合测定一式两份进行,结果概述在下表16-19和图2中。通过使用四种抗体浓度:10 μ g/ml、1 μ g/ml、0.1 μ g/ml和0.01 μ g/ml测试抗体亲和力。将GF1538和GF1757抗体用作对照:GF1538是抗hPD-L1的人源化Ab和GF1757是抗hPD-L2的人源化Ab。使用的第二抗体是PE-山羊抗-人IgG。所有值显示平均荧光强度(GMFI)(如通过FAC分析所检测)。

[0190] 来自结合测定的结果表明受测试的huPD-L1抗体表现出对于结合PD-L1的高亲和性和特异性。使用亲本细胞系300.19(其不表达人PD-L1)作为对照,建立了基础的或非特异

性的荧光(表16和图2,左上)。通过用huPD-L1抗体转染对表达人PD-L1的300.19细胞的染色显示出明显较高的平均荧光强度(MFI),这证明该抗体可结合至PD-L1。明显的FMI值(甚至在抗体的0.01 μ g/ml的最低稀释度下)证明huPD-L1对结合PD-L1蛋白的高亲和力(表17A、17B和图2,右上)。当HuPD-L1抗体当在300.19细胞中表达时展示出一些结合人PD-L2或CLEC2D的能力(如由表18A、18B、19A、19B和图2,下部两张图所展示)。不过,染色PD-L2和CLE2D所得的MFI值不如PD-L1获得的值高。此外,在较低稀释度下,所述MFI值并不明显高于基础水平,这表明huPD-L1抗体不具有对PD-L2或CLE2D的高亲和力或特异性。尽管少数huPD-L1抗体(例如Ab-42)展示了和PD-L2的一些交叉反应性,但是该抗体具有明显更高的对PD-L1的亲合力和特异性。

[0191] 表16. 使用huPD-L1在未转染的300.19细胞上染色

孔	huPD-L1 Ab #		细胞 PE-A 平均			
			大约 10 ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
A1	14		358	186	91	73
A2	16		269	105	79	67
A3	30		75	78	74	66
A4	31		324	137	82	73
A5	42		771	315	119	82
A6	50		145	95	70	71
A7	52		324	124	85	72
A8	55		110	75	74	69
A9	1538	GF 抗-hPD-L1	79	72	75	71
A10	1757	GF 抗-hPD-L2	108	74	70	71
A11	对照 hIgG		260	87	74	73
A12	洗涤		81	73	73	73

[0193] 表17A. 使用huPD-L1在hPD-L1-转染的300.19细胞上染色,测定1结果。

孔	huPD-L1 Ab #		细胞 PE-A 平均			
			大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
E1	14		41500	23277	8095	1653
E2	16		31837	8277	1866	386
E3	30		47645	37503	17479	3509
E4	31		53790	44199	12498	2826
E5	42		53583	40923	14869	2084
E6	50		49437	42087	15083	2690
E7	52		28372	21430	5614	1073
E8	55		24422	9653	2298	543
E9	1538	GF 抗-hPD-L1	64961	60765	27366	5091
E10	1757	GF 抗-hPD-L2	154	60	56	54
E11	对照 hIgG		195	64	52	51
E12	洗涤		52	51	49	51

[0195] 表17B. 使用huPD-L1在hPD-L1-转染的300.19细胞上染色,测定2结果。

[0196]

			细胞 PE-A 平均			
孔	huPD-L1 Ab #		大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
E1	14		77893	53207	17715	3700
E2	16		60182	46561	14101	4218
E3	30		67252	61219	39104	7722
E4	31		76388	70951	37698	6830
E5	42	最好	76824	72143	49449	11559
E6	50		69598	63446	28694	5198
E7	52		37203	34863	14718	2689
E8	55		42433	26528	8911	1758
E9	1538 hPD-L1		83021	85450	47677	8164
E11	1757 hPD-L2		122	72	63	57
E10	对照 hIgG		283	88	71	81

[0197] 表18A.使用huPD-L1在hPD-L2-转染的300.19细胞上染色,测定1结果。

[0198]

			细胞 PE-A 平均			
孔	huPD-L1 Ab #		大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
A1	14		137	464	173	67
A2	16		678	224	80	53
A3	30		60	52	49	50
A4	31		795	239	91	82
A5	42		1417	668	254	72
A6	50		444	149	88	51
A7	52		813	190	79	55
A8	55		132	69	55	51
A9	1538	GF 抗-hPD-L1	60	50	62	51
A10	1757	GF 抗-hPD-L2	104849	105994	36970	4810
A11	对照 hIgG		481	176	60	92
A12	洗涤		69	51	52	60

[0199] 表18B.使用huPD-L1在hPD-L2-转染的300.19细胞上染色,测定2结果。

[0200]

		细胞 PE-A 平均			
huPD-L1 Ab #		大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
14		1394	847	295	133
16		1502	858	317	129
30		112	78	74	67
31		1573	834	182	87
42		2310	1496	761	213
50		680	386	220	79
52		1467	656	182	85
55		440	200	82	69
1538 hPD-L1		78	70	97	74
1757 hPD-L2		132613	117381	66269	11160
对照 hIgG		443	118	77	71

[0201] 表19A.使用huPD-L1在hCLEC2D-转染的300.19细胞上染色,测定1。

[0202]

			细胞 PE-A 平均			
孔	huPD-L1 Ab #		大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1ug/ml	0.01ug/ml
E1	14		3629	1924	793	245
E2	16		2371	898	294	154
E3	30		283	161	153	144
E4	31		2954	870	360	153
E5	42		4669	2318	748	234
E6	50		1957	869	327	167
E7	52		3138	1105	298	166
E8	55		944	297	171	139
E9	1538	GF 抗-hPD-L1	199	143	141	137
E10	1757	GF 抗-hPD-L2	343	163	141	137
E11	对照 hIgG		1541	351	175	146
E12	洗涤		139	141	142	136

[0203] 表19B.使用huPD-L1在hCLEC2-转染的300.19细胞上染色,测定2。

[0204]

孔	huPD-L1 Ab #		细胞 PE-A 平均			
			大 约 10ug/ml	1ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
E1	14		3629	1924	793	245
E2	16		2371	898	294	154
E3	30		283	161	153	144
E4	31		2954	870	360	153
E5	42		4669	2318	748	234
E6	50		1957	869	327	167
E7	52		3138	1105	298	166
E8	55		944	297	171	139
E9	1538	GF 抗-hPD-L1	199	143	141	137
E10	1757	GF 抗-hPD-L2	343	163	141	137
E11	对照 hIgG		1541	351	175	146
E12	洗涤		139	141	142	136

[0205] 实施例2:阻断PD/PD-L1结合的抗-PD-L1的噬菌体-抗体的表征进行竞争性FACS分析以表征通过抗-PD-L1的噬菌体抗体对hPD1结合至hPD-L1的抑制。所有抗-hPD-L1抗体呈噬菌体-scFv形式。用编码融合至人Fc区的人PD-L1的载体(用于hPD-L1-Fc的表达)转染293T细胞。在此测定中,将 10^{12} 个噬斑形成单位(pfu)的噬菌体-scFv与大约0.25mg/ml的可溶性hPD-1-hFc融合蛋白混合并随后加入至hPD-L1-表达的293T细胞。在洗涤之后,将细胞与FITC-抗-人IgG抗体一起孵育并通过FACS分析以测量在细胞表面上hPD1-hFc与hPD-L1的结合。

[0206] 荧光值通过FACS分析获得并用于生成对hPD-1结合至hPD-L1+细胞的抑制百分比。这些值展示于图3中。几乎所有的抗-PD-L1噬菌体scFvs都表现出一些对hPD-1至hPD-L1的结合的抑制能力。尤其,Ab-14、Ab-16、Ab-30、Ab-31、Ab-42、Ab-50、Ab-52和Ab-55噬菌体-scFvs表现出对hPD-1/hPD-L1结合的明显抑制。

[0207] 实施例3:阻断PD/PD-L1结合的huPD-L1可溶性mAb的表征进行竞争性FACS分析以表征通过本发明的可溶性huPD-L1抗体对hPD1结合至hPD-L1的抑制。针对它们抑制hPD1-IgG融合蛋白与hPD-L1-表达300.19细胞的结合的能力,测试所有huPD-L1抗体。在此测定中,50,000个表达hPD-L1的细胞与以下浓度的huPD-L1或对照抗体一起预孵育30分钟:10 μ g/ml、1 μ g/ml、0.1 μ g/ml和0.01 μ g/ml。在预孵育之后,将0.125 μ g的融合至小鼠IgG2的人PD1加入细胞并孵育另外30分钟。将该细胞洗涤两次,并随后将0.125 μ g的山羊抗-小鼠IgG2-PE抗体加入细胞中。在孵育30分钟之后,将细胞洗涤两次并随后通过FACS分析。将由FACS分析获得的值表示为平均荧光强度单位(MFI)并概述在表20中。来自表20的MFI值被用于生成图4的对hPD1与hPD-L1+细胞的结合的抑制百分比。如本文所示,所有受测试的huPD-L1可溶性抗体在10 μ g/ml下表现出对hPD1与hPD-L1的结合的几乎完全抑制。在连续更低的浓度下,多数可溶性抗体仍然表现出对PD1/PD-L1结合的非常良好抑制,特别是Ab-42和Ab-50。

[0208] 表20.使用huPD-L1阻断PD-1结合的结果

[0209]

孔	huPD-L1 Ab #		细胞 PE-A 平均			
			10ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
A1	14		696	11991	14859	15840
A2	16		1092	6660	11080	14783
A3	30		244	661	4775	11585
A4	31		157	623	7934	11908
A5	42		139	142	3137	11797
A6	50		207	156	2795	12517
A7	52		380	2070	6746	11856
A8	55		150	3625	9137	12926
A9	1538	GF 抗-hPD-L1	143	148	198	10145
A10	1757	GF 抗-hPD-L2	10922	11447	11197	13167
A11	对照 hIgG		11355	11664	11571	12274
A12	洗涤		10339	10274	9842	12305
E1	洗涤 阴性对照		155	137	130	
E4	mIgG2a 阴性对照		128	207	131	
平均阳性对照			11363			
平均阴性对照			155			

[0210] 实施例4:双特异性抗体的形成

[0211] 基于铰链在产生IgG₄分子的半单体中的作用,假设在人IgG₁的铰链区引入带电荷的突变可不仅促进半单体交换而且也潜在性地稳定双特异性分子。此实施例表明铰链突变和CH3突变的组合增加双特异性抗体的形成。

[0212] 为进一步稳定杂二聚体的形成,将带相反电荷的突变进一步替换在CH3结构域中,这是“结进孔”的概念。双特异性抗体的形成按以下步骤实现:第一,分别表达并纯化携带有双特异性突变的两种亲本抗体。随后将所述抗体在温和的还原剂存在下混合。所述对抗体的温和还原引起将抗体解离为各自具有可变的重链和轻链的两个单体。随后将单体混合在一起,接着进行氧化步骤,其引起双特异性抗体分子的形成。

[0213] 生成识别PD-L1和G250(碳酸酐酶IX)的双特异性抗体。通过两个独立的载体产生和纯化抗-G250亲本的(G37野生型,G37WT)和工程改造的(G37 KIHA)抗体。G37 KIHA(其遵循“结进孔”概念并携带双特异性突变)在免疫球蛋白铰链区的序列中被改变。

[0214] 为了解G37 KIHA的解离活性,通过处于不同浓度的谷胱甘肽(GSH)使抗体在温和的还原剂存在下混合以干扰形成抗体单体(图7A)。加入渐增浓度的还原剂(GSH)引起抗体解离成单体(如在图7A中,通过低分子量物类的水平增加所示)。

[0215] 类似地,通过两个独立的载体表达和纯化抗-PD-L1亲本(PD-L1野生型,PDL-1WT)和工程改造的(PD-L1 KIHB)抗体。使用不同浓度的GSH验证用以获得抗-PD-L1单体的合适条件(图7B)。选出GSH浓度的最优条件并且将所得抗-PD-L1单体与G37 KIHA单体一起孵育。双特异性抗体的形成在野生型IgG的相同大小处被观察到,这说明生成了含有两个重链-轻链的单体(一个PD-L1-特异性单体和一个G250-特异性单体)的抗体。

[0216] 实施例5:双特异性抗体功能

[0217] 实施例3中生成的双特异性抗体随后被针对它们识别两种抗原(例如,PD-L1和G250)的能力进行测试。PD-L1和G250双特异性抗体的功能使用流式细胞术测试。CAIX⁺PD-L1⁻SKRC-52表达CAIX(250)而非PD-L1,并因此预期细胞可仅被抗-CAIX抗体G37识别,而非抗PD-L1抗体识别。为避免抗体结合的饱和,抗体的浓度是低的并呈减少剂量的方式。事实上,亲本抗-G37识别SKRC-52细胞,而亲本抗-PD-L1不是如此(水平与对照相同)。含缀合的抗-G37和抗-PD-L1单体的双特异性抗体以相对于亲本G37抗体减少一半的浓度识别SKRC-52细胞,由此证明了使用本文描述的方法和抗体生成的双特异性抗体的功能性。

[0218] 实施例6:对mAb42的功能表征

[0219] 进行对抗PD-L1的单克隆抗体(mAb42)的进一步功能表征。培养来自4个不同健康供体(D1-D4)的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC在mAb42存在下或在对照同种型IgG抗体的存在下培养。将PBMC用0.1 μg/ml SEB(葡萄球菌肠毒素B)刺激并使用MSD(Meso Scale Delivery)测量TNFα的产生。样品分析以一式三份的方式进行。

[0220] 如在图8中所示,与对照抗体相比,在全部四个供体样品中当在抗-PD-L1抗体(mAb42)的存在下培养时,在mAb42的存在下培养PBMC引起在响应SEB时TNFα的产生增加。此外,TNFα产生的增加是统计上显著的,p<0.0005。因此,使用抗-PD-L1抗体的治疗提高在响应人中的抗原或感染时的免疫应答。

[0221] 其它实施方案

[0222] 尽管本发明已经结合其详述进行了描述,但上述描述意图阐明而非限制本发明的范围,本发明的范围通过随附的权利要求的范围定义。其它方面、优点和修改在随附权利要求的范围内。

