(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109311970 A
(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780035444.0

(22)申请日 2017.06.07

(30)优先权数据
1610044.8 2016.06.08 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/063796 2017.06.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/211873 EN 2017.12.14

(71)申请人 UCB生物制药私人有限公司
地址 比利时布鲁塞尔

(72)发明人 H·邦 J·E·康普森
K·L·狄克逊 C·B·多伊尔
M·埃利斯 M·M·戈维亚桑乔
R·A·贾普 L·凯沃尔基安
D·J·莱特伍德 D·马歇尔
A·C·佩恩
J·M·D·拉斯特里克
M-S·舒尔策 A·特纳
K·L·泰森

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 郑天松

(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书42页
序列表68页 附图46页

(54)发明名称

结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体及其用于治疗肺纤维化的用途

(57)摘要

本公开涉及TGF-β抗体及其结合片段，编码所述抗体或片段的DNA，包含所述DNA的宿主细胞，及在宿主细胞中表达所述抗体或结合片段的方法。本公开也延伸到药学组合物包含抗体或其结合片段，及抗体，结合片段及包含所述抗体或片段的组合物在治疗各种疾病包括纤维化中的用途。

CN 109311970 A

1.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其包含重链,其中所述重链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:

用于CDR-H1的CDR,其具有SEQ ID NO:4所示的序列,

用于CDR-H2的CDR,其具有SEQ ID NO:5所示的序列,及

用于CDR-H3的CDR,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列。

2.权利要求1的抗体,其中所述重链的可变结构域包含:

用于CDR-H1的SEQ ID NO:4所示的序列,

用于CDR-H2的SEQ ID NO:5所示的序列,及

用于CDR-H3的SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列。

3.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:

用于CDR-L1的CDR,其具有SEQ ID NO:1所示的序列,

用于CDR-L2的CDR,其具有SEQ ID NO:2所示的序列,及

用于CDR-L3的CDR,其具有SEQ ID NO:3所示的序列。

4.权利要求1或2的抗体,其还包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:

用于CDR-L1的CDR,其具有SEQ ID NO:1所示的序列,

用于CDR-L2的CDR,其具有SEQ ID NO:2所示的序列,及

用于CDR-L3的CDR,其具有SEQ ID NO:3所示的序列。

5.权利要求3或4的抗体,其中所述轻链的可变结构域包含:

用于CDR-L1的SEQ ID NO:1所示的序列,

用于CDR-L2的SEQ ID NO:2所示的序列,及

用于CDR-L3的SEQ ID NO:3所示的序列。

6.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其中重链的可变结构域包含3个CDR,且

CDR-H1的序列与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少80%同一性或相似性,

CDR-H2的序列与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少80%同一性或相似性,及

CDR-H3的序列与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列具有至少80%同一性或相似性。

7.权利要求6的抗体,还包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含3个CDR,且

CDR-L1的序列与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%同一性或相似性,

CDR-L2的序列与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少80%同一性或相似性,及

CDR-L3的序列与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少80%同一性或相似性。

8.权利要求1～7之任一项的抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:94所示的序列。

9.权利要求1～8之任一项的抗体,其中所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:38所示的序列。

10.权利要求1～9之任一项的抗体,其中所述抗体分子选自:

完全抗体分子,其具有全长重链和轻链,或

所述完全抗体分子的片段,其例如选自Fab、修饰的Fab'、Fab'、F(ab')$_2$、Fv、VH、VL和scFv片段。

11.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其具有:

重链,其包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:94所示的序列,及

轻链,其包含SEQ ID NO:38所示的序列。

12.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,

其中轻链的可变结构域包含与权利要求11的抗体的轻链可变结构域具有至少80%同一性或相似性的序列,且

其中重链的可变结构域包含与权利要求11的抗体的重链可变结构域具有至少80%同一性或相似性的序列。

13.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其具有:

重链,其包含SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:101所示的序列,及

轻链,其包含SEQ ID NO:45所示的序列。

14.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其中重链和轻链与权利要求13的抗体的对应重链和轻链具有至少80%同一性或相似性。

15.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其中所述抗体接触

与SEQ ID NO:114的氨基酸25～34具有90%同一性的序列,及

任选地SEQ ID NO:114的氨基酸90～95中的至少一个。

16.权利要求15的抗体,其中所述抗体进一步接触SEQ ID NO:114的氨基酸60、97和101中的至少一个。

17.权利要求1～16之任一项的抗体,其具有与其附接的效应子或报告子分子。

18.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其交叉-阻断包含下列序列所示的CDR的抗体的结合:

用于CDR-L1的SEQ ID NO:1,

用于CDR-L2的SEQ ID NO:2,

用于CDR-L3的SEQ ID NO:3,

用于CDR-H1的SEQ ID NO:4,

用于CDR-H2的SEQ ID NO:5,及

用于CDR-H3的SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。

19.权利要求18的抗体,其中所述抗体通过与其所阻断的抗体结合相同的表位来交叉-阻断所述结合。

20.权利要求1～19之任一项的抗体,其具有:

200pM或更佳的对人TGF-β1的结合亲和力,

300pM或更佳的对人TGF-β2的结合亲和力,及

2500pM或更佳的对人TGF-β3的结合亲和力。

21.权利要求20的抗体,其具有:

100pM或更佳的对人TGF-β1的结合亲和力，

200pM或更佳的对人TGF-β2的结合亲和力，及

2000pM或更佳的对人TGF-β3的结合亲和力。

22.权利要求1～21之任一项的抗体，其中在重组TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3HEK-SEAP-SBE报告基因检定中，所述抗体

以0.5nM或更佳的IC50抑制人TGF-β1活性，

以0.05nM或更佳的IC50抑制人TGF-β2活性，及

以2nM或更佳的IC50抑制人TGF-β3活性。

23.权利要求1～22之任一项的抗体，其中在内源性TGF-βHEK-SEAP-SBE报告基因检定中，所述抗体以10nM或更佳的IC50抑制人TGF-β。

24.前述权利要求之任一项的抗体，其中所述抗体或其结合片段是单克隆人源化的抗体。

25.分离的DNA序列，其编码权利要求1～24之任一项的抗体的重链和/或轻链。

26.克隆或表达载体，其包含一种或多种权利要求26的DNA序列。

27.权利要求26的载体，其中所述载体包含：

SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:46所示的轻链DNA序列，和/或

SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103所示的重链DNA序列。

28.宿主细胞，其包含一种或多种权利要求27的克隆或表达载体。

29.产生权利要求1～24之任一项的抗体的方法，其包括：

培养权利要求22的宿主细胞，及

分离抗体。

30.药学组合物，其包含：

权利要求1～24之任一项的抗体，以及组合

一种或多种药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

31.权利要求30的药学组合物，其还包含其他活性成分。

32.权利要求30或31的药学组合物，其中所述药学组合物适合于吸入施用，例如通过雾化、气雾剂和/或干粉。

33.权利要求1～24之任一项的抗体或权利要求30～32的组合物，其用于治疗或预防由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的病理学病症。

34.权利要求1～24之任一项的抗体用于生产治疗或预防由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的病理学病症的药物的用途。

35.治疗患由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的病理学病症或处于所述病理学病症的风险的人受试者的方法，所述方法包括给受试者施用有效量的权利要求1～24之任一项的抗体。

36.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段，其用于由吸入施用，例如通过雾化、气雾剂和/或干粉治疗或预防由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的肺部病症。

37.结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段用于生产由吸入

施用，例如通过雾化、气雾剂和/或干粉治疗或预防由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的肺部病症的药物的用途。

38.治疗患由TGF-β1、2或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的肺部病症或处于所述肺部病症的风险的人受试者的方法，所述方法包括由吸入施用，例如通过雾化、气雾剂和/或干粉给受试者施用有效量的结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段。

39.权利要求36的抗体、权利要求37的用途或权利要求38的方法，其中所述抗体如在权利要求1～24之任一项中定义。

40.权利要求36的抗体、权利要求37的用途或权利要求38的方法，其中所述肺部病症选自：

肺部纤维化诸如特发性肺部纤维化、囊性纤维化，或随全身性硬化继发的肺部纤维化，及

肺部高血压诸如肺部动脉高血压。

结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体及其用于治疗肺纤维化的用途

【背景技术】

[0001] 人体中存在3种TGF-β同种型，TGF-β1，TGF-β2和TGF-β3。同种型是同源的并且具有约70％的序列同一性。它们都被合成并分泌为潜在的复合物，其中TGF-β与另外两种多肽复合，潜在的TGF-β结合蛋白(LTBP)和潜伏相关肽(LAP)(来自N末端区域的蛋白质)。TGF-β基因产物)。血清蛋白酶如纤溶酶催化从复合物中释放活性成熟TGF-β。

[0002] 在它们的活性形式中，TGF-β同种型以～25KDa同型二聚体蛋白存在。所有3种同种型均通过相同的跨膜受体TβRI和TβRII发出信号。TGF-β首先与TβRII结合，然后TβRII与TβRI形成异四聚体复合物，导致TβRI的磷酸化和后续信号传导途径的激活(参见Derynck&Miyazono(eds)，2008，TGF-β家族，Cold Spring Harbor Press)。尽管通过相同的受体复合物发出信号，但已经注意到3种同种型的不同的非重叠功能，其通过含有各自具有不同表型的各种同种型的遗传缺失的小鼠来举例说明(Shull等，1992，Nature 359:693-699；Sanford等，1997，Development 124:2659-2670；Proetzel等，1995，Nature Genet.，11:409-414)。

[0003] TGF-β是参与多种生物过程的多向分子。TGF-β抑制许多细胞类型的增殖，包括上皮细胞，内皮细胞，造血细胞和免疫细胞。免疫细胞的效应功能也对TGF-β和TGF-β有反应，抑制Th1和Th2细胞分化，同时刺激Treg细胞，因此TGF-β具有主要的免疫抑制功能(Li et al.，2006，Ann Rev Immunol.，24:99-146；Rubtsov&Rudensky，2007，Nat Rev Immunol.，7:443-453)。TGF-β表达受到高度调节并参与维持组织稳态。然而，TGF-β的慢性过度表达与疾病状态(例如癌症和纤维化)中的疾病进展相关。

[0004] 由于人TGF-β在多种人类疾病中的作用，已经设计了治疗策略来抑制或抵消TGF-β活性。特别是，已经寻找结合并中和TGF-β的抗体作为抑制TGF-β活性的手段。TGF-β的抗体是本领域已知的。在系统性硬化症患者的I/II期临床试验中评估了全身给药的抗TGF-β1抗体(CAT-192)，剂量高达10mg/kg时没有疗效证据(Denton等，2007，Arthritis Rheum)，56:323-333)。在针对转移性癌症的患者的1期试验中评估针对TGF-β1活性优化的人源化抗体(TβM1)，但未注意到抗肿瘤作用(Cohn等人，2014，Int J Oncol.，45:2221-2231)。评估人TGF-β2抗体(CAT-152)预防小梁切除术后的瘢痕形成，但没有注意到与安慰剂的差异(CAT-1520102小梁切除术研究组，2007，眼科学，114:1822-1830)。已经研究了对TGF-β1，2和3特异性全身施用的全长IgG(Fresolimumab，GC1008)用于治疗某些癌症和纤维化疾病。然而，已经报道了包括似乎与抗体的全身递送相关的皮肤损伤的副作用(Lacouture等，2015，Cancer Immunol Immunother.，64:437-446)。

[0005] 纤维化是对伤口愈合的异常反应，其中在器官或组织中形成过量的纤维结缔组织。在正常伤口愈合期间的重塑阶段，新胶原蛋白的合成超过其降解的速率，导致瘢痕形成。正常伤口愈合的最终过程是瘢痕消退，其通过减少的胶原合成和增加的胶原降解的组合发生，该过程由基质金属蛋白酶(MMP)和由粒细胞，巨噬细胞，表皮细胞产生的金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)控制。肌成纤维细胞。因此，伤口愈合涉及代谢平衡从沉积刺激随后

解决的转变。这种平衡的任何破坏都可能导致基质组分的过度沉积，导致组织硬化和瘢痕形成，破坏正常组织结构并损害组织功能；这种破坏被称为纤维化。

[0006] 异常的上皮-间充质相互作用，改变的成纤维细胞表型，夸大的成纤维细胞增殖，以及胶原和细胞外基质的过度沉积都是导致纤维化疾病的关键过程。该过程中的关键细胞类型是肌成纤维细胞。肌成纤维细胞的活化导致它们增加I，III和IV型胶原，纤连蛋白，层粘连蛋白和蛋白多糖的分泌。被认为在纤维化中起重要作用的其他细胞类型包括上皮细胞和巨噬细胞。TGF-β被认为是纤维化的主要调节剂，并且通过对几种细胞类型(包括巨噬细胞和成纤维细胞)的作用而促成纤维化过程(Leask和Abraham，2004，FASEB J.，18:816-827)。关键的促纤维化活动包括刺激成纤维细胞迁移和成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化，刺激过度的ECM沉积。TGF-β还参与巨噬细胞迁移并刺激从巨噬细胞如PDGF产生间充质生长因子，以及通过增加蛋白酶抑制剂如TIMP3的表达来抑制ECM降解。

[0007] 纤维化疾病是发病率和死亡率的主要原因，并且可以影响许多组织和器官系统。这组疾病包括间质性肺病。特发性肺纤维化(IPF)是间质性肺病的最常见形式，并且是特发性间质性肺炎(IIP)的七个不同组之一。间质是肺泡上皮的基底膜和毛细血管内皮之间的微观空间，并且形成血气屏障的一部分。IIP的特征在于炎性细胞扩张间质区室，特别是IPF引起的相关纤维化。

[0008] IPF患者出现进行性劳累性呼吸困难和咳嗽伴进行性肺实质纤维化，导致肺限制和低氧血症。IPF的诊断是使用临床，放射学和病理学标准的组合建立的，并且与称为常规间质性肺炎(UIP)的特征性病理模式相关。

[0009] IPF可以在任何年龄诊断，但在50岁以上的人群中最为普遍，男性的患病率高于女性。IPF的死亡率高于许多肿瘤性疾病，3年生存率为50％，5年生存率仅为20％。IPF的原因尚不清楚，但据推测，从尚未鉴定的外源性和内源性刺激中有多次上皮细胞激活，如果不进行治疗，会导致进行性肺损伤并最终导致纤维化。破坏肺泡上皮之后是间充质细胞的迁移，增殖和活化，导致成纤维细胞/肌成纤维细胞灶的形成，ECM过度积聚。

[0010] 在IPF患者的纤维化肺中TGF-β表达增加(Broekelmann等，1991，PNAS，88:6642-6646；Khalil等，1991，Am J Respir Cell Mol Biol，5:155-162)和结合TGF-β在驱动纤维化机制中的良好作用，抑制TGF-β应被视为治疗IPF患者的有效机制。

[0011] IPF患者没有有效的治疗方法。已证明抗炎剂，包括皮质类固醇，环磷酰胺和azothiaprine对患者几乎没有益处，并且具有相关的副作用。最近，两种小分子药物吡非尼酮和nintedanib已被批准用于治疗IPF。这两种药物已经被证明可以减缓疾病的进展，但是这两种药物都没有治愈这种疾病，许多患者继续衰退。此外，治疗相关的不良事件如胃肠道事件，皮疹和光敏性也很明显(Cottin和Maher，2015，Eur Respir Rev，24:58-64；Mazzei等，2015，Ther Adv Respir Dis。)迄今为止，没有针对纤维化适应症的靶向治疗和抗体治疗。

[0012] 此外，TGF-β还与肺动脉高压有关，例如肺动脉高压(PAH)。免疫组织化学显示TGF-β在肺动脉高压患者中的表达增加(Botney等，1994，Am J Pathol，144:286-295)，并且在肺动脉高压患者的血液和肺匀浆中也有显着表现(Selimovic等，2009，Eur Respir J，34:662-668；Gore等，PLOS One(2014)9(6):e100310)。还显示TβRI激酶抑制剂抑制野百合碱诱导的肺动脉高压模型(Zaiman等，2008，Am J Respir Crit Care Med，177:896-905)。肺动

脉高压是一种广为人知的IPF并发症，这些数据支持这样的假设：IPF患者的症状由间质纤维化和肺动脉高压驱动，可能是患者的亚群，其抗TGF-β疗法可能是更有效。

[0013] 因此，本领域需要能够结合和抑制适合于治疗应用的所有三种TGF-β同种型的合适和/或改进的抗体。如果通过吸入递送，这样的抗体对于治疗肺部适应症也可以更有效和/或具有更少的副作用。

[0014] 【发明概述】

[0015] 本发明属于新TGF-β特异性抗体及其结合片段，尤其是，拮抗性抗体和片段。

[0016] 一方面，本公开提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体包含重链，其中所述重链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个：用于CDR-H1的CDR，其具有SEQ ID NO:4所示的序列，用于CDR-H2的CDR，其具有SEQ ID NO:5所示的序列。和用于CDR-H3的CDR，其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列。

[0017] 一方面，本公开提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体，其包含轻链，其中所述轻链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个：用于CDR-L1的CDR，其具有SEQ ID NO:1所示的序列，用于CDR-L2的CDR，其具有SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的CDR，其具有SEQ ID NO:3所示的序列。

[0018] 本公开也延伸到多核苷酸，诸如DNA，其编码本文所述的抗体或片段。

[0019] 而且，本公开提供宿主细胞，其包含所述多核苷酸。

[0020] 本公开提供表达抗体或其结合片段的方法。

[0021] 本公开也涉及药学组合物，其包含所述抗体或其结合片段。

[0022] 在一实施方式中提供治疗方，其包括施用治疗有效量的本文所述的抗体，片段或组合物。

[0023] 本公开也延伸到根据本公开的抗体，结合片段或组合物用于治疗，特别是治疗癌和/或纤维化疾病。

[0024] 【附图简述】

[0025] 图1A-I显示本公开的特异性抗体氨基酸和多核苷酸序列。

[0026] 图1A提供来自抗体4856的CDR序列(SEQ ID NO:1-9)。

[0027] 图1B提供用于抗体4856的兔序列(SEQ ID NO:10-25)。

[0028] 图1C提供用于抗体4856的鼠源化的序列(SEQ ID NO:26-33)以及鼠受体序列(SEQ ID NO:34-37)。

[0029] 图1D提供用于抗体4856gL3的轻链(SEQ ID NO:45-51)和可变区序列(SEQ ID NO:38-44)。

[0030] 图1E提供用于抗体4856gH13的Fab重链(SEQ ID NO:59-65)和可变区序列(SEQ ID NO:52-58。

[0031] 图1F提供用于抗体4856gH20的Fab重链(SEQ ID NO:73-79)和可变区序列(SEQ ID NO:66-72)。

[0032] 图1G提供用于抗体4856gH23的Fab重链(SEQ ID NO:87-93)和可变区序列(SEQ ID NO:80-86)。

[0033] 图1H提供用于抗体4856gH29的Fab重链(SEQ ID NO:101-107)和可变区序列(SEQ ID NO:94-100)。

[0034] 图1I提供人受体框架序列(SEQ ID NO:108-111)。

[0035] 图2显示各种轻链的氨基酸序列(图2A)和抗体4856和受体序列的重链(图2B)的比对。

[0036] 图3A显示人潜伏期-关联的肽和TGF-β1的氨基酸序列。

[0037] 图3B显示成熟人TGF-β1的氨基酸序列。

[0038] 图3C显示人潜伏期-关联的肽和TGF-β2的氨基酸序列。

[0039] 图3D显示成熟人TGF-β2的氨基酸序列。

[0040] 图3E显示人潜伏期-关联的肽和TGF-β3的氨基酸序列。

[0041] 图3F显示成熟人TGF-β3的氨基酸序列。

[0042] 图4A,B和C显示(A)TGF-β1,(B)TGF-β2和(C)TGF-β3 HEK-蓝-TGF-β报告基因检定中兔抗体4856 Fab的效应。

[0043] 图5显示内源性BxPC3-HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定中4856兔Fab的效应。

[0044] 图6显示响应10nM阿霉素且在增加的浓度的4856 Fab移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29或对照Fab的存在下由HRMC的ECM沉积的图像。

[0045] 图7A,B和C显示4856 Fab移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29对自用阿霉素处理的HRMC的(A)纤连蛋白,(B)胶原I和III和(C)胶原IV的沉积的效应。

[0046] 图8显示增加的浓度的4856 Fab移植体gL3gH13和对照Fab的存在下由SAEpCs和IPF成纤维细胞共培养的ECM沉积的图像。

[0047] 图9A,B和C显示4856 Fab移植体gL3gH13和对照Fab对自SAEpCs和IPF成纤维细胞共培养的(A)纤连蛋白,(B)胶原I和III和(C)胶原IV的沉积的效应。

[0048] 图10A,B和C显示4856Fab移植体gL3gH13对自人肾近端管状上皮细胞的单-培养的(A)TGF-β1,(B)TGF-β2和(C)TGF-β3诱导的纤连蛋白沉积的抑制的效应。

[0049] 图10D显示4856 Fab移植体gL3gH13对自人肾近端管状上皮细胞和人肾成纤维细胞的共培养的纤连蛋白沉积的抑制的效应。

[0050] 图11A和B显示4856 Fab移植体gL3gH13对自人肾近端管状上皮细胞的单-培养的TGF-β1诱导的(A)胶原I和III,(B)胶原V沉积的抑制的效应。

[0051] 图12显示指定的4856 Fab的鼻内施用对在用博来霉素攻击后第7天小鼠中PAI-1的表达的效应的比较。

[0052] 图13显示鼻内施用的4856 gL3gH13 Fab对在用博来霉素攻击后第7天小鼠中PAI-1的表达的剂量比较。

[0053] 图14A-B显示从第1-28天鼻内施用的4856 gL3gH13 Fab对(A)博来霉素-诱导的胶原沉积(PSR染色)和(B)肺中羟脯氨酸含量的效应。

[0054] 图15A-B显示从第13-28天鼻内施用的4856 gL3gH13 Fab对(A)博来霉素-诱导的胶原沉积(PSR染色)和(B)肺中羟脯氨酸含量的效应。

[0055] 图16A-B显示从(A)第1-28天或(B)第13-28天鼻内施用的4856 gL3gH13 Fab对肺中博来霉素-诱导的成肌纤维细胞分化的效应。

[0056] 图17A-B显示从(A)第1-28天或(B)第13-28天鼻内施用的4856 gL3gH13 Fab对1型胶原表达细胞中博来霉素-诱导的pSmad2/3表达的效应。

[0057] 图18A显示具有涉及与4856 Fab gL3gH13相互作用的残基(加下划线的)和对于与

TβRI和TβRII相互作用关键的残基(粗体)的成熟人TGF-β1(SEQ ID NO:114)的序列(使用在4Å分辨率的结晶学数据)。

[0058] 图18B显示具有涉及与4856 Fab gL3gH13相互作用的残基(加下划线的)和对于与TβRI和TβRII相互作用关键的残基(粗体)的成熟人TGF-β1(SEQ ID NO:114)的序列(使用在5Å分辨率的结晶学数据)。

[0059] 图18C显示成熟人TGF-β2(SEQ ID NO:116)的序列。

[0060] 【发明详述】

[0061] 本公开的抗体结合TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3。在一实施方式中,本公开的抗体结合成熟TGF-β,成熟TGF-β1(SEQ ID NO:114),成熟TGF-β2(SEQ ID NO:115)和成熟TGF-β3(SEQ ID NO:118)的全部3种同种型。在一实施方式中,本公开的抗体结合成熟TGF-β的各3种同种型的同源二聚体,成熟TGF-β1(SEQ ID NO:114)的同源二聚体,成熟TGF-β2(SEQ ID NO:115)的同源二聚体和成熟TGF-β3(SEQ ID NO:118)的同源二聚体。在一实施方式中,本公开的抗体不结合包含潜伏期-关联的肽(LAP)的潜伏形式的TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3,如显示于SEQ ID NO:113,SEQ ID NO:115和SEQ ID NO:117。

[0062] 在一实施方式中,本公开所述的抗体是拮抗性的。如本文所用,术语‘拮抗性抗体’描述能抑制和/或中和TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的生物学信号传导活性,例如通过阻断结合或实质减少TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3与TβRI和/或TβRII的结合,由此抑制TGF-β受体复合体的形成和活化的抗体。

[0063] 适合于测定抗体抑制和/或中和TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的生物学信号传导活性的能力的检定描述于本公开的实施例,例如描述于实施例1和实施例2的使用重组TGF-β1,2和/或3的HEK-蓝TGF-β报告基因检定,或描述于实施例3的由被BvPC3细胞的TGF-β的产生驱动的BxPC3和HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定。

[0064] 在一实施方式中,本发明的抗体分子在重组TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3 HEK-蓝TGF-β报告基因检定中具有抑制性活性,其中所述抗体以0.5nM或更佳的IC50抑制人TGF-β1活性,以0.05nM或更佳的IC50抑制人TGF-β2活性,和以2nM或更佳的IC50抑制人TGF-β3活性。在一实施方式中,抗体在内源性TGF-β HEK-蓝TGF-β报告基因检定中以10nM或更佳的IC50抑制TGF-β。

[0065] 本发明的抗体分子适宜地具有高结合亲和力。亲和性可使用本领域知道的任何适合的方法测量,包括技术诸如表面等离子体共振,例如BIAcore,如本公开的实施例所述,使用分离的天然的或重组TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3或适合的融合蛋白/多肽。在一实施方式中,本发明的抗体分子对于人TGF-β1,之后是人TGF-β2具有如下量级的最高结合亲和力和对于人TGF-β3最低结合亲和力。在一实施方式中,本发明的抗体分子具有对于人TGF-β3的结合亲和力的10～30倍,诸如15～25倍的对于人TGF-β1的结合亲和力。在一实施方式中,本发明的抗体分子具有对于人TGF-β3的结合亲和力的2～20倍,诸如5～15倍的对于人TGF-β2的结合亲和力。

[0066] 适宜地本发明的抗体分子具有约2000pM或小于2000pM的对于分离的人TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的结合亲和力。在一实施方式中,本发明的抗体分子具有500pM或更低,诸如200pM或更低或100pM或更低的对人TGF-β1的结合亲和力。在一实施方式中,本发明的抗体分子具有500pM或更低,诸如300pM或更低,200pM或更低的对人TGF-β2的结合亲和力。在

一实施方式中，本发明的抗体分子具有3000pM或更低，诸如2500pM或更低，2000pM或更低的对人TGF-β3的结合亲和力。

[0067] 在一实施方式中，本发明的抗体具有100pM或更低的对人TGF-β1的结合亲和力，200pM或更低的对人TGF-β2的结合亲和力和2000pM或更佳的对人TGF-β3的结合亲和力。

[0068] 亲和性数值越低，抗体或片段对TGF-β同种型的亲和性越高。

[0069] 本发明人提供了新抗-TGF-β抗体，包括人源化的抗体。抗体从用成熟TGF-β1和成熟TGF-β2免疫兔产生。

[0070] 抗体可变结构域中的残基根据由Kabat等人(1987)作出的系统常规编号。此系统提供于Kabat et al.,1987,在Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA(下文中称之为“kabat等人(见上)”)。除非另外指示，本说明书使用此编号系统。

[0071] Kabat残基指定不总是与氨基酸残基的线性编号直接对应。实际线性氨基酸序列可比对应于结构组分的缩短，或插入到结构组分的严格的Kabat编号含有更少或另外的氨基酸，是否基本可变结构域结构的框架或互补决定区(CDR)。通过比对具有“标准”Kabat编号的序列的抗体的序列中同源性的残基来可对于给定抗体确定残基的校正Kabat编号。

[0072] 根据Kabat编号系统，重链可变结构域的CDR位于残基31-35(CDR-H1)，残基50-65(CDR-H2)和残基95-102(CDR-H3)。但是，根据Chothia(Chothia,C.and Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.,196,901-917(1987))，环相当于CDR-H1从残基26延伸到残基32。由此除非另外指示，本公开中采用的‘CDR-H1’如由Kabat编号系统和Chothia’s拓扑学环定义的组合所述，旨在指称残基26～35，。

[0073] 根据Kabat编号系统，轻链可变结构域的CDR位于残基24-34(CDR-L1)，残基50-56(CDR-L2)和残基89-97(CDR-L3)。

[0074] 用于本公开的抗体可使用本领域知道的任何适合的方法获得。TGF-β多肽/蛋白包括融合蛋白，可使用(重组或天然地)表达所述多肽的细胞来产生特异性识别TGF-β的抗体。多肽可为如显示于SEQ ID NO:113,115和117的TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的‘成熟’多肽或其生物学活性片段或衍生物。用来免疫宿主的多肽可由本领域熟知的方法，从包含表达系统的遗传加工的宿主细胞制备，或它们可从天然的生物学源回收。在本申请中，术语“多肽”包括肽，多肽和蛋白。除非另外确定，这些互换使用。在一些实例中，TGF-β多肽可为更大蛋白诸如融合蛋白例如融合于亲和性标签，前导序列，或其他序列的部分。

[0075] 可获得针对TGF-β多肽产生的抗体，其中动物免疫是必需的，通过使用熟知的和常规流程，见例如Handbook of Experimental Immunology,D.M.Weir(ed.),Vol 4,Blackwell Scientific Publishers,Oxford,England,1986给动物，优选非-人动物施用多肽。可免疫许多温血动物，诸如兔，小鼠，大鼠，绵羊，牛，骆驼或猪。但是，小鼠，兔，猪和大鼠通常是最适合的。

[0076] 单克隆抗体可由本领域知道的任何方法诸如杂交瘤技术(Kohler&Milstein,1975,Nature,256:495-497)，三源杂交瘤技术，人B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al.,1983,Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人，1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,pp77-96,Alan R Liss,Inc.)制备。

[0077] 抗体也可使用单淋巴细胞抗体方法，通过克隆和表达从为由例如，由Babcook,J.

