



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201730214 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：106102009

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 15 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/03/15 美國

61/611,332

(71)申請人：健生生物科技公司 (美國) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：陳強 CHEN, JOHN (CN)；法蘭森 喬韓 FRANSSON, JOHAN (SE)；法索夫 娜塔莉 FURSOV, NATALIE (RU)；漢彌爾 戴蒙 HAMEL, DAMON (US)；馬力亞 湯瑪士 MALIA, THOMAS (US)；歐摩蘿拉 加利亞 OBMOLLOVA, GALINA (US)；歐特 塔錫安納 ORT, TATIANA (RU)；李西林 麥可 RYCYZYN, MICHAEL (US)；史古力 麥可 SCULLY, MICHAEL (US)；史威特 雷蒙 SWEET, RAYMOND (US)；太普雷高夫 艾力克西 TEPLYAKOV, ALEXEY (RU)；威勒強 WHEELER, JOHN (US)；艾美葛 金卡洛斯 ALMAGRO, JUAN CARLOS (US)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：4 共 190 頁

(54)名稱

人類抗-CD27 抗體、方法及用途

HUMAN ANTI-CD27 ANTIBODIES, METHODS, AND USES

(57)摘要

對人類 CD27 具免疫特異性之人類抗體能夠阻斷 CD27 與其配體 CD70 之結合並中和 CD27 的生物活性，包括但不限於 CD27 細胞內的訊號傳遞、T 細胞的增生和活化、B 細胞的增生和分化、漿母細胞的形成和抗體反應的減輕、藉由 CD70 刺激腫瘤細胞以及 T 細胞和 B 細胞的可溶性介質生產。該抗體可用於診斷或治療與 CD27 活性相關之疾病和病症。

Human antibodies immunospecific for human CD27 are capable of blocking CD27 binding to its ligand CD70 and neutralizing bioactivity of CD27 including, but not limited to, CD27 intracellular signaling, T-cell proliferation and activation, B-cell proliferation and differentiation, plasmablast formation and alleviation of antibody responses, stimulation of tumor cells by CD70, and the production of soluble mediators from T and B-cells. The antibodies are useful in diagnosing or treating CD27 activity associated diseases and conditions.

發明摘要

※ 申請案號：106102009 (由102109158分割)

※ 申請日：102/03/15

※IPC 分類：**G07K 16/28** (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

【發明名稱】

人類抗-CD27抗體、方法及用途

HUMAN ANTI-CD27 ANTIBODIES, METHODS, AND USES

【中文】

對人類 CD27 具免疫特異性之人類抗體能夠阻斷 CD27 與其配體 CD70 之結合並中和 CD27 的生物活性，包括但不限於 CD27 細胞內的訊號傳遞、T 細胞的增生和活化、B 細胞的增生和分化、漿母細胞的形成和抗體反應的減輕、藉由 CD70 刺激腫瘤細胞以及 T 細胞和 B 細胞的可溶性介質生產。該抗體可用於診斷或治療與 CD27 活性相關之疾病和病症。

【英文】

Human antibodies immunospecific for human CD27 are capable of blocking CD27 binding to its ligand CD70 and neutralizing bioactivity of CD27 including, but not limited to, CD27 intracellular signaling, T-cell proliferation and activation, B-cell proliferation and differentiation, plasmablast formation and alleviation of antibody responses, stimulation of tumor cells by CD70, and the production of soluble mediators from T and B-cells. The antibodies are useful in diagnosing or treating CD27 activity associated diseases and conditions.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

人類抗-CD27抗體、方法及用途

HUMAN ANTI-CD27 ANTIBODIES, METHODS, AND USES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於人類抗 CD27 蛋白之抗體及其用途，更具體而言係關於人類抗人類 CD27 蛋白之抗體及其在治療炎症疾病上之用途。

【先前技術】

【0002】 CD27 係一種 I 型跨膜蛋白及腫瘤壞死因子受體超家族 (TNFSF27) 的成員，在大多數的 T 細胞、自然殺手細胞和抗體分泌漿細胞和記憶 B 細胞上表現為表面抗原。CD70 係一種細胞介素，也稱為腫瘤壞死因子配體超家族成員 7 (TNFSF7)，為 CD27 的同源配體。TNFSF 配體-受體的交互作用能夠調節 T 依賴性的 B 細胞分化 (Jacquot S. 2000 Immunol Res. 21(1):23-30) 並在不同的胞中誘導細胞凋亡。

【0003】 CD27:CD70 接合造成典型及非典型的 NF- κ B 訊息傳遞路徑的活化，繼而刺激 B 細胞及 T 細胞的增殖、漿細胞的分化以及隨後的抗體分泌 (Yamamoto, H. 1998 J Immunol. 161(9): 4753-9)。CD27 與 OX40、4-1BB 的協同刺激也促進了活化 T 細胞的存活 (Croft, M. 2003 Cytokine Growth Factor Rev. 14(3-4): 265-73)，從而調節一些作用性及記憶性 T 細胞並藉由促進細胞介素 (如 IL-4 及 IFN- γ) 產生或調節 T 細胞對其他細胞介素 (如 IL2 及 IL-12) 作用的反應來直接控制 T 細胞的功能。

【0004】 在人類以及動物的研究中，可推測出 CD27:CD70 路徑在各種不同的免疫相關疾病中扮演著重要的角色，包括全身性紅斑狼瘡 (SLE) (Doerner T Lupus 2004 13(5):283-9)、類風溼性關節炎 (Tak, PP et al. 1996 clin Immunol Immunopathol 80(2): 129-38) 及多發性硬化症

(Hintzen RQ et al.1991 J Neuroimmunol 35(1-3):211-7)。另一方面，已有報導指出 CD70 在惡性 B 細胞上有不同程度的表現，且 CD70:CD27 複合物可以藉由活化抗腫瘤免疫力與減少腫瘤生長來調介抗腫瘤反應(Borst J, Hendriks J and Xiao Y. 2005. Curr Opin Immunol. 17(3):275-81)。CD27 也可控制 CD4+和 CD8 + T 細胞在感染部位的累積(Hendricks et al. 2000 Nature Immunol 1, 433 - 440)。

【0005】 CD70 在正常的非造血細胞上不會表現。CD70 的表現似乎會短暫地被限制在抗原活化的 T 細胞和 B 細胞，並且當抗原的刺激停止時，其表現量會下調。來自動物模型的證據暗示 CD70 可能有助於免疫疾病，例如類風溼性關節炎(Brugnoni et al., 1997 Immunol. Lett. 55:99-104)、乾癬性關節炎(Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104)以及狼瘡(Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60)。除了在炎症反應中的潛在作用，CD70 也在各種轉形細胞上表現，包括淋巴瘤 B 細胞、霍奇金氏症及李特·斯頓伯格細胞(Hodgkin's and Reed-Sternberg cells)、神經來源的惡性細胞以及一些癌細胞。

【0006】 W02008/051424 (南漢普頓大學(Univ. South Hampton))中所描述的促效劑 CD27 結合抗體被注意到可用來促進 T 細胞的免疫性，且該些抗體具有一結合表位使其不受 CD70 的影響(不被抑制)。