[0001]	序列表		
[0002]	<110>	Dana-Farber Cancer Institute, Inc.	
[0003]		Marasco, Wayne A.	
[0004]		Sui, Jianhua	
[0005]	<120>	人单克隆抗-PD-L1抗体和使用方法	
[0006]	<130>	20363-068001W0	
[0007]	<140>	PCT/US13/63509	
[0008]	<141>	2013-10-04	
[0009]	<150>	US 61/709,731	
[0010]	<151>	2012-10-04	
[0011]	<150>	US 61/779,969	
[0012]	<151>	2013-03-13	
[0013]	<160>	140	
[0014]	<170>	PatentIn version 3.5	
[0015]	<210>	1	
[0016]	<211>	372	
[0017]	<212>	DNA	
[0018]	<213>	人工序列	
[0019]	<220>		
[0020]	<223>	Ab-14的可变重链	
[0021]	<400>	1	
[0022]		caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
[0023]		tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0024]		cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat	180
[0025]		gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac	240
[0026]		atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctcta	300
[0027]		cctagtggga ctatactggt cggaggttgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc	360
[0028]		accgtctcct ca	372
[0029]	<210>	2	
[0030]	<211>	124	
[0031]	<212>	PRT	
[0032]	<213>	人工序列	
[0033]	<220>		
[0034]	<223>	Ab-14的可变重链	
[0035]	<400>	2	
[0036]		Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0037]		1 5 10 15	
[0038]		Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	

[0039]	20	25	30
[0040]	Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0041]	35	40	45
[0042]	Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu		
[0043]	50	55	60
[0044]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0045]	65	70	75
[0046]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0047]	85	90	95
[0048]	Ala Arg Ala Leu Pro Ser Gly Thr Ile Leu Val Gly Gly Trp Phe Asp		
[0049]	100	105	110
[0050]	Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0051]	115	120	
[0052]	<210> 3		
[0053]	<211> 333		
[0054]	<212> DNA		
[0055]	<213> 人工序列		
[0056]	<220>		
[0057]	<223> Ab-14的可变轻链		
[0058]	<400> 3		
[0059]	aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc	60	
[0060]	tcctgcaccc gcagcagtgg caacattgcc agcaattatg tgcagtggta ccaacagcgc	120	
[0061]	ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctc	180	
[0062]	gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga	240	
[0063]	ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatagcag caatctttgg	300	
[0064]	gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta	333	
[0065]	<210> 4		
[0066]	<211> 111		
[0067]	<212> PRT		
[0068]	<213> 人工序列		
[0069]	<220>		
[0070]	<223> Ab-14的可变轻链		
[0071]	<400> 4		
[0072]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys		
[0073]	1	5	10
[0074]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Ala Ser Asn		
[0075]	20	25	30
[0076]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val		
[0077]	35	40	45

[0078]	Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0079]	50	60
[0080]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly	
[0081]	65	80
[0082]	Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser	
[0083]	85	95
[0084]	Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0085]	100	110
[0086]	<210>	5
[0087]	<211>	372
[0088]	<212>	DNA
[0089]	<213>	人工序列
[0090]	<220>	
[0091]	<223>	Ab-16的可变重链
[0092]	<400>	5
[0093]	gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
[0094]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccc tgagctgggt ccgccaggct	120
[0095]	ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgggt gtggtggtag cacatactac	180
[0096]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
[0097]	ctgcaaata gaacagctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacgtg	300
[0098]	tttccagaga ctttttcgat gaactacggt atggacgtct ggggccaagg aaccctggtc	360
[0099]	accgtctcct ca	372
[0100]	<210>	6
[0101]	<211>	124
[0102]	<212>	PRT
[0103]	<213>	人工序列
[0104]	<220>	
[0105]	<223>	Ab-16的可变重链
[0106]	<400>	6
[0107]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
[0108]	1	15
[0109]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0110]	20	30
[0111]	Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0112]	35	45
[0113]	Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0114]	50	60
[0115]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0116]	65	80

[0117]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0118]	85	90 95
[0119]	Ala Lys Asp Val Phe Pro Glu Thr Phe Ser Met Asn Tyr Gly Met Asp	
[0120]	100	105 110
[0121]	Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0122]	115	120
[0123]	<210> 7	
[0124]	<211> 324	
[0125]	<212> DNA	
[0126]	<213> 人工序列	
[0127]	<220>	
[0128]	<223> Ab-16的可变轻链	
[0129]	<400> 7	
[0130]	tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc	60
[0131]	acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga	120
[0132]	caggccccctg tactttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga	180
[0133]	ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa	240
[0134]	gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaaccatta tgtcttcgga	300
[0135]	actgggacca aggtcacctg ccta	324
[0136]	<210> 8	
[0137]	<211> 108	
[0138]	<212> PRT	
[0139]	<213> 人工序列	
[0140]	<220>	
[0141]	<223> Ab-16的可变轻链	
[0142]	<400> 8	
[0143]	Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln	
[0144]	1 5 10 15	
[0145]	Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala	
[0146]	20 25 30	
[0147]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
[0148]	35 40 45	
[0149]	Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
[0150]	50 55 60	
[0151]	Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu	
[0152]	65 70 75 80	
[0153]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His	
[0154]	85 90 95	
[0155]	Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	

[0156]	100	105
[0157]	<210> 9	
[0158]	<211> 384	
[0159]	<212> DNA	
[0160]	<213> 人工序列	
[0161]	<220>	
[0162]	<223> Ab-22的可变重链	
[0163]	<400> 9	
[0164]	caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
[0165]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccgtcaagct	120
[0166]	ccaggggaagg gtctggagtg ggtctctctt attagtgggg atgggtggtag cacatactat	180
[0167]	gcagactctg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctcccctgtat	240
[0168]	ctgcaaataga acagtctgag aactgaggac accgccttgt attactgtgc aaaagtgtc	300
[0169]	ctcccctgta gtagtaccag ctgctatgga agcgtcgggtg cttttgatat ctggggccaa	360
[0170]	gggaccacgg tcaccgtctc ctca	384
[0171]	<210> 10	
[0172]	<211> 128	
[0173]	<212> PRT	
[0174]	<213> 人工序列	
[0175]	<220>	
[0176]	<223> Ab-22的可变重链	
[0177]	<400> 10	
[0178]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly	
[0179]	1 5 10 15	
[0180]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
[0181]	20 25 30	
[0182]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0183]	35 40 45	
[0184]	Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0185]	50 55 60	
[0186]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr	
[0187]	65 70 75 80	
[0188]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
[0189]	85 90 95	
[0190]	Ala Lys Val Leu Leu Pro Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Gly Ser Val	
[0191]	100 105 110	
[0192]	Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0193]	115 120 125	
[0194]	<210> 11	

[0195]	<211>	324	
[0196]	<212>	DNA	
[0197]	<213>	人工序列	
[0198]	<220>		
[0199]	<223>	Ab-22的可变轻链	
[0200]	<400>	11	
[0201]	taggacgatg agctcgggtcc cagctccgaa gacataatga tcactattat tatcccacac	60	
[0202]	ctgacagtaa taatcggcct catcaccggc ttcgaccctg ctgatgggtca ggggtggccgt	120	
[0203]	gttccagag ttggagccag agaatcgctc agagatccct gagggccggt ccctatcaga	180	
[0204]	gtagatgacc aacgcagggg cctggcctgg cttctgctgg taccagtgc cactcttcct	240	
[0205]	tccaatgtcg cttccccac aggtaatcct ggccgtcttt cctggggcca ctgacactga	300	
[0206]	gggtgcctga gtcagcacag gcag	324	
[0207]	<210>	12	
[0208]	<211>	108	
[0209]	<212>	PRT	
[0210]	<213>	人工序列	
[0211]	<220>		
[0212]	<223>	Ab-22的可变轻链	
[0213]	<400>	12	
[0214]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys		
[0215]	1 5 10 15		
[0216]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Ser Asp Ile Gly Arg Lys Ser Val		
[0217]	20 25 30		
[0218]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ala Leu Val Ile Tyr		
[0219]	35 40 45		
[0220]	Ser Asp Arg Asp Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
[0221]	50 55 60		
[0222]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
[0223]	65 70 75 80		
[0224]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Asn Ser Asp His		
[0225]	85 90 95		
[0226]	Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ile Val Leu		
[0227]	100 105		
[0228]	<210>	13	
[0229]	<211>	351	
[0230]	<212>	DNA	
[0231]	<213>	人工序列	
[0232]	<220>		
[0233]	<223>	Ab-30的可变重链	

[0234]	<400>	13	
[0235]	caggtgcagc	tggtgcagtc	tgggggaagt gtggtacggc ctggggaatc cctcagactc 60
[0236]	tcctgtgtag	cctctggatt	catctttgat aattatgaca tgagttgggt ccgccaagtt 120
[0237]	ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctctcgt gttaattgga atggtggtag cacaacttat 180
[0238]	gcagacgctg	tgaagggccg	attcaccatc tccagagaca acaccaagaa ctccctgtat 240
[0239]	ctacaaatga	acaacctgag	agccgaagac acggccgtgt attactgtgt gcgcgagttt 300
[0240]	gtcggtgctt	atgatctctg	gggccagggg accacgggtca ccgtctcctc a 351
[0241]	<210>	14	
[0242]	<211>	117	
[0243]	<212>	PRT	
[0244]	<213>	人工序列	
[0245]	<220>		
[0246]	<223>	Ab-30的可变重链	
[0247]	<400>	14	
[0248]	Gln Val Gln	Leu Val Gln	Ser Gly Gly Ser Val Val Arg Pro Gly Glu
[0249]	1	5	10 15
[0250]	Ser Leu Arg	Leu Ser Cys	Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asn Tyr
[0251]		20	25 30
[0252]	Asp Met Ser	Trp Val Arg	Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0253]		35	40 45
[0254]	Ser Arg Val	Asn Trp Asn	Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ala Val
[0255]		50	55 60
[0256]	Lys Gly Arg	Phe Thr Ile	Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ser Leu Tyr
[0257]		65	70 75 80
[0258]	Leu Gln Met	Asn Asn Leu	Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0259]		85	90 95
[0260]	Val Arg Glu	Phe Val Gly	Ala Tyr Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr
[0261]		100	105 110
[0262]	Val Thr Val	Ser Ser	
[0263]		115	
[0264]	<210>	15	
[0265]	<211>	327	
[0266]	<212>	DNA	
[0267]	<213>	人工序列	
[0268]	<220>		
[0269]	<223>	Ab-30的可变轻链	
[0270]	<400>	15	
[0271]	cagtctgcc	tgactcagcc	tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
[0272]	tcctgcactg	gaaccagcag	tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtaccaacaa 120

[0273]	cacccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt	180
[0274]	tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc	240
[0275]	caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcac tctgccgttc	300
[0276]	ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327
[0277]	<210> 16	
[0278]	<211> 109	
[0279]	<212> PRT	
[0280]	<213> 人工序列	
[0281]	<220>	
[0282]	<223> Ab-30的可变轻链	
[0283]	<400> 16	
[0284]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln	
[0285]	1 5 10 15	
[0286]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr	
[0287]	20 25 30	
[0288]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
[0289]	35 40 45	
[0290]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe	
[0291]	50 55 60	
[0292]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
[0293]	65 70 75 80	
[0294]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser	
[0295]	85 90 95	
[0296]	Thr Leu Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0297]	100 105	
[0298]	<210> 17	
[0299]	<211> 363	
[0300]	<212> DNA	
[0301]	<213> 人工序列	
[0302]	<220>	
[0303]	<223> Ab-31的可变重链	
[0304]	<400> 17	
[0305]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc caggggccac agtgaaggtc	60
[0306]	tcctgcaagg tttttggaga caccttccgc ggctctata tacactgggt gcgacaggcc	120
[0307]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac	180
[0308]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accacggacg aatccacgag cacagcctac	240
[0309]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagcggacta	300
[0310]	cgttggggga tctggggctg gttcgacccc tggggccagg gcaccctgggt caccgtctcc	360
[0311]	tca	363

[0312]	<210>	18	
[0313]	<211>	121	
[0314]	<212>	PRT	
[0315]	<213>	人工序列	
[0316]	<220>		
[0317]	<223>	Ab-31的可变重链	
[0318]	<400>	18	
[0319]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0320]	1	5	10 15
[0321]	Thr Val Lys Val Ser Cys Lys Val Phe Gly Asp Thr Phe Arg Gly Leu		
[0322]		20	25 30
[0323]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0324]		35	40 45
[0325]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0326]		50	55 60
[0327]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0328]	65	70	75 80
[0329]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0330]		85	90 95
[0331]	Ala Ser Gly Leu Arg Trp Gly Ile Trp Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly		
[0332]		100	105 110
[0333]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0334]		115	120
[0335]	<210>	19	
[0336]	<211>	321	
[0337]	<212>	DNA	
[0338]	<213>	人工序列	
[0339]	<220>		
[0340]	<223>	Ab-31的可变轻链	
[0341]	<400>	19	
[0342]	gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60	
[0343]	ctctcctgca gggccagtca gagtattggc aacagcttag cctggtacca gcagaaacct	120	
[0344]	ggccaggctc ccaggctcct catgtatggg gcatccagca gggccactgg catcccagac	180	
[0345]	aggttcagtg gcagtggggc tgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct	240	
[0346]	gaagattttg caacgtatta ctgtcagcag catactatcc caacattctc ttctggccct	300	
[0347]	gggaccaaag tggaagtcaa a		321
[0348]	<210>	20	
[0349]	<211>	107	
[0350]	<212>	PRT	

[0351]	<213>	人工序列
[0352]	<220>	
[0353]	<223>	Ab-31的可变轻链
[0354]	<400>	20
[0355]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[0356]	1 5 10 15	
[0357]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Ser	
[0358]	20 25 30	
[0359]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Met	
[0360]	35 40 45	
[0361]	Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[0362]	50 55 60	
[0363]	Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[0364]	65 70 75 80	
[0365]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Thr Ile Pro Thr Phe	
[0366]	85 90 95	
[0367]	Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Val Lys	
[0368]	100 105	
[0369]	<210>	21
[0370]	<211>	363
[0371]	<212>	DNA
[0372]	<213>	人工序列
[0373]	<220>	
[0374]	<223>	Ab-32的可变重链
[0375]	<400>	21
[0376]	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag ctgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
[0377]	tcctgcaagg cttttggagg caccttcagt gacaatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0378]	cctggacaag ggcctgagtg gatggggggc atcattccta tctttggaaa accaaactac	180
[0379]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cactgcctac	240
[0380]	atggctcctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagaactatg	300
[0381]	gttcggggct ttcttgggggt tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
[0382]	tca	363
[0383]	<210>	22
[0384]	<211>	121
[0385]	<212>	PRT
[0386]	<213>	人工序列
[0387]	<220>	
[0388]	<223>	Ab-32的可变重链
[0389]	<400>	22