等人,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7843-7848;WO92/02551;WO04/051268和国际专利申请号WO04/106377描述的方法产生特异性抗体而选择的单淋巴细胞产生的免疫球蛋白可变区cDNA来产生。

[0078] 对抗体的筛选可使用测量结合人TGF-β的检定和/或测量阻断配体结合受体的能力的检定实施。适合的检定的例描述于本公开的实施例。

[0079] 本公开中采用的‘特异性’旨在指称抗体仅识别特异性的抗原,或相比与非特异性的抗原的结合,抗体对于特异性的抗原具有显著更高的结合亲和力,例如至少5,6,7,8,9,10倍的结合亲和力。

[0080] 根据本公开的特异性抗体的氨基酸序列和多核苷酸序列提供于图1和2。

[0081] 一方面,在本发明中,抗体是结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其包含重链,其中所述重链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:用于CDR-H1的CDR,其具有SEQ ID NO:4所示的序列,用于CDR-H2的CDR,其具有SEQ ID NO:5所示的序列和用于CDR-H3的CDR,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列。优选地,重链的可变结构域包含用于CDR-H1的SEQ ID NO:4所示的序列,用于CDR-H2的SEQ ID NO:5所示的序列和用于CDR-H3的SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列。

[0082] 在本发明的第二方面,抗体是结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:用于CDR-L1的CDR,其具有SEQ ID NO:1所示的序列,用于CDR-L2的CDR,其具有SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的CDR,其具有SEQ ID NO:3所示的序列。优选地,轻链的可变结构域包含用于CDR-L1的SEQ ID NO:1所示的序列,用于CDR-L2的SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的SEQ ID NO:3所示的序列。

[0083] 本发明的抗体分子适宜地分别包含互补轻链或互补重链。

[0084] 在一实施方式中,本发明的抗体是结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其包含如上定义的重链,且还包含轻链,其中所述轻链的可变结构域包含下列CDR中的至少一个:用于CDR-L1的CDR,其具有SEQ ID NO:1所示的序列,用于CDR-L2的CDR,其具有SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的CDR,其具有SEQ ID NO:3所示的序列。轻链的可变结构域优选包含用于CDR-L1的SEQ ID NO:1所示的序列,用于CDR-L2的SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的SEQ ID NO:3所示的序列。

[0085] 在一实施方式中,本发明的抗体是结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体包含重链和轻链,其中所述重链的可变结构域包含用于CDR-H1的SEQ ID NO:4所示的序列,用于CDR-H2的SEQ ID NO:5所示的序列和用于CDR-H3的SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9所示的序列;且其中所述轻链的可变结构域包含用于CDR-L1的SEQ ID NO:1所示的序列,用于CDR-L2的SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的SEQ ID NO:3所示的序列。

[0086] 需知,可对由本发明提供的CDR进行一个或多个氨基酸取代,添加和/或缺失,而不显著地改变抗体结合TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3且中和TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3活性的能力。可由本领域技术人员容易测试任何氨基酸取代,添加和/或缺失的效应,例如通过使用本文所述的方法,特别是实施例中例证的那些,以测定TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3结合和抑制TGF-

β1、TGF-β2和TGF-β3和受体相互作用。在一实施方式中，至少一个氨基酸被独立地选自下列的一个或多个CDR中的保守性取代所取代：

[0087] 下列中的任何一个：CDR-H1，CDR-H2，CDR-H3，CDR-L1，CDR-L2，CDR-L3；

[0088] 下列组合中的任何一个：CDR-H1和H2，CDR-H1和H3，CDR-H1和L1，CDR-H1和L2，CDR-H1和L3，CDR-H2和H3，CDR-H2和L1，CDR-H2和L2，CDR-H2和L3，CDR-H3和L1，CDR-H3和L2，CDR-H3和L3，CDR-L1和L2，CDR-L1和L3，CDR-L2和L3；

[0089] CDR-H1，H2和H3，CDR-H1，H2和L1，CDR-H1，H2和L2，CDR-H1，H2和L3，CDR-H2，H3和L1，CDR-H2，H3和L2，CDR-H2，H3和L3，CDR-H3，L1和L2，CDR-H3，L1和L3，CDR-L1，L2，L3；

[0090] 下列组合中的任何一个：CDR-H1，H2，H3和L1，CDR-H1，H2，H3和L2，CDR-H1，H2，H3和L3，CDR-H2，H3，L1和L2，CDR-H2，H3，L2和L3，CDR-H3，L1，L2和L3，CDR-L1，L2，L3和H1，CDR-L1，L2，L3和H2，CDR-L1，L2，L3和H3，CDR-L2，L3，H1和H2，

[0091] CDR-H1，H2，H3，L1和L2，CDR-H1，H2，H3，L1和L3，CDR-H1，H2，H3，L2和L3，CDR-L1，L2，L3，H1和H2，CDR-L1，L2，L3，H1和H3，CDR-L1，L2，L3，H2和H3；和

[0092] 组合CDR-H1，H2，H3，L1，L2和L3。

[0093] 因此，本发明提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体，其包含选自下列的一个或多个CDR：CDRH-1(SEQ ID NO:4)，CDRH-2(SEQ ID NO:5)，CDRH-3(SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9)，CDRL-1(SEQ ID NO:1)，CDRL-2(SEQ ID NO:2)和CDRL-3(SEQ ID NO:3)，其中一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸，例如下文定义的类似氨基酸取代。

[0094] 在一实施方式中，本发明提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体，其包含：CDRH-1(SEQ ID NO:4)，CDRH-2(SEQ ID NO:5)，CDRH-3(SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9)，CDRL-1(SEQ ID NO:1)，CDRL-2(SEQ ID NO:2)和CDRL-3(SEQ ID NO:3)，例如其中一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸，诸如下文定义的类似氨基酸取代。

[0095] 在一实施方式中，本公开的重链的结构域包括具有1，2，3或4个保守性氨基酸取代的序列，例如其中所述取代在框架内。

[0096] 在一实施方式中，重链可变区的框架包含已被插入的，删除的，取代的或其组合的1，2，3，或4个氨基酸。在一实施方式中，取代的氨基酸是来自供体抗体的对应氨基酸。

[0097] 在一实施方式中，本公开的轻链可变区包括具有1，2，3或4个保守性氨基酸取代的序列，例如其中所述取代在框架内。

[0098] 在一实施方式中，轻链可变区的框架包含已被插入的，删除的取代的或其组合的1，2，3或4个氨基酸。在一实施方式中，取代的氨基是来自供体抗体的对应氨基酸。

[0099] 一方面，本发明提供抗-TGF-β抗体或其结合片段，其中所述重链的可变结构域包含3个CDR，且CDR-H1的序列与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少60％，70％，80％，90％，95％，96％，97％，98％，99％或更高同一性或相似性，CDR-H2的序列与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少60％，70％，80％，90％或95％同一性或相似性，且CDR-H3的序列与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列具有至少60％，70％，80％，90％，95％，96％，97％，98％，99％或更高同一性或相似性或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。优选地，抗-TGF-β抗体或其结合片段，还包含轻链，其中所述轻链的可变结构域包含3个CDR，且CDR-L1的序列与SEQ ID

NO:1所示的序列具有至少60％,70％,80％,90％,95％,96％,97％,98％,99％或更高同一性或相似性,CDR-L2的序列与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少60％,70％,80％,90％,95％,96％,97％,98％,99％或更高同一性或相似性,且CDR-L3的序列与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少60％同一性或相似性。

[0100] 在一实施方式中,提供与本公开的可变区序列具有至少60％,70％,80％,90％,95％,96％,97％,98％,99％或更高同一性或相似性的可变区。

[0101] 在一实施方式中,本发明提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其接触与SEQ ID NO:114的氨基酸24～35和任选地SEQ ID NO:114的氨基酸90～95中的至少一个具有至少90％同一性的序列。在进一步实施方式中,抗体接触与SEQ ID NO:114具有至少95％,96％,97％,98％,99％或100％同一性的序列。在一实施方式中,抗体进一步接触SEQ ID NO:114的氨基酸60,97和101中的至少一个。在进一步实施方式中,抗体也接触本公开提供的氨基酸之外的氨基酸。'接触(contacts)'或'接触(contacting)'表示相互作用可使用标准X-射线晶体学技术,以适合的分辨率,诸如5Å或4 Å检测。

[0102] 在另一实施方式中提供就与TβRI和/或TβRII结合竞争与本发明的抗体或片段的结合的抗-TGF-β抗体。

[0103] 在一实施方式中提供交叉-阻断包含下列序列所示的6个CDR的抗体的结合的抗-TGF-β抗体:用于CDR-L1的SEQ ID NO:1,用于CDR-L2的SEQ ID NO:2,用于CDR-L3的SEQ ID NO:3,用于CDR-H1的SEQ ID NO:4,用于CDR-H2的SEQ ID NO:5和用于CDR-H3的SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9,尤其是,其中所述交叉阻断是变构的。

[0104] 在一实施方式中提供交叉-阻断包含下列序列所示的6个CDR的抗体的结合的抗-TGF-β抗体:用于CDR-L1的SEQ ID NO:1,用于CDR-L2的SEQ ID NO:2,用于CDR-L3的SEQ ID NO:3,用于CDR-H1的SEQ ID NO:4,用于CDR-H2的SEQ ID NO:5和用于CDR-H3的SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9,尤其是,其中所述抗体通过与其所阻断的抗体结合相同的表位来交叉-阻断结合。

[0105] 在一实施方式中,抗体或结合片段来自小鼠,大鼠,兔,骆驼科动物或其他哺乳动物物种。例如,抗体或结合片段可来自兔。该抗体的可变区的例提供于SEQ ID NO:10-17。

[0106] 在一实施方式中,抗体或结合片段是嵌合的。一般而言,嵌合抗体或结合片段包含来自2种或多种物种的元件,而保留该物种的特定特征。例如,嵌合抗体或结合片段可具有来自一种物种,诸如来自小鼠,大鼠,兔或其他哺乳动物物种的可变区和来自另一物种,诸如人的恒定区的全部或部分。

[0107] 在一实施方式中,根据本发明的抗体或结合片段是人源化的。

[0108] 如本文所用,术语'人源化的抗体'指称这样的抗体或抗体分子,其中所述重链和/或轻链含有移植到受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区框架的来自供体抗体(例如鼠单克隆抗体)的一个或多个CDR(包括,如果需要,一个或多个修饰的CDR)(见,例如US 5,585,089;WO91/09967)。作为一个综述,见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一实施方式中,并非转移整个CDR,而仅将来自本文如上所述的CDR中的任何一个的一个或多个特异性决定残基转移到人抗体框架(见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36:25-34)。在一实施方式中,仅将来自本文如上所述的一个或多个CDR的特异性决定残基转移到人抗体框架。在另一实施方式中,仅将来自本文如上所述的各CDR的特异性

决定残基转移到人抗体框架。当移植CDR或特异性决定残基时，可根据CDR所来源的供体抗体的类/型而使用任何适当的受体可变区框架序列，包括小鼠，灵长类动物和人框架区。

[0109] 适宜地，根据本发明的人源化的抗体具有包含人受体框架区以及本文特别提供的一个或多个CDR的可变结构域。由此，在一实施方式中提供人源化的抗体，其结合人TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3，其中所述可变结构域包含人受体框架区和非-人供体CDR。

[0110] 可用于本发明的人框架的例是KOL，NEWM，REI，EU，TUR，TEI，LAY和POM(Kabat等人，见上)。例如，KOL和NEWM可用于重链，REI可用于轻链和EU，LAY和POM可用于重链和轻链两者。或者，可使用人种系序列；这些可获自：www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase或www.imgt.org，两者的最后访问时间是2016年1月07日。

[0111] 在本发明的人源化的抗体中，受体重链和轻链无需来源于相同的抗体，且可，如果需要，包含具有来源于不同链的框架区的复合链。

[0112] 在一实施方式中，人框架包含供体残基的1，2，3，或4个氨基酸取代，添加或缺失，例如1，2，3或4个保守性取代或取代。

[0113] 在一实施方式中，作为人框架采用的序列与本公开的序列具有80％，85％，90％，95％，96％，97％，98％，99％或更高相似性或同一性。

[0114] 本发明的人源化的抗体的重链的适合的框架区来源于人亚-组VH3序列IGHV3-21以及JH5(SEQ ID NO:111)。

[0115] 本发明的人源化的抗体的轻链的适合的框架区来源于人亚-组VK1序列IGKV1-5序列以及JK4(SEQ ID NO:109)。

[0116] 因此，在一例中提供人源化的抗体，其包含：用于CDR-H1的SEQ ID NO:4所示的序列，用于CDR-H2的SEQ ID NO:5所示的序列和用于CDR-H3的SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9，其中所述重链框架区来源于人亚组VH3序列IGHV3-21以及JH5(SEQ ID NO:111)。

[0117] 在一例中，抗体的重链可变结构域包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:94所示的序列。

[0118] 本发明的人源化的抗体的轻链的适合的框架区来源于人种系亚-组VK1序列IGKV1-5序列以及JK4(SEQ ID NO:109)。

[0119] 因此，在一例中提供人源化的抗体，其包含：用于CDR-L1的SEQ ID NO:1所示的序列，用于CDR-L2的SEQ ID NO:2所示的序列和用于CDR-L3的SEQ ID NO:3所示的序列，其中所述轻链框架区来源于人亚组VK1序列IGKV1-5序列以及JK4(SEQ ID NO:109)。

[0120] 在一例中，抗体的轻链可变结构域包含SEQ ID NO:38所示的序列。

[0121] 在本发明的人源化的抗体中，框架区无需与受体抗体的那些具有精确地相同的序列。例如，对于该受体链类或类型罕见的残基可变为更常-发生的残基。或者，可改变受体框架区中选定的残基，从而它们对应于供体抗体中相同的位置中发现的残基(见Reichmann等人，1998，Nature，332:323-324)。该变化应保持对于恢复供体抗体的亲和性而言最小必需。选择可需变化的受体框架区中的残基的流程提供于WO91/09967。

[0122] 本公开中采用的供体残基是指来自提供CDR的非-人抗体(例如鼠或兔抗体)的残基。

[0123] 在一实施方式中提供人源化的抗体，其中所述重链可变结构域不含有任何供体残

基。

[0124] 类似地,在一实施方式中提供‘鼠源化的’抗体或结合片段。该抗体或结合片段可具有兔供体和鼠受体。该抗体的例提供于SEQ ID NO:26-33。鼠受体序列的例提供于SEQ ID NO:34-37。

[0125] 在特定实施方式中,本发明提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体,其具有重链,其包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:94所示的重链可变结构域序列,和轻链,其包含SEQ ID NO:38所示的轻链可变结构域序列。

[0126] 在一实施方式中,本公开提供在部分或全部关联序列上与本公开的序列具有80%,例如85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%96%,97%,98%或99%或更高相似性或同一性的抗体序列。在一实施方式中,关联序列是SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:94。在一实施方式中,关联序列是SEQ ID NO:38。

[0127] “同一性“,如本文所用,是指比对的序列中序列之间同一的氨基酸残基的任何特定位置。”相似性”,如本文所用,是指在比对的序列中,序列之间相似类型的氨基酸残基的任何特定位置。例如,亮氨酸可取代为异亮氨酸或缬氨酸。其他可常常被取代为另一个的氨基酸包括但不限于:

[0128] • 苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸(氨基酸具有芳族侧链);

[0129] • 赖氨酸,精氨酸和组氨酸(氨基酸具有碱性侧链);

[0130] • 天冬氨酸和glutamate(氨基酸具有酸性侧链);

[0131] • 天冬酰胺和谷氨酰胺(氨基酸具有酰胺侧链);和

[0132] • 半胱氨酸和甲硫氨酸(氨基酸具有硫-含有侧链)。

[0133] 可容易计算同一性和相似性的程度(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing.Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987,Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991),获自NCBI的BLAST™软件(Altschul,S.F.等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410;Gish,W.&States,D.J.1993,Nature Genet.3:266-272。madden,T.L.等人,1996,Meth.Enzymol.266:131-141;Altschul,S.F.等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Zhang,J.&Madden,T.L。1997,Genome Res.7:649-656)。

[0134] 本发明的抗体分子可包含具有全长重链和轻链的完全抗体分子或其结合片段,且可为,但不限于Fab,修饰的Fab,Fab’,修饰的Fab’,F(ab’)2,Fv,单结构域抗体(例如VH或VL或VHH),scFv,双,三或四-价抗体,Bis-scFv,双抗体,三抗体,四抗体和上述任何的表位-结合片段(见例如Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。创建和生产这些抗体片段的方法是本领域熟知的(见例如Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216:165-181)。用于本发明的其他抗体片段包括描述于国际专利申请WO05/003169,WO05/003170和WO05/003171的Fab和Fab’片段。多-价抗体可包含多特异性例如双特异性或可为单特异性(见例如WO92/22853,WO05/113605,WO2009/040562和WO2010/035012)。

[0135] 本公开中采用的抗体的结合片段指称能以将片段表征为对抗原特异性的亲和性结合抗原的片段。

[0136] 在一实施方式中,根据本公开的抗体作为包含免疫球蛋白部分,例如Fab或Fab'片段,和直接或间接与之连接的1个或2个单结构域抗体(dAb)的TGF-β结合抗体融合蛋白提供,例如如描述于WO2009/040562,WO2010/035012,WO2011/030107,WO2011/061492和WO2011/086091,全部通过引用并入本文。

[0137] 在一实施方式中,融合蛋白包含2个结构域抗体,例如作为任选地由二硫键连接的可变重(VH)和可变轻(VL)配对。

[0138] 在一实施方式中,融合蛋白的Fab或Fab'元件与单结构域抗体具有相同或类似特异性。在一实施方式中,Fab或Fab'与单结构域抗体具有不同特异性,就是说,融合蛋白是多价的。在一实施方式中,根据本发明的多价融合蛋白具有白蛋白结合位点,例如其中VH/VL对提供白蛋白结合位点。

[0139] 本发明的抗体分子的恒定区结构域(如果存在)可根据抗体分子的建议的功能,和尤其是需要的效应子功能选择。例如,恒定区结构域可为人IgA,IgD,IgE,IgG或IgM结构域。尤其是,当抗体分子旨在用于治疗性用途和需要抗体效应子功能时,可使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型。或者,当抗体分子旨在用于治疗性目的和需要抗体效应子功能(例如简单阻断TGF-β活性)时,可使用IgG2和IgG4同种型。

[0140] 需知,也可使用这些恒定区结构域的序列变体。例如可使用如描述于Angal等人,1993,Molecular Immunology,1993,30:105-108的IgG4分子,其中在第241位的丝氨酸已被改变为脯氨酸。因此,在抗体是IgG4抗体的实施方式中,抗体可包括突变S241P。

[0141] 本领域技术人员会明白,抗体可经历各种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度常常依赖于表达抗体中使用的宿主细胞系以及培养条件。该修饰可包括糖基化,甲硫氨酸氧化,哌嗪二酮形成,天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺中的变异。频繁的修饰是由于羧肽酶的作用而羧基-端碱性残基(诸如赖氨酸或精氨酸)的缺失(如描述于Harris,RJ.Journal of Chromatography 705:129-134,1995)。但是,本发明的Ab4856实施方式的重或轻链均无C-端赖氨酸。

[0142] 在一例中,可修饰本公开提供的一种或多种CDR而去除不期望的残基或位点,诸如半胱氨酸残基或天冬氨酸(D)异构化位点或天冬酰胺(N)脱酰胺位点。

[0143] 例如,CDR中的任何一个中的一个或多个半胱氨酸残基可用另一氨基酸,诸如丝氨酸取代。

[0144] 在一例中,可通过将天冬酰胺残基(N)和/或相邻残基突变为任何其他适合的氨基酸来将天冬酰胺脱酰胺位点从一种或多种CDR去除。在一例中,可将天冬酰胺脱酰胺位点诸如NG或NS突变为例如NA或NT。

[0145] 在一例中,可通过将天冬氨酸残基(D)和/或相邻残基突变为任何其他适合的氨基酸来将天冬氨酸异构化位点从一种或多种CDR去除。在一例中,可将天冬氨酸异构化位点诸如DG或DS突变为例如EG,DA或DT。

[0146] 在一例中,可通过将天冬酰胺残基(N)突变为任何其他适合的氨基酸,例如SLS或QLS来去除N-糖基化位点诸如NLS。在一例中,可通过将丝氨酸残基(S)突变为除了苏氨酸(T)之外的任何其他残基来去除N-糖基化位点诸如NLS。

[0147] 在一实施方式中，抗体重链包含CH1结构域，CH2结构域和CH3结构域，且抗体轻链包含CL结构域，κ或λ。

[0148] 在一实施方式中，抗体重链包含CH1结构域且抗体轻链包含CL结构域，κ或λ。

[0149] 在一实施方式中，本发明提供的抗体是拮抗性抗体，其对人TGF-β具有特异性，其中重链恒定区包含修饰的铰链区。因此，本发明提供抗体，其中重链包含SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:101所示的序列，或由所述序列组成。

[0150] 本发明也提供抗体，其中轻链包含SEQ ID NO:45所示的序列，或由所述序列组成。

[0151] 本发明提供的抗体具有重链，其包含SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:101所示的序列，和轻链，其包含SEQ ID NO:45所示的序列。

[0152] 而且，本公开提供抗-TGF-β抗体或其结合片段，其中重链和轻链与包含SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:101所示的序列的重链和包含SEQ ID NO:45所示的序列的轻链具有至少80％(优选地，85％，90％，95％，96％，97％，98％，99％或更高)同一性或相似性。在一实施方式中，轻链具有SEQ ID NO:45所示的序列，或由所述序列组成，且重链具有SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:101所示的序列，或由所述序列组成。在另一实施方式中，轻链具有SEQ ID NO:45的序列，或由所述序列组成，且重链具有SEQ ID NO:59的序列，或由所述序列组成。

[0153] 而且，本发明提供被本发明提供的抗体，尤其是，包含重链序列gH13(SEQ ID NO:59)和/或轻链序列gL3(SEQ ID NO:45)的抗体4856结合的人TGF-β1、2或3的特异性区或表位。

[0154] 此人TGF-β1，2，或3多肽的特异性区或表位可由本领域知道的任何适合的表位标位方法组合由本发明提供的抗体中的任何一个来鉴定。该方法的例包括用可与含有由抗体识别的表位(例如约5～20，优选约7个氨基酸长度的区中的肽)的序列的抗体特异性结合的最小片段筛选用于与本发明的抗体结合的来源于TGF-β的改变的长度的肽。TGF-β肽可合成产生或由TGF-β多肽的蛋白水解消化产生。结合抗体的肽可由，例如，质量光谱测量分析鉴定。在另一例中，可使用NMR光谱学或X-射线晶体学来鉴定由本发明的抗体结合的表位。一旦鉴定的，如果需要，可使用结合本发明的抗体的表位片段作为免疫原来获得结合相同的表位的另外的抗体。

[0155] 交叉-阻断根据本发明的抗体尤其是，包含重链序列(SEQ ID NO:59)和轻链序列(SEQ ID NO:45)的抗体的结合的抗体可在拮抗TGF-β1、2和3活性中类似地有用。因此，本发明也提供对人TGF-β1、2和3具有特异性的拮抗性抗体，其交叉-阻断本文如上所述的抗体中的任何一种与人TGF-β1，2和/或3的结合和/或从由那些抗体中的任何一种结合TGF-β1，2和/或3交叉-阻断。在一实施方式中，该抗体与本公开如上所述的抗体结合相同的表位。在另一实施方式中，交叉-阻断中和抗体结合与由本公开如上所述的抗体结合的表位邻接和/或重叠的表位。在另一实施方式中，本发明此方面的交叉-阻断中和抗体不与本发明的与所述表位邻接和/或重叠抗体或表位结合相同的表位。

[0156] 交叉-阻断性抗体可使用本领域中任何适合的方法鉴定，例如通过使用竞争ELISA或BIAcore检定，其中交叉阻断抗体人TGF-β1，2和/或3的结合阻止本发明的抗体的结合，或反之亦然。

[0157] 在一实施方式中提供对人TGF-β1、2和3具有特异性的拮抗性抗体，其交叉-阻断重

链包含SEQ ID NO:59所示的序列且轻链包含SEQ ID NO:45所示的序列的抗体与人TGF-β1、2和3的结合。在一实施方式中，本发明提供的交叉-阻断性抗体抑制包含SEQ ID NO:59所示的重链序列和SEQ ID NO:45所示的轻链序列的抗体的结合大于80％，例如大于85％，诸如大于90％，尤其是，大于95％，96％，97％，98％，99％或更高。

[0158] 或者，或此外，根据本发明的此方面的拮抗性抗体可从由包含SEQ ID NO:59所示的重链序列和SEQ ID NO:45所示的轻链序列的抗体结合人TGF-β1、2和3交叉-阻断。因此还提供对人TGF-β1、2和3具有特异性的拮抗性抗体分子，其从由包含SEQ ID NO:59所示的重链序列和SEQ ID NO:45所示的轻链序列的抗体结合人TGF-β1、2和3交叉-阻断。在一实施方式中，由本发明的此方面提供的拮抗性抗体从由包含SEQ ID NO:59所示的重链序列和SEQ ID NO:45所示的轻链序列的抗体结合人TGF-β1、2和3抑制大于80％，例如大于85％，诸如大于90％，尤其是，大于95％，96％，97％，98％，99％或更高。

[0159] 在一实施方式中，本发明提供的交叉-阻断性抗体完全是人的。在一实施方式中，本发明提供的交叉-阻断性抗体是人源化的。在一实施方式中，本发明的抗体适合于吸入递送，例如，通过雾化。在一例中，本发明的抗体的物理性质例如结合亲和力和效力基本上不被雾化改变。在一例中，本发明的抗体是高度稳定的。抗体稳定性的一个量度是熔解温度(Tm)。熔解温度可由本领域知道的任何适合的方法测定，例如使用热荧光(Ericsson等人，Analytical Biochemistry 357(2006)289-298)或DSC(差式扫描量热法)。优选地，本发明提供的抗体具有一般至少75℃的高熔解温度(Tm)。在一例中，本发明的抗体具有至少75℃的Tm。在一例中，本发明的抗体具有至少77℃的Tm。在一例中，本发明的抗体具有至少79℃的Tm。

[0160] 生物学分子，诸如抗体或片段，含有酸性和/或碱性官能团，由此给分子净的正或负电荷。总体“观察到的”电荷量会依赖于实体的绝对氨基酸序列，3D结构中带电基团的局部环境和分子的环境条件。等电点(pI)是其特定分子或溶剂可接近的表面不携带净电荷的pH。在一例中，可将本发明的TGF-β抗体和片段加工为具有适当的等电点。此可导致具有更稳健的性质，尤其是，适合的溶解度和/或稳定性表征和/或改善的纯化特征性的抗体和/或片段。

[0161] 由此，在一方面，本发明提供被加工为具有与原本鉴定的抗体的等电点不同的等电点的人源化的TGF-β抗体。抗体可例如通过用一种或多种碱性氨基酸残基取代氨基酸残基诸如取代酸性氨基酸残基来加工。或者，可导入碱性氨基酸残基或可去除酸性氨基酸残基。或者，如果分子具有不可接受地高的pI值，可根据需要导入酸性残基以降低pI。重要的是，当操作pI时，需注意保留抗体或片段的期望活性。由此在一实施方式中，加工的抗体或片段与“未修饰的”抗体或片段具有相同的或基本上相同的活性。

[0162] 可使用程序诸如**ExPASY www.expasy.ch/tools/pi_tool.html(访问日2015年12月21日)来预测抗体或片段的等电点。

[0163] 在一实施方式中，交叉-阻断性抗体具有至少7，例如至少8，诸如8.5，8.6，8.7，8.8或8.9或至少9，诸如9.0，9.1，9.2，9.3或9.4的等电点。

[0164] 需知，本发明提供的抗体的亲和性可使用本领域知道的任何适合的方法改变。本发明因此也涉及对TGF-β具有改善的亲和性的本发明的抗体分子的变体。该变体可由许多亲和性成熟流程，包括突变CDR(Yang等人，1995，J.Mol.Biol.，254:392-403)，链改组

(Marks等人,1992,Bio/技术,10:779-783),使用大肠埃希氏菌(E.coli)株的诱变物(Low等人,1996,J.Mol.Biol.,250:359-368),DNA改组(Patten et al.,1997,Curr.Opin.Biotechnol.,8:724-733),噬菌体展示(Thompson et al.,J.Mol.Biol.,256,77-88,1996)和性PCR(Crameri et al.,1998,Nature,391:288-291)获得。Vaughan等人(见上)讨论这些亲和性成熟的方法。

[0165] 如果需要用于本发明的抗体可缀合于一种或多种效应分子。需知,效应分子可包含单个效应分子或2个或更个该分子,如此连接以形成可附接于本发明的抗体的单个部分。当期望获得与效应分子连接的抗体片段时,此可由标准化学或重组DNA过程制备,其中抗体片段直接或经偶联剂与效应分子连接。本领域熟知将该效应分子缀合于抗体的技术(见,Hellstrom et al.,Controlled Drug Delivery,2nd Ed.,Robinson et al.,eds.,1987,pp.623-53;Thorpe et al.,1982,Immunol.Rev.,62:119-58and Dubowchik et al.,1999,Pharmacology and Therapeutics,83,67-123)。特定化学过程包括,例如,描述于WO93/06231,WO92/22583,WO89/00195,WO89/01476和WO03/031581的那些。或者,当效应分子是蛋白或多肽时,连接可使用例如如描述于WO86/01533和EP0392745的重组DNA过程实现。

[0166] 本文使用的术语效应分子包括,例如,抗肿瘤剂,药物,毒素,有生物学活性的蛋白,例如酶,其他抗体或抗体片段,合成或天然存在的聚合物,核酸和其片段例如DNA,RNA和其片段,放射性核素,特别放射性碘化物,放射性同位素,螯合的金属,纳米粒子和报告基团,诸如荧光化合物或可由NMR或ESR光谱学检测的化合物。

[0167] 效应分子的例可包括细胞毒素或细胞毒性剂,包括任何有害于(例如杀死)细胞的剂。例,包括:考布他丁,多拉司他汀,埃博霉素,星形孢菌素,美登素类化合物,海绵抑素,根霉素,软海绵素,杆孢菌素,哈米特林,泰素,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,依米丁,丝裂霉素,依托泊苷,替尼泊苷,长春新碱,长春碱,秋水仙碱,多柔比星,柔红霉素,二羟基炭疽菌素二酮,米托蒽醌,普卡霉素,放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质类固醇,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔,和嘌罗霉素和其类似物或同源物。

[0168] 效应分子也包括,但不限于,抗代谢剂(例如甲氨喋呤,6-巯嘌呤,6-硫代鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶达卡巴嗪),烷化剂(例如氮芥,塞替派苯丁酸氮芥,美法仑,卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU),环磷酰胺,白消安,二溴甘露糖醇,链脲霉素,丝裂霉素C,和顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂),蒽环类抗生素(例如柔红霉素(以前道诺霉素)和多柔比星),抗生素(例如更生霉素(以前称之为放线菌素),博来霉素,普卡霉素,安曲霉素(AMC),加利刹霉素或多卡米星),和抗-有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0169] 其他效应分子可包括螯合的放射性核素诸如^{111}In和^{90}Y,Lu^{177},铋^{213},锎^{252},铱^{192}和钨^{188}/铼^{188};或药物诸如但不限于,烷基磷酸胆碱,拓扑异构酶I抑制物,紫杉类化合物和舒拉明。

[0170] 其他效应分子包括蛋白,肽和酶。目的酶包括,但不限于,蛋白水解酶,水解酶,裂合酶,异构酶,转移酶。蛋白,目标多肽和肽包括,但不限于,免疫球蛋白,毒素诸如相思豆毒蛋白,蓖麻毒素A,假单胞菌外毒素,或白喉毒素,蛋白诸如胰岛素,肿瘤坏死因子,α-干扰素,β-干扰素,神经生长因子,血小板来源的生长因子或组织纤溶酶原活化物,血栓性剂或抗-血管发生剂,例如血管抑素或内皮他汀,或,生物学应答修饰物诸如淋巴因子,白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-2(IL-2),神经生长因子(NGF)或其他生长因子和免疫球蛋白。

[0171] 其他效应分子可包括例如在诊断中有用的可检测的物质。可检测的物质的例包括各种酶，辅基，荧光物质，发光物质，生物发光物质，放射性核素，正电子发射金属(用于正电子发射层析成像)，和非放射性顺磁性金属离子。见通常美国专利No.4,741,900，关于可缀合于用作诊断学的抗体的金属离子。适合的酶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；适合的辅基包括链霉亲和素，亲和素和生物素；适合的荧光物质包括伞形酮，荧光素，异硫氰酸荧光素，若丹明，二氯三嗪基胺荧光素，氯化丹磺酰和藻红蛋白；适合的发光物质包括鲁米诺；适合的生物发光物质包括萤光素酶，荧光素，和水母荧光素；和适合的放射性核素包括^{125}I，^{131}I，^{111}In和^{99}Tc。

[0172] 在另一例中，效应分子可增加抗体的体内半衰期，和/或减小抗体的免疫原性和/或增强抗体穿过上皮屏障递送到免疫系统。此类型的适合的效应分子的例包括聚合物，白蛋白，白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物诸如描述于WO05/117984的那些。

[0173] 在一实施方式中，由效应分子提供的半衰期不依赖于TGF-β是有利的。

[0174] 当效应分子是聚合物时，其一般可为合成或天然存在的聚合物，例如任选地取代的直或支链聚亚烷基，聚亚烯基或聚氧基亚烷基聚合物或分支的或未分支的多糖，例如同源-或异源-多糖。

[0175] 可存在于上述的合成聚合物上的特定任选的取代包括一种或多种羟基，甲基或甲氧基。

[0176] 合成聚合物的特定例包括任选地取代的直或支链聚(乙二醇)，聚(丙二醇)聚(乙烯醇)或其衍生物，尤其任选地取代的聚(乙二醇)，诸如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0177] 特定天然存在的聚合物包括乳糖，直链淀粉，葡聚糖，糖原或其衍生物。