【0007】 雖然在嚙齒類動物中有關 CD27 及/或 CD70 改變的研究已證實這種受體配體交互作用的潛在重要性，仍需要提供對人類 CD27 具有特異性的人類抗體及其他對表現 CD27 的細胞可產生臨床上有用的細胞毒性、抑制細胞生長或免疫調節作用的 CD27:CD70 交互作用阻斷劑，尤其是在缺乏 CD70 的存在下對 CD27 表現細胞不會有不良促效劑的影響。這類化合物可以有用的治療劑，用來調節 CD27 表現細胞所調介之癌細胞的發育或免疫疾病。

【發明內容】

【0008】 本發明提供與人類 CD27 結合的單株抗體，其可以在一宿主對象中的細胞、組織或器官上阻斷與 CD27-CD70 交互作用相關的活動。本發明提供例示性 CD27 結合單株抗體之胺基酸序列，其係由核酸編碼以在一宿主細胞中表現。此外，本發明之 CD27 單株抗體在 CD27 的胞外區域（extracellular domain）界定有至少三個非覆蓋型表位（epitope），當與本發明之抗體結合時，CD27 無法與 CD70 型配體接合來驅動訊號傳遞以及下游的生物活性。

【0009】 本發明的另一個態樣係一分離的抗-CD27 抗體，其會與 CD27 蛋白質表位（定義為 CD27 蛋白質位置在 21-191 之間的殘基）反應。

【0010】 本發明的另一個態樣係一分離的抗體，其具有一選自 SEQ ID NOs：76、78、80、102-126、128-136 及 145-147 所示序列之重鏈變異區序列，以及一選自 SEQ ID NOs：77、79、81-101、127、137-144 及 148 所示序列之輕鏈變異區序列，其包括該些序列的變異體，例如保守性取代（conservative substitution）。

【0011】 本發明的再一個態樣係一分離的抗體，其具有選自 SEQ ID NOs：1-75 及 151-158 所示序列之重鏈 CDR 序列及輕鏈 CDR 序列，其包括該些序列的變異體，例如保守性取代（conservative substitution）。

【0012】 本發明的另一個態樣係一分離的多核苷酸，其編碼一本發明之抗體。

【0013】 在另一個態樣中，本發明係關於一種抗體，其結合至一共同表位（定義為蛋白質上抗體 C2177 及/或 C2186 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體所結合的區域）或與抗體 C2177 及/或 C2186 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體競爭結合至 CD27 蛋白。在另一個實施例中，本發明係關於一種抗體，其結合至一 CD27 胞外區域的表位（定義為蛋白質上抗體 C2191 結合的區域或由此產生表 30-39 中所述之人類抗體）並與抗體 C2191 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體競爭結合至 CD27 蛋白。在另一個實施例中，本發明係關於一種抗體，其結合至一 CD27

胞外區域的表位（定義為蛋白質上抗體 C2192 結合的區域或由此產生表 30-39 中所述之人類抗體）並與抗體 C2192 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體競爭結合至 CD27 蛋白。在另一個態樣中，本發明包含一種衍生自一或多個抗體 C2177、C2186、C2191 及 C2192 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體之抗體或其片段，其具有一或多個抗體 C2177、C2186、C2191 及 C2192 或表 30-39 中所述之由此產生的人類抗體所展示出的其他功能性結合特性，像是抑制 CD27 結合至 CD70 陽性細胞。

【0014】 因此，本發明的一個態樣係關於一種基因工程抗體，其包含一基因工程（例如人源化或適應人的）重鏈及輕鏈，其中：

- (1) 該基因工程重鏈變異區包含（或衍生自）一或多個來自小鼠抗體 C2177、C2191、C2192 及 C2186 重鏈之互補決定區（CDR）以及一來自人類接受者抗體重鏈之框架，其視情況具有一或多個人類框架殘基取代，及
- (2) 該基因工程輕鏈變異區包含一或多個來自小鼠抗體 C2177、C2191、C2192 及 C2186 輕鏈之互補決定區以及一來自人類接受者抗體輕鏈之框架，其視情況具有一或多個人類框架殘基取代；以及
- (3) 該基因工程抗體特異性地結合至人類 CD27 並干擾其與 CD70 的交互作用。

【0015】 在一進一步的實施例中，該基因工程抗體可由一或多個 CDR 組成且該 CDR 進一步基因改造有一或多個取代或缺失，例如，那些與抗體 C2177、C2191、C2192 及/或 C2186 之一或多個 CDR 有 90%、95%、98%或 99.5%相同的 CDR。

【0016】 另一個實施例係關於治療或預防與 CD27 生物活性相關的病理症狀，藉由投予治療或預防有效量的一本發明抗體、其部份或本發明抗體之混合物或其部份至一需要該治療之對象。

【0017】 在一進一步的實施例中，本發明包含作為一疫苗成分之抗原表位。包含一些或全部 SEQ ID NO：1 殘基 21-191 之亞片段或三維類

似物，或其保守性改變之多肽或編碼上述多肽表位之多核苷酸會被本發明之抗體辨識。該多肽和多核苷酸可用來自動免疫一宿主以引起抗 CD27 抗體的產生，其能對抗或預防與 CD27 生物活性相關的病理症狀。

【0018】 本發明亦關於產生、純化、配製及包裝一本發明抗體之方法，以用來治療或預防與 CD27 生物活性相關的病理症狀，藉由投予治療或預防有效量的一抗體或其部份。

【圖式簡單說明】

【0019】

圖 1 顯示 C2177 抗體對 T 細胞增殖之效果。

圖 2 顯示 CD27:C2177:C2191 三元複合物的晶體結構。CD27 片段的 N 末端及 C 末端被標記。Fabs 上的重鏈顏色較輕鏈深。

圖 3 為 CD27 蛋白-C2177 抗體接觸的示意圖，圓圈裡的是 CD27 蛋白殘基（表位），方塊裡的是 C2177 抗體殘基（補位（paratope））。

圖 4 為 CD27 蛋白-C2191 抗體接觸的示意圖，圓圈裡的是 CD27 蛋白殘基（表位），方塊裡的是 C2191 抗體殘基（補位）。

【實施方式】

縮寫字

【0020】 CDR - 互補決定區；CFSE - 羧基螢光素乙醯乙酸（carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester）；ECD - 胞外區域；FR - 框架；H - 重鏈；GvHD - 移植物對抗宿主疾病（graft-versus-host disease）；L - 輕鏈；IFN - 干擾素（ α , γ ）；Ig - 免疫球蛋白；Mab - 單株抗體；MMP - 基質金屬蛋白酶；PBMC - 週邊血液單核細胞；VL - 輕鏈變異區；VH - 重鏈變異區