[0390]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser	
[0391]	1 5 10 15	
[0392]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Gly Thr Phe Ser Asp Asn	
[0393]	20 25 30	
[0394]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met	
[0395]	35 40 45	
[0396]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0397]	50 55 60	
[0398]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0399]	65 70 75 80	
[0400]	Met Val Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0401]	85 90 95	
[0402]	Ala Arg Thr Met Val Arg Gly Phe Leu Gly Val Met Asp Val Trp Gly	
[0403]	100 105 110	
[0404]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0405]	115 120	
[0406]	<210> 23	
[0407]	<211> 321	
[0408]	<212> DNA	
[0409]	<213> 人工序列	
[0410]	<220>	
[0411]	<223> Ab-32的可变轻链	
[0412]	<400> 23	
[0413]	gatattgtga tgaccagac tccatccttc ctgtccgcat ccataggaga cagagtcacc	60
[0414]	atcacttgcc gggccagtca gggcattggc agttatttag cctggatatca gcaaagacca	120
[0415]	ggggaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatcgactt tgcaaagtgg agtcccatca	180
[0416]	aggttcagcg gcagtggatc tgggacggac ttcactctca caatcagcaa cctgcagcct	240
[0417]	gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ctttaataatt acccgatcac ctteggccaa	300
[0418]	gggacacgac tggagattaa a	321
[0419]	<210> 24	
[0420]	<211> 107	
[0421]	<212> PRT	
[0422]	<213> 人工序列	
[0423]	<220>	
[0424]	<223> Ab-32的可变轻链	
[0425]	<400> 24	
[0426]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Ile Gly	
[0427]	1 5 10 15	
[0428]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Tyr	

[0429]	20	25	30
[0430]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0431]	35	40	45
[0432]	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0433]	50	55	60
[0434]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro		
[0435]	65	70	75
[0436]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Pro Ile		
[0437]	85	90	95
[0438]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0439]	100	105	
[0440]	<210> 25		
[0441]	<211> 375		
[0442]	<212> DNA		
[0443]	<213> 人工序列		
[0444]	<220>		
[0445]	<223> Ab-38的可变重链		
[0446]	<400> 25		
[0447]	caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60	
[0448]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120	
[0449]	ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180	
[0450]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
[0451]	ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcag	300	
[0452]	ttcgttacga tttttggagt gccaaagatac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg	360	
[0453]	gtcaccgtct cctca	375	
[0454]	<210> 26		
[0455]	<211> 125		
[0456]	<212> PRT		
[0457]	<213> 人工序列		
[0458]	<220>		
[0459]	<223> Ab-38的可变重链		
[0460]	<400> 26		
[0461]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0462]	1	5	10
[0463]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0464]	20	25	30
[0465]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0466]	35	40	45
[0467]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		

[0468]	50	55	60
[0469]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0470]	65	70	75 80
[0471]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0472]	85	90	95
[0473]	Ala Lys Asp Gln Phe Val Thr Ile Phe Gly Val Pro Arg Tyr Gly Met		
[0474]	100	105	110
[0475]	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0476]	115	120	125
[0477]	<210> 27		
[0478]	<211> 315		
[0479]	<212> DNA		
[0480]	<213> 人工序列		
[0481]	<220>		
[0482]	<223> Ab-38的可变轻链		
[0483]	<400> 27		
[0484]	cagtctgccc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccaacatc	60	
[0485]	ccctgctctg gagataaatt ggggaataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc	120	
[0486]	cagtccccctg tactgctcat ctatcaagat atcaagcggc cctcaaggat ccctgagcga	180	
[0487]	ttctctggct ccaactctgc ggacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg	240	
[0488]	gatgaggctg actattactg tcagacgtgg gacaacagcg tggtcttcgg cggcgggacc	300	
[0489]	aagctgaccg tcctc		315
[0490]	<210> 28		
[0491]	<211> 105		
[0492]	<212> PRT		
[0493]	<213> 人工序列		
[0494]	<220>		
[0495]	<223> Ab-38的可变轻链		
[0496]	<400> 28		
[0497]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
[0498]	1	5	10 15
[0499]	Thr Ala Asn Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Tyr Ala		
[0500]	20	25	30
[0501]	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Leu Ile Tyr		
[0502]	35	40	45
[0503]	Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
[0504]	50	55	60
[0505]	Asn Ser Ala Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met		
[0506]	65	70	75 80

[0507]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Asp Asn Ser Val Val Phe	
[0508]	85	90 95
[0509]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0510]	100	105
[0511]	<210> 29	
[0512]	<211> 360	
[0513]	<212> DNA	
[0514]	<213> 人工序列	
[0515]	<220>	
[0516]	<223> Ab-42的可变重链	
[0517]	<400> 29	
[0518]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
[0519]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0520]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac	180
[0521]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0522]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtct attactgtgc gagagggcgt	300
[0523]	caaatgttcg gtgcgggaat tgatttctgg ggcccgggca ccctgggtcac cgtctcctca	360
[0524]	<210> 30	
[0525]	<211> 120	
[0526]	<212> PRT	
[0527]	<213> 人工序列	
[0528]	<220>	
[0529]	<223> Ab-42的可变重链	
[0530]	<400> 30	
[0531]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0532]	1 5 10 15	
[0533]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0534]	20 25 30	
[0535]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0536]	35 40 45	
[0537]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0538]	50 55 60	
[0539]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0540]	65 70 75 80	
[0541]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0542]	85 90 95	
[0543]	Ala Arg Gly Arg Gln Met Phe Gly Ala Gly Ile Asp Phe Trp Gly Pro	
[0544]	100 105 110	
[0545]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	

[0546]	115	120
[0547]	<210> 31	
[0548]	<211> 336	
[0549]	<212> DNA	
[0550]	<213> 人工序列	
[0551]	<220>	
[0552]	<223> Ab-42的可变轻链	
[0553]	<400> 31	
[0554]	aatttttatgc tgactcagcc ccactctgtg tccgagtctc cggggaagac ggtaaccatc	60
[0555]	tcctgcaccc gcagcagtgagg cagcattgac agcaactatg tgcagtggtta ccagcagcgc	120
[0556]	ccgggcagcg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tgggggtccct	180
[0557]	gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga	240
[0558]	ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcctt atgatagcaa caatcgtcat	300
[0559]	gtgatattcg gcggagggac caagctgacc gtccta	336
[0560]	<210> 32	
[0561]	<211> 112	
[0562]	<212> PRT	
[0563]	<213> 人工序列	
[0564]	<220>	
[0565]	<223> Ab-42的可变轻链	
[0566]	<400> 32	
[0567]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys	
[0568]	1 5 10 15	
[0569]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Asn	
[0570]	20 25 30	
[0571]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val	
[0572]	35 40 45	
[0573]	Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0574]	50 55 60	
[0575]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly	
[0576]	65 70 75 80	
[0577]	Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser	
[0578]	85 90 95	
[0579]	Asn Asn Arg His Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0580]	100 105 110	
[0581]	<210> 33	
[0582]	<211> 354	
[0583]	<212> DNA	
[0584]	<213> 人工序列	

[0585]	<220>	
[0586]	<223>	Ab-46的可变重链
[0587]	<400>	33
[0588]		gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgaa gtaaagaagc ctgggtcctc ggtgaaagtc 60
[0589]		tcctgcaagg tttcaggagg cacattcggc acctatgctc tcaactgggt gcgccaggcc 120
[0590]		cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcgccctc tcattggtct agtaaaactac 180
[0591]		gcacataact ttgagggcag aatctcgatt accgcggaca agtccacggg cacagcctac 240
[0592]		atggaactga gcaacctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggtc 300
[0593]		tacggtggta actccgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354
[0594]	<210>	34
[0595]	<211>	118
[0596]	<212>	PRT
[0597]	<213>	人工序列
[0598]	<220>	
[0599]	<223>	Ab-46的可变重链
[0600]	<400>	34
[0601]		Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0602]		1 5 10 15
[0603]		Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
[0604]		20 25 30
[0605]		Ala Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0606]		35 40 45
[0607]		Gly Arg Ile Val Pro Leu Ile Gly Leu Val Asn Tyr Ala His Asn Phe
[0608]		50 55 60
[0609]		Glu Gly Arg Ile Ser Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
[0610]		65 70 75 80
[0611]		Met Glu Leu Ser Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0612]		85 90 95
[0613]		Ala Arg Glu Val Tyr Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0614]		100 105 110
[0615]		Leu Val Thr Val Ser Ser
[0616]		115
[0617]	<210>	35
[0618]	<211>	330
[0619]	<212>	DNA
[0620]	<213>	人工序列
[0621]	<220>	
[0622]	<223>	Ab-46的可变轻链
[0623]	<400>	35

[0624]	aattttatgc tgactcagcc ccactcagtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc	60
[0625]	tcctgcactc gcagtagtgg caacattggc accaactatg tgcagtggta ccagcagcgc	120
[0626]	ccgggcagtg ccccgctcgc ttgatctac gaggattatc gaagaccctc tggggtccct	180
[0627]	gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcat catctctgga	240
[0628]	ctgaagcctg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcct atcatagcag cggttgggaa	300
[0629]	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc	330
[0630]	<210>	36
[0631]	<211>	110
[0632]	<212>	PRT
[0633]	<213>	人工序列
[0634]	<220>	
[0635]	<223>	Ab-46的可变轻链
[0636]	<400>	36
[0637]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys	
[0638]	1 5 10 15	
[0639]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Thr Asn	
[0640]	20 25 30	
[0641]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Val Ala Leu	
[0642]	35 40 45	
[0643]	Ile Tyr Glu Asp Tyr Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0644]	50 55 60	
[0645]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Ile Ile Ser Gly	
[0646]	65 70 75 80	
[0647]	Leu Lys Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr His Ser	
[0648]	85 90 95	
[0649]	Ser Gly Trp Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0650]	100 105 110	
[0651]	<210>	37
[0652]	<211>	360
[0653]	<212>	DNA
[0654]	<213>	人工序列
[0655]	<220>	
[0656]	<223>	Ab-50的可变重链
[0657]	<400>	37
[0658]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggaggtgag gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc	60
[0659]	tcctgcaagg cttcttggtta caccttgagc agtcatggta taacctgggt gcgacaggcc	120
[0660]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctc acaatggtea cgctagcaat	180
[0661]	gcacagaagg tggaggacag agtcactatg actactgaca catccacgaa cacagcctac	240
[0662]	atggaactga ggagcctgac agctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtacat	300

[0663]	gctgccctct actatggtat ggacgtctgg ggccaaggaa ccctgggtcac cgtctcctca	360
[0664]	<210>	38
[0665]	<211>	120
[0666]	<212>	PRT
[0667]	<213>	人工序列
[0668]	<220>	
[0669]	<223>	Ab-50的可变重链
[0670]	<400>	38
[0671]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0672]	1 5 10 15	
[0673]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Ser His	
[0674]	20 25 30	
[0675]	Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0676]	35 40 45	
[0677]	Gly Trp Ile Ser Ala His Asn Gly His Ala Ser Asn Ala Gln Lys Val	
[0678]	50 55 60	
[0679]	Glu Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr	
[0680]	65 70 75 80	
[0681]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0682]	85 90 95	
[0683]	Ala Arg Val His Ala Ala Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln	
[0684]	100 105 110	
[0685]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0686]	115 120	
[0687]	<210>	39
[0688]	<211>	324
[0689]	<212>	DNA
[0690]	<213>	人工序列
[0691]	<220>	
[0692]	<223>	Ab-50的可变轻链
[0693]	<400>	39
[0694]	cagtctgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt	60
[0695]	acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa ggtgtgcact ggtatcagca gaagccaggc	120
[0696]	caggccccctg tactggtegt ctatgatgat agtgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
[0697]	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
[0698]	gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtgttcggc	300
[0699]	ggagggacca agctgaccgt ccta	324
[0700]	<210>	40
[0701]	<211>	108

[0702]	<212>	PRT	
[0703]	<213>	人工序列	
[0704]	<220>		
[0705]	<223>	Ab-50的可变轻链	
[0706]	<400>	40	
[0707]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
[0708]	1 5 10 15		
[0709]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Gly Val		
[0710]	20 25 30		
[0711]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
[0712]	35 40 45		
[0713]	Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
[0714]	50 55 60		
[0715]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
[0716]	65 70 75 80		
[0717]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
[0718]	85 90 95		
[0719]	Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0720]	100 105		
[0721]	<210>	41	
[0722]	<211>	363	
[0723]	<212>	DNA	
[0724]	<213>	人工序列	
[0725]	<220>		
[0726]	<223>	Ab-52的可变重链	
[0727]	<400>	41	
[0728]	caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
[0729]	tcctgttcag cctctggatt caccttcagc agacatggca tgcactgggt ccgccaggct	120	
[0730]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatcacatg atggaagtgt aaaatactat	180	
[0731]	gcagactcca tgaagggccg attcagcatc tccagagaca attccaacaa cacactgtat	240	
[0732]	ctccaaatgg acagcctgag agctgacgac acggccgttt attactgtgc gagaggactg	300	
[0733]	tcgtaccagg tgtcgggggtg gttcgacccc tggggccagg gcaccctggc caccgtctcc	360	
[0734]	tca	363	
[0735]	<210>	42	
[0736]	<211>	121	
[0737]	<212>	PRT	
[0738]	<213>	人工序列	
[0739]	<220>		
[0740]	<223>	Ab-52的可变重链	

[0741]	<400>	42	
[0742]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
[0743]	1	5	10 15
[0744]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg His		
[0745]		20	25 30
[0746]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0747]		35	40 45
[0748]	Ala Val Ile Ser His Asp Gly Ser Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met		
[0749]		50	55 60
[0750]	Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr		
[0751]	65	70	75 80
[0752]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0753]		85	90 95
[0754]	Ala Arg Gly Leu Ser Tyr Gln Val Ser Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly		
[0755]		100	105 110
[0756]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0757]		115	120
[0758]	<210>	43	
[0759]	<211>	333	
[0760]	<212>	DNA	
[0761]	<213>	人工序列	
[0762]	<220>		
[0763]	<223>	Ab-52的可变轻链	
[0764]	<400>	43	
[0765]	aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc	60	
[0766]	tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc	120	
[0767]	ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tgggggtccct	180	
[0768]	gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga	240	
[0769]	ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatagcac cacccttcg	300	
[0770]	gtgttcggcg gcgggaccaa gctgaccgtc cta	333	
[0771]	<210>	44	
[0772]	<211>	111	
[0773]	<212>	PRT	
[0774]	<213>	人工序列	
[0775]	<220>		
[0776]	<223>	Ab-52的可变轻链	
[0777]	<400>	44	
[0778]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys		
[0779]	1	5	10 15