[0178] 在一实施方式中，聚合物是白蛋白或其片段，诸如人血清白蛋白或其片段。

[0179] 本文所述的“衍生物”旨在包括反应性衍生物，例如氢硫基-选择性反应性基团诸如马来酰亚胺等。反应性基团可直接或通过接头段而连接于聚合物。需知，在一些实例中，该基团的残基会形成作为抗体片段和聚合物之间的连接基的产物的部分。

[0180] 聚合物的尺寸可如期望改变，但通常会在500Da～50000Da，例如5000～40000Da，诸如20000～40000Da的平均分子量范围内。聚合物尺寸可尤其是基于产物的目标用途，例如定位到特定组织诸如肿瘤的能力或延长循环半衰期选择(综述见Chapman,2002,Advanced Drug Delivery Reviews,54,531-545)。由此，例如，当产物旨在离开循环系统且穿透组织，例如用于治疗肿瘤时，使用例如具有约5000Da分子量的小分子量聚合物可为有利的。对于产物保持在循环中的应用而言，使用例如具有20000Da～40000Da范围内的分子量的更高分子量聚合物可为有利的。

[0181] 适合的聚合物包括聚亚烷基聚合物，诸如聚(乙二醇)或，尤其，甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物，且尤其具有约15000Da～约40000Da范围内的分子量。

[0182] 在一例中，用于本发明的抗体附接于聚(乙二醇)(PEG)部分。在一特定例中，抗体是可通过位于抗体片段的任何可利用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团，例如任何游离的氨基，亚氨基，氢硫基，羟基或羧基附接的抗体片段和PEG分子。该氨基酸可天然地存在于抗体片段中或可使用重组DNA方法加工成所述片段(见例如US 5,219,996;US 5,667,425;WO98/25971,WO2008/038024)。在一例中，本发明的抗体分子是修饰的Fab片段，其中所述修饰是向其重链的C-末端添加一个或多个氨基酸而使效应分子的附接。适宜地，另外的氨基

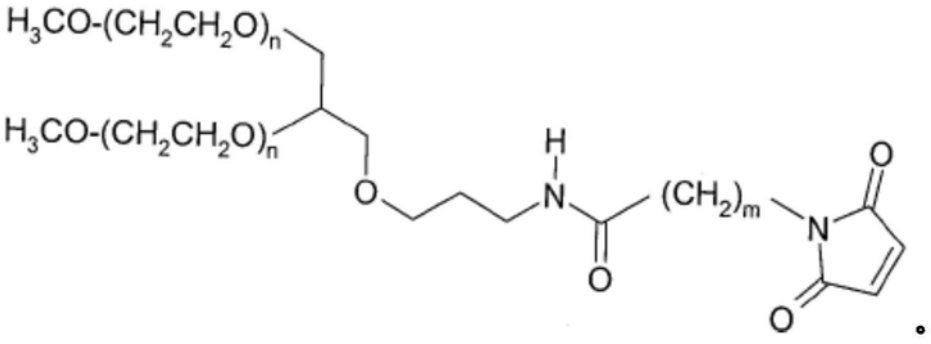
酸形成含有一个或多个可附接效应分子的半胱氨酸残基的修饰的铰链区。可使用多个位点来附接2个或更多PEG分子。

[0183] 适宜地,PEG分子通过位于抗体片段的至少一个半胱氨酸残基的氢硫基共价连接。附接于修饰的抗体片段的各聚合物分子可共价连接到位于片段上的半胱氨酸残基的硫原子。共价连接通常会是二硫键或,尤其是,硫-碳键。当使用氢硫基作为附接适当活化的效应分子的点时,可使用例如氢硫基选择性衍生物诸如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。如上所述,可使用活化的聚合物作为制备聚合物-修饰的抗体片段的原材料。活化的聚合物可为任何含有氢硫基反应性基团的聚合物,诸如卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺,酰亚胺,例如马来酰亚胺,乙烯基砜或二硫化物。该原材料可商业上获得(例如从Nektar,以前称之为Shearwater Polymers Inc.,Huntsville,AL,USA)或可从可商购的原材料,使用常规化学过程制备。特定PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可获自Nektar,以前称之为Shearwater;Rapp Polymere;和SunBio)和M-PEG-SPA(可获自Nektar,以前称之为Shearwater)。

[0184] 在一实施方式中,抗体是聚乙二醇化的修饰的Fab片段,Fab'片段或diFab,即,具有与之共价附接的PEG(聚(乙二醇)),例如根据EP 0948544或EP1090037[见也"Poly(ethyleneglycol)Chemistry,Biotechnical and Biomedical Applications",1992,J.Milton Harris(ed),Plenum Press,New York,"Poly(ethyleneglycol)Chemistry and Biological Applications",1997,J.Milton Harris and S.Zalipsky(eds),American Chemical Society,Washington DC and"Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences",1998,M.Aslam and A.Dent,Grove Publishers,New York;Chapman,A.2002,Advanced Drug Delivery Reviews 2002,54:531-545]中公开的方法。在一例中,PEG附接于铰链区中的半胱氨酸。在一例中,PEG修饰的Fab片段具有与修饰的铰链区中的单个氢硫基共价连接的马来酰亚胺基。赖氨酸残基可与马来酰亚胺基共价连接,且赖氨酸残基上的各胺基可附接具有大致20,000Da的分子量的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此,附接于Fab片段上的PEG的总分子量可大致为40,000Da。

[0185] 特定PEG分子包括N,N'-双(甲氧基聚(乙二醇))MW 20,000修饰的赖氨酸的2-[3-(N-马来酰亚胺基)丙酰胺基]乙基酰胺,也被称为PEG2MAL40K(可获自Nektar,以前称之为Shearwater)。

[0186] PEG接头的替代性的来源包括供给GL2-400MA3(其中以下结构中的m是5)和GL2-400MA(其中m是2)的NOF,且n大致是450:

[0187] 

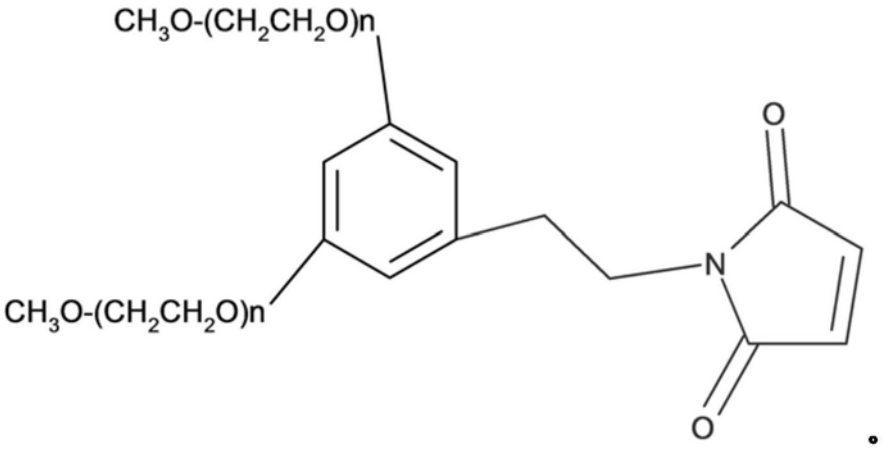
[0188] m是2或5

[0189] 就是说,各PEG是约20,000Da。

[0190] 由此,在一实施方式中,PEG是2,3-Bis(甲基聚氧乙烯-氧基)-1-{[3-(6-马来酰亚

胺基-1-氧代己基)氨基]丙基氧基}己烷(2臂分支的PEG,-CH_2)$_3$NHCO(CH_2)$_5$-MAL,Mw 40,000被称为SUNBRIGHT GL2-400MA3。

[0191] 而且,以下类型的替代性的PEG效应分子:

[0192] 

[0193] 在一实施方式中提供抗体,诸如通过在链中的氨基酸226或约氨基酸226,例如重链的氨基酸226(由连续编号)的半胱氨酸氨基酸残基附接聚乙二醇化的(例如具有本文描述的PEG)的全长抗体。在一实施方式中,PEG附接于SEQ ID NO:101的Cys 226。

[0194] 在一实施方式中,本公开提供包含一个或多个PEG聚合物,例如1个或2个聚合物诸如40kDa聚合物的Fab-PEG分子。

[0195] 根据本公开的Fab-PEG分子可因它们具有不依赖于Fc片段的半衰期而特别有利。

[0196] 在一实施方式中提供缀合于聚合物,诸如PEG分子,淀粉分子或白蛋白分子的scFv。

[0197] 在一实施方式中,抗体或片段缀合于淀粉分子,例如而增加半衰期。将淀粉缀合于蛋白的方法如描述于US 8,017,739(通过引用并入本文)。

[0198] 本公开中采用的报告分子是能被检测的分子,例如荧光染料,放射性标记或其他可检测的实体。

[0199] 本发明也提供分离的DNA序列,其编码本发明的抗体分子的重链和/或轻链。适宜地,DNA序列编码本发明的抗体分子的重或轻链。本发明的DNA序列可包含合成DNA,例如由化学处理产生的,cDNA,基因组DNA或其任何组合。

[0200] 编码本发明的抗体分子的DNA序列可由本领域技术人员熟知的方法获得。例如,编码抗体重链和轻链的部分或全部的DNA序列可如期望从测定的DNA序列或基于对应氨基酸序列合成。

[0201] 编码受体框架序列的DNA是本领域技术人员可广泛利用的,且可为容易基于它们的知道的氨基酸序列合成。

[0202] 可使用分子生物学的标准技术制备编码本发明的抗体分子的DNA序列。期望的DNA序列可完全或部分使用寡核苷酸合成技术合成。可适当使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0203] 适合的DNA序列的例提供于图1。

[0204] 本发明也涉及包含一种或多种本发明的DNA序列的克隆或表达载体。因此,提供克隆或表达载体,其包含一种或多种编码本发明的抗体的DNA序列。在一实施方式中,载体包

含SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47所示的轻链DNA序列和/或SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103所示的重链DNA序列。适宜地，克隆或表达载体包含编码本发明的抗体分子的轻链和重链的2种DNA序列，优选分别SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:61和适合的信号序列。在一例中，载体包含重链和轻链之间的基因间序列(见WO03/048208)。

[0205] 本领域技术人员熟知可构建载体的通用的方法，转染方法和培养方法。关于此，可参照“Current Protocols in Molecular Biology”，1999，F.M.Ausubel(ed)，Wiley Interscience，New York和由冷泉港出版社出版的Maniatis Manual。

[0206] 而且，本公开提供宿主细胞，其包含一种或多种包含一种或多种编码本发明的抗体的DNA序列的克隆或表达载体。任何适合的宿主细胞/载体系统可用于表达编码本发明的抗体的DNA序列分子。可使用细菌，例如大肠埃希氏菌(E.coli)，和其他微生物系统或也可使用真核生物，例如哺乳动物，宿主细胞表达系统。适合的哺乳动物宿主细胞包括HEK，CHO，骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0207] 本发明也提供产生根据本发明的抗体分子的方法，其包括在适合于导致从编码本发明的抗体分子的DNA表达蛋白的条件下培养含有本发明的载体的宿主细胞，和分离所述抗体分子。

[0208] 在仅需使用重链或轻链多肽编码序列来转染宿主细胞的情况中，抗体分子可仅包含重或轻链多肽。为了产生包含重链和轻链两者的产物，细胞系可用2种载体转染，第一载体编码轻链多肽和第二载体编码重链多肽。或者，可使用单个载体，所述载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0209] 根据本公开的抗体和片段从宿主细胞以良好水平表达。由此，抗体和/或结合片段的性质适合于商业规模表达。

[0210] 由此，提供培养宿主细胞和表达抗体或其片段的方法，分离后者，且任选地纯化而提供分离的抗体或片段。在一实施方式中，所述方法还包括使效应分子缀合于分离的抗体或片段，例如缀合于PEG聚合物(尤其是如本文所述的)的步骤。

[0211] 在一实施方式中提供纯化抗体(尤其是，根据本发明的抗体或片段)的方法，其包括以非-结合模式实施阴离子交换层析，使得杂质保留在柱上，并洗脱抗体。

[0212] 在一实施方式中，纯化采用在TGF-β柱上亲和性捕获。

[0213] 在一实施方式中，纯化采用用于白蛋白融合或缀合分子的纯化的cibacron蓝或类似物。

[0214] 用于方法的适合的离子交换树脂包括Q.FF树脂(由GE-Healthcare供给)。步骤可例如在pH约8实施。

[0215] 方法还可包括采用阳离子交换层析的例如在约4～5，诸如4.5的pH实施的初始捕获步骤。阳离子交换层析可，例如采用树脂诸如CaptoS树脂或SP琼脂糖FF(由GE-Healthcare供给)。然后可采用离子盐溶液诸如氯化钠(例如200mM的浓度)将抗体或片段从树脂洗脱。

[0216] 由此，层析步骤可适当包括一个或多个洗涤步骤。

[0217] 纯化方法可也包括一个或多个过滤步骤，诸如渗滤步骤。

[0218] 由此，在一实施方式中提供以实质纯化的形式，尤其是，无或基本上无内毒素和/

或宿主细胞蛋白或DNA地纯化的抗-TGF-β抗体或片段，例如人源化的抗体或片段，尤其是，根据本发明的抗体或片段。

[0219] 如上使用的纯化的形式旨在指称至少90％纯度，诸如91，92，93，94，95，96，97，98，99％w/w或更纯。

[0220] 基本上无内毒素通常是指1EU/mg抗体产物或更少的内毒素含量，诸如0.5或0.1EU/mg产物。

[0221] 基本上无宿主细胞蛋白或DNA通常是指宿主细胞蛋白和/或DNA含量400μg/mg抗体产物或更少诸如100μg/mg或更少，尤其是，20μg/mg，如果适当。

[0222] 本发明也提供本公开的结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体(或者包含该抗体的药学组合物)作为药物的用途。本发明也提供本公开的结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体(或者包含该抗体的药学组合物)，其用于治疗或预防由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症。

[0223] 本发明也提供本公开的结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体用于生产治疗或预防由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症的药物的用途。

[0224] 本发明也提供治疗患由TGF-β1，2和/或3介导的或与TGF-β1、2或3的水平增加关联的病理学病症或处于所述病理学病症的风险的人受试者的方法，所述方法包括给受试者施用有效量的根据本公开的抗体。在本申请中，由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症可为任何适合的病症。在一实施方式中，病理学病症选自：肺部纤维化诸如特发性肺部纤维化，肺部高血压诸如肺部动脉高血压。

[0225] 根据本公开的抗体可用于治疗肺部疾病包括肺部动脉高血压。

[0226] 根据本公开的抗体可用于治疗患特发性肺部纤维化和肺部动脉高血压的患者。

[0227] 本发明也提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段，其用于由吸入施用治疗或预防由TGF-β1、2或3介导的和/或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症。

[0228] 本发明也提供结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段用于生产由吸入施用治疗或预防由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症的药物的用途。

[0229] 本发明也提供治疗患由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的病理学病症或处于所述病理学病症的风险的人受试者的方法，所述方法包括由吸入施用给受试者施用有效量的结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体Fab或Fab'片段。

[0230] 适合于由吸入施用治疗的病理学病症可为由TGF-β1、2和/或3介导的或与TGF-β1、2和/或3的水平增加关联的任何肺部疾病，例如选自下列的疾病：肺部纤维化诸如特发性肺部纤维化(IPF)，例如弱，中等和/或严重的IPF，和囊性纤维化和肺部高血压诸如肺部动脉高血压(PAH)。在另一实施方式中，抗体可用于治疗弱IPF，诸如与肺部高血压，特别PAH或不匀称肺部高血压关联的弱IPF。在一实施方式中，抗体可用于治疗患有IPF和肺部高血压，诸如IPF和PAH的患者。在另一实施方式中，抗体可用于治疗全身性硬化。在进一步实施方式中，抗体可用于治疗与下列中的至少一种关联的全身性硬化：肺部纤维化(SSc-ILD)；肺部

高血压,例如结缔组织疾病-关联的肺部高血压;或IPF和肺部高血压两者。

[0231] 相比抗体的系统性施用,使用与人TGF-β1,人TGF-β2和人TGF-β3结合的吸入式抗体可通过向肺的局部施用而减小副作用的风险。

[0232] 根据本公开的抗体和片段可在治疗或预防中采用。

[0233] 本发明的抗体分子也可用于诊断,例如涉及TGF-β的疾病状态的体内诊断和成像。

[0234] 由于本发明的抗体在病理学病情的治疗和/或预防中有用,本发明也提供药学或诊断组合物,其包含本发明的抗体分子、组合一种或多种药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。因此,提供本发明的抗体用于药物生产的用途。组合物通常会作为无菌部分供给,药学组合物正常会包括药学可接受的载体。本发明的药学组合物可还包含药学-可接受的佐剂。

[0235] 本发明也提供制备药学或诊断组合物的方法,其包括添加和混合本发明的抗体分子以及一种或多种药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0236] 抗体分子可为药学或诊断组合物中的单独的活性成分。或者,抗体可例如同时,依次或独立地与一种或多种其他治疗活性成分组合施用。药学或诊断组合物中的抗体分子可伴随其他活性成分,包括其他抗体成分,例如表皮生长因子受体家族(EGFR,HER-2),血管内皮生长因子受体(VEGFR),血小板来源的生长因子受体(PDGFR)抗体,或非-抗体成分诸如伊马替尼,达沙替尼,尼洛替尼,BASUTINIB,吉非替尼,厄洛替尼,坦罗莫司,凡德他尼,威罗菲尼,克唑替尼,伏立诺他,罗米地辛,硼替佐米,索拉非尼,舒尼替尼,帕唑帕尼,瑞格非尼,卡博替尼,吡非尼酮,尼达尼布,甾或其他药物分子,尤其是半衰期不依赖于TGF-β结合的药物分子。在特定实施方式中,抗体随尼达尼布施用,例如为了治疗IPF。

[0237] 本公开中采用的活性成分指称以关联剂量具有药理学效应,诸如治疗效果的成分。

[0238] 药学组合物适宜地包含治疗有效量的本发明的抗体。本文所用的术语“治疗有效量”指称治疗,改善或防止靶向的疾病或病情,或呈现可检测的治疗性,药理学或预防性效应所需要的治疗性剂的量。对于任何抗体,治疗有效量可起初在细胞培养检定中或在动物模型中,通常在啮齿动物,兔,狗,猪或灵长类动物中估计。动物模型也可用于确定适当的浓度范围和施用途径。然后可用该信息在人中确定有用的剂量和施用途径。

[0239] 对于人受试者的精确的治疗有效量会依赖于疾病状态的严重性,受试者的一般健康,受试者的年龄,重量和性别,膳食,施用时间和频度,药物组合,对治疗的反应灵敏度和耐受性/应答。此量可由常规实验确定,且在临床医师判断内。一般而言,治疗有效量会是0.01mg/kg～500mg/kg,例如0.1mg/kg～200mg/kg,诸如100mg/kg。尤其是,治疗有效量会在0.001～100mg/kg之间。

[0240] 药学组合物可以每剂量含有预定量的本发明的活性剂的单元剂量形式便利地表示。

[0241] 根据本公开的抗体的治疗性剂量不显示明显的或限制的体内毒理学效应。

[0242] 组合物可个别施用于患者,或可与其他剂,药物或激素组合(例如同时,依次或独立地)施用。

[0243] 待用于治疗各种炎性疾病的抗体可单独或与各种其他抗-炎性剂组合使用。

[0244] 待用于治疗各种纤维化疾病的抗体可单独或与各种其他抗-纤维化剂组合使用。该剂的例是吡非尼酮和/或尼达尼布。

[0245] 本发明的抗体分子的施用剂量依赖于待治疗的病情的性质，存在的病情的严重性及依赖于抗体分子是用于预防还是用于治疗既有病情。

[0246] 剂量频度会依赖于抗体分子的半衰期和其效应的持续时间。如果抗体分子具有短半衰期(例如2～10小时)，则必需每天给一个或多个剂量。或者，如果抗体分子具有长半衰期(例如2～15天)和/或持久的药效学(PD)表征，则仅需以一次/天，一次/周或甚至一次/1或2个月施用剂量。

[0247] 本公开中采用的半衰期旨在指称循环中，例如血清/血浆中所述分子的持续时间。

[0248] 本公开中采用的药效学指称表征和尤其是根据本公开的分子的生物学作用的持续时间。

[0249] 药学可接受的载体不应本身诱导有害于接收组合物的个体的抗体产生，且不应有毒性。适合的载体可为大，缓慢代谢的大分子诸如蛋白，多肽，脂质体，多糖，聚乳酸，聚乙醇酸，聚合物氨基酸，氨基酸共聚物和无活性病毒粒子。

[0250] 可使用药学可接受的盐，例如无机酸盐，诸如盐酸盐;氢溴酸盐，磷酸盐和硫酸盐，或有机酸的盐，诸如乙酸盐，并酸盐，丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0251] 治疗组合物中的药学可接受的载体可另外地含有液体诸如水，盐水，甘油和乙醇。此外，辅助物质，诸如润湿或乳化剂或pH缓冲物质，可存在于该组合物中。该载体致使药学组合物被配制成用于被患者摄入的片剂，丸剂，糖锭剂，胶囊，液剂，凝胶，糖浆，浆和悬浮液。

[0252] 适合的施用形式包括适合于肠胃外施用的形式，例如通过例如由推注或连续输注注射或输注。当产物用于注射或输注时，其可为在油性或水性媒质中的悬浮液，溶液或乳剂形式，且其可含有配制剂，诸如悬浮剂，防腐剂，稳定化剂和/或分散剂。或者，抗体分子可处于干的形式，用于在使用前用适当的无菌液体再构成。

[0253] 一旦配制出，本发明的组合物可直接施用给受试者。待治疗的受试者可为动物。但是，在一个或多个实施方式中，组合物适应于施用给人受试者。

[0254] 适宜地，在根据本公开的制剂中，最终制剂的pH不近似于抗体或片段的等电点的值，例如如果制剂的pH是7，则8～9或以上的pI可为适当的。不受理论束缚，认为其可最终提供具有改善的稳定性的最终制剂，例如抗体或片段保留在溶液中。

[0255] 在一例中，药学制剂在4.0～7.0的范围内的pH包含:1～200mg/mL的根据本公开的抗体，1～100mM的缓冲剂，0.001～1％的表面活性剂，(a)10～500mM的稳定剂，(b)10～500mM的稳定剂和5～500mM的张度剂，或(c)5～500mM的张度剂。

[0256] 本发明的药学组合物可由任意数的途径施用，包括，但不限于，口腔，静脉内，肌内，动脉内，髓内，鞘内，心室内，经皮(transdermal)，经皮(transcutaneous)(例如，见WO98/20734)，皮下，腹膜内，鼻内，肠内，局部，舌下，阴道内或直肠途径。也可用无针注射器施用本发明的药学组合物。一般而言，治疗组合物可制备为可注射剂，制备为液体溶液或悬浮液。也可制备适合于注射之前的液体媒质中的溶液或悬浮液的固体形式。优选地，本发明的抗体分子通过吸入皮下或局部施用。例如，抗体可鼻内或经口，诸如通过吸入施用。

[0257] 组合物的直接递送通常会通过注射，皮下，腹膜内，静脉内或肌内实现，或递送到组织的间质空间。组合物也可施用到损伤。剂量处理可为单剂量进程或多剂量进程。

[0258] 需知，组合物中的活性成分会是抗体分子。如此，其会对于消化道中降解敏感。由

此，如果组合物待由使用消化道的途径施用，组合物需含有保护抗体免于降解但一旦其已从消化道吸收就释放抗体的剂。

[0259] 药学可接受的载体的充分讨论可参考Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company，N.J。1991)。

[0260] 在一实施方式中，提供制剂作为用于局部施用(包括吸入)的制剂。

[0261] 适合的可吸入的制备物包括可吸入的粉，含有推进气体或从推进气体释放出的可吸入的溶液(诸如可雾化的溶液或悬浮液)的计量气雾剂。根据本公开的含有活性物质的可吸入的粉可单独由上述活性物质组成或由上述活性物质的混合物与生理学可接受的赋形剂组成。

[0262] 这些可吸入的粉可包括单糖(例如葡萄糖或阿拉伯糖)，二糖(例如乳糖，蔗糖，麦芽糖)，寡-和多糖(例如葡聚糖)，多元醇(例如山梨糖醇，甘露糖醇，木糖醇)，盐(例如氯化钠，碳酸钙)或这些与另一个的混合物。适宜地使用单-或二糖，特别但不唯独以它们的水合形式使用乳糖或葡萄糖。

[0263] 用于肺中沉积的粒子需要小于10μm，诸如1～9μm例如0.1～5μm，尤其是，1～5μm的粒径。活性成分(诸如抗体或片段)的粒径是首要的，其被认为与适合于用本发明的抗体或结合片段治疗的肺的区中的沉积关联。例如，10μm或更小，诸如0.1～5μm，尤其是1～5μm的粒子更可能在肺的肺泡结构中沉积。

[0264] 本领域知道可用来制备可吸入的气雾剂的推进气体。适合的推进气体尤其选自烃，诸如n-丙烷，n-丁烷或异丁烷和卤代烃诸如甲烷，乙烷，丙烷，丁烷，环丙烷或环丁烷的氯化的和/或氟化的衍生物。上述推进气体可以它们的自身或以其混合物使用。

[0265] 特别是，适合的推进气体是卤化的烷烃衍生物，其尤其选自：TG11，TG 12，TG 134a和TG227。在上述卤化的烃中，TG134a(1，1，1，2-四氟乙烷)和TG227(1，1，1，2，3，3，3-七氟丙烷)和其混合物是特别适合的。

[0266] 含有推进气体的可吸入的气雾剂也可含有其他成分，诸如共溶剂，稳定剂，表面-活性剂(表面活性剂)，抗氧化剂，润滑剂和调整pH的试剂。全部这些成分是本领域知道的。

[0267] 根据本发明的含有推进气体的可吸入的气雾剂可含有达5重量％的活性物质。根据本发明的气雾剂含有，例如，0.002～5重量％，0.01～3重量％，0.015～2重量％，0.1～2重量％，0.5～2重量％或0.5～1重量％的活性成分。

[0268] 或者，局部施用到肺也可通过例如采用装置诸如雾化器，例如，与压缩机连接的雾化器施用液体溶液或悬浮液制剂。

[0269] 在一实施方式中，提供制剂作为用于通过雾化递送的含有单元剂量的离散安瓿。

[0270] 在一实施方式中，以冷冻干燥的形式供给抗体，用于再构成或替代性地作为悬浮液制剂。

[0271] 本发明的抗体可例如，以溶液或悬浮液形式在溶剂中递送分散。其可在适当的生理学溶液，例如，盐水或其他药理学可接受的溶剂或缓冲溶液中悬浮。本领域知道的缓冲溶液可含有0.05mg～0.15mg乙二胺四乙酸二钠，8.0mg～9.0mg NaCl，0.15mg～0.25mg聚山梨酯，0.25mg～0.30mg无水柠檬酸，和0.45mg～0.55mg柠檬酸钠/1ml水，由此达到约4.0～5.0的pH。悬浮液可采用，例如，冷冻干燥的抗体。

[0272] 治疗性悬浮液或溶液制剂也可含有一种或多种赋形剂。赋形剂为本领域熟知，且

包括缓冲剂(例如,柠檬酸化缓冲剂,磷酸盐缓冲剂,乙酸盐缓冲剂和碳酸氢盐缓冲剂),氨基酸,脲,醇,抗坏血酸,磷脂,蛋白(例如,血清白蛋白),EDTA,氯化钠,脂质体,甘露糖醇,山梨糖醇,和甘油。溶液或悬浮液可包裹进脂质体或可生物降解的微球。制剂通常会以基本上无菌形式,采用无菌生产过程提供。

[0273] 此可包括通过制剂用的缓冲溶剂/溶液的过滤,无菌缓冲溶剂溶液中抗体的无菌悬浮,和由本领域技术人员熟悉的方法将制剂分注进无菌容具来产生和灭菌。

[0274] 可例如,作为填充进箔包膜的单剂量单元(例如,密封的塑料容器或管形瓶)提供根据本公开的可雾化的制剂。各管形瓶含有例如,2mL体积的溶剂/溶液缓冲剂的单元剂量。

[0275] 本公开的抗体被认为适合于经雾化递送。

[0276] 也设想本发明的抗体可通过使用基因疗法施用。为了达到此,在适当的DNA组分的控制下将编码抗体分子的重链和轻链的DNA序列导入患者,使得抗体链从DNA序列表达和原位组装。

[0277] 在一实施方式中,本公开包含抗体或其片段作为试剂或诊断的用途,例如缀合于报告分子。由此提供根据本公开的被标记的抗体或片段。一方面,本公开提供包含根据本公开的抗体或片段的柱。

[0278] 由此提供抗-TGF-β抗体或片段,其用作用于如下方面的试剂:

[0279] (1)缀合于基质且用作亲和性柱,或(作为抗-TGF-β的修饰的形式)作为沉淀剂(例如作为经被可被修饰的另一分子识别的结构域修饰的形式),任选地由抗-Fc试剂沉淀的TGF-β蛋白(或者其结合片段)的纯化。

[0280] (2)活的或固定的(体外或组织中或细胞切片上的细胞)细胞上或细胞中TGF-β的检测和/或定量。为此使用可包括定量TGF-β作为生物标志物,以追踪抗-TGF-β处理的效应。为这些目的,可以修饰的形式使用候选物(例如通过添加另一部分作为遗传融合蛋白或化学缀合物,诸如添加报告分子,例如为检测目的使用的荧光标签)。

[0281] (3)通过与由(1)和(2)中例示的方式修饰的候选物结合而标记的带TGF-β的细胞的纯化或分选。

[0282] 在本说明书的情景中,包含(Comprising)旨在表示‘包括(including)’。

[0283] 当技术上适当时,本发明的实施方式可组合。

[0284] 实施方式在本文被描述为包含特定特征/元件。本公开也延伸到由所述特征/元件组成或基本上由所述特征/元件组成的分离的实施方式。

[0285] 技术参考文献诸如专利和申请通过引用并入本文。

[0286] 本文特别和明确地叙述的任何实施方式可形成放弃单独或组合一种或多种进一步实施方式的基础。

[0287] 在下列实施例中仅以例证方式进一步描述本发明:

【实施例】

[0288] 在下列实施例中,术语TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的使用指称如分别在图3b,3d和3f中显示的TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3的成熟序列。

[0289] 【实施例1:免疫及B细胞培养上清的一次和二次筛选】

[0290] 对4只雌性Half-Lop兔(>2kg)以每只兔500μg的总剂量皮下免疫由用注射器剧烈

混合而在等体积的完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的250μg人TGF-β1(图3b)蛋白和250μg人TGF-β2蛋白(图3d)的混合物。以21天间隔使用不完全的弗氏佐剂(IFA)给兔追加注射,在免疫后14天从耳取血。在仅人TGF-β2蛋白的最终剂量(500μg)之前施用3剂量的同种型1/2混合物。在用在10%DMSO/FCS中制备和于-80℃冷冻的脾脏,骨髓和外周血单核细胞的单细胞悬浮液最终追施后14天发生终止。

[0291] 由ELISA测定产生的免疫应答。将Nunc-Immuno™ 1Maxisorp™ 96孔微孔板各用PBS中2μg/ml的人TGF-β1蛋白(Peprotech;#100-21C),PBS中0.5μg/ml的人TGF-β2蛋白(R&D systems;302-B2-010/CF)或人TGF-β-3蛋白(R&D systems;243-B3-010/CF)包被,并于4℃温育过夜。各层后洗涤平板(自动化的,以4x200ml用PBS+0.05%吐温洗涤)。通过于室温(RT)温育1hr来将孔用PBS中的1%(w/v)酪蛋白(VWR Chemicals;440203H)阻断。添加在1%酪蛋白中自1/100对数稀释的血清,于室温温育11/2小时。将在1%(w/v)酪蛋白/PBS中以1/3000稀释的100μl的山羊抗-兔IgG Fc特异性辣根过氧化物酶抗体(Jackson;111-036-046)添加到各孔,于室温温育1小时。添加作为底物的100μl的TMB(3,3',5,5'四甲基联苯胺,可溶性),将反应用50μl的dH_2O中2.5%氟化钠溶液停止。使用ELISA读取器测定610nm处的光密度(OD)。