定義

【0021】 如本文所述，「抗體」包括整個抗體及其任何抗原結合片段或其單鏈。因此，該抗體包括任何含有包含至少一部分免疫球蛋白分子的分子之蛋白質或胜肽，例如但不限於至少一重鏈或輕鏈的互補決定區（CDR）或其配體結合部分，一重鏈或輕鏈變異區，一重鏈或輕鏈恆定區，一框架（FR）區，或其任何部分，或至少一結合蛋白的一部分，其可被併至本發明之抗體。「抗體」一詞係進一步欲含括抗體、其截切片段、特定部分及變異體，包括抗體模擬物，或包含模擬抗體或其特定片段或部分之結構及/或功能的抗體部分，包括單鏈及單鏈域抗體及片段。功能性片段包括對一預選標靶之抗原結合片段。以術語一抗體的「抗原結合部分」涵蓋的結合片段的實例包括（i）一 Fab 片段，即一由 VL、VH、CL 及 CH 域所組成之單價片段；（ii）一 F(ab')₂ 片段，即一二價片段，包含兩個在絞鏈區（hinge region）透過二硫橋連接的 Fab 片段；（iii）一 Fd 片段，由該 VH 及 CH 域所組成；（iv）一 Fv 片段，由一抗體單臂之 VL 及 VH 域所組成，（v）一 dAb 片段（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546），其係由一 VH 域所組成；及（vi）一分離的互補決定區（CDR）。此外，雖然 Fv 片段的兩域：VL 和 VH 係透過不同基因進行編碼，但可使用重組方法，透過一種合成鏈接物來將它們連接，該合成鏈接物能夠將它們製成一個單一蛋白質鏈，其中該 VL 和 VH 區配對形成單價分子（稱為單鏈 Fv（scFv）；參見如 Bird et al. (1988) Science 242:423-426，以及 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:5879-5883）。此種單鏈抗體亦欲含括於抗體之「抗原結合部分」一詞內。這些抗體片段係使用具該領域中技術者所知悉的習知技術而獲得，且該些片段係經篩選具有如完整抗體相同方式之效用。反之，可使用 scFv 構造基因庫來篩選抗原結合能力，並接著使用習知技術將其剪接為編碼人類生殖系基因序列的其他 DNA。該基因庫的一個實例係「HuCAL：人類組合抗體庫」（Knappik, A. et al. J Mol Biol (2000) 296(1):57-86）。

【0022】 術語「CDR」係指抗體的互補決定區或高變區之胺基酸殘基，其參與或負責抗原結合。人類 IgG 抗體亞型的高變區或 CDR 包含如 Kabat 等人所述（1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.）之來自輕鏈變異區中殘基 24-34（L1）、50-56（L2）及 89-97（L3）及重鏈變異區中殘基 31-35（H1）、50-65（H2）及 95-102（H3）的胺基酸殘基，及/或那些來自高變區環（hypervariable loop）的殘基（即輕鏈變異區中的殘基 26-32（L1）、50-52（L2）及 91-96（L3）及重鏈變異區中的殘基 26-32（H1）、53-55（H2）或現今 H2 Chothia 定義的 52-57 及 96-101（H3），如 Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)所述。）

【0023】 框架或 FR1-4 殘基係那些非高變區且框住高變區的變異區殘基。最近，一個通用的編號系統已經被開發和廣泛採用，即國際免疫遺傳學信息系統（international ImMunoGeneTics information system®（IMGT））（LaFranc, et al. 2005. Nucl Acids Res. 33:D593–D597）。

【0024】 在此，CDR 依據在輕鏈或重鏈內之胺基酸序列及位置兩者、藉由依序編號指稱。由於免疫球蛋白變異區結構內的 CDR「位置」在物種間為保留且存於稱為環的結構中，根據結構特徵，藉由比對（align）變異區序列使用編號系統，因此即容易辨識 CDR 及框架殘基。此資訊係用於將來自一物種免疫球蛋白之 CDR 殘基移植（grafting）及置換至典型上來自人類抗體之受體框架。

【0025】 術語「CD27」意指人類 TNF 受體超家族（TNFSF27），即人類基因 939（CD27 基因）的產物，亦稱為人類 CD27L 受體、MGC20393、S152、T14、T 細胞活化抗原 CD27 並包括所有 CD27 的變異體、異構物和物種同源物（species homologs）。該表達的人類 CD27（NCBI 登錄號為 NP_001233）係一個長度為 260 胺基酸的多肽，其在 N 末端具有 20 胺基酸的分泌訊號。因此，本發明之抗體在某些情況中可能與來自人類以外物種的 CD27 交叉反應。在其他情況中，該抗體可能對人類 CD27 具有完全特異性且沒有表現出物種或其他類型的交叉反應性。CD27 生物活性的

意思係指由於一或多個配體（尤其是 CD70 多肽（TNFSF7，NP_001243）或其他配體，例如 SIVA）活化 CD27 所造成之 CD27 受體結合及/或活化而產生之任何下游的活性。CD27 轉換訊號而導致 NF- κ - β 及 MAPK8/JNK 的活化。轉接蛋白 TRAF2 及 TRAF5 已顯示出會調介這種受體的訊息傳遞過程。CD27 的生物活性也可能來自某些截短形式的 CD27 或 CD27 片段與本身展現出生物活性的配體的結合，例如，一包含約全長蛋白的殘基 21-191 的多肽可結合至 CD70。該 CD27 抗原胞質尾（殘基 213-260）結合至 SIVA 蛋白（亦稱為凋亡誘導因子：CD27BP；SIVA1，Siva-1，NP_006418（175 aa））的 N 端末端；以及 Siva-2，SIVA2，NP_068355（110 aa）。

【0026】 術語「表位（epitope）」是指能特異性結合至一抗體的蛋白質決定區。表位通常由分子的化學活性表面分類，例如胺基酸或糖側鏈所構成，且通常具有特定三維結構特徵以及比電荷特徵。構形及非構形表位差別為與前者的結合在變性溶劑存在下即失去，但後者並不會。

【0027】 「人源化（Humanization）」（亦稱為重塑或 CDR 移植）或「基因工程」包括建立減少來自異種源（通常為嚙齒動物）的單株抗體（mAb）的免疫原性以及改善親和性或效應物功能的技術（ADCC，補體活化，結合 C1q）。基因工程的單株抗體可以使用分子生物學技術來產生，利用噬菌體呈現的隨機序列或重新合成。例如，為了建構一併入有來自非人物種之 CDR 區的人源化抗體，該設計可包括變異體，像是在 CDR 殘基上的保守胺基酸取代，以及將來自非人物種單株抗體的殘基倒回取代至人類框架區（backmutations）。該位置可透過序列比對法、共有序列分析或變異區 3D 結構的結構分析來分辨或辨識。可利用電腦程式來描繪或顯示所選的候選免疫球蛋白序列可能的三維構象結構。審視這些影像可分析殘基在候選免疫球蛋白序列的功能上可能扮演的角色，亦即分析會影響該候選免疫球蛋白與其抗原結合能力的殘基。用這種方法，或通過簡單的序列比對演算法（例如 Clustal W），可以從已知的抗體序列（在可公開進入的資料庫尋找，如 VBASE 或 Kabat）選擇 FR（框架）殘基，並最佳化共有序列以取得想要的抗體特性，像是對目標抗原的親和性。隨著抗體結構已