[0780]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn	
[0781]	20	25 30
[0782]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val	
[0783]	35	40 45
[0784]	Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0785]	50	55 60
[0786]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly	
[0787]	65	70 75 80
[0788]	Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser	
[0789]	85	90 95
[0790]	Thr Thr Pro Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0791]	100	105 110
[0792]	<210>	45
[0793]	<211>	360
[0794]	<212>	DNA
[0795]	<213>	人工序列
[0796]	<220>	
[0797]	<223>	Ab-55的可变重链
[0798]	<400>	45
[0799]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
[0800]	tcctgcaagg cttcttggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0801]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg accagccctc ataatggtct cacagcattt	180
[0802]	gcacagatcc tagagggccg agtcaccatg accacagaca catccacgaa cacagcctac	240
[0803]	atggaattga ggaacctgac atttgatgac acggccgttt atttctgtgc gaaagtacat	300
[0804]	cctgtcttct cttatgcgtt ggacgtctgg ggccaaggca ccctgggtcac cgtctcctca	360
[0805]	<210>	46
[0806]	<211>	120
[0807]	<212>	PRT
[0808]	<213>	人工序列
[0809]	<220>	
[0810]	<223>	Ab-55的可变重链
[0811]	<400>	46
[0812]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0813]	1	5 10 15
[0814]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0815]	20	25 30
[0816]	Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0817]	35	40 45
[0818]	Gly Trp Thr Ser Pro His Asn Gly Leu Thr Ala Phe Ala Gln Ile Leu	

[0819]	50	55	60
[0820]	Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr		
[0821]	65	70	75
[0822]	Met Glu Leu Arg Asn Leu Thr Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		80
[0823]		85	90
[0824]	Ala Lys Val His Pro Val Phe Ser Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln		95
[0825]		100	105
[0826]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
[0827]		115	120
[0828]	<210>	47	
[0829]	<211>	330	
[0830]	<212>	DNA	
[0831]	<213>	人工序列	
[0832]	<220>		
[0833]	<223>	Ab-55的可变轻链	
[0834]	<400>	47	
[0835]	aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtccc cggggaagac ggtaaccatc	60	
[0836]	tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgcc agcaactatg tacagtggta ccagcagcgc	120	
[0837]	ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaagataacc aaagaccctc tggggtcctt	180	
[0838]	gatcggttct ctggctccat cgacacctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga	240	
[0839]	ctgaagacta aggacgaggc ggactactac tgtcagtctt atgatggcat cactgtgatt	300	
[0840]	ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta	330	
[0841]	<210>	48	
[0842]	<211>	110	
[0843]	<212>	PRT	
[0844]	<213>	人工序列	
[0845]	<220>		
[0846]	<223>	Ab-55的可变轻链	
[0847]	<400>	48	
[0848]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys		
[0849]	1	5	10
[0850]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn		15
[0851]		20	25
[0852]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val		30
[0853]		35	40
[0854]	Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		45
[0855]		50	55
[0856]	Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly		60
[0857]	65	70	75
			80

[0858]	Leu Lys Thr Lys Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly	
[0859]		85 90 95
[0860]	Ile Thr Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0861]		100 105 110
[0862]	<210>	49
[0863]	<211>	354
[0864]	<212>	DNA
[0865]	<213>	人工序列
[0866]	<220>	
[0867]	<223>	Ab-56的可变重链
[0868]	<400>	49
[0869]	gaggtgcagc tgggtggagtc tggagctgag gtgatgaacc ctgggtcctc ggtgagggtc	60
[0870]	tcctgcaggg gttctggagg cgacttcagt acctatgctt tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0871]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcaaaactac	180
[0872]	gcacagaagt tccagggcag ggtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0873]	atggagctga gcagcctgag atctgacgat acggccgtgt attactgtgc gagagatggc	300
[0874]	tatggttcgg acccggtgct atggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctca	354
[0875]	<210>	50
[0876]	<211>	118
[0877]	<212>	PRT
[0878]	<213>	人工序列
[0879]	<220>	
[0880]	<223>	Ab-56的可变重链
[0881]	<400>	50
[0882]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Met Asn Pro Gly Ser	
[0883]	1 5 10 15	
[0884]	Ser Val Arg Val Ser Cys Arg Gly Ser Gly Gly Asp Phe Ser Thr Tyr	
[0885]	20 25 30	
[0886]	Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0887]	35 40 45	
[0888]	Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0889]	50 55 60	
[0890]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0891]	65 70 75 80	
[0892]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0893]	85 90 95	
[0894]	Ala Arg Asp Gly Tyr Gly Ser Asp Pro Val Leu Trp Gly Gln Gly Thr	
[0895]	100 105 110	
[0896]	Leu Val Thr Val Ser Ser	

[0897]	115	
[0898]	<210>	51
[0899]	<211>	333
[0900]	<212>	DNA
[0901]	<213>	人工序列
[0902]	<220>	
[0903]	<223>	Ab-56的可变轻链
[0904]	<400>	51
[0905]	aatttttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggggtctc cggggaagac ggtaaccctc	60
[0906]	ccctgcaccc gcagcagtg cagcattgcc agccactatg tccagtggta ccagcagcgc	120
[0907]	ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataaca agagaccctc tgggggtccct	180
[0908]	gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcag catctctgga	240
[0909]	ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagctctt atgatagcag caatcgttgg	300
[0910]	gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta	333
[0911]	<210>	52
[0912]	<211>	111
[0913]	<212>	PRT
[0914]	<213>	人工序列
[0915]	<220>	
[0916]	<223>	Ab-56的可变轻链
[0917]	<400>	52
[0918]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys	
[0919]	1 5 10 15	
[0920]	Thr Val Thr Leu Pro Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser His	
[0921]	20 25 30	
[0922]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val	
[0923]	35 40 45	
[0924]	Ile Tyr Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0925]	50 55 60	
[0926]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly	
[0927]	65 70 75 80	
[0928]	Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser	
[0929]	85 90 95	
[0930]	Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0931]	100 105 110	
[0932]	<210>	53
[0933]	<211>	354
[0934]	<212>	DNA
[0935]	<213>	人工序列

[0936]	<220>	
[0937]	<223>	Ab-65的可变重链
[0938]	<400>	53
[0939]	gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
[0940]	tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactatggta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[0941]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat	180
[0942]	gcacagaagg tccagggcag agtcacatg accacagaca catccacgag cacaggctac	240
[0943]	atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggagat	300
[0944]	tttcggaaac cttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca	354
[0945]	<210>	54
[0946]	<211>	118
[0947]	<212>	PRT
[0948]	<213>	人工序列
[0949]	<220>	
[0950]	<223>	Ab-65的可变重链
[0951]	<400>	54
[0952]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0953]	1 5 10 15	
[0954]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
[0955]	20 25 30	
[0956]	Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0957]	35 40 45	
[0958]	Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val	
[0959]	50 55 60	
[0960]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Gly Tyr	
[0961]	65 70 75 80	
[0962]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0963]	85 90 95	
[0964]	Ala Arg Gly Asp Phe Arg Lys Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0965]	100 105 110	
[0966]	Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0967]	115	
[0968]	<210>	55
[0969]	<211>	345
[0970]	<212>	DNA
[0971]	<213>	人工序列
[0972]	<220>	
[0973]	<223>	Ab-65的可变轻链
[0974]	<400>	55

[0975]	ctgcctgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatccc ccggagcatc agccagtctc	60
[0976]	acctgcacct tacgcagtgg cctcaatggt ggttcctaca ggatatactg gtaccagcag	120
[0977]	aagccaggga gtcgtcccca gtatctcctg aactacaaat cagactcaaa taaacagcag	180
[0978]	gcctctggag tccccagccg cttctctgga tccaaggatg cttcggccaa tgcagggatt	240
[0979]	ttactcatct cgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggtac	300
[0980]	agcagcgctg tggatttcgg cggagggacc aagctgaccg tccta	345
[0981]	<210>	56
[0982]	<211>	115
[0983]	<212>	PRT
[0984]	<213>	人工序列
[0985]	<220>	
[0986]	<223>	Ab-65的可变轻链
[0987]	<400>	56
[0988]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala	
[0989]	1 5 10 15	
[0990]	Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Leu Asn Val Gly Ser	
[0991]	20 25 30	
[0992]	Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Arg Pro Gln Tyr	
[0993]	35 40 45	
[0994]	Leu Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asn Lys Gln Gln Ala Ser Gly Val	
[0995]	50 55 60	
[0996]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile	
[0997]	65 70 75 80	
[0998]	Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys	
[0999]	85 90 95	
[1000]	Met Ile Trp Tyr Ser Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
[1001]	100 105 110	
[1002]	Thr Val Leu	
[1003]	115	
[1004]	<210>	57
[1005]	<211>	5
[1006]	<212>	PRT
[1007]	<213>	人工序列
[1008]	<220>	
[1009]	<223>	重链CDR1共有区, Ab-42
[1010]	<400>	57
[1011]	Ser Tyr Ala Ile Ser	
[1012]	1 5	
[1013]	<210>	58

[1014] <211> 5
[1015] <212> PRT
[1016] <213> 人工序列
[1017] <220>
[1018] <223> Ab-14, Ab-55的重链CDR1
[1019] <400> 58
[1020] Ser Tyr Gly Ile Ser
[1021] 1 5
[1022] <210> 59
[1023] <211> 5
[1024] <212> PRT
[1025] <213> 人工序列
[1026] <220>
[1027] <223> Ab-16的重链CDR1
[1028] <400> 59
[1029] Ser Tyr Ala Leu Ser
[1030] 1 5
[1031] <210> 60
[1032] <211> 5
[1033] <212> PRT
[1034] <213> 人工序列
[1035] <220>
[1036] <223> Ab-22非人重链CDR1
[1037] <400> 60
[1038] Asp Tyr Ala Met His
[1039] 1 5
[1040] <210> 61
[1041] <211> 5
[1042] <212> PRT
[1043] <213> 人工序列
[1044] <220>
[1045] <223> Ab-30的重链CDR1
[1046] <400> 61
[1047] Asn Tyr Asp Met Ser
[1048] 1 5
[1049] <210> 62
[1050] <211> 5
[1051] <212> PRT
[1052] <213> 人工序列

[1053] <220>
[1054] <223> Ab-31的重链CDR1
[1055] <400> 62
[1056] Gly Leu Tyr Ile His
[1057] 1 5
[1058] <210> 63
[1059] <211> 5
[1060] <212> PRT
[1061] <213> 人工序列
[1062] <220>
[1063] <223> Ab-32的重链CDR1
[1064] <400> 63
[1065] Asp Asn Ala Ile Ser
[1066] 1 5
[1067] <210> 64
[1068] <211> 5
[1069] <212> PRT
[1070] <213> 人工序列
[1071] <220>
[1072] <223> Ab-38的重链CDR1
[1073] <400> 64
[1074] Ser Tyr Ala Met Ser
[1075] 1 5
[1076] <210> 65
[1077] <211> 5
[1078] <212> PRT
[1079] <213> 人工序列
[1080] <220>
[1081] <223> Ab-46的重链CDR1
[1082] <400> 65
[1083] Thr Tyr Ala Leu Asn
[1084] 1 5
[1085] <210> 66
[1086] <211> 5
[1087] <212> PRT
[1088] <213> 人工序列
[1089] <220>
[1090] <223> Ab-50的重链CDR1
[1091] <400> 66

[1092]	Ser His Gly Ile Thr			
[1093]	1	5		
[1094]	<210>	67		
[1095]	<211>	5		
[1096]	<212>	PRT		
[1097]	<213>	人工序列		
[1098]	<220>			
[1099]	<223>	Ab-52的重链CDR1		
[1100]	<400>	67		
[1101]	Arg His Gly Met His			
[1102]	1	5		
[1103]	<210>	68		
[1104]	<211>	5		
[1105]	<212>	PRT		
[1106]	<213>	人工序列		
[1107]	<220>			
[1108]	<223>	Ab-56的重链CDR1		
[1109]	<400>	68		
[1110]	Thr Tyr Ala Phe Ser			
[1111]	1	5		
[1112]	<210>	69		
[1113]	<211>	5		
[1114]	<212>	PRT		
[1115]	<213>	人工序列		
[1116]	<220>			
[1117]	<223>	Ab-65的重链CDR1		
[1118]	<400>	69		
[1119]	Asn Tyr Gly Ile Ser			
[1120]	1	5		
[1121]	<210>	70		
[1122]	<211>	17		
[1123]	<212>	PRT		
[1124]	<213>	人工序列		
[1125]	<220>			
[1126]	<223>	重链CDR2共有区		
[1127]	<400>	70		
[1128]	Trp Ile Ser Pro Ile Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val Gln			
[1129]	1	5	10	15
[1130]	Gly			

[1131]	<210>	71
[1132]	<211>	17
[1133]	<212>	PRT
[1134]	<213>	人工序列
[1135]	<220>	
[1136]	<223>	Ab-14的重链CDR2
[1137]	<400>	71
[1138]	Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln	
[1139]	1 5 10 15	
[1140]	Gly	
[1141]	<210>	72
[1142]	<211>	17
[1143]	<212>	PRT
[1144]	<213>	人工序列
[1145]	<220>	
[1146]	<223>	Ab-16的重链CDR2
[1147]	<400>	72
[1148]	Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
[1149]	1 5 10 15	
[1150]	Asp	
[1151]	<210>	73
[1152]	<211>	17
[1153]	<212>	PRT
[1154]	<213>	人工序列
[1155]	<220>	
[1156]	<223>	Ab-22的重链CDR2
[1157]	<400>	73
[1158]	Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
[1159]	1 5 10 15	
[1160]	Asp	
[1161]	<210>	74
[1162]	<211>	17
[1163]	<212>	PRT
[1164]	<213>	人工序列
[1165]	<220>	
[1166]	<223>	Ab-30的重链CDR2
[1167]	<400>	74
[1168]	Arg Val Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ala Val Lys	
[1169]	1 5 10 15	

[1170]	Asp
[1171]	<210> 75
[1172]	<211> 17
[1173]	<212> PRT
[1174]	<213> 人工序列
[1175]	<220>
[1176]	<223> Ab-31的重链CDR2
[1177]	<400> 75
[1178]	Trp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu
[1179]	1 5 10 15
[1180]	Asp
[1181]	<210> 76
[1182]	<211> 17
[1183]	<212> PRT
[1184]	<213> 人工序列
[1185]	<220>
[1186]	<223> Ab-32的重链CDR2
[1187]	<400> 76
[1188]	Trp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu
[1189]	1 5 10 15
[1190]	Asp
[1191]	<210> 77
[1192]	<211> 17
[1193]	<212> PRT
[1194]	<213> 人工序列
[1195]	<220>
[1196]	<223> Ab-38的重链CDR2
[1197]	<400> 77
[1198]	Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1199]	1 5 10 15
[1200]	Asp
[1201]	<210> 78
[1202]	<211> 17
[1203]	<212> PRT
[1204]	<213> 人工序列
[1205]	<220>
[1206]	<223> Ab-42的重链CDR2
[1207]	<400> 78
[1208]	Trp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu

[1209]	1	5	10	15												
[1210]	Asp															
[1211]	<210>	79														
[1212]	<211>	17														
[1213]	<212>	PRT														
[1214]	<213>	人工序列														
[1215]	<220>															
[1216]	<223>	Ab-46的重链CDR2														
[1217]	<400>	79														
[1218]	Arg	Ile	Val	Pro	Leu	Ile	Gly	Leu	Val	Asn	Tyr	Ala	His	Asn	Phe	Glu
[1219]	1	5	10	15												
[1220]	Asp															
[1221]	<210>	80														
[1222]	<211>	17														
[1223]	<212>	PRT														
[1224]	<213>	人工序列														
[1225]	<220>															
[1226]	<223>	Ab-50的重链CDR2														
[1227]	<400>	80														
[1228]	Trp	Ile	Ser	Ala	His	Asn	Gly	His	Ala	Ser	Asn	Ala	Gln	Lys	Val	Glu
[1229]	1	5	10	15												
[1230]	Asp															
[1231]	<210>	81														
[1232]	<211>	17														
[1233]	<212>	PRT														
[1234]	<213>	人工序列														
[1235]	<220>															
[1236]	<223>	Ab-52的重链CDR2														
[1237]	<400>	81														
[1238]	Val	Ile	Ser	His	Asp	Gly	Ser	Val	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Met	Lys
[1239]	1	5	10	15												
[1240]	Asp															
[1241]	<210>	82														
[1242]	<211>	17														
[1243]	<212>	PRT														
[1244]	<213>	人工序列														
[1245]	<220>															
[1246]	<223>	Ab-55的重链CDR2														
[1247]	<400>	82														

[1248]	Trp Thr Ser Pro His Asn Gly Leu Thr Ala Phe Ala Gln Ile Leu Glu
[1249]	1 5 10 15
[1250]	Asp
[1251]	<210> 83
[1252]	<211> 17
[1253]	<212> PRT
[1254]	<213> 人工序列
[1255]	<220>
[1256]	<223> Ab-56的重链CDR2
[1257]	<400> 83
[1258]	Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu
[1259]	1 5 10 15
[1260]	Asp
[1261]	<210> 84
[1262]	<211> 17
[1263]	<212> PRT
[1264]	<213> 人工序列
[1265]	<220>
[1266]	<223> Ab-65的重链CDR2
[1267]	<400> 84
[1268]	Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val Glu
[1269]	1 5 10 15
[1270]	Asp
[1271]	<210> 85
[1272]	<211> 19
[1273]	<212> PRT
[1274]	<213> 人工序列
[1275]	<220>
[1276]	<223> 重链CDR3共有区
[1277]	<220>
[1278]	<221> 其它特征
[1279]	<222> (3) .. (17)
[1280]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[1281]	<400> 85
[1282]	Gly Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[1283]	1 5 10 15
[1284]	Xaa Asp Val
[1285]	<210> 86
[1286]	<211> 15

[1287]	<212>	PRT
[1288]	<213>	人工序列
[1289]	<220>	
[1290]	<223>	Ab-14的重链CDR3
[1291]	<400>	86
[1292]	Ala Leu Pro Ser Gly Thr Ile Leu Val Gly Gly Trp Phe Asp Pro	
[1293]	1 5 10 15	
[1294]	<210>	87
[1295]	<211>	15
[1296]	<212>	PRT
[1297]	<213>	人工序列
[1298]	<220>	
[1299]	<223>	Ab-16的重链CDR3
[1300]	<400>	87
[1301]	Asp Val Phe Pro Glu Thr Phe Ser Met Asn Tyr Gly Met Asp Val	
[1302]	1 5 10 15	
[1303]	<210>	88
[1304]	<211>	19
[1305]	<212>	PRT
[1306]	<213>	人工序列
[1307]	<220>	
[1308]	<223>	Ab-22的重链CDR3
[1309]	<400>	88
[1310]	Val Leu Leu Pro Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Gly Ser Val Gly Ala	
[1311]	1 5 10 15	
[1312]	Phe Asp Ile	
[1313]	<210>	89
[1314]	<211>	8
[1315]	<212>	PRT
[1316]	<213>	人工序列
[1317]	<220>	
[1318]	<223>	Ab-30的重链CDR3
[1319]	<400>	89
[1320]	Glu Phe Val Gly Ala Tyr Asp Leu	
[1321]	1 5	
[1322]	<210>	90
[1323]	<211>	12
[1324]	<212>	PRT
[1325]	<213>	人工序列

[1326] <220>
[1327] <223> Ab-31的重链CDR3
[1328] <400> 90
[1329] Gly Leu Arg Trp Gly Ile Trp Gly Trp Phe Asp Pro
[1330] 1 5 10
[1331] <210> 91
[1332] <211> 12
[1333] <212> PRT
[1334] <213> 人工序列
[1335] <220>
[1336] <223> Ab-32的重链CDR3
[1337] <400> 91
[1338] Thr Met Val Arg Gly Phe Leu Gly Val Met Asp Val
[1339] 1 5 10
[1340] <210> 92
[1341] <211> 16
[1342] <212> PRT
[1343] <213> 人工序列
[1344] <220>
[1345] <223> Ab-38的重链CDR3
[1346] <400> 92
[1347] Asp Gln Phe Val Thr Ile Phe Gly Val Pro Arg Tyr Gly Met Asp Val
[1348] 1 5 10 15
[1349] <210> 93
[1350] <211> 11
[1351] <212> PRT
[1352] <213> 人工序列
[1353] <220>
[1354] <223> Ab-42的重链CDR3
[1355] <400> 93
[1356] Gly Arg Gln Met Phe Gly Ala Gly Ile Asp Phe
[1357] 1 5 10
[1358] <210> 94
[1359] <211> 9
[1360] <212> PRT
[1361] <213> 人工序列
[1362] <220>
[1363] <223> Ab-46的重链CDR3
[1364] <400> 94

[1365]	Glu Val Tyr Gly Gly Asn Ser Asp Tyr
[1366]	1 5
[1367]	<210> 95
[1368]	<211> 11
[1369]	<212> PRT
[1370]	<213> 人工序列
[1371]	<220>
[1372]	<223> Ab-50的重链CDR3
[1373]	<400> 95
[1374]	Val His Ala Ala Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val
[1375]	1 5 10
[1376]	<210> 96
[1377]	<211> 12
[1378]	<212> PRT
[1379]	<213> 人工序列
[1380]	<220>
[1381]	<223> Ab-52的重链CDR3
[1382]	<400> 96
[1383]	Gly Leu Ser Tyr Gln Val Ser Gly Trp Phe Asp Pro
[1384]	1 5 10
[1385]	<210> 97
[1386]	<211> 11
[1387]	<212> PRT
[1388]	<213> 人工序列
[1389]	<220>
[1390]	<223> Ab-55的重链CDR3
[1391]	<400> 97
[1392]	Val His Pro Val Phe Ser Tyr Ala Leu Asp Val
[1393]	1 5 10
[1394]	<210> 98
[1395]	<211> 9
[1396]	<212> PRT
[1397]	<213> 人工序列
[1398]	<220>
[1399]	<223> Ab-56的重链CDR3
[1400]	<400> 98
[1401]	Asp Gly Tyr Gly Ser Asp Pro Val Leu
[1402]	1 5
[1403]	<210> 99

[1404]	<211>	9
[1405]	<212>	PRT
[1406]	<213>	人工序列
[1407]	<220>	
[1408]	<223>	Ab-65的重链CDR3
[1409]	<400>	99
[1410]	Gly Asp Phe Arg Lys Pro Phe Asp Tyr	
[1411]	1	5
[1412]	<210>	100
[1413]	<211>	13
[1414]	<212>	PRT
[1415]	<213>	人工序列
[1416]	<220>	
[1417]	<223>	轻链CDR1共有区
[1418]	<400>	100
[1419]	Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Gly Ser Asn Tyr Val Gln	
[1420]	1	5 10
[1421]	<210>	101
[1422]	<211>	13
[1423]	<212>	PRT
[1424]	<213>	人工序列
[1425]	<220>	
[1426]	<223>	Ab-14的轻链CDR1
[1427]	<400>	101
[1428]	Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln	
[1429]	1	5 10
[1430]	<210>	102
[1431]	<211>	11
[1432]	<212>	PRT
[1433]	<213>	人工序列
[1434]	<220>	
[1435]	<223>	Ab-16的轻链CDR1
[1436]	<400>	102
[1437]	Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser	
[1438]	1	5 10
[1439]	<210>	103
[1440]	<211>	11
[1441]	<212>	PRT
[1442]	<213>	人工序列

[1443] <220>
[1444] <223> Ab-22的轻链CDR1
[1445] <400> 103
[1446] Gly Gly Ser Asp Ile Gly Arg Lys Ser Val His
[1447] 1 5 10
[1448] <210> 104
[1449] <211> 14
[1450] <212> PRT
[1451] <213> 人工序列
[1452] <220>
[1453] <223> Ab-30的轻链CDR1
[1454] <400> 104
[1455] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
[1456] 1 5 10
[1457] <210> 105
[1458] <211> 11
[1459] <212> PRT
[1460] <213> 人工序列
[1461] <220>
[1462] <223> Ab-31的轻链CDR1
[1463] <400> 105
[1464] Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Ser Leu Ala
[1465] 1 5 10
[1466] <210> 106
[1467] <211> 11
[1468] <212> PRT
[1469] <213> 人工序列
[1470] <220>
[1471] <223> Ab-32的轻链CDR1
[1472] <400> 106
[1473] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
[1474] 1 5 10
[1475] <210> 107
[1476] <211> 11
[1477] <212> PRT
[1478] <213> 人工序列
[1479] <220>
[1480] <223> Ab-38的轻链CDR1
[1481] <400> 107

[1482]	Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Tyr Ala Tyr
[1483]	1 5 10
[1484]	<210> 108
[1485]	<211> 13
[1486]	<212> PRT
[1487]	<213> 人工序列
[1488]	<220>
[1489]	<223> Ab-42的轻链CDR1
[1490]	<400> 108
[1491]	Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Asn Tyr Val Gln
[1492]	1 5 10
[1493]	<210> 109
[1494]	<211> 13
[1495]	<212> PRT
[1496]	<213> 人工序列
[1497]	<220>
[1498]	<223> Ab-46的轻链CDR1
[1499]	<400> 109
[1500]	Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Thr Asn Tyr Val Gln
[1501]	1 5 10
[1502]	<210> 110
[1503]	<211> 11
[1504]	<212> PRT
[1505]	<213> 人工序列
[1506]	<220>
[1507]	<223> Ab-50的轻链CDR1
[1508]	<400> 110
[1509]	Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Gly Val His
[1510]	1 5 10
[1511]	<210> 111
[1512]	<211> 13
[1513]	<212> PRT
[1514]	<213> 人工序列
[1515]	<220>
[1516]	<223> Ab-52的轻链CDR1
[1517]	<400> 111
[1518]	Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln
[1519]	1 5 10
[1520]	<210> 112

[1521]	<211>	13
[1522]	<212>	PRT
[1523]	<213>	人工序列
[1524]	<220>	
[1525]	<223>	Ab-55的轻链CDR1
[1526]	<400>	112
[1527]	Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln	
[1528]	1	5 10
[1529]	<210>	113
[1530]	<211>	13
[1531]	<212>	PRT
[1532]	<213>	人工序列
[1533]	<220>	
[1534]	<223>	Ab-56的轻链CDR1
[1535]	<400>	113
[1536]	Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser His Tyr Val Gln	
[1537]	1	5 10
[1538]	<210>	114
[1539]	<211>	14
[1540]	<212>	PRT
[1541]	<213>	人工序列
[1542]	<220>	
[1543]	<223>	Ab-65的轻链CDR1
[1544]	<400>	114
[1545]	Thr Leu Arg Ser Gly Leu Asn Val Gly Ser Tyr Arg Ile Tyr	
[1546]	1	5 10
[1547]	<210>	115
[1548]	<211>	7
[1549]	<212>	PRT
[1550]	<213>	人工序列
[1551]	<220>	
[1552]	<223>	Ab-14, Ab-42, Ab-52, Ab-55的轻链CDR2共有区
[1553]	<400>	115
[1554]	Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser	
[1555]	1	5
[1556]	<210>	116
[1557]	<211>	7
[1558]	<212>	PRT
[1559]	<213>	人工序列

[1560] <220>
[1561] <223> Ab-16的轻链CDR2
[1562] <400> 116
[1563] Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
[1564] 1 5
[1565] <210> 117
[1566] <211> 7
[1567] <212> PRT
[1568] <213> 人工序列
[1569] <220>
[1570] <223> Ab-22的轻链CDR2
[1571] <400> 117
[1572] Ser Asp Arg Asp Arg Pro Ser
[1573] 1 5
[1574] <210> 118
[1575] <211> 7
[1576] <212> PRT
[1577] <213> 人工序列
[1578] <220>
[1579] <223> Ab-30的轻链CDR2
[1580] <400> 118
[1581] Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
[1582] 1 5
[1583] <210> 119
[1584] <211> 7
[1585] <212> PRT
[1586] <213> 人工序列
[1587] <220>
[1588] <223> Ab-31的轻链CDR2
[1589] <400> 119
[1590] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
[1591] 1 5
[1592] <210> 120
[1593] <211> 7
[1594] <212> PRT
[1595] <213> 人工序列
[1596] <220>
[1597] <223> Ab-32的轻链CDR2
[1598] <400> 120

[1599] Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
[1600] 1 5
[1601] <210> 121
[1602] <211> 7
[1603] <212> PRT
[1604] <213> 人工序列
[1605] <220>
[1606] <223> Ab-38的轻链CDR2
[1607] <400> 121
[1608] Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser
[1609] 1 5
[1610] <210> 122
[1611] <211> 7
[1612] <212> PRT
[1613] <213> 人工序列
[1614] <220>
[1615] <223> Ab-46的轻链CDR2
[1616] <400> 122
[1617] Glu Asp Tyr Arg Arg Pro Ser
[1618] 1 5
[1619] <210> 123
[1620] <211> 7
[1621] <212> PRT
[1622] <213> 人工序列
[1623] <220>
[1624] <223> Ab-50的轻链CDR2
[1625] <400> 123
[1626] Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[1627] 1 5
[1628] <210> 124
[1629] <211> 7
[1630] <212> PRT
[1631] <213> 人工序列
[1632] <220>
[1633] <223> Ab-56的轻链CDR2
[1634] <400> 124
[1635] Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser
[1636] 1 5
[1637] <210> 125