[0292] 使用类似于Zubler等人(1985)描述的方法制备B细胞培养物。简言之,将来自免疫的兔的外周血单核细胞(PBMC)-来源的B细胞在含200ml/孔补充了10%FCS(Sigma Aldrich),2%HEPES(Sigma Aldrich),2%L-谷氨酰胺(Gibco BRL),1%青霉素/链霉素溶液(Gibco BRL),0.1%β-巯基乙醇(Gibco BRL),0.2%Normocin(Invivogen),1%活化的人外周血单核细胞(PBMC)上清和γ-照射的突变EL4鼠胸腺瘤细胞(5×10^4/孔)的RPMI 1640培养基(Gibco BRL)的条形编码的96-孔组织培养平板中以大致5000个细胞/孔的密度于37℃在5%CO_2气氛下培养7天。

[0293] 就TGF-β1结合的一次筛选:

[0294] 使用基于均质荧光的结合检定,使用被生物素化的TGF-β1(Peprotech)包被的Superavidin™珠(Bangs Laboratories)测定B细胞培养上清中TGF-β1蛋白-特异性抗体的存在。使用Lightning-**Link®**生物素化试剂盒(Innova Biosciences),根据生产商的使用说明将TGF-β1蛋白生物素化。

[0295] 使用Bravo自动化的液体处理机(Agilent)将10μl的B细胞培养上清从标条码的96-孔组织培养平板转移到含有固定在珠(10μl/孔)上的TGF-β1的标条码的384-孔黑-壁测定板。用山羊抗-兔IgG Fcγ-特异性FITC缀合物(Jackson ImmunoResearch)揭示结合。在TTP Labtech **mirrorball®**检测系统上读取平板。

[0296] 在一次筛选之后,将对于TGF-β1结合的阳性上清使用Beckman hit-挑选机器人和于-80℃冷冻的细胞培养板中的B细胞巩固到96-孔条形编码的样板上。

[0297] 就与TGF-β1、2和3结合的二次筛选:

[0298] 为了测定抗体结合TGF-β的不同同种型的能力,在ELISA检定中对TGF-β的3种不同同种型筛选这些样板中的B细胞上清。ELISA检定涉及不同的TGF-β1,2,3同种型(Peprotech)以PBS中2μg/ml包被到384-孔Maxisorp™平板(ThermoScientific/Nunc)上。将平板用PBS中1%BSA阻断,然后用10μl/孔的B细胞培养上清温育。将第二HRP-缀合的山羊抗-兔IgG fc抗体(Jackson ImmunoResearch)添加到平板,之后是用TMB基体(3,3',5,5'-

四甲基联苯胺,获自EMD Millipore;10μl/孔)进行结合的可视化。使用BioTek协同2酶标仪测量630nM处的光密度。

[0299] 自一次筛选和二次筛选的结果

[0300] 将79只小鼠,大鼠和兔仅用人TGF-β1(SEQ ID NO:114;图3b)免疫,且用改变水平的阳性TGF-β1结合剂就TGF-β1结合进行筛选。从这些79只不同免疫的大鼠,小鼠和兔动物中鉴定2656抗-人TGF-β1结合剂。但是,仅这些中的831只在二次筛选中显示与全部3种同种型良好结合。

[0301] 如上所述,将4只兔用人TGF-β1和人TGF-β2免疫。在一次筛选中分析来自这4只兔的总血清,且就TGF-β1结合显示1367阳性孔,然后在二次筛选中就与全部3TGF-β1、2和3同种型结合进行筛选,其导致1026个具有与TGF-β的全部3种同种型结合的孔。

[0302] 一次和二次筛选之后,然后就阻断活性检定展示与全部3种同种型结合的B细胞孔。

[0303] 使用重组TGF-β1的HEK-蓝TGF-β报告基因检定

[0304] 报告基因检定使用HEK-蓝TGF-β细胞(HEK-蓝TGF-β细胞系;Invivogen)显影。HEK-蓝TGF-β细胞系通过SEAP的表达(用比色检测试剂检测)来应答TGF-β的存在。能中和TGF-β的抗体会导致报告细胞系中产生的信号减小。评定测试剂中和TGF-β1的能力。

[0305] 将抗体3-倍滴定或以单个浓度添加,且在添加50,000个HEK-蓝TGF-β细胞之前在测试培养基(DMEM,4.5g/l葡萄糖,10%(v/v)胚胎牛类血清,50U/ml青霉素,50μg/ml链霉素,100μg/ml Normoci,2mM L-谷氨酰胺)中与人TGF-β1,2或3同种型(50pg/ml TGF-β同种型)温育30分钟,及于37℃温育16小时。通过于37℃添加Quanti Blue(Invivogen)试剂1小时且检测在630nm处的吸光度来检测响应被TGF-β活化而由细胞产生的SEAP。从含有HEK-蓝TGF-β细胞和TGF-β的孔产生最大信号,使用过量的TGF-β-中和抗体产生最小信号。

[0306] 在单点TGF-β1报告基因检定(样板3142,自孔D012)中检定含有BSN.4856的B细胞培养上清。抗体呈现TGF-β1的80%抑制。基于测定板中的最大和最小信号来计算来自浓度应答检定的百分率抑制。

[0307] 【实施例2:从B细胞克隆可变区基因和在体外检定中重组Fab活性的表达和表征】

[0308] 来自实施例1中的结合ELISA和阻断报告基因检定的数据允许就可变区恢复选择孔。为了从目标孔回收抗体可变区基因,需实施去卷积步骤,以致使在给定的孔中鉴定抗原-特异性B细胞,因为存在异源B细胞群。这使用荧光焦点方法实现(Clargo et al.,mAbs Vol.6,Iss.1,2014)。简言之,将来自阳性孔的分泌免疫球蛋白的B细胞与经生物素化的TGF-β1包被的链霉亲和素珠(New England Biolabs)和山羊抗-兔Fcγ片段-特异性FITC缀合物(Jackson ImmunoResearch)的1:1200最终稀释物混合。于37℃静态温育1小时后,由于存在围绕该B细胞的荧光晕,可鉴定抗原-特异性B细胞。然后用Eppendorf显微操作仪挑选使用Olympus显微镜鉴定的这些个体B细胞,且沉淀到PCR管。

[0309] 从单细胞由反转录(RT)-PCR,使用重链和轻链可变区-特异性引物回收抗体可变区基因。用在3'和5'端合并限制性位点的巢式2°PCR实施2轮PCR,允许将可变区克隆进兔Fab无铰链(VH)或兔κ(VL)哺乳动物表达载体。使用ExpiFectamine™ 293(Invitrogen)将重链和轻链构建体共转染进Expi-293细胞,且在1ml体积的48深孔区块或30mL尺寸的圆锥细颈瓶中表达重组抗体。在7天表达后,收获未纯化的瞬时上清,且如实施例1所述由ELISA就

结合和在报告基因检定中阻断再次测试。在ELISA中用重组4856兔Fab确认全部3种同种型的结合。序列提供于图1B。

[0310] 由亲和性捕获，使用小规模基于真空的纯化系统纯化表达的4856兔Fab分子。简言之，将来自30ml细胞培养物的上清经0.22μm无菌过滤，之后添加1ml的GammaBind Plus™珠(GE Healthcare)。然后使上清/珠混合物翻滚1小时，之后通过应用真空将上清移出。将珠用PBS洗涤，之后用0.1M甘氨酸pH 2.7洗脱。将洗脱的级分中和，且将缓冲剂更换为PBS，之后经0.22μm无菌过滤。最终分析由A280确定浓度；由SEC-UPLC(BEH200柱，Waters)确定纯度；和由PTS-Endosafe™盒系统(Charles River)确定内毒素组成。

[0311] 【实施例3：体外检定中重组兔Fab活性的表征】

[0312] 使用重组TGF-β1、2和3的HEK-SEAP-SBE报告基因检定：

[0313] 然后如实施例1所述在TGF-β报告基因检定中以针对TGF-β1、2和3的10点剂量应答测试纯化的兔Fab(n＝2)。以50pg/ml添加TGF-β1、2和3同种型。且评定抗体中和TGF-β1、2和3的能力。

[0314] 使用4参数逻辑拟合来拟合数据(图4a，4b和4c)。基于曲线的弯曲点计算IC50(表1)。

[0315] 表1.HEK-蓝TGF-β(Invivogen)报告基因检定中纯化的4856兔Fab的IC50值

[0316]

	几何平均值 IC50（nM）		
标识符	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
BSN.4856.rbFab（n=2，从 5 个独立样品）	1.77（0.04nM）	0.30（0.01nM）	24.51（0.54nM）

[0317] 纯化的兔Fab 4856分别以0.04，0.01，和0.54nM的IC50抑制TGF-β1-，TGF-β2-和TGF-β3-驱动的HEK-蓝TGF-β报告基因检定。

[0318] 内源性TGF-βBxPC3和HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定：

[0319] 开发由Bx-PC3细胞(ATCC)和HEK-蓝TGF-β细胞系(Invivogen)组成的共培养系统。BXPC-3细胞组成性产生和活化TGF-β。HEK-蓝TGF-β细胞系通过SEAP的表达(用比色检测试剂检测)来应答有活性的TGF-β的存在。能中和TGF-β的抗体会导致报告细胞系中产生的信号减小。

[0320] 在含10％FCS的DMEM中以100000个细胞/孔平铺HEK-蓝TGF-β细胞，且于37℃温育90分钟。将测试剂在含有0.2％(w/v)BSA的无血清DMEM中3-倍滴定，且添加到HEK-蓝TGF-β细胞。在含有0.2％(w/v)BSA的无血清DMEM中以50000个细胞/孔添加BxPC3细胞，且于37℃温育18小时。从含有BX-PC3和HEK-蓝TGF-β细胞的孔产生了最大信号，而使用过量的TGF-β-中和抗体产生了最小信号。通过于37℃添加QuantiBlue试剂1小时来检测SEAP，且测量在630nm处的吸光度。

[0321] 在HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定中检定纯化的4856兔Fab(n＝3)。基于检定中的最大和最小信号计算从浓度应答检定的百分率抑制，且将数据使用4参数逻辑拟合来拟合(图5)。基于曲线的弯曲点计算IC50(表2)。

[0322] 表2.BxPC3-HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定中4856兔Fab的效力结果。在3次独立实验中各测试4856兔Fab的5个不同样品。

[0323]

标识符	n	几何平均值IC50(nM)范围
BSN.4856.rbFab	3	3.7;0.8-16

[0324] BSN.4856.rbFab以3.7nM的IC50抑制BxPC3-HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定。

[0325] 4856兔Fab的亲和性

[0326] 由表面等离子体共振,使用Biacore™ T200(GE Healthcare)测定4856兔Fab对TGF-β1,2,和3同种型的亲和性。

[0327] 将TGF-β1,2,和3同种型(Peprotech)在流动池2,3和4上(分别)经胺偶联化学固定在CM5系列S芯片上至大致150RU的水平。使用HBS-EP缓冲剂(10mM HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.05％表面活性P20;GE Healthcare)作为电泳缓冲液。将4856兔Fab对全部3种同种型以各种浓度(200nM～12.5nM)以30mL/min的流速滴定。将表面通过以10μL/min的流速2×10mL注射10mM HCl来再生。

[0328] 使用Biacore™ T200评估软件(1.0版),按照标准过程分析减去背景的结合曲线。使用RI＝0的'异源配体拟合'算法测定4856兔Fab的动力学参数。动力学参数总结于表3。

[0329] TGFβ的各同种型经赖氨酸残基固定在Biacore™传感器芯片上被认为闭塞了抗体与一个结合结构域的结合,且导致次要弱相互作用(KD1)。已将数据拟合至异源模型,以解释2个独立的结合事件。更高亲和性组分(KD2)被认为表示非-闭塞的相互作用,由此是测试抗体的最有代表性的亲和性测量。

[0330] 表3.使用Biacore亲和性检定测定的4856兔Fab的亲和性,对于各组n＝5。

[0331]

	Ka1(1/M)	Kd1(1/s)	KD1(M)	ka2(1/M)	kd2(1/s)	KD2(M)
TGFb1	5.05E+04	3.18E-04	6.30E-09	4.55E+05	5.08E-05	1.12E-10
TGFb2	3.87E+04	6.55E-05	1.69E-09	6.32E+05	3.83E-04	6.06E-10

[0332]

TGFb3	6.33E+04	7.82E-04	1.24E-08	8.73E+05	1.44E-03	1.65E-09

[0333] 【实施例4:抗体4856的嵌合和人源化的移植体的产生】

[0334] 选择抗体Fab 4856而用于基于在HEK-蓝™-SBE报告基因检定和BxPC3-HEK-蓝™-SBE报告基因共培养检定中其优良的抑制性活性组合其以高亲和性结合TGF-β的全部3种同种型的能力而进行进一步优化。

[0335] 嵌合抗体4856

[0336] 将抗体4856的可变区克隆进分离的重链和轻链表达载体,且表达为人Fab(无铰链)片段。

[0337] 将VH基因(SEQ ID NO:17)克隆进含有编码具有截短的铰链和6组氨酸残基的C-端标签的人γ-1CH1恒定区(G1m17同种异型)的DNA的载体pMhFab-HIS_6。将VL基因(κ)(SEQ ID NO:13)克隆进含有编码人κ恒定区(K1m3同种异型)的DNA的载体pMhCK。

[0338] 通过将重链和轻链载体瞬时共转染进Expi293F™细胞来表达抗体。

[0339] 人源化的抗体4856

[0340] 将抗体4856通过将来自兔抗体V-区的CDR移植到人种系抗体V-区框架来进行人源

化。

[0341] 为了恢复抗体的活性,在人源化的序列中也保留来自兔V-区的许多框架残基。使用Adair等人(1991)(人源化的抗体。WO91/09967)中描述的流程选择这些残基。兔抗体(供体)V-区序列与人种系(受体)V-区序列的比对显示于图2a和2b,以及设计人源化的序列。

[0342] 从供体移植到受体序列的CDR如Kabat等人(见上)定义,除了其中使用组合的Chothia/Kabat定义的CDRH1之外(见Adair等人见上)。

[0343] 由DNA2.0In由自动化的合成方法c设计和构建编码许多变体重链和轻链V-区序列的基因。而且,通过由寡核苷酸-导向的诱变(包括,在一些情况中,在CDR内突变以修饰潜在天冬氨酸异构化位点)来修饰VH和VK基因来创建重链和轻链V-区的变体。

[0344] 将这些基因克隆进许多载体,致使在大肠埃希氏菌(E.coli)和哺乳动物细胞中人源化的4856 Fab抗体的表达。评定变体链和其组合的相对于亲本抗体的效力,生物物理学性质和对于下游处理的适应性,导致gL3轻链移植体和gH13重链移植体的选择。

[0345] 选择人V-区IGKV1-5加JK4J-区(图1I,也可获自IMGT®,www.imgt.org,最后访问时间2016年1月05日)作为抗体4856轻链CDR的受体。移植体gL3中的轻链框架残基全部来自人种系基因,除了残基1,2,3和71(Kabat编号)之外,其中分别保留供体残基丙氨酸(A1),酪氨酸(Y2),天冬氨酸(D3)和酪氨酸(Y71)。残基A1,Y2,D3和Y71的保留对于人源化的抗体的完整效力是必要的。

[0346] 选择人V-区IGHV3-21加JH5J-区(图1I,也获自IMGT®,www.imgt.org,最后访问时间2016年1月05日)作为抗体4856的重链CDR的受体。在许多兔抗体中常见,抗体4856的VH基因短于选择的人受体。当与人受体序列比对时,抗体4856的VH区的框架1缺少N-端残基,其保留在人源化的抗体中(图2b)。4856兔VH区的框架3也在β折叠片链D和E之间的环中缺少2个残基(75和76):在移植体gH13中,在间隔填补从人受体序列选择的对应残基(赖氨酸75,K75;天冬酰胺76,N76)(图2b)。移植体gH13,gH23和gH29中的重链框架残基全部来自人种系基因,除了残基48,49,73和78(Kabat编号)之外,其中分别保留供体残基异亮氨酸(I48),甘氨酸(G49),丝氨酸(S73)和缬氨酸(V78)。残基E1,V2,Q3,I48,G49,S73和V78的保留对于人源化的抗体的完整效力是必要的。

[0347] 在移植体gH20中,框架残基全部来自人种系基因,除了残基48,69,71,73和78(Kabat编号)之外,其中分别保留供体残基异亮氨酸(I48),甲硫氨酸(M69),赖氨酸(K71),丝氨酸(S73)和缬氨酸(V78)。

[0348] 将移植体gH13,gH20,gH23和gH29的CDRH3中的残基98从甘氨酸(G98)突变为丙氨酸(A98)残基,由此从gH13,gH20,gH23和gH29序列去除潜在天冬氨酸异构化位点。

[0349] 在残基N100e和G100f(图2b)的潜在天冬酰胺脱酰胺位点,通过将G100f突变为A100f来在gH23移植体中去除,且通过将N100e突变为D100e来在gH29移植体中去除。

[0350] 人源化的4856 Fab的表达

[0351] 构建原4856 Fab片段,且作为哺乳动物表达载体测试。为了达到最高产率,改变移植体的密码子利用,以适应大肠埃希氏菌(E.coli)周质表达。将移植体与历史上一贯地给出高产率的之前人源化的Fab比对,且对应密码子改变为匹配框架序列。

[0352] 为了大肠埃希氏菌(E.coli)中人源化的4856Fab的表达,将人源化的重链V-区基因(SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:96)和轻链V-区基因(SEQ ID

NO:40)克隆进含有编码人C-κ恒定区(K1m3同种异型)和人γ-1CH1区(G1m17同种异型)的DNA的UCB表达载体pTTOD。将大肠埃希氏菌(E.coli)fkpA和dsbC基因也导入表达质粒,使用IPTG来诱导Fab表达,这些伴侣蛋白的共表达被发现在流加发酵期间改善大肠埃希氏菌(E.coli)株MXE016中人源化的Fab的产生。4856Fab轻和重链和FkpA和DsbC多肽在IPTG-诱导性tac启动子的控制下全部从单多-顺反子表达。

[0353] 在大肠埃希氏菌(E.coli)产生株MXE016中,使用5ml自动诱导方法测试Fab的表达。FkpA和DsbC伴侣的组合基本上增加获得的Fab的产率。

[0354] 为了哺乳动物细胞中人源化的4856Fab的表达,将人源化的轻链V-区基因与编码人C-κ恒定区(K1m3同种异型)的DNA序列拼接,以创建连续的轻链基因(SEQ ID NO:41)。将人源化的重链V-区基因与编码人γ-1CH1区(G1m17同种异型)的DNA序列拼接,以创建连续的重链基因(SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:69,SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:97)。将重链和轻链基因克隆进哺乳动物表达载体pMXE692Cellca载体DGV 4856 gL3 gH13VL VH。

[0355] 大肠埃希氏菌(E.coli)来源的4856Fab gL3gH13的Biacore亲和性确定

[0356] 通过表面等离子体共振,使用Biacore T200(GE Healthcare)测定来测试在大肠埃希氏菌(E.coli)中根据以上描述的方法产生的抗体4856 gL3gH13的对TGF-β1,2,和3同种型的亲和性。将人TGF-β1,2,和3同种型(Peprotech)在流动池2,3和4(分别)上经胺偶联化学固定在CM5系列S芯片至大致20RU的水平。使用HBS-EP缓冲剂(10mM HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.05%表面活性P20,GE Healthcare)作为电泳缓冲液。将抗体4856 gL3gH13Fab以各种浓度(200nM～1.56nM),以30mL/min的流速对全部3种同种型滴定。将表面通过以10μL/min的流速2×10mL注射10mM HCl来再生。

[0357] 使用T200evaluation软件(1.0版;GE Healthcare),按照标准过程分析减去背景的结合曲线。如实施例3中所述,使用异源拟合算法(RI＝0)测定动力学参数,且值提供于表4。如之前表3中兔版的Fab,表4的KD2被认为表示对于抗体4856 gL3gH13Fab的未闭塞的结合值。

[0358] 表4:使用Biacore亲和性检定测定的4856人源化的Fab的亲和性,对于各组n＝4。

[0359]

TGFb同种型	ka1(1/M)	kd1(1/s)	KD1(M)	ka2(1/M)	kd2(1/s)	KD2(M)
TGFb1	7.49E+04	7.09E-04	9.48E-09	7.04E+05	5.56E-05	8.08E-11
TGFb2	5.77E+04	2.11E-04	3.67E-09	9.04E+05	1.70E-04	1.96E-10
TGFb3	9.32E+04	1.46E-03	1.57E-08	2.00E+06	3.39E-03	1.72E-09

[0360] 实施分析凝胶过滤,以测定是否抗体移植体4856 gL3gH13与包括潜伏期关联的肽的TGF-β1的全长序列结合。数据显示,抗体4856 gL3gH13不结合包括潜伏期关联的肽的全长TGF-β1(数据未显示)。

[0361] 【实施例5:人源化的移植体的体外抑制性活性】

[0362] HEK-蓝TGF-β报告基因检定中使用重组TGF-β1、2和3的抑制性活性:

[0363] 如实施例1所述,以对TGF-β1、2和3的10点剂量应答,在HEK-蓝TGF-β报告基因检定中使用重组TGF-β1、2和3分析4856人源化的移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29的抑制性活性。以50pg/ml添加TGF-β1、2和3同种型,且评定抗体中和TGF-β1、2和3的能力。数据使用4参数逻辑拟合来拟合。基于曲线的弯曲点计算IC50(表5)。如可从表5看出,人源化

的移植体,特别gL3gH13和gL3gH20在中和TGF-β1、2和3活性中有效。

[0364] 表5:外源TGF-β1、2和3同种型的抑制。

[0365]

TGF-β1	N	几何平均值(nM)	95%CI(范围其中N=<4)
4856gL3gH29	9	0.255	0.173-0.376
4856gL3gH23	8	0.41	0.313-0.538
4856gL3gH13	11	0.074	0.053-0.104
4856gL3gH20	12	0.038	0.024-0.062
TGF-β2	N	几何平均值(nM)	95%CI(范围其中N=<4)
4856gL3gH29	3	0.016	0.013-0.018(范围)
4856gL3gH23	3	0.017	0.015-0.022(范围)
4856gL3gH13	3	0.01	0.007-0.019(范围)
4856gL3gH20	5	0.011	0.010-0.027
TGF-β3	N	几何平均值(nM)	95%CI(范围其中N=<4)
4856gL3gH29	3	1.954	1.6-2.46(范围)
4856gL3gH23	4	1.987	1.21-1.88(范围)
4856gL3gH13	4	0.475	0.248-0.909
4856gL3gH20	5	0.302	0.141-0.647

[0366] 在内源性TGF-βBxPC3和HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定中的抑制性活性:

[0367] 如实施例3中所述,在BxPC3和HEK-蓝TGF-β报告基因共培养检定中分析4856人源化的移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29的抑制性活性。基于检定中的最大和最小信号而计算从浓度应答检定的百分率抑制,且数据使用4参数逻辑拟合来拟合。基于曲线的弯曲点计算IC50,且结果显示于表6。如可从表6看出,在此检定中,人源化的移植体,特别是gL3gH13,gL3gH20和gL3gH29在中和由细胞表达的且活化的TGF-β中有效。

[0368] 表6:用HEK-蓝TGF-β细胞的共培养检定中由BxPC3细胞表达的TGF-β的抑制。

[0369]

内源性检定	N	几何平均值(nM)	95%CI(范围其中N=<4)
4856gL3gH23	4	9.104	3.89-21.31
4856gL3gH29	4	3.773	0.71-20.05
4856gL3gH13	4	3.949	2.52-6.19
4856gL3gH20	3	4.626	3.01-6.41(范围)

[0370] 【实施例6:阿霉素-诱导的肾纤维化的体外模型中人源化的4856移植体的抑制性活性】

[0371] 阿霉素-诱导的肾病是良好表征的具有类似于人肾小球硬化和小管间质性纤维化的病理学特征的啮齿动物获得性肾纤维化模型。肾小球系膜细胞是涉及应答阿霉素的纤维化表型的主要细胞类型之一。建立了对阿霉素处理的纤维化应答的人体外模型,且评定此系统中抗体4856Fab的TGF-β-中和移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29调节细胞外基质(ECM)组分的沉积的能力。

[0372] 将原代人肾肾小球系膜细胞(HRMC,Innoprot)在10nM阿霉素及测试4856 Fab移植

体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29和对照Fab(0.2～6000nM的3-倍连续稀释范围)的存在下以1.6×10^{4}个细胞/cm^{2}平铺。将细胞于37℃在5％CO_2中温育6天,然后在0.25M NH_4OH/25mM Tris中裂解(于37℃经30min),且沉淀ECM在冰冷的甲醇中固定(于-20℃经30min)。由纤连蛋白(AlexaFluor488-缀合的Ebioscience 53-9869-82),胶原I和III(Millipore兔多克隆抗体AB745和AB747)和胶原IV型(Efluor660-缀合的Ebioscience 50-9871-80)的免疫染色后的高内容成像检测个体ECM组分的沉积。获取图像,且由Cellomics Arrayscan检测荧光强度。在Fab的缺失下,从含有阿霉素-处理的细胞的孔产生了最大信号,而在细胞未暴露于阿霉素的孔中获得了最小信号。

[0373] 基于检定中的最大和最小荧光强度计算从浓度应答检定的百分率抑制,且数据使用4参数逻辑拟合来拟合。显示的图像和点是3次重复实验的代表。

[0374] 图6显示由HRMC响应10nM阿霉素且在指定浓度的TGF-β-中和4856 Fab移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29或对照Fab的存在下ECM沉积的代表性的图像。

[0375] 图7显示阿霉素体外检定中4856 Fab移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29的代表性的浓度应答曲线。

[0376] 4种测试的TGF-β-中和Fab移植体抑制由HRMC的阿霉素-诱导的ECM沉积(表7)。

[0377] 表7:阿霉素-诱导的肾纤维化模型中由4856 Fab移植体gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29的ECM沉积的抑制(自3次重复实验的几何平均值)。

[0378]

4856 Fab移植体	纤连蛋白		胶原 I&III		胶原 IV	
	几何平均值IC50（nM）	范围（n=3）	几何平均值IC50（nM）	范围（n=3）	几何平均值IC50（nM）	范围（n=3）
gL3gH29	105.96	49.3-190.1	90.10	40.2-178.1	22.93	6.0-50.7
gL3gH23	227.29	40.6-1387.7	198.35	110.4-540.2	44.86	24.8-99.8
gL3gH13	57.30	32.9-118.6	57.94	31.0-87.7	10.39	9.2-11.8
gL3gH20	104.84	52.1-329.4	33.86	16.8-60.2	16.65	8.3-51.0

[0379] 注意,一些曲线的上和下渐近线在最小或最大值固定。

[0380] 【实施例7:体外人肺间质纤维化模型中人源化的4856移植体的抑制性活性】

[0381] 上皮损伤和成纤维细胞活化是纤维化处理期间导致ECM蓄积的关键事件。为了建立体外肺间质纤维化模型,使用从IPF患者分离的原代人小气道上皮细胞(SAEpCs,ATCC)和肺成纤维细胞(ATCC)开发检定。上皮细胞培养基中这2种细胞类型的共培养甚至在另外的刺激缺失下诱导显著的ECM沉积,允许抗-纤维化剂的研究。

[0382] 每cm^2(总3.6×10^{4}个细胞/cm^2)平铺1.8×10^{4}个原代人小气道上皮细胞(SAEpCs)和等同数量的IPF肺成纤维细胞,且于37℃,在5％CO_2中共培养7天。将4856 Fab移植体gL3gH13,和对照Fab在0.03～1000nM范围内3-倍滴定。7天共培养后,用Presto蓝评定细胞活力,然后将细胞在0.25M NH_4OH/25mM Tris中裂解(于37℃经30min),且将沉淀的ECM在冰冷的甲醇中固定(于-20℃经30min)。通过对纤连蛋白和胶原I,III,IV和V型免疫染色后高内容成像来检测个体ECM组分的沉积。获取图像,且由Cellomics Arrayscan检测荧光强度。在未处理的共培养中产生了最大信号,而使用过量Fab产生了最小信号。

[0383] 基于检定中的最大和最小信号而计算自浓度应答检定的百分率抑制,且数据使用

4参数逻辑拟合来拟合。基于曲线的弯曲点计算IC50。显示的图像和点是3次重复实验的代表。

[0384] 图8显示在指定浓度的4856 Fab移植体gL3gH13和对照Fab的存在下由SAEpC和IPF成纤维细胞共培养的ECM沉积的图像。

[0385] 图9显示人肺共培养检定中4856 Fab移植体gL3gH13和对照Fab的浓度应答曲线。

[0386] 表7显示肺共培养检定中由4856 Fab移植体gL3gH13的ECM沉积的抑制的效力结果(自3次重复实验的几何平均值)

[0387]

ECM蛋白	几何平均值IC50（nM）（范围）n=3
	4856 gL3gH13
纤连蛋白	2.42（1.6-3.9）
胶原I & III	2.66（2.3-3.2）
胶原IV	2.91（2.1-5.5）
胶原V	2.70（1.8-4.5）

[0388] SAEpCs和IPF成纤维细胞的共培养中ECM沉积被4856 Fab移植体gL3gH13抑制。

[0389] 【实施例8:体外人肾纤维化模型中人源化的4856移植体的抑制性活性】

[0390] 在用TGF-β1、2或3刺激的人肾近端管状上皮细胞(RPTEC)的单-培养物和人肾近端管状上皮细胞(RPTEC)与人肾成纤维细胞(HRF)的共培养物(无刺激)上使用额外细胞基质(ECM)蓄积检定来评定4856 Fab gL3gH13在人原代肾细胞中抑制纤连蛋白和胶原沉积的能力。

[0391] 人肾近端管状上皮细胞(RPTEC,Innoprot)和人肾成纤维细胞(HRF,InnoProt),在0.1～100μg/mL(0.2-2000nM)的抗-TGF-β抗体(gL3gH13 Fab)或对照Fab和10ng/ml TGF-β1(Peprotech),TGF-β2(R&D)或TGF-β3(R&D)的存在下(对于RPTEC的单-培养),或无外源TGF-β(无刺激)(对于RPTEC和HRF的共培养),以50μL的最终体积,在肾上皮细胞基础培养基+0.5%Fcs和补充物(ATCC)中,以2,000个细胞/孔(共培养中1:1的比)接种在384-孔黑色底部透明的平板(Corning)中。

[0392] 于37℃在5％CO_2中温育7天后,将细胞在PBS中洗涤,且于37℃,用20μl 0.25M NH4OH/25mM Tris裂解15分钟。将基质在PBS中洗涤3次,于-20℃在40μl 100％甲醇中固定30分钟,且在PBS中洗涤3次,之后使用抗-纤连蛋白(eBiosciences),抗-胶原I(Millipore),抗-胶原III(Millipore),抗-胶原IV(eBiosciences)和抗-胶原V(Abcam)抗体染色。将平板在Cellomics Arrayscan HC读取器上,在“cellomics CellHealth”表征生物应用和具有2×2Binning(1104×1104像素/视野)的10x物镜(新×1照相机)下,使用3-通道流程扫描。

[0393] 尽管胶原IV读数产生了数据,结果由于无法接受的检定窗和变异性而排除。

[0394] 结果显示于表9和图10a,b,c和d和图11a和b,其中显示,gL3gH13 Fab能在RPTEC单培养系统中抑制TGF-β1、2和3诱导的纤连蛋白和胶原I,III和V的蓄积,且在RPTEC和HRF共培养系统中抑制由内源性地产生的TGF-β诱导的纤连蛋白和胶原I,III和V的蓄积。