知參數的資料組增加，也使得這些技術更加成熟和完善。另一種人類化的方法係以人類單株抗體上最常見的殘基僅修飾嚙齒類動物序列的表面殘基，該方法被稱為「重修表面 (resurfacing)」或「面飾法 (veneering)」。大量的人類和非人類的 Ig 序列現在已知道並可被該領域中熟諳此技藝者自由取得和使用，例如在 IMGT 下可找到的 LeFranc 等人發展的資料庫和工具；美國國家生物中心 (NCBI) 策劃的網站；Kabat 等人的 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. Health (1983) (現在也大大地擴充並可在網路上取得)，各皆全文併入本文中作為參考。可用任何已知方法或利用人類免疫球蛋白序列資訊發展的方法來進行本發明抗體的人類化或基因工程。例如，在 Winter 的美國專利第 6982361 號及 Bowdish 等人的 WO03/025019 中有教導該方法，其內容被併入本文中作為參考。

【0028】 如本文所述， K_D 係指解離常數，特定言之，為該抗體對一預定抗原之 K_D ，且為該抗體對一特定標靶之親和性的量值。高親和性抗體對一預定抗原之 K_D 係 10^{-8} M 或更少，更佳的是 10^{-9} M 或更少，且再佳者為 10^{-10} M 或更少。 K_D 的倒數為 K_A ，即結合常數。如本文所述之術語「 k_{dis} 」或「 k_2 」或「 k_d 」，係意指特定抗體-抗原交互作用的解離速率。「 K_D 」是解離速率 (k_2) (亦稱為「離開速率 (k_{off})」與結合速率 (k_1) 或「連接速率 (k_{on})」之比率。因此， K_D 等同 k_2/k_1 或 k_{off}/k_{on} ，且以莫耳濃度 (M) 表示。 K_D 越小，則結合越強。因此， K_D 為 10^{-6} M (或 1 μ M) 表示較 10^{-9} M (或 1 nM) 結合力弱。這些數值可利用表面電漿子共振 (surface plasmon resonance) 及/或 Kinexa 法計算，如該領域中所習知。

【0029】 如本文所述之術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指由單一分子組成之抗體分子的製劑。單株抗體組合物對於一特定表位呈現單一的結合特異性及親和性。當所有抗體係藉由重組方法製備、表現、產生或分離時，該術語亦包括「重組抗體」及「重組單株抗體」，如(a)分離自一動物或融合瘤之抗體，該融合瘤係藉由融合抗體分泌動物細胞及融合夥伴 (fusion partner) 而製備；(b)自經轉形以表現抗體之宿主細胞 (例如來自轉染瘤 (transfectoma)) 所分離之抗體；(c)自重組的組合人類或其

他物種之抗體庫分離之抗體；以及(d)藉由任何其他涉及將免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列方式所製備、表現、產生或單離之抗體。如本文所述之「經分離之抗體」，係意指一抗體為實質上不含具有不同抗原特異性的其他抗體。然而，與人類 CD27 之表位、異構型或變異體特異性結合之分離抗體可能具有與其他有關抗原（例如來自其他物種的抗原，如 CD27 物種同源物）之交叉反應性。此外，經分離之抗體可實質上不含其他細胞材料和/或化學物。在本發明之一實施例中，具有不同特異性之「經分離之」單株抗體的組合係經組合至一明確界定之組成物。

【0030】 如本文所述，「特異性結合」、「免疫特異性結合」及「免疫特異性地結合」意指抗體結合至一預定抗原。典型上，該抗體結合之解離常數 (K_D) 為 10^{-7} M 或更少，且結合至預定抗原之 K_D 至少小於其結合非特異性抗原（例如 BSA、酪蛋白或任何其他特定多肽）之 K_D 二倍。慣用語「會識別抗原的抗體」和「對抗原具特異性之抗體」係與本文的術語「會特異性地結合抗原的抗體」交替使用。如本文所述，「高度特異性」結合意指特異性標靶表位的抗體之相對 K_D 至少比抗體結合其他配體 K_D 的小 10 倍。

【0031】 如本文所述的「同型」意指由重鏈恆定區基因所編碼的抗體分類（例如 IgM 或 IgG）。一些抗體分類更包含子類，該子類亦由重鏈恆定區所編碼，且在恆定區域內之特定殘基處（如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4）進一步經寡醣裝飾，藉此進一步給予該抗體生物功能。例如，在人類抗體同型中，IgG1、IgG3 和範圍較小的 IgG2 顯示有如鼠類 IgG2a 抗體般的效應物功能。

【0032】 「效應物」功能或「效應物陽性」係指抗體包含不同於抗原特異性結合域之區域，其能與受體或其他血液成分（例如補體）交互作用，導致如巨噬細胞的誘集（recruitment），以及導致被抗體之抗原結合域結合之細胞破壞之事件。抗體具有數種藉由結合效應物分子所調介之效應物功能。舉例而言，補體 C1 成分與抗體結合會活化補體系統。補體活化在調理作用（opsonisation）及細胞病原體的裂解上是重要的。補體活化刺

激炎症反應，且亦涉及自體免疫過敏反應。再者，抗體經由 Fc 區結合至細胞，以抗體 Fc 區之 Fc 受體位置結合至細胞上的 Fc 受體 (FcR)。有許多的 Fc 受體係對不同種類抗體有特異性，包括 IgG 抗體 (γ 受體)、IgE (η 受體)、IgA (α 受體) 和 IgM (μ 受體)。抗體結合至細胞表面之 Fc 受體引發許多重要及多樣之生物反應，包括吞噬及破壞抗體包覆粒子、廓清免疫複體、藉由殺手細胞溶裂抗體包覆之標靶細胞 (稱為抗體依賴性細胞調介之細胞毒殺作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)，或 ADCC)、釋出炎症調介物、胎盤轉移作用及控制免疫球蛋白產生。

1. 本發明之抗體組成

【0033】 本發明之 CD27 中和抗體為體外、原位及/或體內抑制、阻斷或干擾至少一種 CD27 活性或 CD70 結合的抗體，且不促進、刺激、誘發或促效 (agonize) CD27 活性或配體結合，且抗體結合亦不會模擬 CD27 配體接合之下游作用的抗體，特別是 CD70 與 CD27 之交互作用，例如宿主細胞中的訊號傳遞。合適的 CD27 中和抗體、特定部分或變異體亦可視情況影響至少一個 CD27 活性或功能，例如但不限於：RNA、DNA 或蛋白質合成；蛋白質釋放；T 細胞活化；B 細胞增生或分化；抗體分泌；CD27 受體訊號傳遞；CD27 截切；CD27 配體結合；CD27 或 CD70 的誘發、合成或分泌。

【0034】 關於阻斷本發明之 CD27 中和抗體活性的 CD27:CD70 共刺激路徑，以提升的 T 細胞或 B 細胞效應物功能治療自體免疫疾病可能是有益的。

【0035】 本發明係基於發現抗人類 CD27 單株抗體能夠抑制 CD70 造成的 CD27 活化，且在缺乏 CD70 的刺激下不會使 CD27 自活化。能夠分泌這樣的抗體的融合瘤和轉染瘤 (transfectoma) 被產生。利用 NF- κ B 報導基因分析來鑑定幾個在表現 CD27 的宿主細胞中能夠抑制 CD70 調介的 NF- κ B 報導子活化的候選抗體。第二，確認該抗體的特徵為當在缺乏 CD70 的刺激下與 CD27 偶聯的螢光素酶報導子轉染細胞一起培養時無法