[1638] <211> 11
 [1639] <212> PRT
 [1640] <213> 人工序列
 [1641] <220>
 [1642] <223> Ab-65的轻链CDR2
 [1643] <400> 125
 [1644] Tyr Lys Ser Asp Ser Asn Lys Gln Gln Ala Ser
 [1645] 1 5 10
 [1646] <210> 126
 [1647] <211> 9
 [1648] <212> PRT
 [1649] <213> 人工序列
 [1650] <220>
 [1651] <223> 轻链CDR3共有区
 [1652] <400> 126
 [1653] Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Trp Val
 [1654] 1 5
 [1655] <210> 127
 [1656] <211> 10
 [1657] <212> PRT
 [1658] <213> 人工序列
 [1659] <220>
 [1660] <223> Ab-14的轻链CDR3
 [1661] <400> 127
 [1662] Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Leu Trp Val
 [1663] 1 5 10
 [1664] <210> 128
 [1665] <211> 11
 [1666] <212> PRT
 [1667] <213> 人工序列
 [1668] <220>
 [1669] <223> Ab-16的轻链CDR3
 [1670] <400> 128
 [1671] Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Tyr Val
 [1672] 1 5 10
 [1673] <210> 129
 [1674] <211> 11
 [1675] <212> PRT
 [1676] <213> 人工序列

[1677] <220>
[1678] <223> Ab-22的轻链CDR3
[1679] <400> 129
[1680] Gln Val Trp Asp Asn Asn Ser Asp His Tyr Val
[1681] 1 5 10
[1682] <210> 130
[1683] <211> 9
[1684] <212> PRT
[1685] <213> 人工序列
[1686] <220>
[1687] <223> Ab-30的轻链CDR3
[1688] <400> 130
[1689] Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Thr Leu Pro
[1690] 1 5
[1691] <210> 131
[1692] <211> 9
[1693] <212> PRT
[1694] <213> 人工序列
[1695] <220>
[1696] <223> Ab-31的轻链CDR3
[1697] <400> 131
[1698] Gln Gln His Thr Ile Pro Thr Phe Ser
[1699] 1 5
[1700] <210> 132
[1701] <211> 9
[1702] <212> PRT
[1703] <213> 人工序列
[1704] <220>
[1705] <223> Ab-32的轻链CDR3
[1706] <400> 132
[1707] Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Pro Ile Thr
[1708] 1 5
[1709] <210> 133
[1710] <211> 8
[1711] <212> PRT
[1712] <213> 人工序列
[1713] <220>
[1714] <223> Ab-38的轻链CDR3
[1715] <400> 133

[1716] Gln Thr Trp Asp Asn Ser Val Val
[1717] 1 5
[1718] <210> 134
[1719] <211> 11
[1720] <212> PRT
[1721] <213> 人工序列
[1722] <220>
[1723] <223> Ab-42的轻链CDR3
[1724] <400> 134
[1725] Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Arg His Val Ile
[1726] 1 5 10
[1727] <210> 135
[1728] <211> 9
[1729] <212> PRT
[1730] <213> 人工序列
[1731] <220>
[1732] <223> Ab-46的轻链CDR3
[1733] <400> 135
[1734] Gln Ser Tyr His Ser Ser Gly Trp Glu
[1735] 1 5
[1736] <210> 136
[1737] <211> 11
[1738] <212> PRT
[1739] <213> 人工序列
[1740] <220>
[1741] <223> Ab-50的轻链CDR3
[1742] <400> 136
[1743] Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
[1744] 1 5 10
[1745] <210> 137
[1746] <211> 10
[1747] <212> PRT
[1748] <213> 人工序列
[1749] <220>
[1750] <223> Ab-52的轻链CDR3
[1751] <400> 137
[1752] Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Thr Pro Ser Val
[1753] 1 5 10
[1754] <210> 138

[1755] <211> 9
[1756] <212> PRT
[1757] <213> 人工序列
[1758] <220>
[1759] <223> Ab-55的轻链CDR3
[1760] <400> 138
[1761] Gln Ser Tyr Asp Gly Ile Thr Val Ile
[1762] 1 5
[1763] <210> 139
[1764] <211> 10
[1765] <212> PRT
[1766] <213> 人工序列
[1767] <220>
[1768] <223> Ab-56的轻链CDR3
[1769] <400> 139
[1770] Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Trp Val
[1771] 1 5 10
[1772] <210> 140
[1773] <211> 9
[1774] <212> PRT
[1775] <213> 人工序列
[1776] <220>
[1777] <223> Ab-65的轻链CDR3
[1778] <400> 140
[1779] Met Ile Trp Tyr Ser Ser Ala Val Val
[1780] 1 5

VH:

1	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4	家族	
1		31	36	50 A 66	ABC	95 ABCDEFGHIJK	103	IGHV	
共有区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKASCTES	SYAIS	WRQAPGQGLENMG	WISPIGSSNYAQVQC	RVITIDNSINTAYMELSSRDDTAVYVCAR	GLAXXXXXXXXXXXXXV	WGQGLIVTVSS		
50	G.....	Y.L. EG.T	AHN HASN....	ED	..M.T.T.....	R.TA.....	VHAALYGM-----		1-18*01
55		Y.T .G..	T.HN.L.AF..ILE.		..M.T.T.....	RN.TF.....	F.K VHPVSVAL		1-18*01
14		Y.T .G..	AYN.N....	L..	..M.T.T.S....	R.....	A.PSGTILNGWF----	P	1-18*01
65	E.....	Y.T N.G..	AYN.N....		..M.T.T.S.G..	R.....	DERKPT-----	Y	1-18*01
46	E...E.....	S.....V.G.G T.LN	R.V.LI.LV..HNEE.	IS.A.K.G.....	N.....	EVIGNS-----	Y		1-69*09
31	T.....	VT.D.R GLY.H	I.F.TA....	F..	T.E.S....	E.....	S .RNGINGWF-----	P	1-69*01
32	E.....L...S.....	F.G.. DN..	I.F.KP....	F..	A.E.S...V....	E.....	TMVGFILGM-----		1-69*01
56	E...E.....MN.....	R...RG.GD..	T.F.		R.I.L.IA....	F..	DGYGSDP-----	VL	1-69*09
42		G..			I.F.TA....	F..	RQWFGAGI-----	F .P	1-69*06
52	...QE.GG.VQ..R.LRL..S.....	REGMH	V.K...VS	RVWN...T.DA.K.	F.S.SR..N..L.LQMD..	A.....	..SYQVSGWF-----	P	3-30*03
30	GS.VR..E.LRL..V....	I.D N.DM.	V.K...VS	VS	F.S.SR..TK.SL.LQNN..	AE..L..V.	EFVCAY-----	L	3-20*01
22	GG.VQ..G.LRL..A.....	D.D.MH	K...VS	L.GD....Y..DS.K.	F.SR..K.SL.LQNN..	TE.....	K V.LPCSSTSCVGSVCAE..I		3-43*02
16	E.....GG.VQ..R.LRL..A.....	...L.	K...VS	A.GG....Y..DS.K.	F.SR..K.L.LQNN..	AE.....	K DVFFETFSMNYGM-----		3-23*04
38	GELVQ..G.LRL..A.....	...M.	K...VS	A.GS....Y..DS.K.	F.SR..K.L.LQNN..	AE.....	K DQVFTFGVPRYGM-----		3-23*04

略语表：“.”与共有区匹配的AA，“X”非共有区AA和“-”为空白(即没有AA)

VL:

	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4	家族
1	24 ABC 35	50	ABCD57	AB	89	AB	98	
共有区	NFMLTQ-PHSVSEPGKTVTISC TRSGS-IGSNVQ WYQPGSAPTVIY EDNQ-----PS GVPDRFGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYIC QSYDSST--WV FGGGKLVTL							
50	QSV,...P...VA...Q...AR...T...GCNN--...KG...H...K...Q...V...V...D...SD...I...E...N--G...T...RVEAG...VN...SDH...IGLV3-21*02							
55	G...A.....S...T.....K.....GL...VI.....IGLV6-57*01							
14	Q.....GN...A.....T.....NL.....IGLV6-57*01							
65	LPV...Q...A...L...A...ASASLT...LR...GLNV...YRIY...K...R...QVILN YKSDSNKQA...S...K...A...A...GL...L...QS...MINY...A...V...IGLV5-45*01							
46	Q.....GN...T.....VAL...YR...H...G...E...IGLV6-57*01							
31	EIV...QS...ATL...LS...ERA...L...RA...Q--...SIG...SLA...K...Q...R...LM...CASS...AT...I...G--ACIDET...SEP...F...T...QHTIP...FS...P...VE...K...IGKV3-20*01							
32	DIVM...QT...SFL...A...I...DR...T...RA...Q--...GIGS...LA...E...K...L...AASLT...Q...S...G--GTDFT...NQP...F...T...QANNYP...IT...Q...R...EIK...IGKV1-9*01							
56	Q.....G.....LP...G...A...H...T...K.....S.....NR.....IGLV6-57*01							
42	Q.....G.....D.....T.....MNRHVI.....IGLV6-57*01							
52	Q.....G...A.....T.....T...P...S...IGLV6-57*01							
30	QSA...Q...A...G...QST...GT...SDVG...Y...S...H...K...K...M...DVSN...SN...K--G...F...QA...S...T...LP...IGLV2-14*01							
22	LPV...Q...AP...VA...AR...T...GS...D--...RKS...H...K...Q...A...S...RD...ISE...N--G...T...RVEAG...VN...NSDHY...A...E...I...IGLV3-12*01							
16	SSE...Q...DPA...VAL...Q...R...T...QGD...--LR...Y...AS...K...Q...V...GK...M...I...S--G...T...T...ACA...N...R...GNHY...T...V...IGLV3-19*01							
38	QSA...Q...P...V...Q...AN...P...SGDK--L...NK...AY...K...QS...V...L...Q...IK...RI...E...N--ADT...T...TCAM...TW...N--V...IGLV3-1*01							

略语表：“.”与共有区匹配的AA，“X”非共有区AA和“-”为空白(即没有AA)