[0395] 表9:gL3gH13的IC50和几何平均IC50(nM)(N＝3):

[0396]

标志物	抗体	单-培养+ TGFB1				单-培养+ TGFB2				单-培养+ TGFB3				共培养		
		N=1	N=2	N=3	几何平均值	N=1	N=2	N=3	几何平均值	N=1	N=2	N=3	几何平均值	N=1	N=2	几何平均值
纤连蛋白	gL3gH13	12.6	57.4	9.8	19.2	0.16	0.76	0.22	0.30	51.5	140.0	76.8	82.1	32.6	27.1	29.7
胶原 I &III	gL3gH13	5.1	13.8	19.8	11.2	<2	0.60	0.13	0.30	64.3	123.8	67.2	81.2	22.4	48.0	32.8
胶原 V	gL3gH13	13.1	92.1	69.4	43.7	0.52	10.5	5.29	3.1	140.8	336.3	146.6	190.8	38.9	81.6	56.3

[0397] 【实施例9:体内鼠肺纤维化模型】

[0398] (i)7天攻击

[0399] 急性博来霉素-诱导的肺损伤模型涉及将糖肽博来霉素直接局部施用到小鼠肺。此诱导与纤溶酶原活化物抑制物-1(PAI-1)的增加关联的炎性应答,且最终导致肺部纤维化。PAI-1受TGF-β转录调控,且可作为有力的纤维发生性介质诱导炎性细胞的募集和细胞外基质(ECM)的沉积(Ghosh and Vaughan,2012,J Cell Physiol,227:493-507)。

[0400] 任何测试抗-TGF-β Fab限制纤维发生诸如PAI-1抑制的效应提供直接递送到肺的泛-特异性抗-TGF-β阻断性Fab是人中肺部纤维化的有活力的治疗剂的支持性证据。

[0401] 将4856 Fab移植体(人源化的)经鼻内(i.n)途径直接局部施用到小鼠肺。在博来霉素攻击(或者,.p;0.05U/小鼠)1小时之前和6小时后给C57/BL6小鼠施用4856gL3gH13或4856gL3gH29(i.n;200μg/小鼠)。小鼠随后每12小时接收4856gL3gH13或4856gL3gH29(i.n;200μg/小鼠),直到将它们在第7天处死。处死后立即收集气管肺泡灌洗液(BAL),且由ELISA测定总PAI-1浓度。由单因素ANOVA对比博来霉素处理的对照组实施统计学分析。

[0402] 此2种4856Fab(4856gL3gH13和4856gL3gH29)的施用结果显示于图12。图12展示,相比盐水攻击的对照小鼠,用博来霉素攻击的小鼠的BAL中PAI-1水平大大提升,且当直接递送到肺时,人源化的Fab 4856gL3gH13和4856gL3gH29能分别抑制博来霉素-诱导的PAI-1×49%和64%。

[0403] 在第二研究中,在博来霉素攻击(或者,.p;0.05U/小鼠)1小时之前和6小时之后给C57/BL6小鼠施用人源化的4856gL3gH13(i.n;20,60,200μg/小鼠)。小鼠随后每12小时接收4856gL3gH13,直到在第7天将它们处死。处死后立即收集BAL,且由ELISA测定总PAI-1浓度。由单因素ANOVA对比博来霉素处理的对照组实施统计学分析。*p≤0.05,**p≤0.005,***p≤0.0005,****p≤0.00005。

[0404] 为了展示此系统中4856gL3gH13的更优功效,图13例证不同剂量的4856gL3gH13对博来霉素-诱导的PAI-1的效应。如之前显示,博来霉素诱导BAL PAI-1水平的增加,其可因使用200μg/小鼠i.n 4856gL3gH13而被显著地抑制达76%,且因使用60μg/小鼠i.n 4856gL3gH13而被显著地抑制达45%。

[0405] 这展示,局部递送的(i.n)4856gL3gH13显著地抑制急性博来霉素-诱导的PAI-1,且局部抑制肺中的TGF-β,潜在地避免不需要的系统性事件是可能的。

[0406] (ii)28天攻击

[0407] 博来霉素攻击的更长期效应导致肺部纤维化,因此用预防性地从第1天起以及从博来霉素攻击的第13天起施剂的鼠源化的4856gL3gH13(下文中称为4856)在小鼠中实施类似研究28天。4856的此随后施用允许在起始治疗之前在肺中变得更完全建立纤维化。

[0408] 由肺中ECM沉积和成肌纤维细胞分化的衰减评定4856对博来霉素-诱导的肺部纤维化的影响。在石蜡-包埋的肺组织中,通过使用Picro Sirius Red(PSR)对胶原进行染色来组织学测定ECM沉积。此被消化的肺组织中的羟脯氨酸水平的更多定量分析支持。羟脯氨酸是胶原的主要组分,且可用于估计组织中胶原的量。此外,使用对α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的免疫组织化学(IHC)染色来测定成肌纤维细胞(被认为是负责肺中胶原沉积的主要细胞类型)数。此外,也由IHC测定磷酸化的-Mothers against decapentaplegic同源物2和3(p-Smad2/3)的抑制,以展示TGFβ信号传导通路被4856的特异性抑制。相比分配的博来霉素攻击的对照组而使用未配对的t检验测定全部统计学。*p＝0.05;**p＝0.01;***p＝0.001;****p＝0.0001。

[0409] (a)4856改善肺中博来霉素-诱导的胶原沉积

[0410] 从第1-28天用4856处理

[0411] 将小鼠(雄性c57BL/6;n＝8/组)用盐水(i.t,50μL)或博来霉素(i.t,50μL;0.5mg/mL)处理28天。此外,从第1-28天,将小鼠每天用媒质(i.n,25μL)或4856(i.n,25μL;400μg/小鼠)处理两次。

[0412] 从第13-28天用4856的处理

[0413] 将小鼠(雄性c57BL/6;n＝8/组)用盐水(i.t,50μL)或博来霉素(i.t,50μL;0.5mg/mL)处理12或28天。此外,从第13-28天,将小鼠每天用媒质(i.n,25μL)或4856(i.n,25μL;400μg/小鼠)处理两次。

[0414] 检定

[0415] 将整个左叶在4%福尔马林中固定6小时,且在石蜡中包埋。切出5μm切片,且用PSR染色。使用Nikon Eclipse 80i显微镜(Nikon,Badhoevedorp,Netherlands)捕获图像,且使用ImageJ(V.1.42q,National Institutes of Health,USA)分析每只小鼠最少4个视野中的纤维化面积。经羟脯氨酸检定测定右肺(奇叶,心叶和横膈膜叶)的3个下叶中胶原蛋白的量。于120℃在6M HCl中消化3小时后,用6M NaOH将样品的pH调整到6。然后将0.06M氯胺T添加到各样品,且于室温温育20分钟。接下来,添加3.15M高氯酸和20%p-二甲基氨基苯甲醛,且将样品于60℃温育另外的20分钟。用Spectra MAX 190微平板分光光度计测定在557nm处的吸光度。

[0416] 结果

[0417] 相比用气管内(i.t)滴注盐水(0.9%NaCl,博来霉素的溶剂)处理的对照小鼠,使用微-喷雾器(50μL;0.5mg/mL)气管内(i.t)滴注博来霉素诱导了显著的肺部纤维化。这被增强的PSR染色和肺中提升的羟脯氨酸含量证实(图14和15)。此外,相比在12天后,在28天后这些纤维化变化更显著(图15),提示经时进展的纤维化的严重性。

[0418] 从第1-28天用4856处理(25μL i.n;400μg/小鼠;每天两次)导致PSR(图14A)和肺中羟脯氨酸含量(图14B)显著减小。这提示,4856可防止博来霉素-诱导的肺部纤维化。此外,在第28天观察到,相比媒质处理的小鼠,从第13-28天向博来霉素攻击的小鼠施用4856显著地限制PSR(图15A)和羟脯氨酸(图15B)的进行性增加。这提示,当已证实纤维化后,4856能限制疾病的进展。

[0419] (b)4856改善肺中博来霉素-诱导的成肌纤维细胞分化

[0420] 将小鼠(雄性c57BL/6;n＝8/组)用盐水(i.t,50μL)或博来霉素(i.t,50μL;0.5mg/

mL)处理12或28天。此外,从第1-28天或13-28,将小鼠每天用媒质(i.n,25μL)或4856(i.n,25μL;400μg/小鼠)处理两次。通过α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达表征成肌纤维细胞。通过与单克隆抗-αSMA抗体(克隆1A4,Sigma-Aldrich,Steinheim,德国)温育来检测对于α-SMA的成纤维细胞阳性。将表达用辣根过氧化物酶标记的第二抗体和3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)(Sigma-Aldrich)可视化。将单克隆小鼠IgG抗体(Calbiochem,San Diego,CA,USA)用于同种型对照。每只小鼠评价4个不同视野。

[0421] 博来霉素的施用也诱导了肺中成肌纤维细胞分化增加,通过由IHC而α-SMA的表达来表征(图16)。图16A例证,通过从第1-28天i.n施用4856而抑制了肺中的博来霉素-诱导的成肌纤维细胞分化。此外,尽管博来霉素处理的第12和28天之间α-SMA表达未显著增加,从第13-28天4856的施用也导致了成肌纤维细胞分化的显著衰减。此外,这减少到低于单独处理博来霉素12天后观察到的α-SMA表达水平,提示在此时间点纤维化过程的可能的反转(图16B)。

[0422] (c)4856抑制肺中博来霉素-诱导的TGF-β信号传导。

[0423] 将小鼠(雄性c57BL/6;n=8/组)用盐水(i.t,50μL)或博来霉素(i.t,50μL;0.5mg/mL)处理12或28天。此外,从第1-28天或13-28,将小鼠每天用媒质(i.n,25μL)或4856(i.n,25μL;400μg/小鼠)处理两次。将肺切片用山羊抗-pSmad2/3抗体(Santa Cruz Biotechnology,Heidelberg,德国)和I型胶原抗体(Abcam,Cambridge,UK)染色。使用HRP-缀合的-或Alexa Fluor抗体(Life Technologies,Darmstadt,德国)作为第二抗体。不相关的同种型匹配作为对照的抗体。将核使用DAPI(Santa Cruz Biotechnology)染色。将染色使用Nikon Eclipse 80i显微镜(Nikon,Badhoevedorp,Netherlands)可视化。每只小鼠在3个不同视野评定1型胶原阳性细胞中pSmad2/3的表达。

[0424] 相比盐水处理的对照,博来霉素-诱导的肺纤维化在第12天且在第28天以更大程度与1型胶原阳性细胞中pSmad2/3表达增加关联(图17B)。从第1-28天(图17A)和从第13-28天(图17B)用4856处理显著地抑制pSmad2/3表达至比盐水处理的对照小鼠还低,提示TGFβ-依赖性Smad2/3磷酸化被4856完全阻断。此外,从第13-28天施剂的4856可逆转博来霉素(加媒质)攻击12天后观察到的pSmad2/3表达的博来霉素-诱导的增加,这与见于成肌纤维细胞分化的效应关联。

[0425] (d)总结

[0426] 4856在博来霉素-诱导的肺部纤维化的鼠模型中发挥有力的抗-纤维化效应,且改善了胶原沉积(PSR染色),胶原蓄积(羟脯氨酸检定),成肌纤维细胞分化(α-SMA表达),和规范TGF-β信号传导的活化(pSmad2/3表达)中的组织变化。此外,4856在从第1-28天预防性地施剂或作为已证实纤维化变化后从第13-28天干预时被证明有效。此支持局部抑制肺中TGFβ,潜在地避免不需要的系统性事件是可能的假说。

[0427] 【实施例10:人源化的4856 Fab移植体的生物物理学分析】

[0428] 使抗体4856:gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23,gL3gH29的人源化的移植体经历一系列生物化学和生物物理学分析,以筛选和选择用于开发和施用稳定性的最稳健的分子。分析包括特征诸如T_m(在未折叠的中-点的熔解温度);实验pI,和在空气-液体界面的聚集稳定性(生产和雾化稳定性中剪切应力的模拟);和脱酰胺倾向的比较。

[0429] 热稳定性测量(T_m)

[0430] 实施基于荧光的热移位检定(而且,指称为热荧光检定),以获得T_m(在未折叠的中-点的温度),以评定纯化的分子的热稳定性。反应混合物含有5μl的用PBS从5000×浓储物溶液稀释的30×SYPRO®橙染料(Invitrogen)和45μl的0.12mgml^{-1}的样品(在PBS中pH 7.4)。将10μl的混合物以一式四份分注进384PCR光学孔板,且在7900HT Fast实时PCR系统(Applied Biosystems)上运行。将PCR系统加热装置以1.1℃min^{-1}的变温速度设为20℃～99℃。电荷耦合装置监测孔中的荧光变化。标绘强度增加,用斜率的弯曲点产生T_m。

[0431] 由热荧光检定测定T_m(在未折叠的中点的温度)。在此方法中,使用SYPRO橙(荧光染料)来通过与热渐变期间暴露的疏水区结合来监测未折叠过程。更高T_m值等于更大分子稳定性和对可展性和雾化应激的稳健性。

[0432] 如所预期,对于全部分子观察到一个未折叠结构域,相当的于Fab未折叠的结构域。结果总结于表10。

[0433] 基于熔解温度对分子排序是可能的:gL3gH13被显示具有最高熔解温度,在HCCDR3(gL3gH29)中用D109G取代N109G导致熔解温度降低2℃,且gL3gH23和gL3gH20呈现出熔解温度进一步降低2℃。gL3gH13具有79℃的最高熔解温度,这使其成为用于经雾化向肺局部递送的优良的候选物,其中Fab需在雾化之后保留足够的生物学活性。

[0434] 表10:T_m分析:热荧光测定:gL3gH13＞gL3gH29＞gL3gH20＝gL3gH23

[0435]

抗体4856 Fab移植体	Tm℃
gL3gH13	79.0
gL3gH20	75.3
gL3gH23	75.7
gL3gH29	77.0

[0436] 变体的实验pI和电荷分析

[0437] 使用全-毛细管成像的cIEF ICE3系统(ProteinSimple)分析纯化的样品。通过混合下列物质制备样品:30μl样品(从HPLC级水中1mg/ml浓储物),35μl的1%甲基纤维素溶液(蛋白简单),4μl pH3-10ampholyte(Pharmalyte),0.5μl的4.65和0.5μl 9.77合成pI标志物(ProteinSimple),12.5μl的8M脲溶液(Sigma-Aldrich)。使用HPLC级水使得最终体积达到100μl。将混合物短暂涡旋,以确保完全混合,且以10,000rpm离心3分钟来在分析前去除气泡。将样品以1.5kV聚焦1分钟,之后是以3kV聚焦5分钟,且使用ProteinSimple软件获取毛细管的A_{280}图像。首先使用iCE3软件分析得到的电泳图谱,且分配pI值(pI标志物之间的线性关系)。然后使用Empower软件(Waters)整合校准的电泳图谱。

[0438] 全部领先的候选物的pI高(见表11),使得以预期的制剂pH分子不可能具有大致0的总体分子电荷(其中有增加的聚集风险)。实验pI被发现对于全部分子类似,由此无法在它们之间相区别。

[0439] 表11:实验pI

[0440]

	实验pI
gL3gH13	9.34
gL3gH20	9.25

gL3gH23	9.34
gL3gH29	9.10

[0441] 在空气-液体界面的聚集倾向

[0442] 将PBS中1mg ml^{-1}的纯化的样品(3×250μl等分)(pH 7.4)于25℃,以1400rpm,在1.5ml eppendorf中,使用Eppendorf Mixmate涡旋。在涡旋后的各时间-点,通过使用分光光度计(Varian)获得595nm处的吸光度来分析样品的浊度产生。对比时间标绘数据。

[0443] 通过涡旋使全部领先的候选物经历应激,以提供在空气-液体界面的聚集稳定性方面的信息。这用于模拟生产期间的剪切以及雾化期间的潜在稳定性。由595nm处的浊度测量直至144小时来监测聚集稳定性。聚集速度慢(低吸光度值),且移植体之间观察不到差异。

[0444] 脱酰胺状态Asn(N)109(重链CDR3)的分析。

[0445] 对于gL3gH13,gL3gH20(两个N109G)和gL3gH23(N109A),重链CDR3中存在脱酰胺基序。在此位点的化学不稳定性可导致产物异质性和免疫原性。移植体gL3gH29在此位点具有D109G(脱酰氨基化的产物),以测试作为候选物的适应性,同时最小化脱酰胺的风险。

[0446] 纯化后立即由(i)胰蛋白酶消化/肽标位/质量光谱法和(ii)毛细管成像的等电聚焦(ICE3)测定对于gL3gH13,gL3gH20和gL3gH23重链CDR3中N109处的基础百分率脱酰胺。通过使3种分子经历已知促进脱酰胺的加速的应激条件(pH 8,37℃)来测定N109位点脱酰氨基化(氨的损失;酸性种的产生)的速度/倾向。

[0447] (i)质量光谱法

[0448] 将等分(50μg)用DTT还原,用碘乙酰胺烷基化,然后用胰蛋白酶(1:20w/w)于室温消化过夜。通过注射到用0.2%甲酸/水平衡的C18柱(1x 150mm BEH-300)来分析消化(～2μg)。将得到的肽以20μL/分钟,用乙腈梯度洗脱进以+ve-离子模式操作的Thermo融合质谱仪。数据依赖性获取(DDA)由orbitrap全扫描(120000分辨率)之后是最强前体的HCD片段化和离子阱测量组成。使用Thermo Pepfinder分析MS数据,以匹配针对抗体的预期的序列获取的谱。

[0449] 在gL3gH13和gL3gH20中位点N109G(重链CDR3)的脱酰胺(氨损失)的百分率基础水平类似(～4%),然而对于gL3gH23,在N109A未观察到脱酰胺。

[0450] 加速的应激(pH 8、于4℃和37℃经2周)后,任何Fab移植体的脱酰胺水平均无变化(表12)。

[0451] 总之,N109G被N109A取代而产生具有潜在地更低脱酰胺风险的gL3gH23。但是,由于对于全部基础水平低,且加速的应激后无增加的倾向,全部分子具有适合于治疗性候选物的脱酰胺水平。

[0452] 表12:加速的应激之前和之后的百分率脱酰胺(pH 8)。

[0453]

	gL3gH13	gL3gH20	gL3gH23	gL3gH29
位点(重链CDR3)	N109G	N109G	N109A	D109G
T0(基础水平)	4.70%	4.10%	未检测到	未检测到
2周/4℃	4.40%	4.00%	未检测到	未检测到
2周/37℃	3.40%	2.40%	未检测到	未检测到

[0454] (ii)毛细管成像的等电聚焦(ICE3)

[0455] 如上所述为了pI测量而实施ICE3,且结果显示在加速的应激之前和之后(pH 8),%带电的种中在gL3gH13,gL3gH20,gL3gH23和gL3gH29移植体之间无显著差异。

[0456] 【实施例11:人源化的4856 Fab移植体gL3gH13的雾化研究】

[0457] 利用调查研究性PARI eFlow®雾化器(PARI Pharma GmBh,Grafeling,德国)测定对通过Fab 4856移植体gL3gH13(下文称为4856)的雾化发挥的剪力的聚集稳定性。大肠埃希氏菌(E.coli)在稀释至标称浓度20mg/mL,50mg/mL和80mg/mL的pH 6.0缓冲剂和稀释至标称浓度20mg/mL和50mg/mL的pH 7.4缓冲剂中以～100mg/mL表达Fab 4856。

[0458] 将不同浓度的4856样品的预过滤的/无菌样品(～1.0mL)和缓冲剂使用eFlow®雾化器雾化。

[0459] (i)雾化对浓度的效应

[0460] 使用Varian Cary 50-Bio UV/Vis分光光度计测量稀释的样品(在280nm处＜1AU)。使用1.72AU的消光系数(280nm,1mg/mL,和1cm途径长度)计算浓度。

[0461] 雾化之前和之后的样品之间未观察到浓度(mg/mL)差异。

[0462] (ii)尺寸排阻HPLC(SEC HPLC)

[0463] 此分析监测可溶性聚集物和片段化的物质的产生。

[0464] 将样品稀释至1mg/mL(25μL注射体积)或5mg/mL(20μL注射体积)。使用与Agilent 1100系统连接的TSK G3000SW(7.7mm I.Dx30.0cm)柱实施分析,对30℃使用0.2M磷酸钠(pH 7)以1.0mL/min无梯度地洗脱17分钟。在280nm处监测峰。

[0465] 在存在于雾化之前和雾化之后的物质中的高分子量种(HMW)的百分率中未观察到差异。因此雾化不导致可溶性聚集物的产生。无任何低分子量物质的证据,因此作为雾化结果未观察到片段化。

[0466] (iii)动态光散射(DLS)

[0467] 此分析监测大分子量种(会由SEC HPLC柱基质过滤的不溶性颗粒物)的产生。由动态光散射,使用Malvern Nano ZS仪器测试包含组氨酸和氯化钠的缓冲剂(pH 6.0)中的Fab 4856。

[0468] 在雾化之前和之后的样品中来自达50mg/mL的4856的强度粒度分布表征(SDP)的主要峰强度(%)中未观察到差异。关于百分率聚-分散性(%PD),强度分布对更大分子量物质(散射与分子量的平方成比例)重度加权,且当将其转变为描述存在的多种物质的相对比例的体积分布时,观察到达50mg/mL的最小不显著的变化。

[0469] (iv)SDS PAGE(非-还原性和还原性条件)

[0470] 此分析监测包含组氨酸和NaCl的缓冲剂(pH 6.0)中聚集/片段化的产生。

[0471] 对于非-还原性条件,将10μl的1mg/mL的样品与10μl的Tris/甘氨酸SDS样品缓冲剂(2x,Invitrogen)和2μl的100mM N-乙基马来酰亚胺混合;于100℃加热2分钟。

[0472] 对于还原性条件,将10μl的1mg/mL的样品与10μl的Tris/甘氨酸SDS样品缓冲剂(2x,Invitrogen)和2μl的DTT(10x Invitrogen)混合;于100℃加热3分钟。

[0473] 离心后,将10μL(4.5μg)的各样品装载到Novex Tris/甘氨酸(4-20%)凝胶(Invitrogen)上,且以125mV(恒定电压)电泳100分钟。条带由考马斯蓝可视化。

[0474] 在达20mg/mL的雾化之前和之后的样品之间未观察到差异。

[0475] (vi)体外检定中有功能。

[0476] 在20,50和80mg/mL的组氨酸pH 6.0,NaCl中实施此分析。

[0477] 如实施例3中所述进行使用重组TGF-β1的HEK-蓝TGF-β报告基因检定。

[0478] 在任何浓度的雾化之前和之后的样品之间未观察到IC50的显著差异。

[0479] (v)在呼吸模拟中雾化的抗体的气雾剂表征

[0480] 此分析使用PARI**eFlow®**雾化器监测了50mg/mL浓度的Fab 4856(pH 6.0)的滴尺寸以及递送的剂量和雾化时间。简言之,将雾化器与鼻窦泵连接,且在吸气收集过滤器上收集含有雾化的物质的气雾剂滴。使用成年人呼吸模式,具有以15次呼吸/分钟的500ml的潮汐体积和50:50的吸入:呼出比。完成后,洗涤收集过滤器而提取雾化的物质,将其由HPLC分析(表13)。

[0481] 表13.来自使用2个不同雾化器头的呼吸模拟实验的数据。

[0482]

质量中位直径(MMD)	2.9 μm		3.7 μm	
	平均	SD(n=6)	平均	SD(n=6)
雾化时间(min)	14.10*(反冲洗后:5.75)	5.00	3.62	0.34
DD(mg)	71.5	5.5	66.4	3.5
DD(%)	68.0	5.1	63.5	3.4
残留物(mg)	14.7	3.2	22.9	2.1
残留物(%)	14.0	3.1	21.9	2.0
RD<5μm(mg)	66.6	5.0	52.1	4.3
RD<5μm(%)	63.4	4.6	49.8	4.2
RD<3.3μm(mg)	45.2	4.9	25.7	3.1
RD<3.3μm(%)	43.1	4.7	24.6	2.9
DDR(mg/min)	2.2	1.2	20.8	3.3
DDR(%/min)	2.1	1.1	19.9	3.2

[0483] 由呼吸模拟实验测定递送的剂量(DD)。DD[%]是68%(2.9μm MMD)和64%(3.7μm MMD),其被判断为是典型的好结果,由于DD值很少超过70%。残留物是14%(2.9μm MMD)和21.9%(3.7μm MMD),其也在典型范围内。可呼吸的剂量<5μm(RD<5μm)是63%(2.9μm MMD)对比50%(3.7μm MMD)。粒径影响递送至呼吸道通路的不同区,且RD<5μm对应于肺泡递送。

[0484] 这些数据确认通过雾化递送4856 Fab的适应性。

[0485] 【实施例12:X-射线晶体学结构】

[0486] 将抗体4856用TGF-β1结晶化而测定抗体接触的氨基酸残基。

[0487] (i)样品制备

[0488] 通过添加30μl 2M Tris pH8来将2ml的在5mM HCl中的2.25mg/ml的成熟TGF-β1调整至pH7。于室温温育1hr后,通过离心去除沉淀,留下2.1mg/ml的2ml。以1:1.1的TGF-β1:Fab的近似的摩尔比向其添加0.46ml的32mg/ml(14.7mg)的Fab4856gL3gH13。将其置于室温1hr,然后装载到在50mM NaCl,25mM Tris,5%甘油,pH 7.5中预平衡的S20016/160柱。将复

合物的峰级分合并,且浓缩至10mg/ml用于晶体学。

[0489] (ii)结晶

[0490]

结晶实验类型	坐滴,蒸气扩散
结晶条件	0.1M柠檬酸磷酸钠pH4.2,40%PEG300
蛋白浓度	10mg/ml
滴体积/比	0.4μl蛋白+0.4μl贮器
晶体生长时间	8-21天
凝冰保护	从滴收获晶体,且在10s内在液氮(-180℃)中速冻。

[0491] 使用获自Qiagen的各种条件(大致2000个条件)实施筛选。由Formulatrix RockImager 1000实施温育和成像(21天的总温育时期)。

[0492] (iii)数据收集和结构精制

[0493]

X-射线源	金刚石同步加速器
实验类型	振荡
波长	0.92819Å
处理软件	Mosflm
分辨率限制	40-2.48
空间群	$P6_522$
单元细胞	a = 114.0Å，b = 114.0Å，c = 289.5Å
参数	α = 90°，β = 90°，γ = 120°
完全性	99.9（100.0）
多重性	18.3（19.0）
I/σ(I)	20.1（3.7）
$R_{合并}$	11.2%（83.2 %）
反射数	741045（109123）
独特反射数	40392（5758）
评论	

结构确定方法	分子取代
使用的程序	Phaser
结构模板	内部人 Fab，3KFD
精制程序	Refmac
分辨率限制	40-2.48
R 因素	22.18%
自由 R 因素	25.14%
非-氢原子数	4175
RMSD 键长度	0.0205 Å
RMSD 键角	2.057°
Ramachandran 偏好的	515（94.5%）
Ramachandran 离群值	2（0.37%）
评论	使用 Coot 重建

[0494] 与4856gL3gH13 Fab相互作用的TGF-β1残基显示于图18A和18B。4856gL3gH13 Fab在覆盖受体结合区的区结合，提示被4856gL3gH13 Fab的受体阻断是通过竞争由更优亲和性有效的抗-TGF-β1。也测试了含有轻链中苏氨酸被天冬酰胺取代(SEQ ID NO:45的第5位)的4856gL3H13的变体，且发现不导致结构变化。

[0495] 类似地，将单链抗体形式的抗体4856(scFv 4856，SEQ ID NO:108)用TGF-β2(SEQ ID NO:116)结晶化，以测定抗体接触的氨基酸残基。与scFv 4856相互作用的TGF-β2残基显示于图18C，显示结合对于TGF-β1的Fab结合显示的相同的区。

序列表

<110> UCB Biopharma sprl

<120> 结合人TGF-β1、人TGF-β2和人TGF-β3的拮抗性抗体及其用于治疗肺纤维化的用途

<130> PF0037-WO

<150> GB1610044.8

<151> 2016-06-08

<160> 118

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL1

<400> 1

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL2

<400> 2

Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL3

<400> 3

Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDRH1
<400> 4
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser
1 5 10
<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDRH2
<400> 5
Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDRH3
<400> 6
Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu
1 5 10 15
<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDRH3 var1
<400> 7
Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu
1 5 10 15
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3 var 2
<400> 8
Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala Tyr Ser Leu
1 5 10 15
<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDRH3 var3
<400> 9
Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly Tyr Ser Leu
1 5 10 15
<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 VL
<400> 10
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
85 90 95
Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110
<210> 11
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 兔 4856 VL
<400> 11
gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg cctggtatca gcagacacca 120
gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct gcatccgatc tggcatctgg ggtcccatcg 180
cgattcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atggtggtat tgataatcct 300
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330
<210> 12
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 VL区,其带信号序列
<400> 12
Met Asn Met Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30
Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys
130
<210> 13
<211> 396
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 兔 4856 VL,其带信号序列

<400> 13

atgaacatga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtgagagc atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag 180
acaccagggc agcgtcccaa gctcctgatc tatgctgcat ccgatctggc atctggggtc 240
ccatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg tggtattgat 360
aatcctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaa 396

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔 4856 VH

<400> 14

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

<210> 15

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔 4856 VH

<400> 15

cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60
tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga gctgggtccg ccaggctcca 120
gggaaggggc tggaatggat cggaatcatt tatggtggta gtggtagcac atggtacgcg 180
agctgggcga aaggccgatt caccatgtcc aaaacgtcga ccacggtgga tctgaaaatc 240
accagtccga cgaccgagga catggccacc tatttctgtg ccagaggacg ggatggtggt 300
gctggtggtt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt caccgtctcg 360
agt 363

<210> 16
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 VH,其带信号序列
<400> 16

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp
85 90 95
Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110
Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
115 120 125
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 17
<211> 420
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 VH,其带信号序列
<400> 17

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga cacccctgac actcacctgc 120
acagcctctg gattctccct cagcagctac gacatgagct gggtccgcca ggctccaggg 180
aaggggctgg aatggatcgg aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc 240
tgggcgaaag gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cggtggatct gaaaatcacc 300
agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga tggtggtgct 360
ggtggttctc gtaatggcta ttccttgtgg ggccaaggca ccctggtcac cgtctcgagt 420

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 轻链
<400> 18

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
85 90 95
Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110
Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val
115 120 125
Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro
130 135 140
Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly
145 150 155 160
Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn
165 170 175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys
180 185 190
Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Asp Cys
210

<210> 19
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 轻链
<400> 19

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg cctggtatca gcagacacca 120
gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct gcatccgatc tggcatctgg ggtcccatcg 180
cgattcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atggtggtat tgataatcct 300
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgtacgccag ttgcacctac tgtcctcatc 360
ttcccaccag ctgctgatca ggtggcaact ggaacagtca ccatcgtgtg tgtggcgaat 420
aaatactttc ccgatgtcac cgtcacctgg gaggtggatg gcaccaccca aacaactggc 480
atcgagaaca gtaaaacacc gcagaattct gcagattgta cctacaacct cagcagcact 540
ctgacactga ccagcacaca gtacaacagc cacaaagagt acacctgcaa ggtgacccag 600
ggcacgacct cagtcgtcca gagcttcaat aggggtgact gt 642

<210> 20
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 轻链,其带信号序列
<400> 20

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

85 90 95
Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys Arg Thr Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val
145 150 155 160
Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly
165 170 175
Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser
180 185 190
Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr
195 200 205
Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr
210 215 220
Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
225 230 235