誘導劑量依賴性的催動活性。第三，證實該抗體劑量依賴性地抑制 CD70 依賴性人類初始 (naïve) CD4 T 細胞的增殖。第四，生成的該 CD27 中和抗體能夠以劑量依賴的方式減少 CD70 調介的來自人類原發性 B 細胞對生成漿細胞的刺激。第五，在有測試的抗-CD27 抗體的原發性 T 細胞或 B 細胞中沒有觀察到顯著的劑量依賴性催動活性。

【0036】 本發明之抗體可干擾 CD27:CD70 的接合，在細胞培養中既可抑制 T 細胞效應物功能也可抑制 B 細胞分化成漿細胞，因此可用來治療免疫調介的疾病，包括但不限於類風溼性關節炎、全身性紅斑狼瘡、多發性硬化症、發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease)、克隆氏病、慢性阻塞性肺臟疾病或其他併發症狀、與功能異常相關的病狀、疾病或失調、或是 CD27 表現細胞群的活化。本文所述之 CD27 結合抗體會辨識人類 CD27 胞外區域上的至少三個不同區域，表示 CD27 上額外發現有多處位點適於作為抗體或其他具有類似功能阻斷能力的化合物之標靶。因此，表現及純化此處提供之抗體結合域為胺基酸序列進一步提供了一種工具，其可作為篩選展現 CD27 中和活性之新穎分子之裝置。

【0037】 在一實施例中，該抗人類 CD27 抗體具有一包含一輕鏈變異區 (VL) 或重鏈變異區 (VH) 的結合區，其具有如 SEQ ID NO: 76-144 所示之胺基酸序列，且該抗體或其上之結合部份會免疫特異性地結合至 CD27。在本發明之另一個實施例中，該抗體或其抗原結合部份會結合至 CD27 蛋白，並且除此之外，該抗體還擁有本發明抗體之特定功能特性，像是：

結合至固定化的人類 CD27；

抑制人類可溶性 CD27 結合至表現 CD70 的細胞；

抑制人類 CD70 調介的 CD27 訊號傳遞，由 NF- κ B 報導基因分析測量且 IC50 小於 0.5 ug/ml；

抑制 CD70 調介的初始 (naïve) T 細胞增生；

抑制 CD70 調介的來自原發性人類 B 細胞的漿細胞爆炸性形成；

抑制人類 CD70 調介的來自原發性 T 細胞及原發性 B 細胞或細胞株的可溶性調節分子 (soluble mediator) 釋放；

結合至人類 CD27 且 K_d 小於 100 nM (10^{-7} M)；

在缺乏 CD70 的刺激下最小活化 CD27 訊號傳遞；以及

結合至人類 CD27 胞外區域上的一表位，其中該單株抗體以一或多個 SEQ ID NOS：76-144 的變異區序列與該表位結合並與被辨識具有一或多個 SEQ ID NOS：76-144 的變異區序列的單株抗體競爭結合。

【0038】 因為在該領域中抗體重鏈和輕鏈 CDR 區在抗體對抗原的結合特異性/親和性上扮演著特別重要的角色係屬習知，因此本文揭露之本發明之重組抗體較佳地包含一或多個 SEQ ID NOS：1-75 的重鏈和輕鏈 CDR。這樣的抗體可以利用習知技術以化學的方式將抗體的各種不同部分（例如 CDR、框架）結合在一起來製備，利用重組 DNA 技術的習知技術藉由製備或表現一（亦即一或多個）編碼該抗體之核酸分子來製備，或利用任何其他合適的方法來製備。

【0039】 在一實施例中，本發明之人類抗體具有一或多個 SEQ ID NOS：1-75 的重鏈和輕鏈 CDR 序列。除了這些 CDR 序列，熟諳此技藝者將知道該確切 CDR 序列可能（或被希望）有一些誤差，但仍然維持該抗體結合至 CD27 的能力（例如保守性取代）。因此，在另一實施例中，該人類抗體可由一或多個 CDR 組成，例如，該 CDR 與 SEQ ID NOS: 1-75 列出的 CDR 具有 90%、95%、98%或 99.5%相似度。

【0040】 在另一實施例中，本發明抗體所結合之表位（包含少至五個多至全部的 CD27 蛋白殘基 21 至 191 或編碼其序列之核酸）可用以免疫化一對象，以直接於宿主中產生本發明之抗體，以達治療、預防或改善與 CD27 產生有關之疾病或疾病症狀之目的。

2. CD27 中和抗體的產生

【0041】 一展現如本文揭露及描述之抗體所例示之所需生物活性譜的 CD27 中和抗體可藉由各種不同的技術來產生，包括標準的體細胞雜

交技術（融合瘤方法）（Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495）。在融合瘤方法中，將小鼠或其他適當的宿主動物（例如倉鼠或獼猴）如此文所述免疫，以引起會產生或能夠產生特異性結合至用於免疫之蛋白質的抗體的淋巴球。或者，淋巴細胞可為體外免疫。然後使用一個合適的融合劑，如聚乙二醇，將淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成一融合瘤細胞（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。

【0042】 如本文所述及/或如該領域中所習知，也可藉由免疫化一能夠產生全套人類抗體之基因轉殖動物（例如小鼠、大鼠、倉鼠、非人類靈長類動物等等）來視情況產生 CD27 中和抗體。產生人類抗 CD27 抗體的細胞可以從這些動物中分離出且使用合適的方法不死化（immortalized），如本文所述的方法。或者，編碼序列的抗體可為經選殖的，引入到一個合適的載體，且藉由本文所教示及此項技術領域已知的方法轉染用於表現和分離抗體的宿主細胞。

【0043】 利用生殖系組態中攜帶人類免疫球蛋白（Ig）基因位點的基因轉殖小鼠可提供單離的針對各種標靶的高親和性完全人類單株抗體，該標靶包括正常人類免疫系統可耐受的人類自體抗原（Lonberg, N.等人，US5569825，US6300129 及 1994, *Nature* 368:856-9；Green, L.等人，1994, *Nature Genet.* 7:13-21；Green, L. & Jakobovits, 1998, *Exp. Med.* 188:483-95；Lonberg, N and Huszar, D., 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93；Kucherlapati 等人，US6713610；Bruggemann, M.等人，1991, *Eur. J. Immunol.* 21:1323- 1326；Fishwild, D.等人，1996, *Nat. Biotechnol.* 14:845-851；Mendez, M.等人，1997, *Nat. Genet.* 15:146-156；Green, L., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23；Yang, X.等人，1999, *Cancer Res.* 59:1236-1243；Bruggemann, M. and Taussig, M J., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458, 1997；Tomizuka 等人，WO02043478）。在這種小鼠的內源性免疫球蛋白基因位點可以被破壞或刪除，以消除動物產生內源性基因編碼的抗體的能力。此外，可委託如

Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和 Medarex (San Jose, Calif.) 公司，使用如上所述的技術來提供針對一選定抗原的人類抗體。

【0044】 在另一實施例中，該人類抗體係選自一噬菌體庫，其中該噬菌體包含人類免疫球蛋白基因，且該庫表現人類抗體結合域，例如單鏈抗體 (scFv)，如 Fab，或一些展現成對或不成對抗體變異區的其他構造 (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets et al. *PITAS (USA)* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。本發明之人類單株抗體亦可使用噬菌體呈現法 (phage display method) 製備，以供篩選人類免疫球蛋白基因庫。此種用於分離人類抗體之噬菌體呈現法已於本領域中建立。例如見：美國專利第 5,223,409、5,403,484、及 5,571,698 號 (Ladner 等人)、美國專利第 5,427,908 及 5,580,717 號 (Dower 等人)、美國專利第 5,969,108 及 6,172,197 號 (McCafferty 等人)、以及美國專利第 5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915 及 6,593,081 號 (Griffiths 等人)。

【0045】 免疫原性抗原的製備以及單株抗體的生產可利用任何合適的技術 (如重組蛋白生產) 來進行。可將該免疫原性抗原以純化蛋白或包括整個細胞或細胞或組織萃取物之蛋白質混合物的形式投予至一動物中，或者該抗原可由編碼該抗原或其部份之核酸於該動物體內重新 (de novo) 形成。

【0046】 本發明之經分離的核酸可使用(a)重組方法、(b)合成技術、(c)純化技術、或其組合而製得，如該領域中所習知。利用該領域中習知方法 (例如藉由使用能特異性地結合至編碼鼠源性抗體的重鏈與輕鏈的基因的寡核苷酸探針)，可輕易地單離與定序出編碼該單株抗體的 DNA。當生產融合瘤時，該等細胞可做為該等 DNA 的來源。或者使用其中編碼序列與轉譯產物相連結的呈現技術，如噬菌體或核糖體呈現庫，該結合劑 (binder) 與該核酸的選擇則簡化。噬菌體選擇後，可從噬菌體分離出抗體編碼區且用於產生全抗體，包括人類抗體，或任何所欲抗原結合片段，

且表現於任何所欲宿主，包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母菌與細菌。

人源化抗體

【0047】 本發明進一步提供與人類 CD27 結合之人源化（基因工程改造或適應人類）免疫球蛋白（或抗體）。該人源化形式之免疫球蛋白具有實質上來自人類免疫球蛋白的各種不同框架區（稱為受體免疫球蛋白）以及實質上來自非人類單株抗體之特異性結合 CD27 的 CDR。恆定區若存在時，亦可實質上為來自人類免疫球蛋白。該人源化抗體對 CD27 所展現之 K_D 至少約 10^{-6} M (1 μ M)、約 10^{-7} M (100 nM) 或更少。該人源化抗體之結合親和力可能大於或小於產出該人源化抗體之小鼠抗體之結合親和力。為了影響改變該人源化抗體對 CD27 的親和力（例如提高親和力），可在該 CDR 殘基或該人類殘基進行取代。

【0048】 如果人類變異區框架採用與該 CDR 起源之小鼠變異區框架相同或類似的構形，將小鼠 CDR 取代進人類變異區框架最有可能導致其保留正確的空間定位。此係藉由從框架序列展現與衍生該 CDR 之鼠類變異區框架具高度序列相似度的人類抗體獲得該人類變異區來達成。該重鏈與輕鏈變異區框架可衍生自相同或不同的人類抗體序列。該人類抗體序列可為天然發生的人類抗體的序列，可為衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列的序列，或可為數種人類抗體及/或生殖系序列的共有序列。

【0049】 合適的人類抗體序列係經由電腦比較小鼠變異區的胺基酸序列與已知人類抗體的序列而加以鑑定。該比較係分別對重鏈與輕鏈進行，但原則都是類似的。

【0050】 在一實例中，使用該 CD27 中和單株抗體之胺基酸序列於編制在公共抗體序列資料庫中的人類抗體資料庫中查詢。本文中所揭露或描述之重鏈變異區可用來找尋具有最高序列相似度的該人類變異區。同樣地，本文中所揭露或描述之輕鏈變異區可用來找尋具有最高序列相似度的該人類變異區。為各個鼠類變異區製備一 DNA 構造，其中該編碼來自鼠

類單株抗體供體的其中一個重鏈變異區的區域被轉移至所選的人類重鏈變異序列，取代該人類變異區的 CDR。

【0051】 將鼠類 CDR 區與人類變異框架區不自然的並置可造成不自然的構形限制，除非以某些胺基酸殘基取代來修正，否則該限制會導致結合親和力的喪失。如上所述，本發明之人源化抗體包含實質上來自人類免疫球蛋白的各種不同的框架區以及實質上來自小鼠免疫球蛋白（例如 C2177、C2186、C2191 或 C2192 小鼠抗體）的 CDR。在確認小鼠抗體的 CDR 及合適的人類受體免疫球蛋白序列後，下一個步驟係決定來自這些成份的哪些殘基（如果有的話）應被取代以優化所得的人源化抗體的特性。在一般情況下，應儘量減少以鼠類胺基酸殘基取代人類胺基酸殘基，因為引進鼠類殘基會增加該抗體在人類中引發 HAMA 反應的風險。用來取代的胺基酸係基於其對 CDR 構形及/或抗原結合的可能影響來選擇。對於這些可能影響的研究可藉由建造模型、檢驗該胺基酸在特定位置的特性或經驗上觀察特定胺基酸取代或突變的影響來完成。關於經驗法，已發現要創建一可用於篩選所欲活性、結合親和力或特異性的變異體序列庫是特別便利的。一種用於創造該等變異體基因庫的形式為噬菌體呈現載體。或者，可使用用來多樣化變異域內編碼有標靶殘基的核酸序列的其他方法來產生變異體。

【0052】 決定是否需要進一步取代的另一方法，以及用於取代的胺基酸殘基的選擇，可使用電腦模型完成。用於製造免疫球蛋白分子的三維影像的電腦硬體與軟體已可廣為取得。一般而言，分子模型係由經解析的免疫球蛋白鏈或其域的結構開始產生。將欲模型化的鏈與經解析的三維結構的鏈或域比較胺基酸序列相似性，並選擇顯示最大序列相似性的鏈或域作為構築該分子模型的起點。修改經解析的起始結構以使介於免疫球蛋白鏈或域與該起始結構之真實胺基酸之間的差異被模型化。然後經修正的結構被組裝為組合免疫球蛋白。最終地，該模型藉由能量模擬以及藉由確認所有原子皆彼此於適當距離內且結合長度與角度皆於化學可接受限制內而被精細化。

【0053】 通常人源化抗體中的 CDR 區與其來源的小鼠抗體中對應的 CDR 區大體上相同，更通常的是完全相同。雖然不是通常想要，有時候可以在 CDR 殘基製造一或多個保守的胺基酸取代而不會明顯影響所得的人源化免疫球蛋白之結合親和力。偶爾，CDR 區的取代可以提高結合親和力。