图 1 续

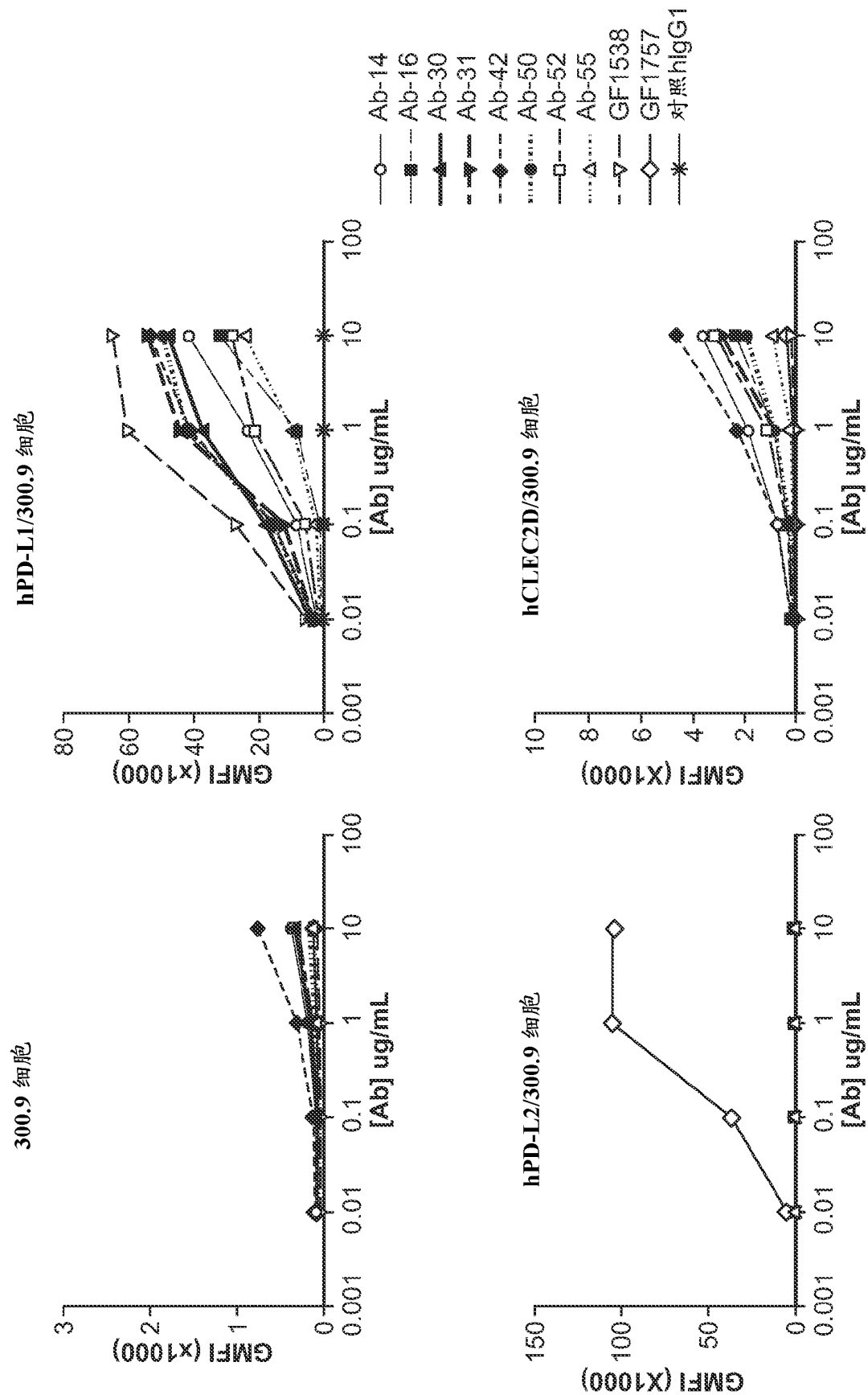


图 2

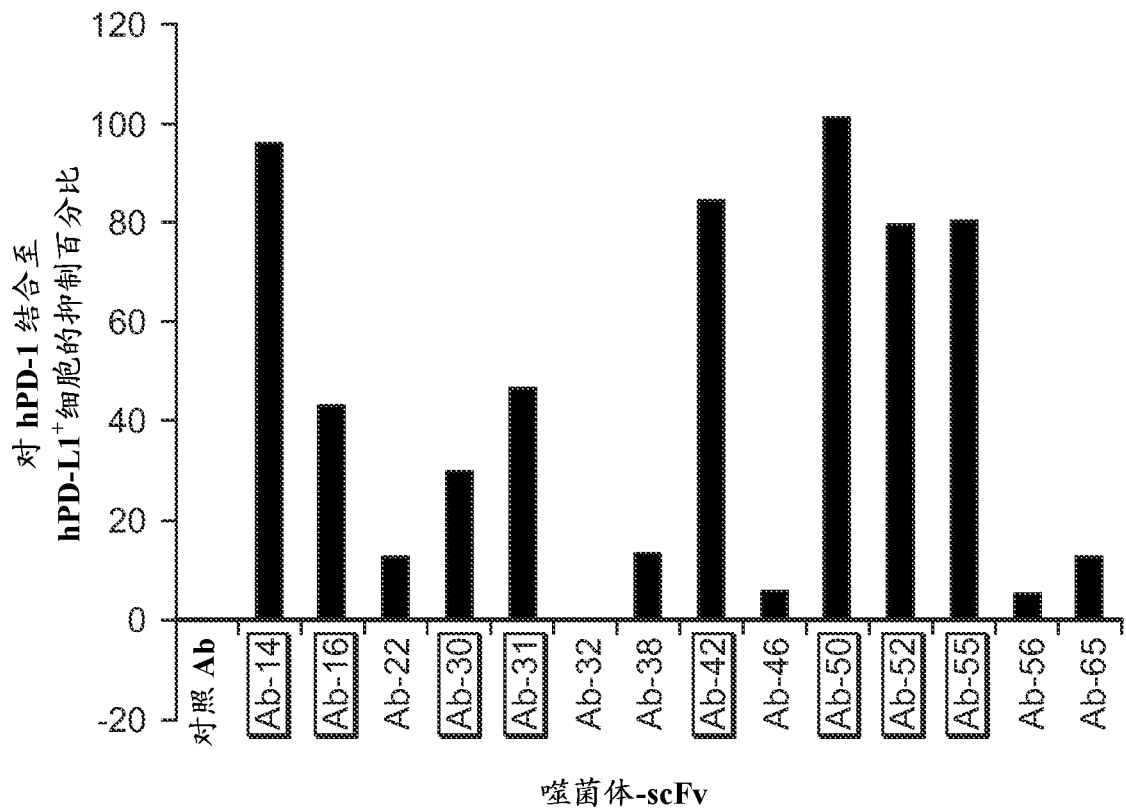


图 3

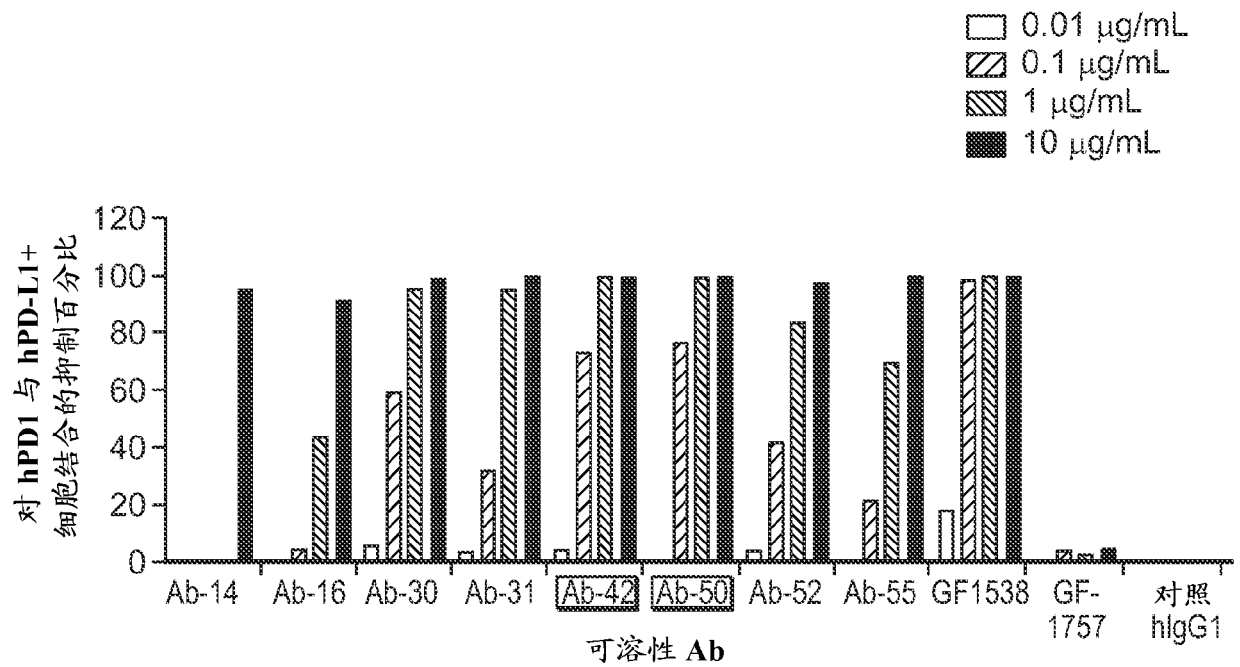


图 4

双特异性抗体的设计和形成

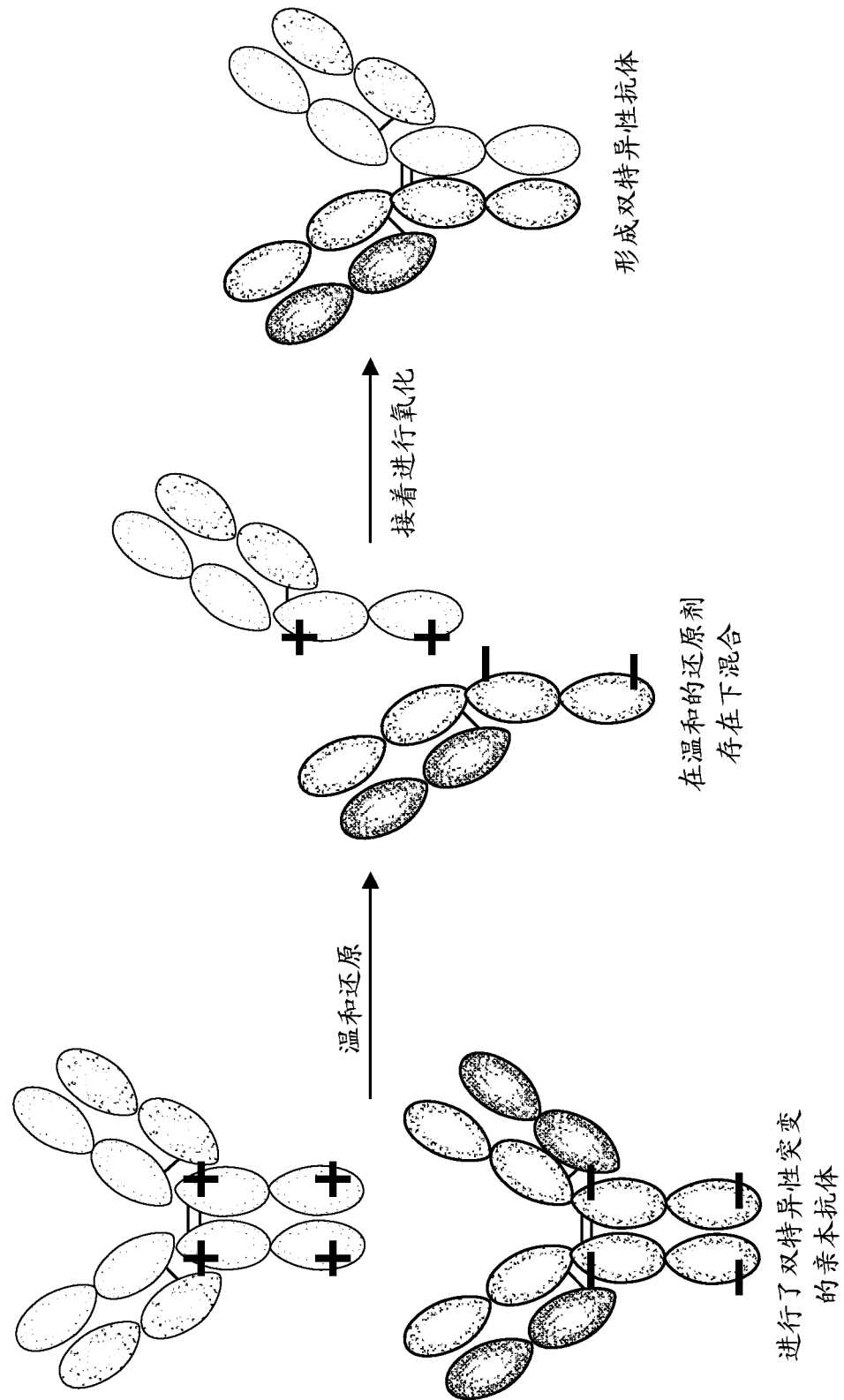


图 5

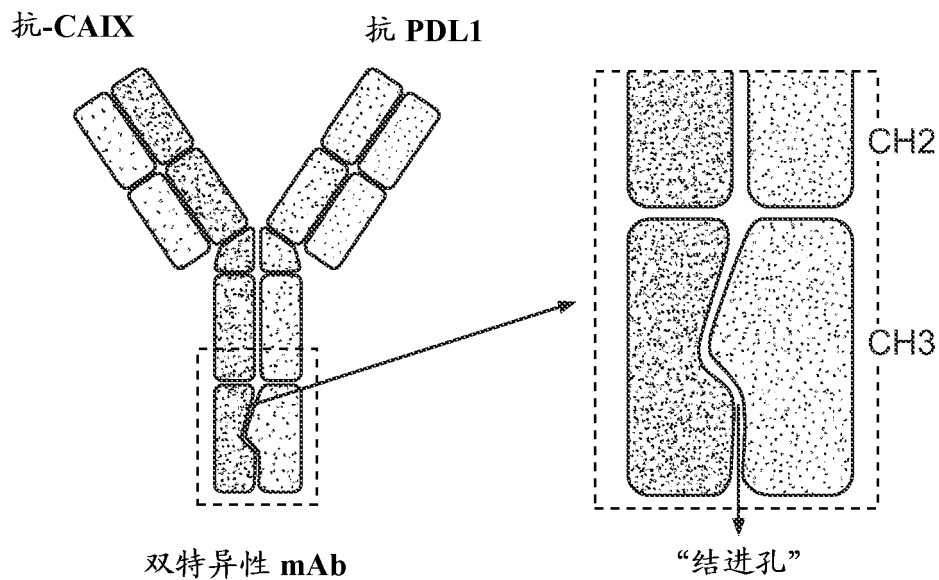


图 6A