<210> 21
<211> 708
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 轻链,其中信号序列加下划线
<400> 21
atgaacatga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtgagagc atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag 180
acaccagggc agcgtcccaa gctcctgatc tatgctgcat ccgatctggc atctggggtc 240
ccatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg tggtattgat 360
aatcctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaacgta cgccagttgc acctactgtc 420
ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg 480
gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca 540
actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaaggtg 660
acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgt 708
<210> 22

<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 Fab 重链
<400> 22

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80
Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
85 90 95
Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val
130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser
165 170 175
Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val
180 185 190
Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
210 215

<210> 23
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 兔 4856 Fab 重链

<400> 23

cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60
tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga gctgggtccg ccaggctcca 120
gggaaggggc tggaatggat cggaatcatt tatggtggta gtggtagcac atggtacgcg 180
agctgggcga aaggccgatt caccatgtcc aaaacgtcga ccacggtgga tctgaaaatc 240
accagtccga cgaccgagga catggccacc tatttctgtg ccagaggacg ggatggtggt 300
gctggtggtt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt caccgtctcg 360
agtgggcaac ctaaggctcc atcagtcttc ccactggccc cctgctgcgg ggacacaccc 420
agctccacgg tgaccctggg ctgcctggtc aaaggctacc tcccggagcc agtgaccgtg 480
acctggaact cgggcaccct caccaatggg gtacgcacct tcccgtccgt ccggcagtcc 540
tcaggcctct actcgctgag cagcgtggtg agcgtgacct caagcagcca gcccgtcacc 600
tgcaacgtgg cccacccagc caccaacacc aaagtggaca agaccgtt 648

<210> 24

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 兔 4856 Fab 重链,其中信号序列加下划线

<400> 24

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp
85 90 95
Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110
Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
115 120 125
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys
130 135 140
Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser

145 150 155 160
Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro
165 170 175
Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr
180 185 190
Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205
Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His
210 215 220
Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225 230 235

<210> 25
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 兔 4856 Fab 重链,其带信号序列
<400> 25
atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga cacccctgac actcacctgc 120
acagcctctg gattctccct cagcagctac gacatgagct gggtccgcca ggctccaggg 180
aaggggctgg aatggatcgg aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc 240
tgggcgaaag gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cggtggatct gaaaatcacc 300
agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga tggtggtgct 360
ggtggttctc gtaatggcta ttccttgtgg ggccaaggca ccctggtcac cgtctcgagt 420
gggcaaccta aggctccatc agtcttccca ctggcccccc gctgcgggga cacacccagc 480
tccacggtga ccctgggctg cctggtcaaa ggctacctcc cggagccagt gaccgtgacc 540
tggaactcgg gcaccctcac caatggggta cgcaccttcc cgtccgtccg gcagtcctca 600
ggcctctact cgctgagcag cgtggtgagc gtgacctcaa gcagccagcc cgtcacctgc 660
aacgtggccc acccagccac caacaccaaa gtggacaaga ccgtt 705
<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mL1.1 V-区
<400> 26
Ala Tyr Asp Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

<210> 27
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mL1.1 V-区
<400> 27
gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct cccttggcga caccatcacc 60
attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg cctggtatca gcagaaaccg 120
gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca 180
cggttcaagg ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaaccc 240
gaggatattg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct 300
ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag 330
<210> 28
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mL1.1 V-区,其带信号序列
<400> 28
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15
Asp Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser
35 40 45
Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp
100 105 110
Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125
Ile Lys
130

<210> 29
<211> 390
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mL1.1 V-区,其带信号序列
<400> 29
atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgccagatgc 60
gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct cccttggcga caccatcacc 120
attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg cctggtatca gcagaaaccg 180
gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca 240
cggttcaagg ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaaccc 300
gaggatattg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct 360
ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag 390
<210> 30
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mH2.1 V-区
<400> 30
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala

50 55 60

Lys Gly Lys Phe Ile Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mH2.1 V-区
<400> 31
gaggtcaagc tgctggaatc gggggggaggt ctggtgcagc cgggcggatc tctgaagctg 60
tcatgcaccg catccgggtt tagcctttcg tcctacgaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggaaagg gattggaatg gatcggcatt atctacgggg gctccggttc cacttggtac 180
gcgagctggg ccaaggggaa gttcatcatg tcgaaggact ccgctaagaa caccgtgtac 240
ctccaaatga gcaaagtccg gagcgaggat atggccacct atttctgcgc ccggggaagg 300
gacggaggag ccggcggttc cagaaacggc tactcactgt ggggacaggg caccctcgtg 360
actgtctcga gt 372
<210> 32
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mH2.1 V-区,其带信号序列
<400> 32
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala

65 70 75 80
Ser Trp Ala Lys Gly Lys Phe Ile Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn
85 90 95
Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Met Ala Thr
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn
115 120 125
Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 33
<211> 429
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠源化的4856 mH2.1 V-区,其带信号序列
<400> 33
atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctgag 60
gtcaagctgc tggaatcggg gggaggtctg gtgcagccgg gcggatctct gaagctgtca 120
tgcaccgcat ccgggtttag cctttcgtcc tacgacatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
ggaaagggat tggaatggat cggcattatc tacgggggct ccggttccac ttggtacgcg 240
agctgggcca aggggaagtt catcatgtcg aaggactccg ctaagaacac cgtgtacctc 300
caaatgagca aagtccggag cgaggatatg gccacctatt tctgcgcccg gggaagggac 360
ggaggagccg gcggttccag aaacggctac tcactgtggg gacagggcac cctcgtgact 420
gtctcgagt 429

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠IGKV15-103 JK1 接受体框架
<400> 34
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠IGKV15-103 JK1 接受体框架
<400> 35
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccttggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠IGHV4-S1 JH3 接受体框架
<400> 36
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ala

<210> 37

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠IGHV4-S1 JH3 接受体框架

<400> 37

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgattttagt agatactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat 180
acgccatctc taaaggataa attcatcatc tccagagaca acgccaaaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagatggttt 300
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4856 gL3 V-区

<400> 38

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

<210> 39

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区 (哺乳动物表达)
<400> 39
gcctacgaca tgacccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga tcgcgtgacc 60
atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtctgg cctggtatca gcagaagcca 120
gggaaggcac ctaagctgtt gatctacgcg gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc 180
cggttctccg gctccggaag cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg 240
gatgacttcg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaacccg 300
tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag 330
<210> 40
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 40
gcgtatgata tgacccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg cgtggtatca gcaaaaaccg 120
ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg gcgtccgatc tggcgagcgg tgtgccaagc 180
cgtttcagtg gcagcggcag cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg 240
gatgatttcg ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcat tgataacccg 300
ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa 330
<210> 41
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区,其带信号序列
<400> 41
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
20 25 30
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr
35 40 45
Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
50 55 60
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
85 90 95
Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp
100 105 110
Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 42
<211> 384
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区,其带信号序列
<400> 42
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta ctccgcctac 60
gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg gagatcgcgt gaccatcact 120
tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag 180
gcacctaagc tgttgatcta cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccggttc 240
tccggctccg gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac 300
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa cccgtttggt 360
ggaggcacca aagtcgagat taag 384

<210> 43
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 43
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile

85 90 95
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr
100 105 110
Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys
130

<210> 44
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 44
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
gctgcgtatg atatgaccca gagtccaagc accctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtcaggccag tgaaagcatc tatagcggcc tggcgtggta tcagcaaaaa 180
ccgggcaaag ccccgaagct gctcatctat gcggcgtccg atctggcgag cggtgtgcca 240
agccgtttca gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag 300
ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgatggcgg cattgataac 360
ccgttcggtg gcggcactaa agtagaaatc aaa 393

<210> 45
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链
<400> 45
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly

85 90 95
Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 46
<211> 651
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链 (哺乳动物表达)
<400> 46
gcctacgaca tgacccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga tcgcgtgacc 60
atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtctgg cctggtatca gcagaagcca 120
gggaaggcac ctaagctgtt gatctacgcg gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc 180
cggttctccg gctccggaag cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg 240
gatgacttcg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaacccg 300
tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag cgtacggtag cggccccatc tgtcttcatc 360
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651
<210> 47
<211> 651
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4856 gL3 轻链 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 47
gcgtatgata tgacccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg cgtggtatca gcaaaaaccg 120
ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg gcgtccgatc tggcgagcgg tgtgccaagc 180
cgtttcagtg gcagcggcag cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg 240
gatgatttcg ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcat tgataacccg 300
ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa cgtacggtag cggccccatc tgtcttcatc 360
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
catcagggcc tgagctcacc agtaacaaaa agttttaata gaggggagtg t 651
<210> 48
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链,其带信号序列
<400> 48
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
20 25 30
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr
35 40 45
Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
50 55 60
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
85 90 95
Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp
100 105 110
Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 49
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 49
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta ctccgcctac 60
gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg gagatcgcgt gaccatcact 120
tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag 180
gcacctaagc tgttgatcta cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccggttc 240
tccggctccg gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac 300
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa cccgtttggt 360
ggaggcacca aagtcgagat taagcgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 50
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 50
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr
100 105 110
Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 51
<211> 714
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gL3 轻链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 51
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
gctgcgtatg atatgaccca gagtccaagc accctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtcaggccag tgaaagcatc tatagcggcc tggcgtggta tcagcaaaaa 180

ccgggcaaag ccccgaagct gctcatctat gcggcgtccg atctggcgag cggtgtgcca 240
agccgtttca gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag 300
ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgatggcgg cattgataac 360
ccgttcggtg gcggcactaa agtagaaatc aaacgtacgg tagcggcccc atctgtcttc 420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc accagtaaca aaaagtttta atagagggga gtgt 714

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区
<400> 52

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

<210> 53
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区 (哺乳动物表达)
<400> 53

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372

<210> 54
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 54
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372

<210> 55
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 55

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

85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 56
<211> 426
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 56
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagc 426

<210> 57
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 57
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser
145

<210> 58
<211> 435
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH13 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 58
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac ggctatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagc 435

<210> 59
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链
<400> 59
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys
225

<210> 60
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链 (哺乳动物表达)
<400> 60

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 61
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 61

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 62
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 62

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

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 63
<211> 735
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 63
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735

<210> 64
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 64

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 65
<211> 744
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH13 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 65

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac ggctatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
aagaaagttg agcccaaatc ttgt 744

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区
<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区
<400> 67
gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372
<210> 68
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 68
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372
<210> 69
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4856gH20 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 69

```
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1               5                  10                  15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
            20                  25                  30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
        35                  40                  45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    50                  55                  60
Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65                  70                  75                  80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser
                85                  90                  95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
        115                 120                 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 70
<211> 426
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 70

```
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggatttc catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagc 426
```

<210> 71
<211> 145
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 71

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser
145

<210> 72
<211> 435
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH20 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 72

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaat gggtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagc 435

<210> 73
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链
<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys
225

<210> 74
<211> 681

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (哺乳动物表达)
<400> 74
gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681
<210> 75
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 75
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681
<210> 76
<211> 245
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4856 gH20 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)

<400> 76

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 77

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 77
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggccccggg 180
aagggcctgg agtggatttc catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735
<210> 78
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 78
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser

115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 79
<211> 744
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH20 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 79
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctcttcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaat gggtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
aagaaagttg agcccaaatc ttgt 744
<210> 80
<211> 124

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH23 V-区
<400> 80

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

<210> 81
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH23 V-区
<400> 81

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372

<210> 82
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4856gH23 V-区 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 82
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372
<210> 83
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH23 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 83
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 84
<211> 426
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4856gH23 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 84
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagc 426
<210> 85
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH23 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 85
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Ala Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser
145
<210> 86

<211> 435
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH23 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 86
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac gcgtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagc 435
<210> 87
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1)
<400> 87
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys
225

<210> 88
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (哺乳动物表达)
<400> 88
gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 89
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 89
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 90
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 90

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 91
<211> 735
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 91
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735
<210> 92
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 92
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Ala Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 93
<211> 744
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH23 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 93
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60

gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac gcgtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
aagaaagttg agcccaaatc ttgt 744

<210> 94
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区
<400> 94

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

<210> 95
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4856gH29 V-区 (哺乳动物表达)
<400> 95
gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcgacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372
<210> 96
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 96
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372
<210> 97
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 97
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 98
<211> 426
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 98
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagc 426
<210> 99
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 99
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser
145

<210> 100
<211> 435
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856gH29 V-区,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 100
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcgat gggtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagc 435
<210> 101
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1)
<400> 101
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys
225

<210> 102
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (哺乳动物表达)
<400> 102

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcgacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360

actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 103
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链 (V + 人γ-1 CH1) (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 103
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaatcttg t 681

<210> 104
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 104