【0054】 除了上述討論的特定胺基酸取代以外，人源化免疫球蛋白的框架區通常與其來源的人類抗體中的框架區大體上相同，更通常的是完全相同。當然，很多框架區中的胺基酸對抗體的特異性或親和力貢獻很少或沒有直接貢獻。因此，框架殘基的許多個別保守性取代不會明顯改變所得的人源化免疫球蛋白的特異性或親和力而可以被容忍。

【0055】 由於編碼的簡併，每個免疫球蛋白胺基酸序列都有各種不同的核酸序列來編碼。所欲核酸序列可藉由重新合成固相 DNA 或藉由將該所欲多肽之較早製備的變異體以 PCR 突變來製造。編碼本發明所揭示的抗體的所有核酸皆涵括於本發明。

【0056】 如上述製造的人類抗體的變異區段典型地係連結至人類免疫球蛋白恆定區的至少一部份。該抗體將含有輕鏈與重鏈恆定區兩者。重鏈恆定區通常包括 CH1 域、鉸鏈域、CH2 域、CH3 域，有時還會包括 CH4 域。

【0057】 該人源化抗體可包含來自任何抗體種類的任何類型的恆定域，抗體種類包括 IgM、IgG、IgD、IgA 與 IgE，以及任何亞種類（同型），包括 IgG1、IgG2、IgG3 以及 IgG4。當期望該人源化抗體顯現細胞毒性活性時，恆定域通常為補體固定恆定域且該種類典型為 IgG₁。當不期望該等細胞毒性活性時，該恆定域可為 IgG₂ 種類。該人源化抗體可包含來自一種以上的種類或同型的序列。

【0058】 將編碼人源化輕鏈與重鏈變異區的核酸（視情況連結至恆定區）插入至表現載體。該輕鏈與重鏈可選殖於相同或不同的表現載體。可將編碼免疫球蛋白鏈的 DNA 區段操作連接至表現載體的控制序列以確保免疫球蛋白多肽的表現。該等控制序列包括一訊號序列、一啟動子、一

增強子以及一轉錄終止序列（參照 Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989)；WO 90/07861；Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992)，其全文皆併入本文中作為用於所有目的之參考）。

【0059】 治療性蛋白質的功效係可能因不需要的免疫反應而受到限制。非人類單株抗體可具有可引起人類免疫反應之線性胺基酸序列的實質延伸與局部結構構象。減少非人類抗體的免疫原性的第一次嘗試係建造人鼠抗體的嵌合體，接著在 1980 年代晚期出現人源化那些嵌合體的方法（可在 Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13: 1619-1633, 2008 中複習）。

【0060】 最常使用的人源化方法之一係所謂的「互補決定區(CDR)移植」，其中鼠類 CDR 係被移植到人類抗體框架區 (FR)。然而，應用這種方法往往會導致大量損失對抗原的結合性，從而減少以該抗體為基礎的藥物的效力。因此，使用良好的設計原理來創造當注射到人體內時引起最小的免疫原性反應但保留母代非人類分子的結合性和生物物理外貌的抗體分子是非常有價值的。

【0061】 本文敘述 2177 及 2191（對 CD27 具有結合特異性的兩種小鼠單株抗體 (mAb)）的人源化。利用 Janssen 專有的人源化技術（稱為人類框架改編 (Human Framework Adaption (HFA))，揭露於 Raghunathan, G.的專利申請案 US20090118127 A1 並進一步經 Fransson 等人說明 (J Mol Biol 398:214-231, 2010)）的第一個步驟，將這些抗體的框架 (FR) 以人類生殖系基因 FRs 取代。該技術使一組對 CD27 具特異性的單株抗體比起親代小鼠抗體 2177 及 2191 具有較好的結合和抑制特性。

3. 使用抗-CD27 抗體之方法

【0062】 如下面所詳述，本發明證實四種分離的單株抗體 (C2177、C2186、C2191 及 C2192) 會結合至 CD27 上的三個非覆蓋型表位並展現體外及/或體內的 CD27 抑制活性。值得注意的是，該單株抗體的反應性包括劑量依賴性阻斷 CD27 與 CD70 相互作用的能力；在有 CD70 的存在下減少 CD27 訊號傳遞的能力；減少 T 細胞產生 IL-4 及 IFN γ 的能力以及抑

制 CD70 依賴性人類初始 CD4⁺ T 細胞增殖、抑制 CD70 依賴性 B 細胞增殖及抑制漿細胞生成的能力。此外，分離的抗體在缺少 CD70 刺激的情況下不會顯著誘導 CD27 活化。

【0063】 鑑於在本發明中所述的單株抗體的性質，該抗體或其抗原結合片段皆適合作為在人類和動物中治療或預防 CD27 相關症狀的治療劑和預防劑。

【0064】 一般而言，用途將包含將治療或預防有效量的本發明的一或多種單株抗體或抗原結合片段，或選自具有相同結合與生物活性範圍的一抗體或分子，投予至一易感對象或一顯示症狀者，其中已知 CD27 活性具有病理後遺症，如免疫失調或腫瘤的生長與轉移。可投予該抗體之任何活性形式，包括 Fab 與 F(ab')₂ 片段。

【0065】 較佳地，所使用的抗體與接受者種型相容以使該個體對單株抗體的免疫反應不會造成不可接受的短循環半衰期或誘發對單株抗體的免疫反應。所投予的單株抗體可顯示某些二級功能，例如結合至該對象的 Fc 受體以及活化 ADCC 機制，以使用細胞溶解或細胞毒殺機制來去除標靶細胞族群，或可將彼等以基因工程限制或拿掉該些二級效應物功能以保存標靶細胞族群。

【0066】 個體的治療可包含投予一治療有效量的本發明抗體。該抗體可如下文所述提供於一套組中。該抗體可呈混合物使用或投予，例如等量投予，或個別地依序提供或全部於一次投予。在提供給患者能結合至 CD27 的抗體或其片段，或能保護接受的患者對抗 CD27 的抗體時，投予劑的劑量會依據某些因子而變動，例如患者的年齡、體重、身高、性別、身體病況、既往病史等等。

【0067】 在一類似的方法中，本發明單株抗體的另一治療用途係利用因抗本發明單株抗體之一而產生之抗獨特型抗體（anti-idiotypic antibody）來自動免疫（active immunization）一患者。以模擬該表位結構之抗獨特型來免疫可引起活躍的抗-CD27 反應（Linthicum, D. S. and Farid,

N. R., Anti-idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry (1988), pp 1-5 and 285-300)。

【0068】 同樣地，可藉由投予一或多種抗原性及/或免疫原性表位作為疫苗組分而誘發自動免疫。疫苗接種可以足以使接受者產生對抗此生物性功能區的抗體的量，預防性或治療性，經口或腸道外地進行。可用抗原性/免疫原性肽之純的形式、該肽的片段或該肽的修改形式，來自動免疫該宿主。可將不相應於原始蛋白質序列的一或多種胺基酸添加至原始胜肽或截斷形式胜肽的的胺基或羧基終端。該等額外的胺基酸有用於耦合該胜肽至另一胜肽、至一大的攜帶蛋白質或至一支撐體。可用於這些目的的胺基酸包括：酪胺酸、離胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸及其衍生物。可使用其他的蛋白質修飾技術，例如 NH₂-乙醯化或 COOH-終端醯胺化，以提供用於耦合或融合該胜肽至另一蛋白質或胜肽分子或支撐體的額外手段。