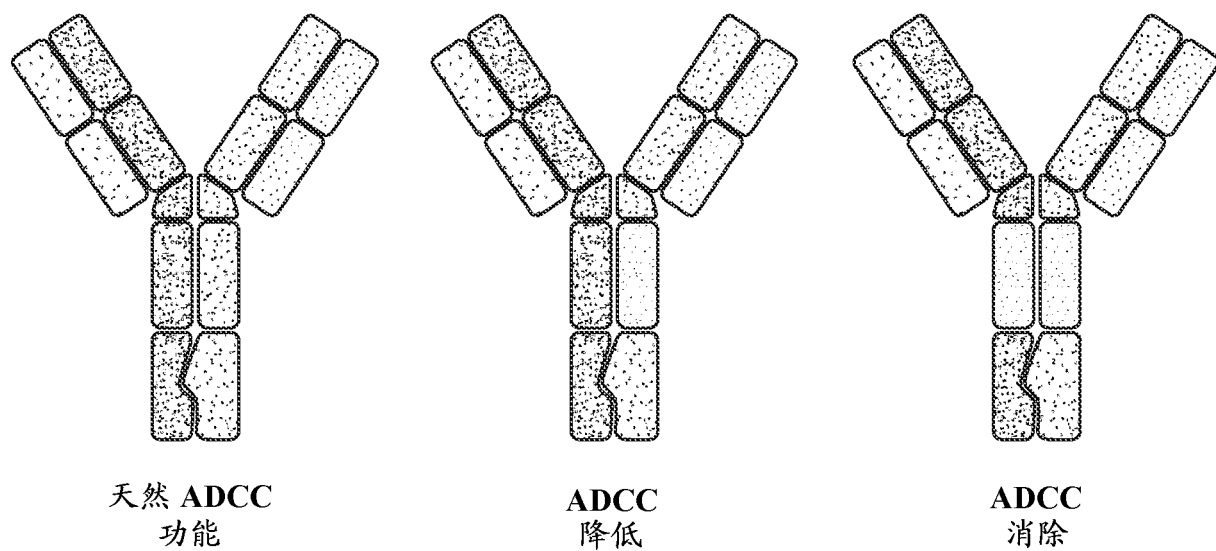


图 6B

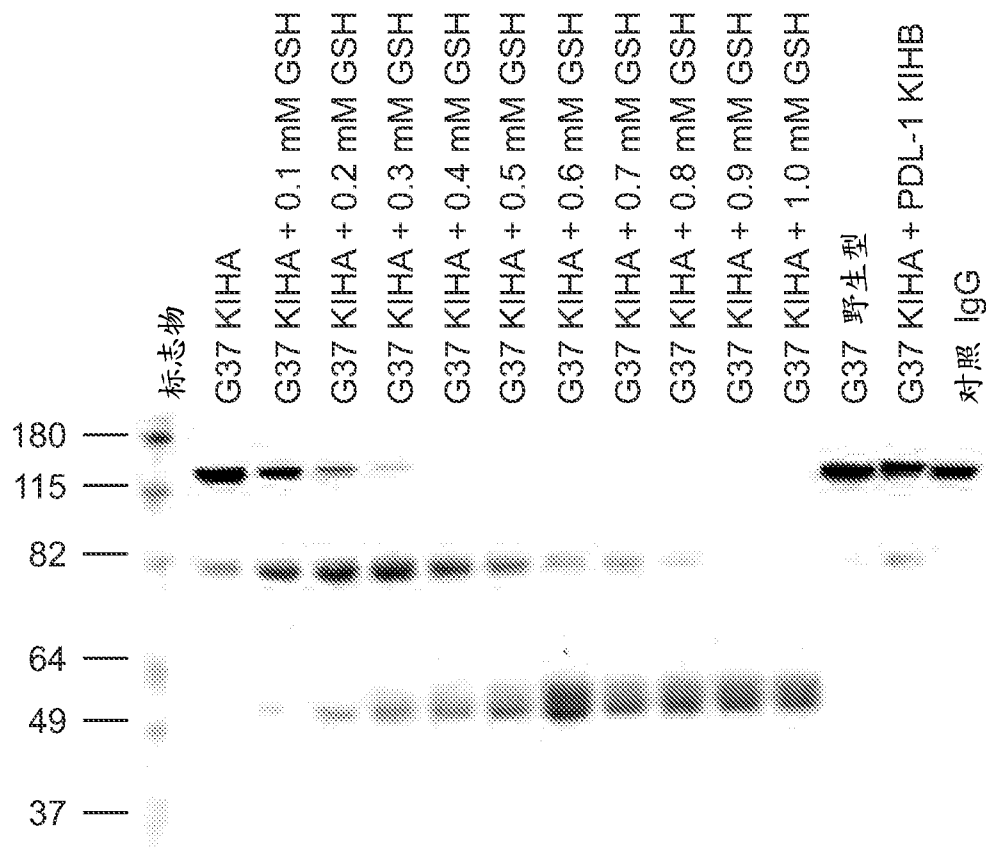


图 7A

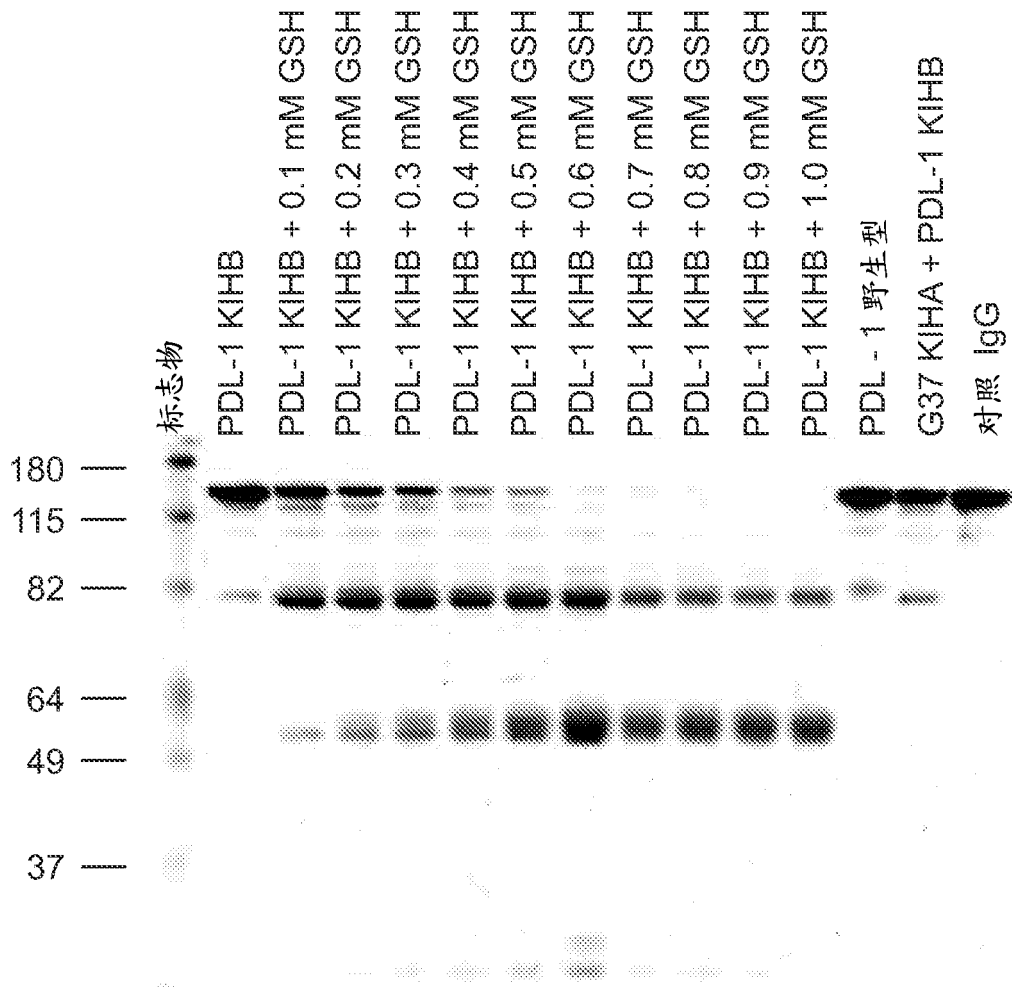


图 7B

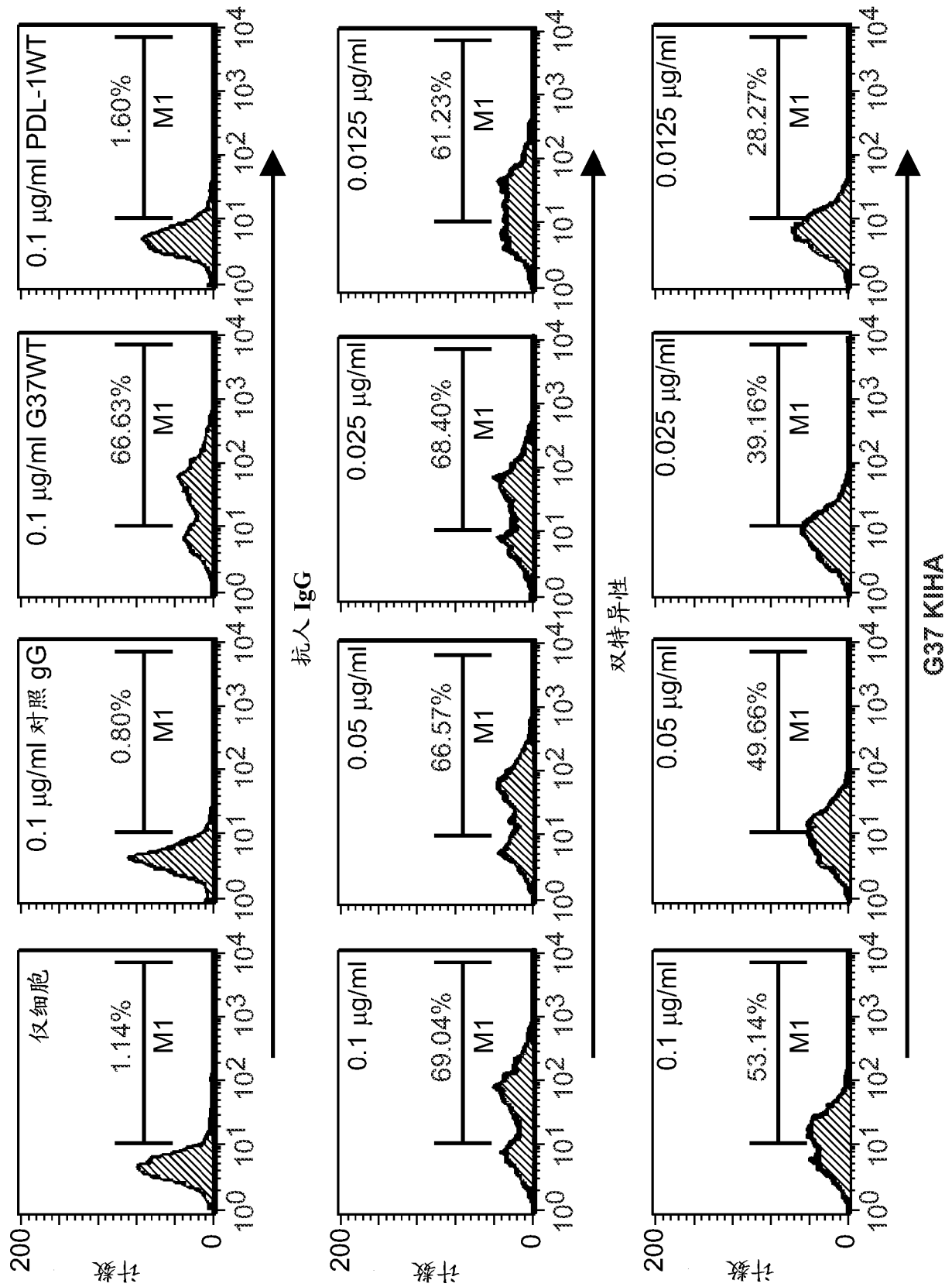


图 7C-1

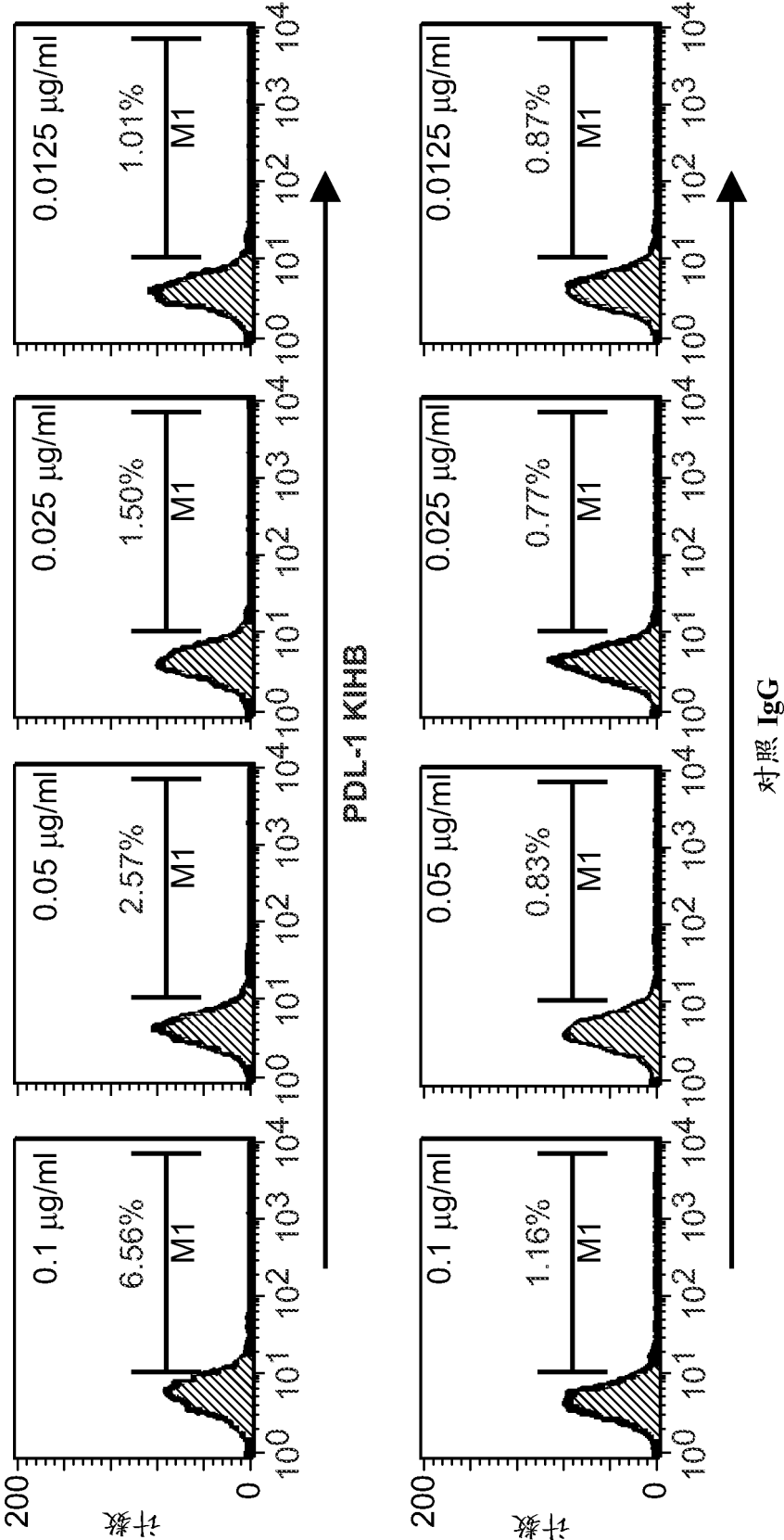


图 7C-2

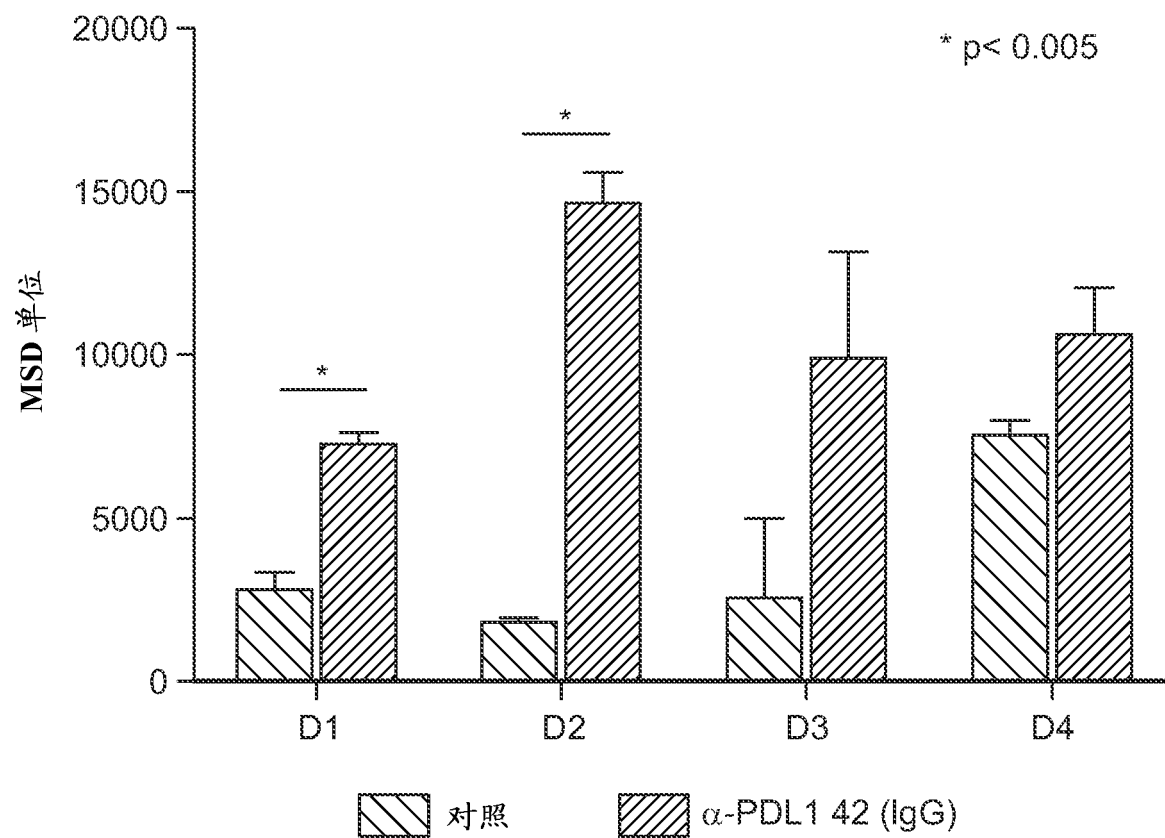


图 8