```
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1               5                  10                  15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
            20                  25                  30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
        35                  40                  45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
```

50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 105
<211> 735
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链,其带信号序列 (哺乳动物表达)
<400> 105

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420

tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735

<210> 106
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 106

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 107
<211> 744
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 gH29 Fab 重链,其带信号序列 (大肠埃希氏菌(E. coli)表达)
<400> 107
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcgat gggtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
aagaaagttg agcccaaatc ttgt 744

<210> 108
<211> 262
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4856 scFv
<400> 108
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
145 150 155 160
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
165 170 175
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
195 200 205
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
210 215 220
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
225 230 235 240
Ile Asp Asn Pro Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
245 250 255
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
260

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人IGKV1-5 JK4 接受体框架
<400> 109
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

<210> 110
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人IGKV1-5 JK4 接受体框架
<400> 110
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 111
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人IGHV3-21 JH5 接受体框架
<400> 111
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 112
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人IGHV3-21 JH5 接受体框架
<400> 112
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaactgg 300
ttcgactcct ggggccaagg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 113
<211> 361
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LAP和TGFb1
<400> 113
Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30
Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45
Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60
Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80
Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95
Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg

100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu

115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys

130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg

165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala

180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn

195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met

210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln

225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys

245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp

260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr

275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp

290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro

325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn

340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

355 360

<210> 114

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 成熟的人TGFb1

<400> 114

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

<210> 115

<211> 394

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人LAP和TGFb2

<400> 115

Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu Thr Ser
20 25 30
Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val Ile
35 40 45
Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser Arg
50 55 60
Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Pro Phe Phe Pro Ser Glu Asn
85 90 95
Ala Ile Pro Pro Thr Phe Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg Phe
100 105 110
Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala Glu
115 120 125
Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu Gln

130 135 140

Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser Pro
145 150 155 160
Thr Gln Arg Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly
165 170 175
Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His
180 185 190
His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile Ser Leu His Cys Pro Cys
195 200 205
Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser Glu
210 215 220
Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Thr
225 230 235 240
Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys Lys Asn Ser Gly
245 250 255
Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Tyr Arg Leu Glu
260 265 270
Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr
275 280 285
Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile
290 295 300
Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly
305 310 315 320
Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser
325 330 335
Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro
340 345 350
Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu
355 360 365
Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser
370 375 380
Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 116
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 成熟的人TGFb2

<400> 116

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

<210> 117

<211> 389

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人LAP和TGFb3

<400> 117

Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys Lys Lys Arg
1 5 10 15
Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Thr Ser
20 25 30
Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His Val Pro Tyr Gln Val Leu Ala
35 40 45
Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His Gly Glu Arg
50 55 60
Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr Tyr Ala Lys
65 70 75 80
Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu His Asn Glu
85 90 95
Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe Arg Phe Asn
100 105 110
Val Ser Ser Val Glu Lys Asn Arg Thr Asn Leu Phe Arg Ala Glu Phe
115 120 125
Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn Glu Gln Arg

130 135 140
Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile Ala Lys Gln
145 150 155 160
Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr Ala Glu Trp
165 170 175
Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu Leu Arg Arg
180 185 190
Glu Ser Asn Leu Gly Leu Glu Ile Ser Ile His Cys Pro Cys His Thr
195 200 205
Phe Gln Pro Asn Gly Asp Ile Leu Glu Asn Ile His Glu Val Met Glu
210 215 220
Ile Lys Phe Lys Gly Val Asp Asn Glu Asp Asp His Gly Arg Gly Asp
225 230 235 240
Leu Gly Arg Leu Lys Lys Gln Lys Asp His His Asn Pro His Leu Ile
245 250 255
Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu Asp Asn Pro Gly Gln Gly Gly
260 265 270
Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu
275 280 285
Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp
290 295 300
Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe
305 310 315 320
Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser
325 330 335
Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser
340 345 350
Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr
355 360 365
Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys
370 375 380
Ser Cys Lys Cys Ser
385

<210> 118
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 成熟的人TGFb3

<400> 118

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

Ab 4856

CDRL1

QASESIYSGLA SEQ ID NO: 1

CDRL2

AASDLAS SEQ ID NO: 2

CDRL3

QQTWTDGGIDNP SEQ ID NO: 3

CDRH1

GFSLSSYDMS SEQ ID NO: 4

CDRH2

IIYGGSGSTWYASWAKG SEQ ID NO: 5

CDRH3

GRDGGAGGSRNGYSL SEQ ID NO: 6

CDRH3 变体 1– 存在于 gH13 和 gH20

GRDAGAGGSRNGYSL SEQ ID NO: 7

CDRH3 变体 2– 存在于 gH23

GRDAGAGGSRNAYSL SEQ ID NO: 8

CDRH3 变体 3– 存在于 gH29

GRDAGAGGSRDGYSL SEQ ID NO: 9

图1A

兔 Ab 4856 VL 区 SEQ ID NO: 10

AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IKCQASESIY SGLAWYQQTP GQRPKLLIYA
ASDLASGVPS RFKGSGSGTE YTLTISGVEC ADAATYYCQQ TWTDGGIDNP
FGGGTEVVVK

兔 Ab 4856 VL 区 SEQ ID NO: 11

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg
cacagtcacc atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg
cctggtatca gcagacacca gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct
gcatccgatc tggcatctgg ggtcccatcg cgattcaaag gcagtggatc
tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtgt gccgatgctg
ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atggtggtat tgataatcct
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa

兔 Ab 4856 VL 区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 12

*MNMRAPTQLL GLLLLWLPGA RC*AYDMTQTP ASVEVAVGGT VTIKCQASES
IYSGLAWYQQ TPGQRPKLLI YAASDLASGV PSRFKGSGSG TEYTLTISGV
ECADAATYYC QQTWTDGGID NPFGGGTEVV VK

兔 Ab 4856 VL 区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 13

atgaacatga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct
*cccaggtgcc agatgt*gcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg
aggtagctgt gggaggcaca gtcaccatca agtgccaggc cagtgagagc
atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag acaccagggc agcgtcccaa
gctcctgatc tatgctgcat ccgatctggc atctggggtc ccatcgcgat
tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg
tggtattgat aatcctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaa

兔 Ab 4856 VH 区 SEQ ID NO: 14

QSLEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLSS YDMSWVRQAP GKGLEWIGII
YGGSGSTWYA SWAKGRFTMS KTSTTVDLKI TSPTTEDMAT YFCARGRDGG
AGGSRNGYSL WGQGTLVTVS S

兔 Ab 4856 VH 区 SEQ ID NO:15

cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct

图1B

gacactcacc tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga
gctgggtccg ccaggctcca gggaaggggc tggaatggat cggaatcatt
tatggtggta gtggtagcac atggtacgcg agctgggcga aaggccgatt
caccatgtcc aaaacgtcga ccacggtgga tctgaaaatc accagtccga
cgaccgagga catggccacc tatttctgtg ccagaggacg ggatggtggt
gctggtggtt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt
caccgtctcg agt

兔 Ab 4856 VH 区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 16

METGLRWLLL VAVLKGVQCQ SLEESGGRLV TPGTPLTLTC TASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTMSK TSTTVDLKIT
SPTTEDMATY FCARGRDGGA GGSRNGYSLW GQGTLVTVSS

兔 Ab 4856 VH 区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 17

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt
*ccagtgt*cag tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga
caccctgac actcacctgc acagcctctg gattctccct cagcagctac
gacatgagct gggtccgcca ggctccaggg aaggggctgg aatggatcgg
aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc tgggcgaaag
gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cggtggatct gaaaatcacc
agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga
tggtggtgct ggtggttctc gtaatggcta ttccttgtgg ggccaaggca
ccctggtcac cgtctcgagt

兔 Ab 4856 轻链 (V+恒定区) SEQ ID NO: 18

AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IKCQASESIY SGLAWYQQTP GQRPKLLIYA
ASDLASGVPS RFKGSGSGTE YTLTISGVEC ADAATYYCQQ TWTDGGIDNP
FGGGTEVVVK RTPVAPTVLI FPPAADQVAT GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW
EVDGTTQTTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST LTLTSTQYNS HKEYTCKVTQ
GTTSVVQSFN RGDC

兔 Ab 4856 轻链 (V+恒定区) SEQ ID NO: 19

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg
cacagtcacc atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg
cctggtatca gcagacacca gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct
gcatccgatc tggcatctgg ggtcccatcg cgattcaaag gcagtggatc
tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtgt gccgatgctg
ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atggtggtat tgataatcct
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgtacgccag ttgcacctac
tgtcctcatc ttcccaccag ctgctgatca ggtggcaact ggaacagtca
ccatcgtgtg tgtggcgaat aaatactttc ccgatgtcac cgtcacctgg
gaggtggatg gcaccaccca aacaactggc atcgagaaca gtaaaacacc

图1B(续)

gcagaattct gcagattgta cctacaacct cagcagcact ctgacactga
ccagcacaca gtacaacagc cacaaagagt acacctgcaa ggtgacccag
ggcacgacct cagtcgtcca gagcttcaat aggggtgact gt

兔 Ab 4856 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 20

*MNMRAPTQLL GLLLLWLPGA RC*AYDMTQTP ASVEVAVGGT VTIKCQASES
IYSGLAWYQQ TPGQRPKLLI YAASDLASGV PSRFKGSGSG TEYTLTISGV
ECADAATYYC QQTWTDGGID NPFGGGTEVV VKRTPVAPTV LIFPPAADQV
ATGTVTIVCV ANKYFPDVTV TWEVDGTTQT TGIENSKTPQ NSADCTYNLS
STLTLTSTQY NSHKEYTCKV TQGTTSVVQS FNRGDC

兔 Ab 4856 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 21

atgaacatga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct
*cccaggtgcc agatgt*gcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg
aggtagctgt gggaggcaca gtcaccatca agtgccaggc cagtgagagc
atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag acaccagggc agcgtcccaa
gctcctgatc tatgctgcat ccgatctggc atctggggtc ccatcgcgat
tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg
tggtattgat aatcctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaacgta
cgccagttgc acctactgtc ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg
gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg gcgaataaat actttcccga
tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca actggcatcg
agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac
ctgcaaggtg acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg
gtgactgt

兔 Ab 4856 Fab 重链 SEQ ID NO: 22

QSLEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLSS YDMSWVRQAP GKGLEWIGII
YGGSGSTWYA SWAKGRFTMS KTSTTVDLKI TSPTTEDMAT YFCARGRDGG
AGGSRNGYSL WGQGTLVTVS SGQPKAPSVF PLAPCCGDTP SSTVTLGCLV
KGYLPEPVTV TWNSGTLTNG VRTFPSVRQS SGLYSLSSVV SVTSSSQPVT
CNVAHPATNT KVDKTV

兔 Ab 4856 Fab 重链 SEQ ID NO: 23

cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct
gacactcacc tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga
gctgggtccg ccaggctcca gggaaggggc tggaatggat cggaatcatt
tatggtggta gtggtagcac atggtacgcg agctgggcga aaggccgatt
caccatgtcc aaaacgtcga ccacggtgga tctgaaaatc accagtccga

图1B(续)

cgaccgagga catggccacc tatttctgtg ccagaggacg ggatggtggt
gctggtggtt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt
caccgtctcg agtgggcaac ctaaggctcc atcagtcttc ccactggccc
cctgctgcgg ggacacaccc agctccacgg tgaccctggg ctgcctggtc
aaaggctacc tcccggagcc agtgaccgtg acctggaact cgggcaccct
caccaatggg gtacgcacct tcccgtccgt ccggcagtcc tcaggcctct
actcgctgag cagcgtggtg agcgtgacct caagcagcca gcccgtcacc
tgcaacgtgg cccacccagc caccaacacc aaagtggaca agaccgtt

兔Ab 4856 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 24

METGLRWLLL VAVLKGVQCQ SLEESGGRLV TPGTPLTLTC TASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTMSK TSTTVDLKIT
SPTTEDMATY FCARGRDGGA GGSRNGYSLW GQGTLVTVSS GQPKAPSVFP
LAPCCGDTPS STVTLGCLVK GYLPEPVTVT WNSGTLTNGV RTFPSVRQSS
GLYSLSSVVS VTSSSQPVTC NVAHPATNTK VDKTV

兔Ab 4856 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO: 25

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt
*ccagtgt*cag tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga
cacccctgac actcacctgc acagcctctg gattctccct cagcagctac
gacatgagct gggtccgcca ggctccaggg aaggggctgg aatggatcgg
aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc tgggcgaaag
gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cggtggatct gaaaatcacc
agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga
tggtggtgct ggtggttctc gtaatggcta ttccttgtgg ggccaaggca
ccctggtcac cgtctcgagt gggcaaccta aggctccatc agtcttccca
ctggcccccc gctgcgggga cacacccagc tccacggtga ccctgggctg
cctggtcaaa ggctacctcc cggagccagt gaccgtgacc tggaactcgg
gcaccctcac caatggggta cgcaccttcc cgtccgtccg gcagtcctca
ggcctctact cgctgagcag cgtggtgagc gtgacctcaa gcagccagcc
cgtcacctgc aacgtggccc acccagccac caacaccaaa gtggacaaga
ccgtt

图1B(续)

鼠源化的4856 mL1.1 V-区 SEQ ID NO:26

AYDMNQSPSS LSASLGDTIT ITCQASESIY SGLAWYQQKP GNIPKLLIYA
ASDLASGVPS RFKGSGSGTE YTLTISSLQP EDIATYYCQQ TWTDGGIDNP
FGGGTKLEIK

鼠源化的4856 mL1.1 V-区 SEQ ID NO:27

gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct cccttggcga
caccatcacc attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg
cctggtatca gcagaaaccg gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc
gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca cggttcaagg ggtccggatc
gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaaccc gaggatattg
cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct
ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag

鼠源化的4856 mL1.1 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO:28

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC AYDMNQSPSS LSASLGDTIT ITCQASESIY
SGLAWYQQKP GNIPKLLIYA ASDLASGVPS RFKGSGSGTE YTLTISSLQP
EDIATYYCQQ TWTDGGIDNP FGGGTKLEIK

鼠源化的4856 mL1.1 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO:29

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga
tgccagatgc gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct
cccttggcga caccatcacc attacttgcc aagcctccga aagcatctac
tccggactcg cctggtatca gcagaaaccg gggaacattc ccaagctcct
gatctacgcc gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca cggttcaagg
ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaaccc
gaggatattg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat
cgacaaccct ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag

鼠源化的4856 mH2.1 V-区 SEQ ID NO:30

EVKLLESGGG LVQPGGSLKL SCTASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGKFIM SKDSAKNTVY LQMSKVRSED MATYFCARGR
DGGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSS

鼠源化的4856 mH2.1 V-区 SEQ ID NO:31

gaggtcaagc tgctggaatc ggggggaggt ctggtgcagc cgggcggatc
tctgaagctg tcatgcaccg catccgggtt tagcctttcg tcctacgaca
tgtcctgggt gcgccaggcc cccggaaagg gattggaatg gatcggcatt
atctacgggg gctccggttc cacttggtac gcgagctggg ccaaggggaa
gttcatcatg tcgaaggact ccgctaagaa caccgtgtac ctccaaatga
gcaaagtccg gagcgaggat atggccacct atttctgcgc ccggggaagg
gacggaggag ccggcggttc cagaaacggc tactcactgt ggggacaggg
caccctcgtg actgtctcga gt

图1C

鼠源化的4856 mH2.1 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO:32

*MEWSWVFLFF LSVTTGVHS*E VKLLESGGGL VQPGGSLKLS CTASGFSLSS
YDMSWVRQAP GKGLEWIGII YGGSGSTWYA SWAKGKFIMS KDSAKNTVYL
QMSKVRSEDM ATYFCARGRD GGAGGSRNGY SLWGQGTLVT VSS

鼠源化的4856 mH2.1 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示 SEQ ID NO:33

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
*ccattct*gag gtcaagctgc tggaatcggg gggaggtctg gtgcagccgg
gcggatctct gaagctgtca tgcaccgcat ccgggtttag cctttcgtcc
tacgacatgt cctgggtgcg ccaggccccc ggaaagggat tggaatggat
cggcattatc tacgggggct ccggttccac ttggtacgcg agctgggcca
aggggaagtt catcatgtcg aaggactccg ctaagaacac cgtgtacctc
caaatgagca aagtccggag cgaggatatg gccacctatt tctgcgcccg
gggaagggac ggaggagccg gcggttccag aaacggctac tcactgtggg
gacagggcac cctcgtgact gtctcgagt

小鼠 IGKV15-103 JK1 接受体框架 SEQ ID NO:34

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ITCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIYK
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPWTFGG
GTKLEIK

小鼠 IGKV15-103 JK1 接受体框架 SEQ ID NO:35

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga
cacaattacc atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa
gctggtacca gcagaaacca ggaaatattc ctaaactatt gatctataag
gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca aggtttagtg gcagtggatc
tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct gaagacattg
ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccttggac gttcggtgga
ggcaccaagc tggaaatcaa a

小鼠 IGHV4-S1 JH3 接受体框架 SEQ ID NO:36

EVKLLESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFDFS RYWMSWVRQA PGKGLEWIGE
INPDSSTINY TPSLKDKFII SRDNAKNTLY LQMSKVRSED TALYYCARWF
AYWGQGTLVT VSA

小鼠 IGHV4-S1 JH3 接受体框架 SEQ ID NO:37

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc
cctgaaactc tcctgtgcag cctcaggatt cgattttagt agatactgga
tgagttgggt ccggcaggct ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa
attaatccag atagcagtac gataaactat acgccatctc taaaggataa
attcatcatc tccagagaca acgccaaaaa tacgctgtac ctgcaaatga
gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagatggttt
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtctctgca

图1C(续)

4856 gL3 V-区 SEQ ID NO:38

AYDMTQSPST LSASVGDRVT ITCQASESIY SGLAWYQQKP GKAPKLLIYA
ASDLASGVPS RFSGSGSGTE YTLTISSLQP DDFATYYCQQ TWTDGGIDNP
FGGGTKVEIK

4856 gL3 V-区（哺乳动物表达） SEQ ID NO:39

gcctacgaca tgacccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga
tcgcgtgacc atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtctgg
cctggtatca gcagaagcca gggaaggcac ctaagctgtt gatctacgcg
gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc cggttctccg gctccggaag
cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg gatgacttcg
cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaacccg
tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag

4856 gL3 V-区(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:40

gcgtatgata tgacccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg
cgtggtatca gcaaaaaccg ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg
gcgtccgatc tggcgagcgg tgtgccaagc cgtttcagtg gcagcggcag
cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg gatgatttcg
ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcat tgataacccg
ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa

4856 gL3 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示（哺乳动物表达）
SEQ ID NO:41

*MKWVTFISLL FLFSSAYS*AY DMTQSPSTLS ASVGDRVTIT CQASESIYSG
LAWYQQKPGK APKLLIYAAS DLASGVPSRF SGSGSGTEYT LTISSLQPDD
FATYYCQQTW TDGGIDNPFG GGTKVEIK

4856 gL3 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示（哺乳动物表达）
SEQ ID NO:42

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta
*ctcc*gcctac gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg
gagatcgcgt gaccatcact tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt
ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag gcacctaagc tgttgatcta
cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccggttc tccggctccg
gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa
cccgtttggt ggaggcacca aagtcgagat taag

图1D

4856 gL3 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:43

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*AYDMTQSPS TLSASVGDRV TITCQASESI
YSGLAWYQQK PGKAPKLLIY AASDLASGVP SRFSGSGSGT EYTLTISSLQ
PDDFATYYCQ QTWTDGGIDN PFGGGTKVEI K

4856 gL3 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:44

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
*cgtagcgcaa gct*gcgtatg atatgaccca gagtccaagc accctctccg
ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcaggccag tgaaagcatc
tatagcggcc tggcgtggta tcagcaaaaa ccgggcaaag ccccgaagct
gctcatctat gcggcgtccg atctggcgag cggtgtgcca agccgtttca
gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag
ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgatggcgg
cattgataac ccgttcggtg gcggcactaa agtagaaatc aaa

4856 gL3 轻链(V+恒定区) SEQ ID NO:45

AYDMTQSPST LSASVGDRVT ITCQASESIY SGLAWYQQKP GKAPKLLIYA
ASDLASGVPS RFSGSGSGTE YTLTISSLQP DDFATYYCQQ TWTDGGIDNP
FGGGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
HQGLSSPVTK SFNRGEC

4856 gL3 轻链(V+恒定区)(哺乳动物表达) SEQ ID NO: 46

gcctacgaca tgacccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga
tcgcgtgacc atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtctgg
cctggtatca gcagaagcca gggaaggcac ctaagctgtt gatctacgcg
gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc cggttctccg gctccggaag
cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg gatgacttcg
cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaacccg
tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag cgtacggtag cggccccatc
tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct
ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac
agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc
tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg
t

4856 gL3轻链(V+恒定区)(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:47

图1D(续)

gcgtatgata tgacccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg
cgtggtatca gcaaaaaccg ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg
gcgtccgatc tggcgagcgg tgtgccaagc cgtttcagtg gcagcggcag
cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg gatgatttcg
ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcat tgataacccg
ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa cgtacggtag cggccccatc
tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct
ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac
agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc
tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc
catcagggcc tgagctcacc agtaacaaaa agttttaata gaggggagtg
t

4856 gL3 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO: 48

*MKWVTFISLL FLFSSAYS*AY DMTQSPSTLS ASVGDRVTIT CQASESIYSG
LAWYQQKPGK APKLLIYAAS DLASGVPSRF SGSGSGTEYT LTISSLQPDD
FATYYCQQTW TDGGIDNPFG GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT
ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

4856 gL3 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO: 49

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta
*ctcc*gcctac gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg
gagatcgcgt gaccatcact tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt
ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag gcacctaagc tgttgatcta
cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccggttc tccggctccg
gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa
cccgtttggt ggaggcacca aagtcgagat taagcgtacg gtagcggccc
catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt
cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag
agtgt

4856 gL3 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:50

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*AYDMTQSPS TLSASVGDRV TITCQASESI
YSGLAWYQQK PGKAPKLLIY AASDLASGVP SRFSGSGSGT EYTLTISSLQ

图1D(续)

PDDFATYYCQ QTWTDGGIDN PFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

4856 gL3 轻链，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:51

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
*cgtagcgcaa gct*gcgtatg atatgaccca gagtccaagc accctctccg
ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcaggccag tgaaagcatc
tatagcggcc tggcgtggta tcagcaaaaa ccgggcaaag ccccgaagct
gctcatctat gcggcgtccg atctggcgag cggtgtgcca agccgtttca
gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag
ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgatggcgg
cattgataac ccgttcggtg gcggcactaa agtagaaatc aaacgtacgg
tagcggcccc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa
tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga
ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc
aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc
ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc accagtaaca aaaagtttta
atagagggga gtgt

图1D(续)

4856gH13 V-区 SEQ ID NO:52

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSS

4856gH13 V-区(哺乳动物表达) SEQ ID NO:53

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gc

4856gH13 V-区(大肠埃希氏菌表达)SEQ ID NO:54

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gc

4856gH13 V-区,其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:55

*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQGTLVTV SS

4856gH13 V-区,其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:56

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag

图1E

atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagc

4856gH13 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:57

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTL VTVSS

4856gH13 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:58

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac ggctatagcc
tgtggggaca ggggacccct gtgacagtct cgagc

4856 gH13 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) SEQ ID NO:59

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH13 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (哺乳动物表达) SEQ ID NO:60

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

图1E(续)

4856 gH13 Fab 重链(V+人 γ-1 CH1)(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:61

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH13 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:62

*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQGTLVTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

4856 gH13 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:63

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttcccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgt

图1E(续)

4856 gH13 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)
SEQ ID NO:64

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTL VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH13 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)
SEQ ID NO:65

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac ggctatagcc
tgtggggaca ggggacccct gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

图1E(续)

4856gH20 V- 区 SEQ ID NO:66

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWISI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTM SKDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSS

4856gH20 V- 区 (哺乳动物表达) SEQ ID NO:67

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gc

4856gH20 V-区 (大肠埃希氏菌表达)SEQ ID NO:68

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gc

4856gH20 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:69
*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWISIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTMSK DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQGTLVTV SS

4856gH20 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:70
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggatttc
catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac

图1F

agggaaccct ggtcactgtc tccagc

4856gH20 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:71

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIS IIYGGSGSTW YASWAKGRFT MSKDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTL VTVSS

4856gH20 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:72

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaat gggtatagcc
tgtggggaca ggggacccct gtgacagtct cgagc

4856 gH20 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) SEQ ID NO:73

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWISI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTM SKDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH20 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (哺乳动物表达) SEQ ID NO:74

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH20 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:75

图1F (续)

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH20 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)

SEQ ID NO:76

*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWISIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTMSK DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQGTLVTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

4856 gH20 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)

SEQ ID NO:77

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggatttc
catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgt

4856 gH20 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示（大肠埃希氏菌表达）

SEQ ID NO:78

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIS IIYGGSGSTW YASWAKGRFT MSKDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTL VTVSSASTKG

图1F(续)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH20 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)
SEQ ID NO:79
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaat gggtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

图1F(续)

4856gH23 V-区 SEQ ID NO:80

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNA YSLWGQGTLV TVSS

4856gH23 V-区(哺乳动物表达) SEQ ID NO:81

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacgcct actcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gc

4856gH23 V-区(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:82

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gc

4856gH23 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:83
*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNAYS LWGQGTLVTV SS

4856gH23 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:84
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg

图1G

gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagc

4856gH23 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:85

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN AYSLWGQGTL VTVSS

4856gH23 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:86

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac gcgtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagc

4856 gH23 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1)

SEQ ID NO:87

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNA YSLWGQGTLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH23 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (哺乳动物表达)

SEQ ID NO:88

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH23 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (大肠埃希氏菌表达)

图1G(续)

SEQ ID NO:89
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH23 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:90
*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNAYS LWGQGTLVTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

4856 gH23 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:91
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgt

4856 gH23 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示（大肠埃希氏菌表达）
SEQ ID NO:9ℓ
*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN AYSLWGQGTL VTVSSASTKG

图1G(续)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH23 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示（大肠埃希氏菌表示）
SEQ ID NO:93
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcaac gcgtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

图1G(续)

4856gH29 V-区 SEQ ID NO:94

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRDG YSLWGQGTLV TVSS

4856gH29 V-区(哺乳动物表达) SEQ ID NO:95

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcgacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gc

4856gH29 V-区(大肠埃希氏菌表达) SEQ ID NO:96

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gc

4856gH29 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:97
*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRDGYS LWGQGTLVTV SS

4856gH29 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:98
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg

图1H

gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagc

4856gH29 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:99

*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRD GYSLWGQGTL VTVSS

4856gH29 V-区，其中信号序列加下划线且斜体表示(大肠埃希氏菌表达)

SEQ ID NO:100

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcgat gggtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagc

4856 gH29 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1)

SEQ ID NO:101

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRDG YSLWGQGTLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH29 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (哺乳动物表达)

SEQ ID NO:102

gaagtgcaac tggtggaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gaggggcgc
gacgccggcg ccgggggatc acgcgacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH29 Fab 重链 (V + 人 γ -1 CH1) (大肠埃希氏菌表达)

图1H(续)

SEQ ID NO:103
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH29 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:104
*MKWVTFISLL FLFSSAYS*EV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GGSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRDGYS LWGQGTLVTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

4856 gH29 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示(哺乳动物表达)
SEQ ID NO:105
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctcc*gaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgt

4856 gH29 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示（大肠埃希氏菌表达）
SEQ ID NO:106
*MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ A*EVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRD GYSLWGQGTL VTVSSASTKG

图1H(续)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH29 Fab 重链，其中信号序列加下划线且斜体表示（大肠埃希氏菌表示）

SEQ ID NO:107

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
*cgtggcgcaa gct*gaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggcgg cagccgcgat gggtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

4856 scFv

SEQ ID NO:108

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKCLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLV TVSSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSAYDMTQ
SPSTLSASVG DRVTITCQAS ESIYSGLAWY QQKPGKAPKL LIYAASDLAS
GVPSRFSGSG SGTEYTLTIS SLQPDDFATY YCQQTWTDGG IDNPFGCGTK
VEIKRTENLY FQ

图1H(续)

人 IGKV1-5 JK4 接受体框架 SEQ ID NO:109

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQSIS SWLAWYQQKP GKAPKLLIYD
ASSLESGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP DDFATYYCQQ YNSYSLTFGG
GTKVEIK

人 IGKV1-5 JK4 接受体框架 SEQ ID NO:110

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg
cctggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat
gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc
tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gatgattttg
caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctctcac tttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa a

人 IGHV3-21 JH5 接受体框架 SEQ ID NO:111

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARNW
FDSWGQGTLV TVSS

人 IGHV3-21 JH5 接受体框架 SEQ ID NO:112

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca
tgaactgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc
attagtagta gtagtagtta catatactac gcagactcag tgaagggccg
attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat ctgcaaatga
acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaactgg
ttcgactcct ggggccaagg aaccctggtc accgtctcct ca

图1I

轻链移植体4856

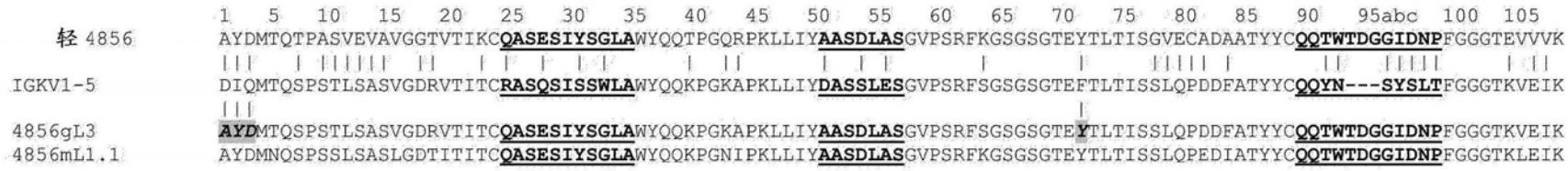


图2A

图解

轻 4856 = 免轻链可变区序列 (SEQ ID NO: 10)
IGKV1-5 = 人种系接受体框架VK1序列 IGKV1-5具有JK4 (SEQ ID NO:108)

4856gL3 = 使用IGKV1-5人种系作为接受体框架的4856轻链可变区的人源化的移植体 (SEQ ID NO:38)
4856mL1.1 = 使用鼠种系作为接受体框架的4856轻链可变区的鼠源化的移植体 (SEQ ID NO:26)
CDR以粗体/下划线表示
供者残基以粗体/斜体且高亮显示: A1, Y2, D3和Y71

重链移植体4856

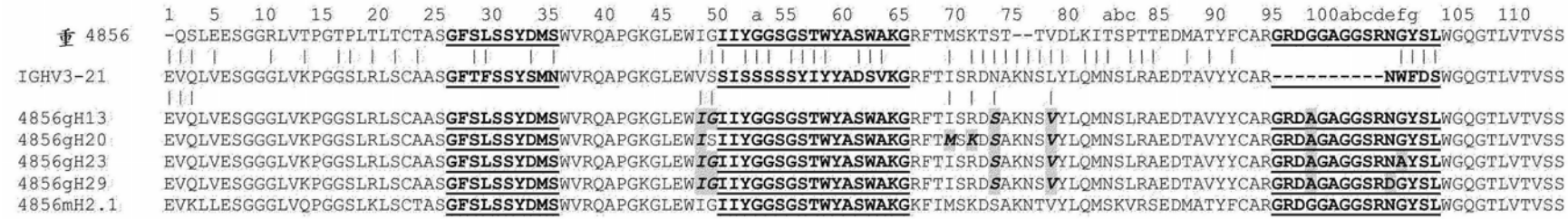


图2B

图解

4856 = 兔重链可变区序列(SEQ ID NO:14)
IGHV3-21 = 人种系接受体框架VH3序列 IGHV3-21具有JH5 (SEQ ID NO:110)
4856gH13 (SEQ ID NO:52), gH20 (SEQ ID NO:66), gH23 (SEQ ID NO:80) 和 gH29 (SEQ ID NO:94)=使用IGHV3-21人种系作为接受体框架的4856重链可变区的人源化的移植体。
4856mH2.1 = 使用鼠种系作为接受体框架的4856重链可变区的鼠源化的移植体(SEQ ID NO:30)

CDR以粗体/下划线表示
供者残基以粗体/斜体且高亮显示I48, G49, M69, K71, S73 and V78
CDRH3中除去潜在的天冬氨酸异构化位点的突变以粗体/下划线且高亮显示: A98
CDRH3中除去潜在的天冬酰胺脱酰胺位点的突变以粗体/下划线且高亮显示: D100e, A100f

人潜伏期相关肽和转化生长因子β-1 SEQ ID NO:113

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAK
EVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLS
NRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLL
MATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYS
KVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

图3A

成熟的人转化生长因子β-1 SEQ ID NO:114

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPC
CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

图3B

人潜伏期相关肽和转化生长因子β-2 SEQ ID NO:115

LSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE
YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKS
KDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFA
GIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKR
DLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN
MIVKSCKCS

图3C

成熟的人转化生长因子β-2 SEQ ID NO:116

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQH
SRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

图3D

人潜伏期相关肽和转化生长因子β-3 SEQ ID NO:117

LSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEY
YAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPD
EHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVD
NEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWK
WVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKS
CKCS

图3E

成熟的人转化生长因子β-3 SEQ ID NO:118
ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHST
VLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS

图3F

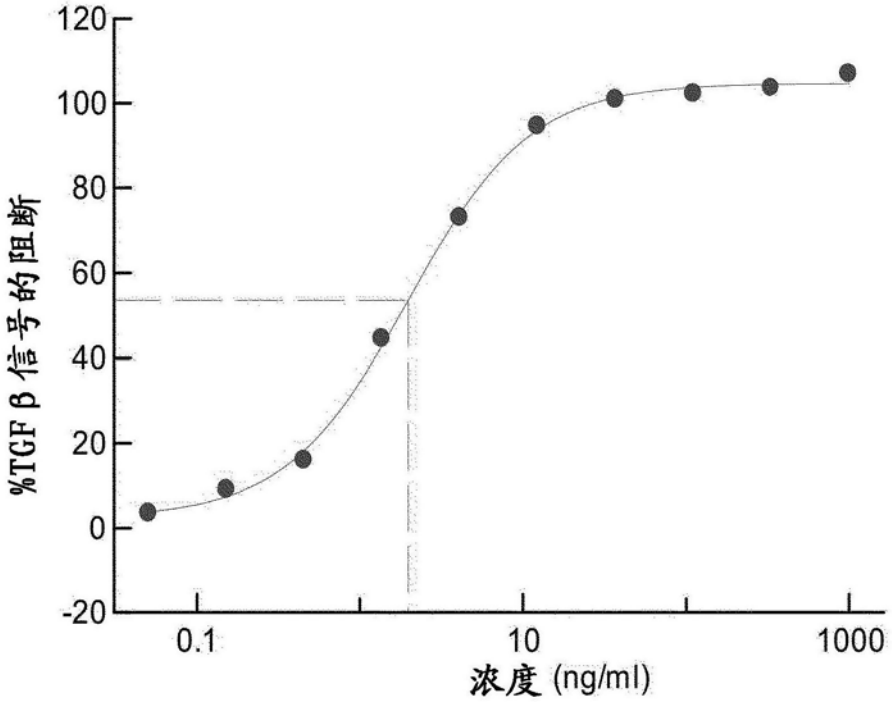


图4A

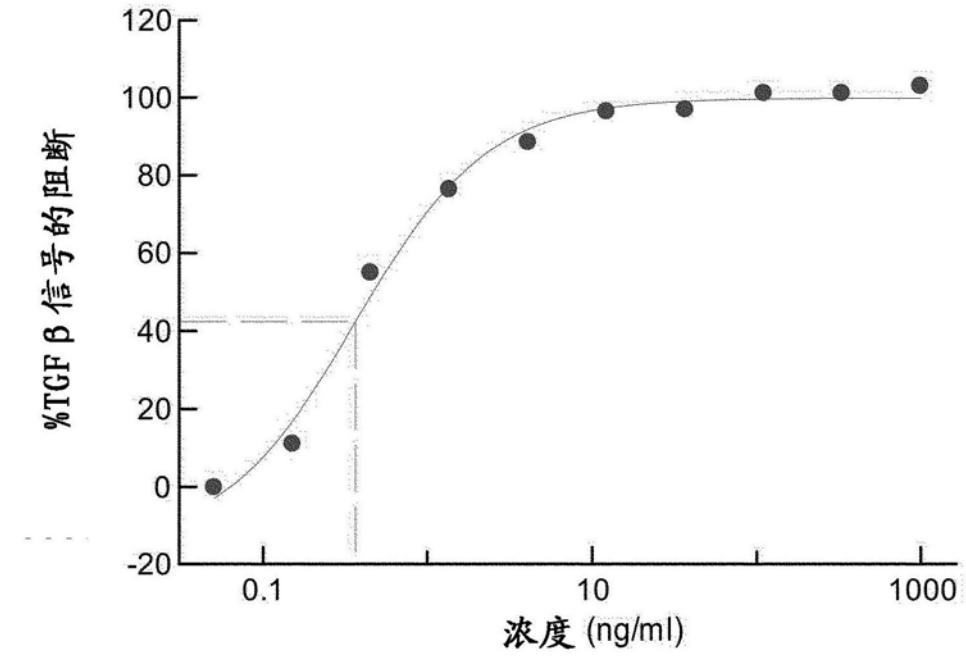

%TGFβ信号的阻断
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
10
1000
浓度 (ng/ml)

图4B

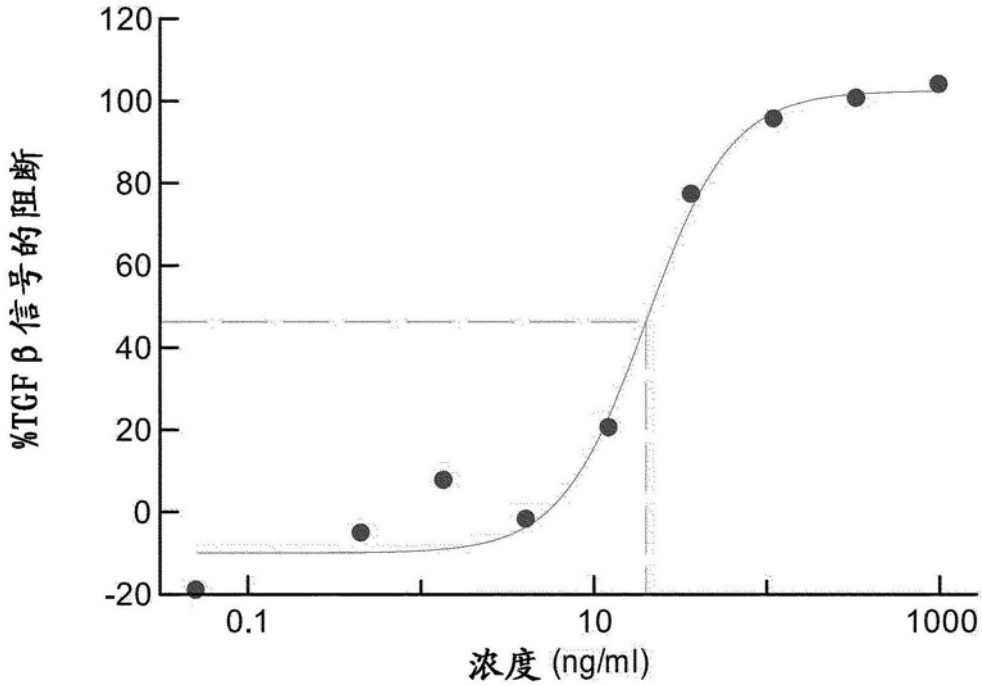

%TGFβ信号的阻断
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
10
1000
浓度 (ng/ml)

图4C

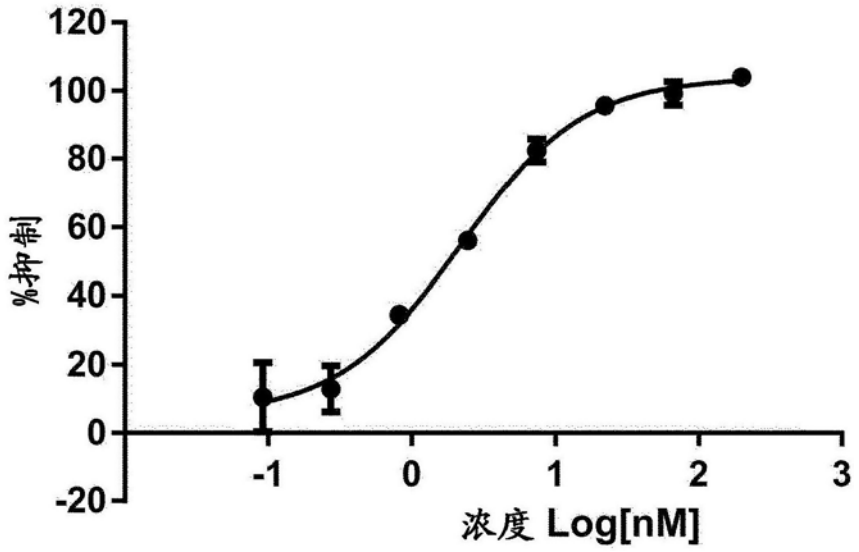

120
100
80
60
40
20
0
-20
%抑制
-1
0
1
2
3
浓度 Log[nM]

图5

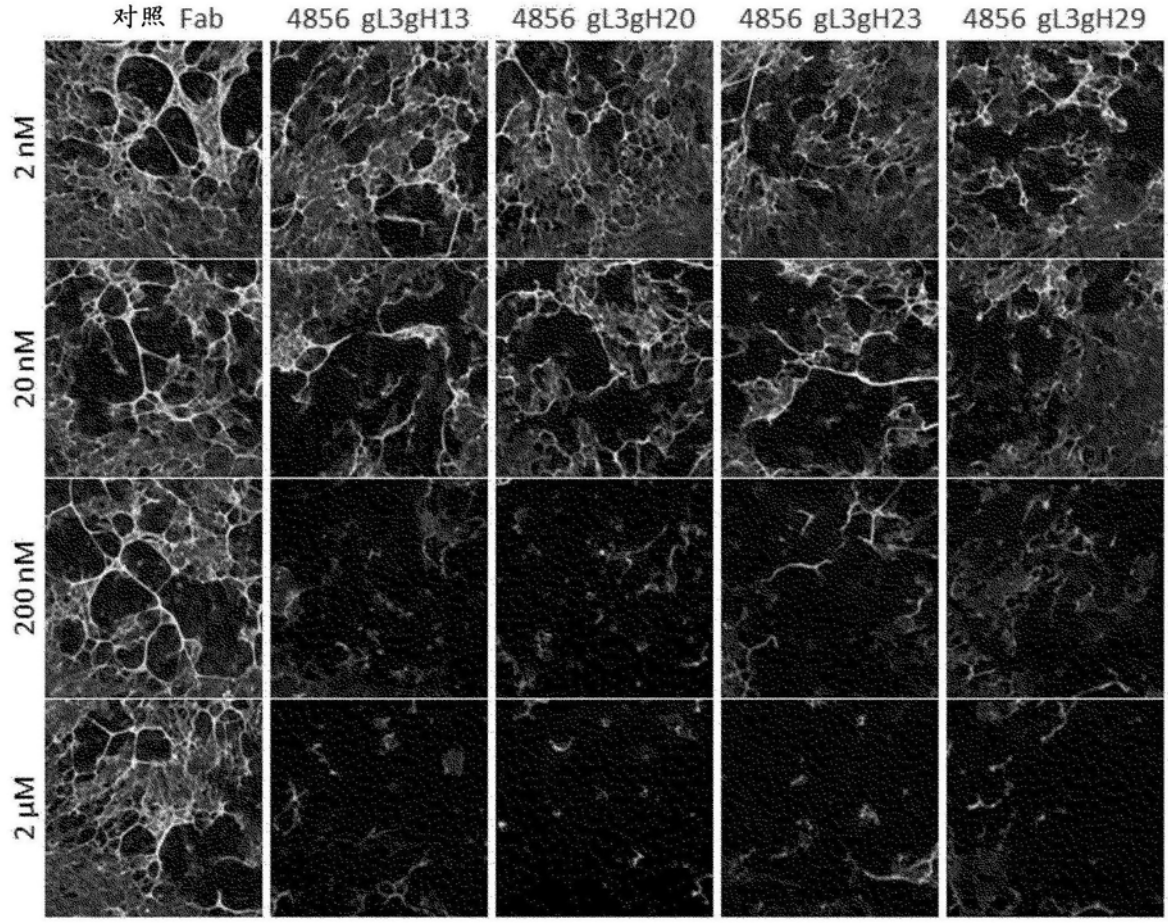

对照 Fab
4856 gL3gH13
4856 gL3gH20
4856 gL3gH23
4856 gL3gH29
2 nM
20 nM
200 nM
2 μM

图6

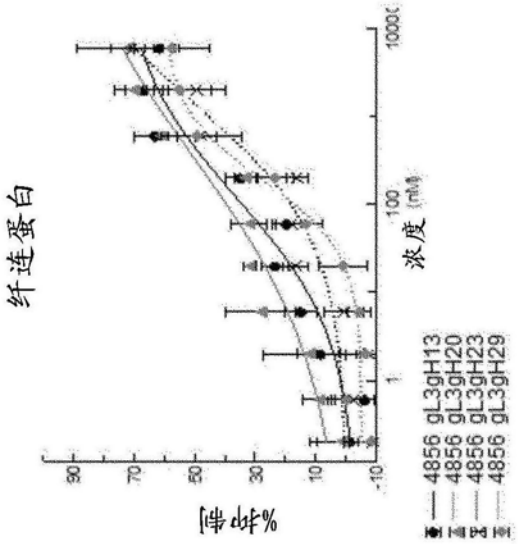

纤连蛋白
%抑制
浓度 (nM)
4856 gL3gH13
4856 gL3gH20
4856 gL3gH23
4856 gL3gH29

图7A

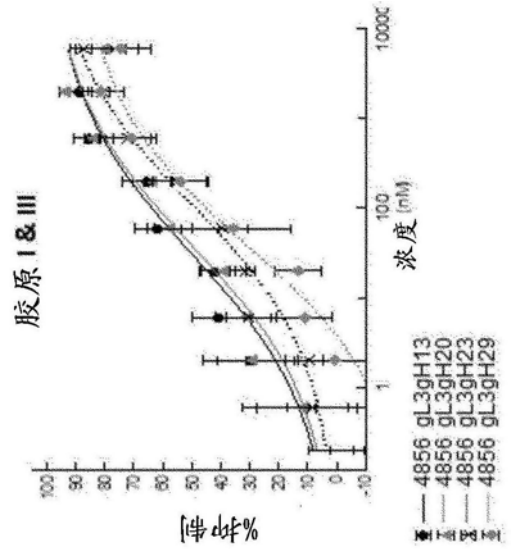

胶原 I & III
%抑制
浓度 (nM)
4856 gL3gH13
4856 gL3gH20
4856 gL3gH23
4856 gL3gH29

图7B

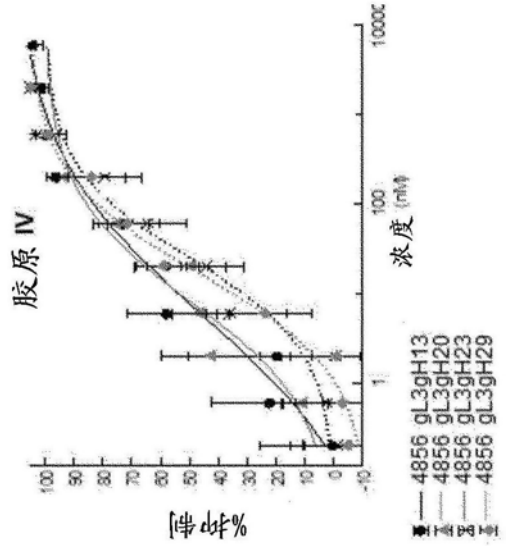

胶原 IV
%抑制
浓度 (nM)
4856 gL3gH13
4856 gL3gH20
4856 gL3gH23
4856 gL3gH29

图7C

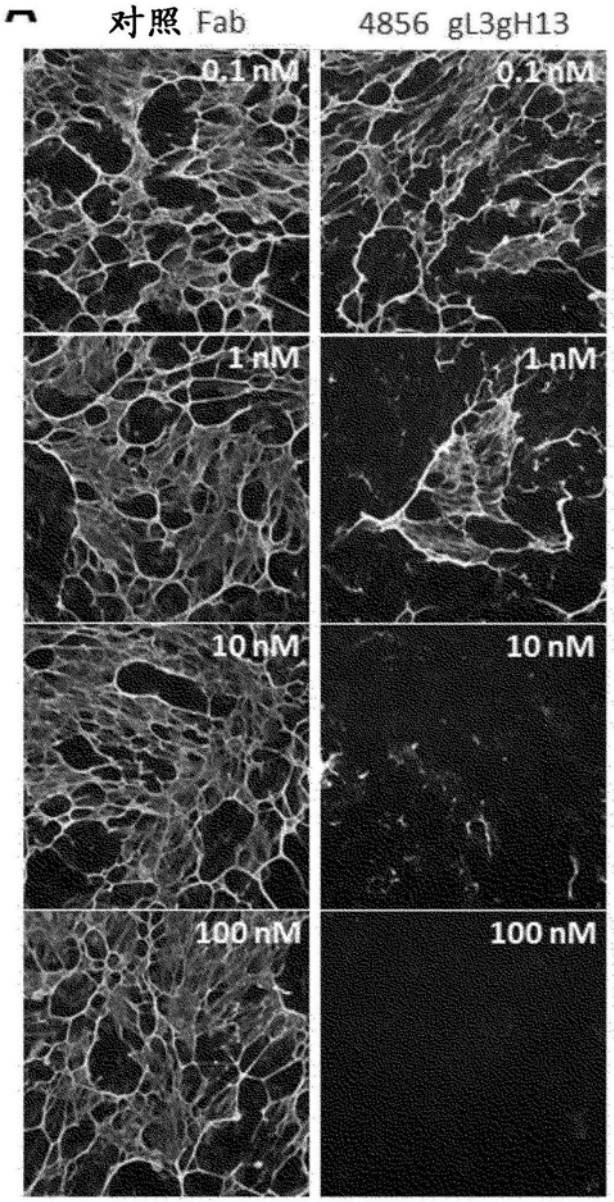


图8

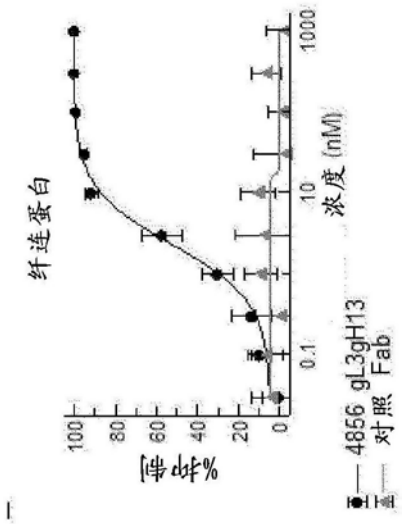

纤连蛋白
%抑制
浓度 (nM)
4856 gL3gH13 Fab
对照 Fab

图9A

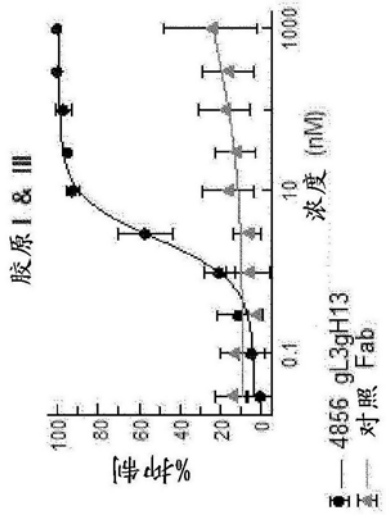

胶原 I & III
%抑制
浓度 (nM)
4856 gL3gH13 Fab
对照 Fab

图9B

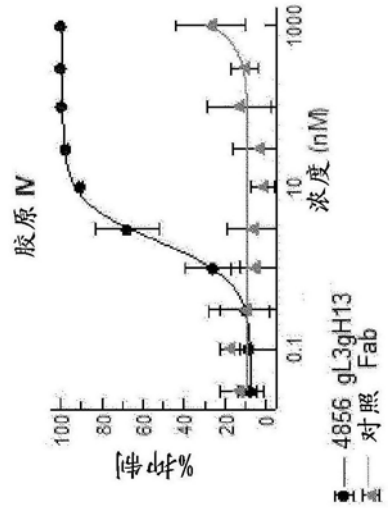


图9C

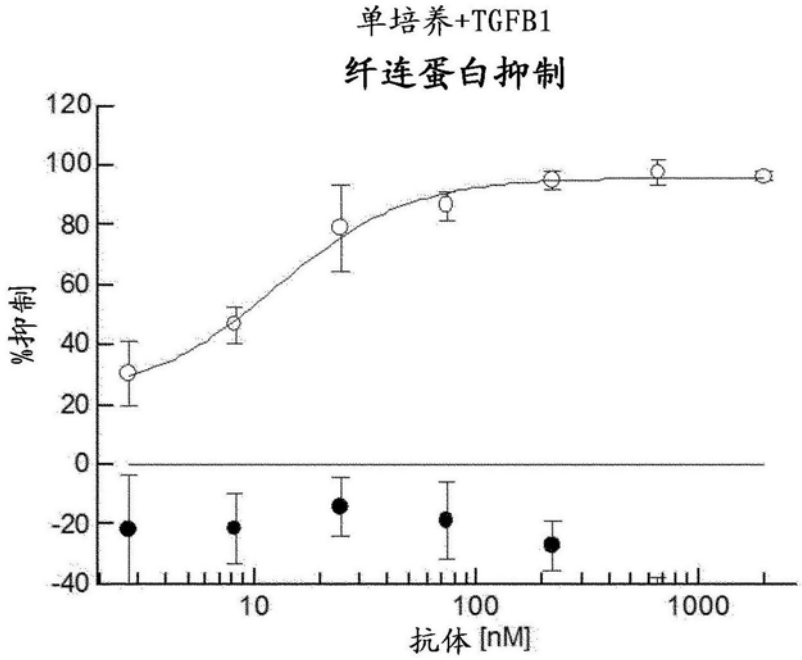


图10A

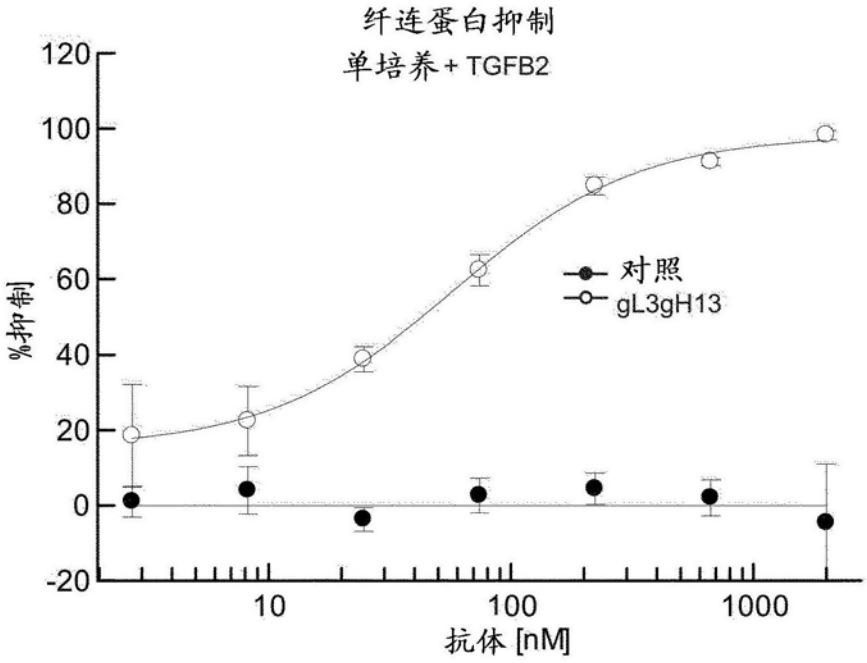

纤连蛋白抑制
单培养+TGFB2
120
100
80
60
40
20
0
-20
%抑制
对照
gL3gH13
10
100
1000
抗体 [nM]

图10B

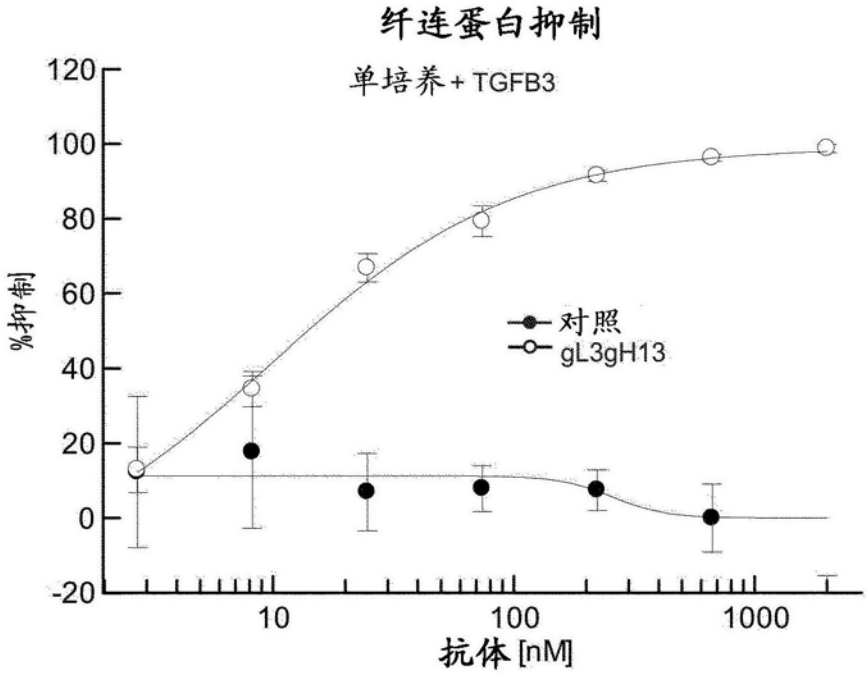

纤连蛋白抑制
单培养+TGFB3
120
100
80
60
40
20
0
-20
%抑制
对照
gL3gH13
10
100
1000
抗体 [nM]

图10C

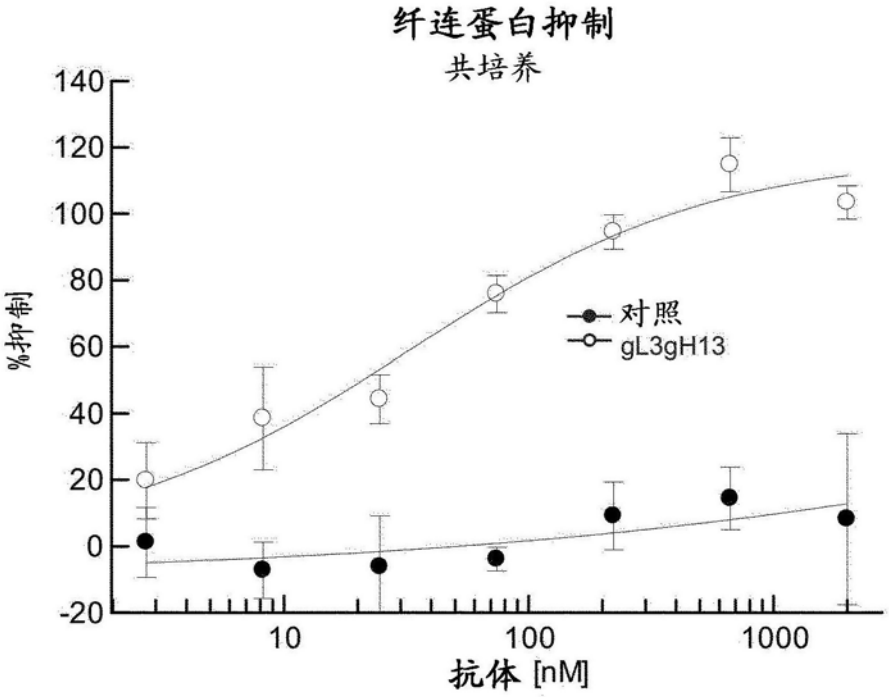

纤连蛋白抑制
共培养
%抑制
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
10
100
1000
抗体 [nM]
对照
gL3gH13

图10D

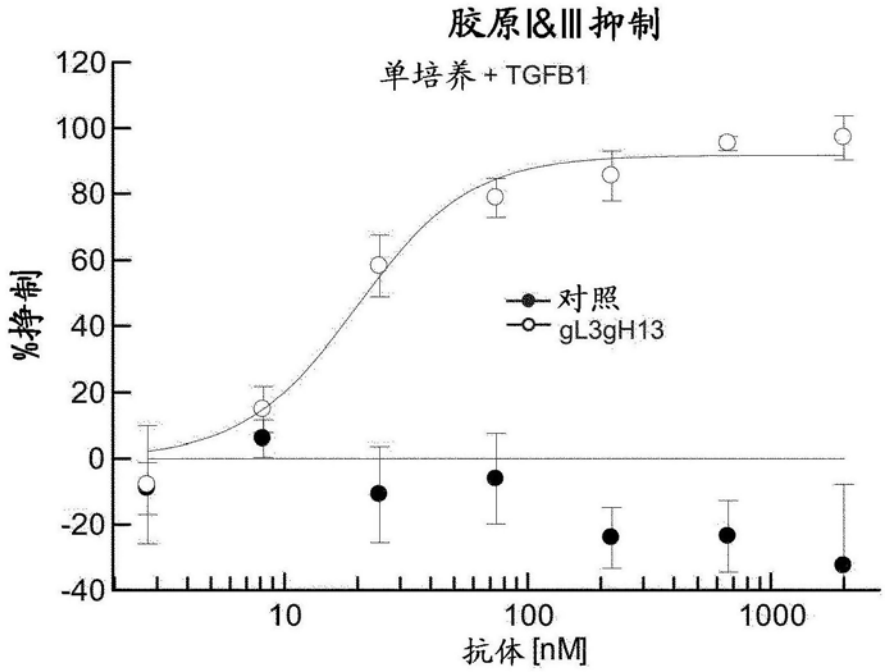

胶原I&III抑制
单培养 + TGFB1
%抑制
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
10
100
1000
抗体 [nM]
对照
gL3gH13

图11A

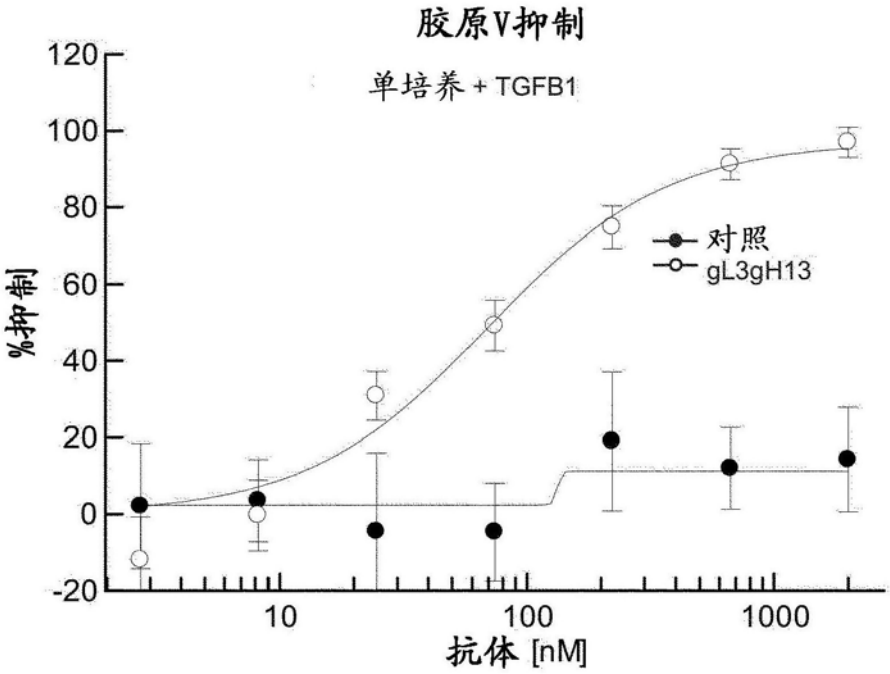

胶原V抑制
单培养 + TGFB1
%抑制
120
100
80
60
40
20
0
-20
10
100
1000
抗体 [nM]
对照
gL3gH13

图11B

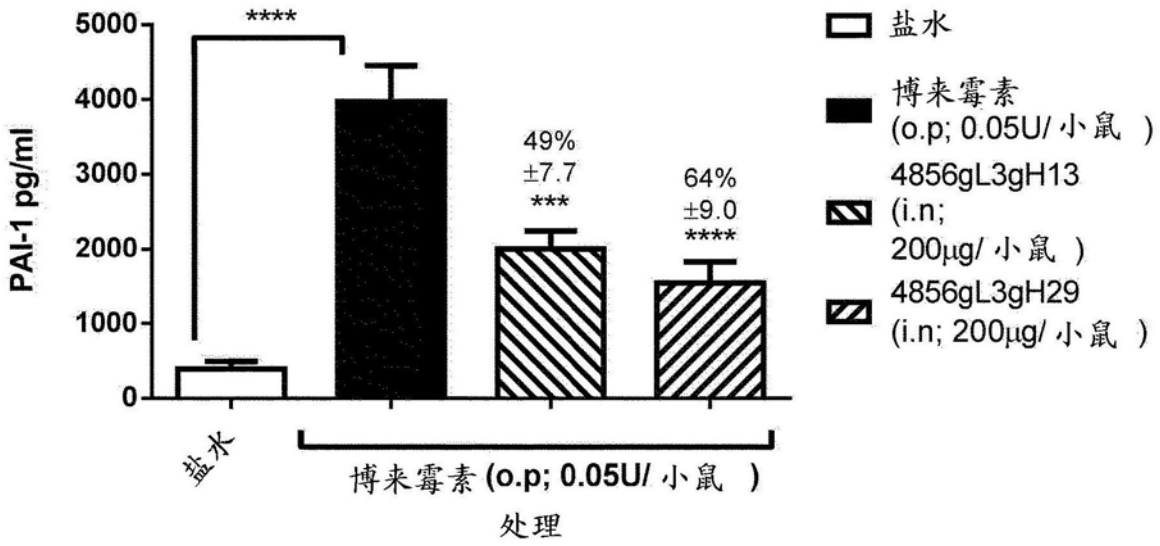

PAI-1 pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
****
49%
±7.7
***
64%
±9.0
****
盐水
博来霉素 (o.p; 0.05U/ 小鼠)
处理
盐水
博来霉素
(o.p; 0.05U/ 小鼠)
4856gL3gH13
(i.n;
200μg/ 小鼠)
4856gL3gH29
(i.n; 200μg/ 小鼠)

图12

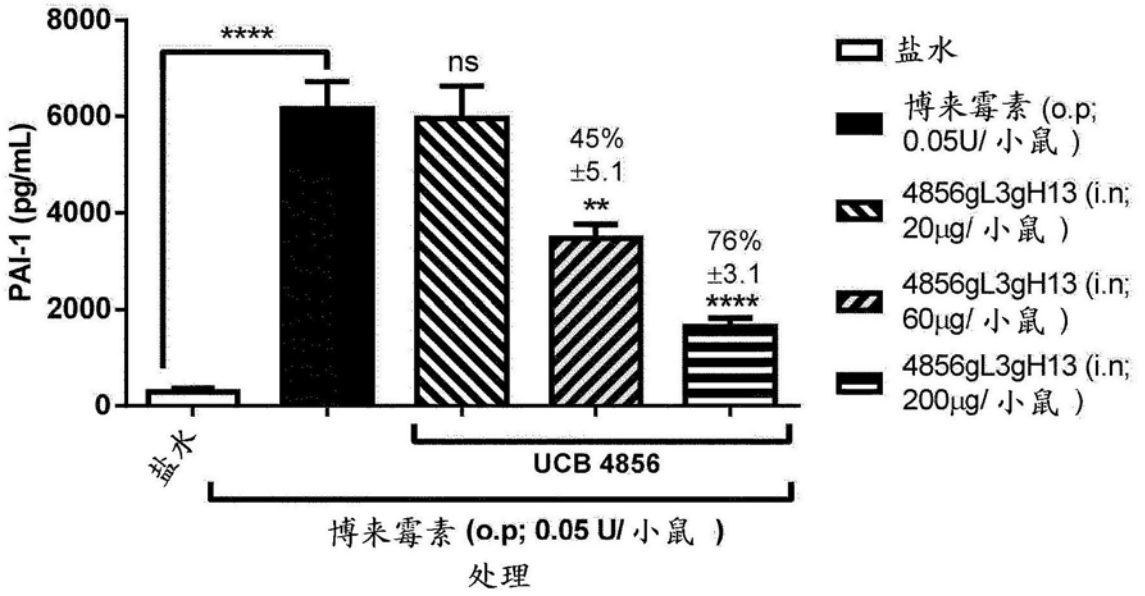

8000
6000
4000
2000
0
PAI-1 (pg/mL)
****
ns
45%
±5.1
**
76%
±3.1
****
盐水
UCB 4856
博来霉素 (o.p; 0.05 U/ 小鼠)
处理
盐水
博来霉素 (o.p; 0.05U/ 小鼠)
4856gL3gH13 (i.n; 20μg/ 小鼠)
4856gL3gH13 (i.n; 60μg/ 小鼠)
4856gL3gH13 (i.n; 200μg/ 小鼠)

图13

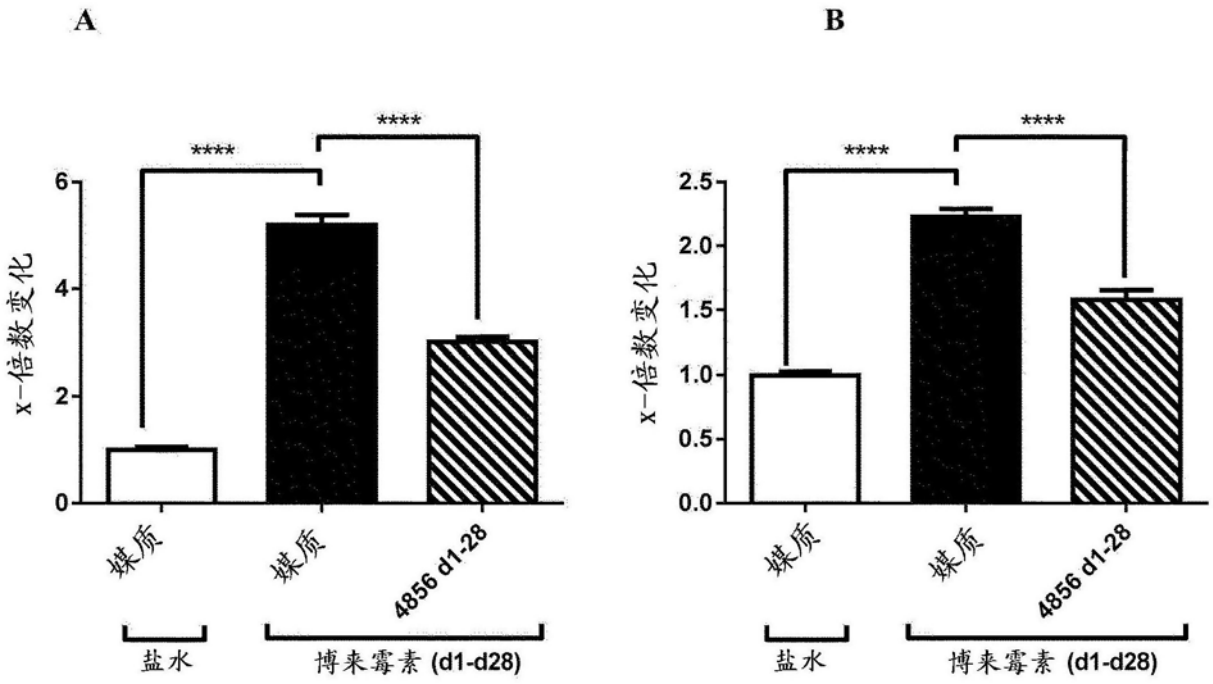

A
B
****
****
x-倍数变化
6
4
2
0
媒质
媒质
4856 d1-28
盐水
博来霉素 (d1-d28)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

图14

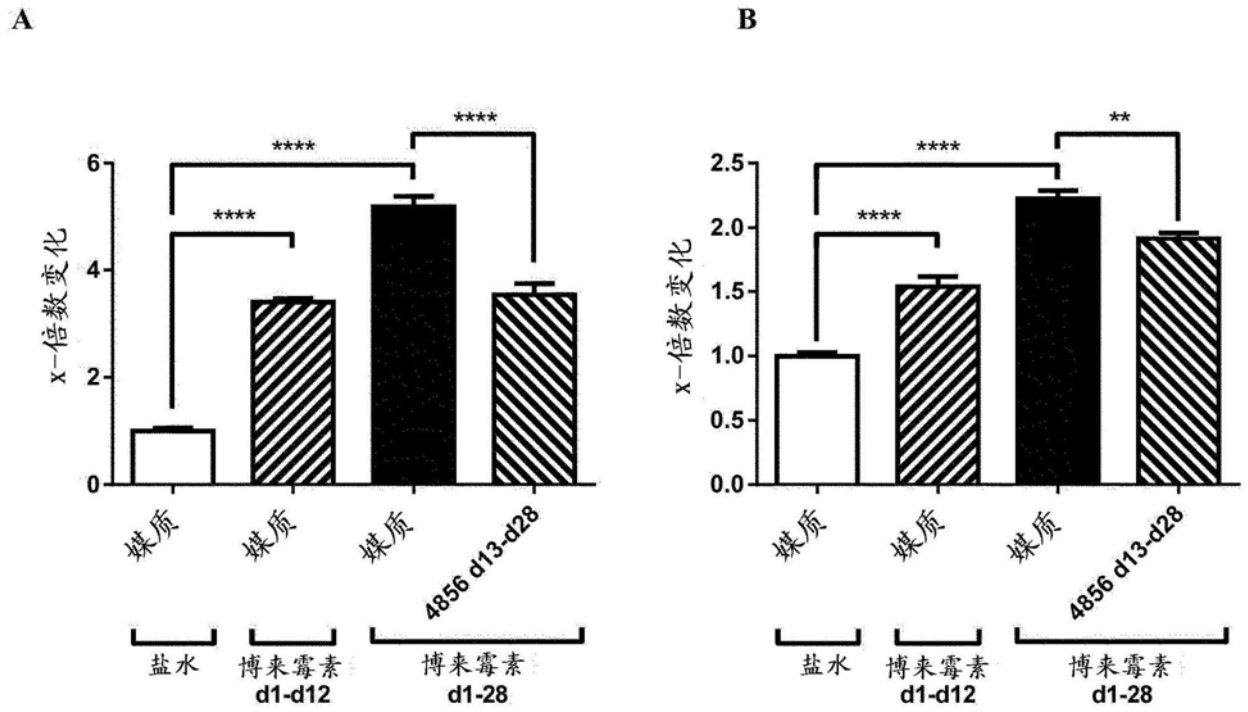

A
B
x-倍数变化
****
**
粘质
4856 d13-d28
盐水
博来霉素 d1-d12
博来霉素 d1-28

图15

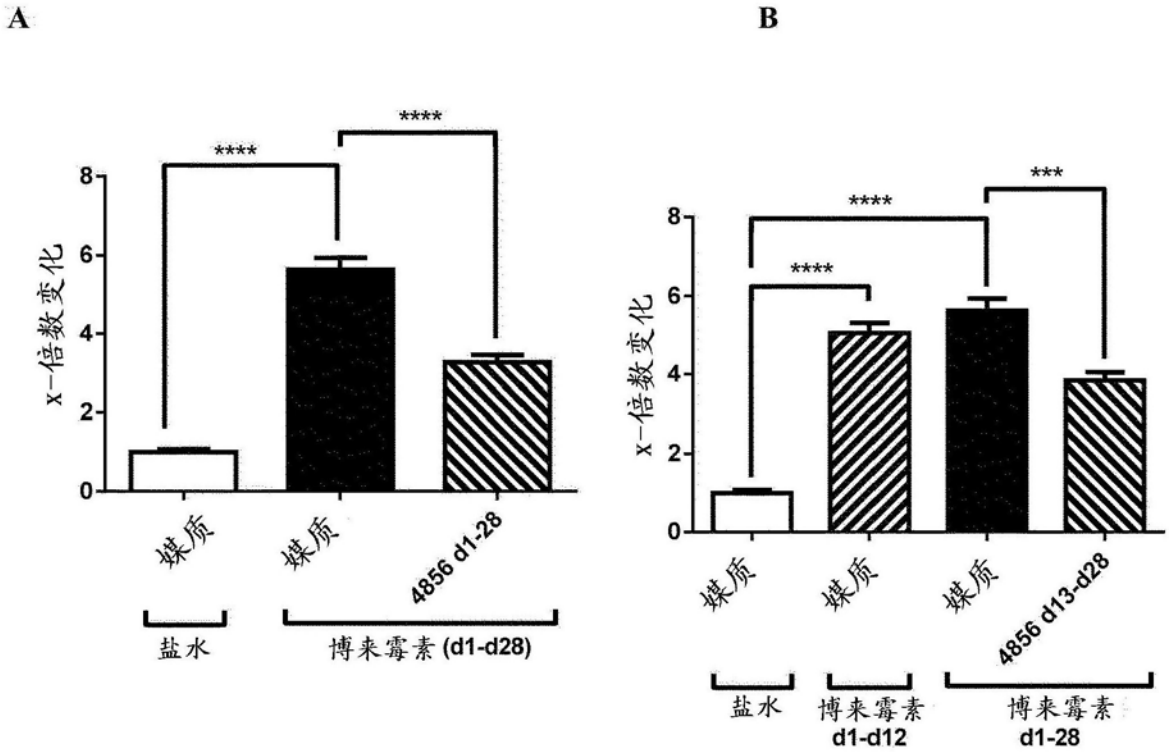

A
B
x-倍数变化
****
***
粘质
4856 d1-28
4856 d13-d28
盐水
博来霉素 (d1-d28)
博来霉素 d1-d12
博来霉素 d1-28

图16

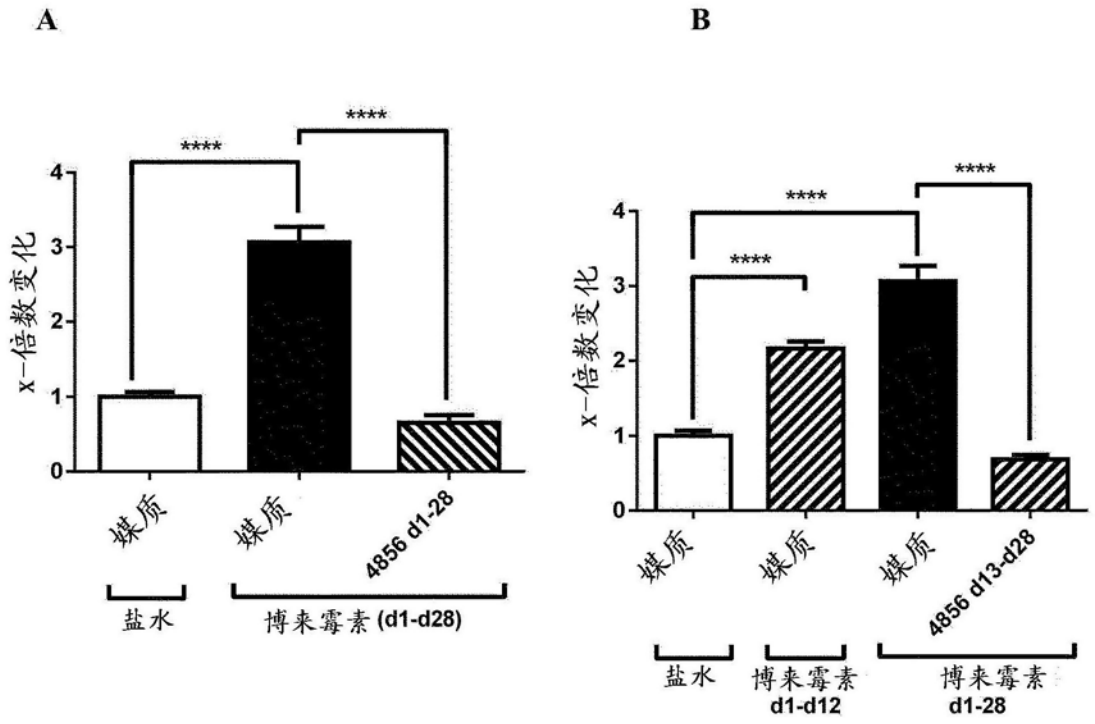


图17

成熟的人TGF-β1(SEQ ID NO: 114)，其中显示涉及与4856 Fab gL3gH13相互作用的残基（加下划线），和对于与TβRI和TβRII相互作用而言关键的残基（粗体）。4Å内的接触残基。

1
ALDTN**Y**CFSSTEKNCCVRQLYIDF**R**KDLG**WKW**I**H**EPKGY

40
HANFCLGPCP**YIW**SLDT**Q**YS**K**VLALYNQHNPGASAAPCCV

80
PQALEPLPIV**YYVGR**KP**K**VEQ**L**SNMIVRSCKCS

4856: R25, K26, D27, L28, G29, W30, K31, W32, I33, H34, K60, L64, H68, Y90, V92, G93, R94, K97, E99, L101

图18A

成熟的人TGF-β1(SEQ ID NO: 114)，其中显示涉及与4856 Fab gL3gH13相互作用的残基（加下划线），和对于与TβRI和TβRII相互作用而言关键的残基（粗体）。5Å内的接触残基。

1
ALDTN**Y**CFSST**E**KNCCVRQLYIDF**R**KDLG**WKWI**H**E**PKGY

40
HANFCLGPCP**YIWS**LDT**Q**YS**K**VLA**L**YNQHNPGASAAPCCV

80
PQALEPLPIV**YYVGRK**P**K**V**E**Q**L**SNMIVRSCKCS

4856: R25, K26, D27, L28, G29, W30, K31, W32, H34, I33, Q57, K60, L64, H68, I88, Y90, Y91, V92, G93, R94, K95, K97, E99, L101

图18B

成熟的人TGF-β2（SEQ ID NO:116），其中显示涉及与scFv4856相互作用的残基（加下划线）。4Å内的接触残基。

ALDAAYCFRN VQDNCCLRPL YIDFKRDLGW KWIHEPKGYN ANFCAGACPY LWSSDTQHSR VLSLYNTINP EASASPCCVS QDLEPLTILY YIGKTPKIEQ LSNMIVKSCK CS

图18C