【0069】 能防止不想要的 CD27 生物活性的抗體係打算被用來以足以有效減少、解決或改善 CD27 相關症狀或病狀的量提供給接受對象。若藥劑的劑量、投予路徑等足以影響該等反應，則量係稱為充足的或「治療有效量」以「有效於」症狀的減少。對於抗體投予的反應可藉由例如成像技術或藉由組織樣本的活體外分析而分析對象受到影響的組織、器官或細胞予以量測。若一藥劑的存在造成接受患者生理上有可偵測的變化，則該藥劑為生理顯著的。

治療性應用

【0070】 本發明之 CD27 中和抗體、抗原結合片段或其特定變異體可用於量測或在細胞、組織、器官或動物（包括哺乳動物與人類）中引起反應，以診斷、監測、調控、治療、緩和、幫助預防 CD27 或表現 CD27 的細胞所調介、影響或調控的病況的發生或減輕其症狀。因此，本發明提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療至少一種如該領域

中所習知或如本文中所描述之 CD27 相關疾病的方法，其係使用至少一種本發明之 CD27 抗體。特別的適應症係於下文討論。

免疫相關疾病

【0071】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療免疫相關發炎性疾病的方法，該疾病包括但不限於類風溼性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、全身性幼年型類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、僵直性脊椎炎、胃潰瘍、血清反應陰性關節炎、骨關節炎、發炎性腸道疾病、潰瘍性大腸炎、全身性紅斑性狼瘡、抗磷脂症候群、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、特發性肺纖維化 (idiopathic pulmonary fibrosis)、全身性血管炎/韋格納肉芽腫 (weger's granulomatosis)、類肉瘤病、睪丸炎/輸精管結紮逆轉手術 (vasectomy reversal procedures)、過敏性/異位性疾病 (atopic disease)、氣喘、過敏性鼻炎、濕疹、過敏性接觸皮膚炎、過敏性結膜炎、過敏性肺炎、移植、器官移植排斥反應、移植物對抗宿主疾病、全身性炎症反應症候群、敗血症候群、革蘭氏陽性敗血症、革蘭氏陰性敗血症、培養陰性敗血症 (culture negative sepsis)、真菌性敗血症、嗜中性白血球低下發燒 (neutropenic fever)、尿膿毒症 (urosepsis)、腦膜炎球菌血症 (meningococcemia)、創傷/出血、燒傷、游離輻射暴露、急性胰臟炎、成人呼吸窘迫症候群 (adult respiratory distress syndrome)、酒精性肝炎、慢性炎性病 (chronic inflammatory pathologies)、類肉瘤病、克羅恩病 (Crohn's pathology)、鎌狀細胞貧血症、糖尿病、腎病、遺傳性過敏疾病、過敏反應、花粉熱、常年性鼻炎、結膜炎、子宮內膜異位、蕁麻疹、全身過敏性反應 (systemic anaphalaxis)、皮膚炎、惡性貧血、溶血性疾病、血小板減少症、任何器官或組織的移植排斥反應、腎臟移植排斥反應、心臟移植排斥反應、肝移植排斥反應、胰臟移植排斥反應、肺移植排斥反應、骨髓移植 (BMT) 排斥反應、皮膚移植排斥反應、軟骨移植排斥反應、硬骨移植排斥反應、小腸移植排斥反應、胎兒胸腺植入物排斥反應、副甲狀腺移植排斥反應、任何器官或組織的異種移植排斥反應

(xenograft rejection)、同種異體移植排斥反應 (allograft rejection)、抗受體過敏性反應、葛瑞夫茲氏病 (Graves disease)、雷諾氏症 (Raynaud's disease)、B 型胰島素阻抗性糖尿病、重症肌無力、抗體調介的細胞毒性、III 型過敏性反應、POEMS 症候群 (多發性神經病變、器官腫大、內分泌異常、單株球蛋白症 (monoclonal gammopathy) 和皮膚變化症候群)、天疱瘡、硬皮病、混合性結締組織疾病、特發性愛迪生氏病 (idiopathic Addison's disease)、糖尿病、慢性活動性肝炎 (chronic active hepatitis)、原發性膽汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、白斑病 (vitiligo)、血管炎、心肌梗塞後心切開術症候群、IV 型過敏、接觸性皮膚炎、由於細胞內有機體而產生之肉芽腫、藥物敏感性、代謝性/特發性、威爾森氏症、血色病 (hemochromatosis)、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、糖尿病視網膜病變、橋本氏甲狀腺炎、骨質疏鬆症、下丘腦-腦下垂體-腎上腺軸的評估、甲狀腺炎、腦脊髓炎、惡病質、囊腫纖維化、新生兒慢性肺部疾病、慢性阻塞性肺部疾病 (COPD)、家族性噬血症候群 (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis)、皮膚病、牛皮癬、禿髮、腎病症候群、腎炎、腎絲球腎炎、急性腎功能衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、OKT3 治療、抗 CD3 治療、細胞介素治療、化學治療、放射治療 (包括但不限於例如無力、貧血、惡病質等等)、慢性水楊酸中毒等等。

肺部疾病

【0072】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療肺部或胸膜疾病的方法，其包括但不限於調節對相關細胞或輔助細胞的免疫反應或在例如以下列舉中涉及 CD27 之細胞進程：肺炎；肺膿瘍；由粉塵、氣體或煙霧形式之媒介所引起之職業性肺部疾病；氣喘、纖維閉塞性細支氣管炎 (bronchiolitis fibrosa obliterations)、呼吸衰竭、肺部過敏性疾病 (包括過敏性肺炎 (外源性過敏性肺泡炎)、過敏性支氣管肺麴菌症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis) 與藥物反應)；成人呼吸窘迫症候群 (ARDS)、肺出血腎炎症候群 (Goodpasture's Syndrome)、慢性

阻塞性氣道疾病（COPD）、特發性間質性肺病（如特發性肺纖維化（idiopathic pulmonary fibrosis）、類肉瘤病、脫屑性間質性肺炎（desquamative interstitial pneumonia）、急性間質性肺炎、呼吸性細支氣管炎相關的間質性肺病、特發性阻塞性細支氣管炎合併器質化肺炎（idiopathic bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia）、淋巴細胞性間質性肺炎、蘭格罕細胞組織球增生症（Langerhans' cell granulomatosis）、特發性肺鐵質沉著症（idiopathic pulmonary hemosiderosis）；急性支氣管炎、肺泡蛋白質沉著症（pulmonary alveolar proteinosis）、支氣管擴張、胸膜異常、肺不張、囊腫纖維化及肺部腫瘤，以及肺栓塞。

惡性疾病

【0073】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療惡性疾病的方法，其包括但不限於調節對相關細胞或輔助細胞的免疫反應或在以下列舉之至少其中一種中涉及 CD27 之細胞進程：白血病、急性白血病、急性淋巴性白血病（ALL）、B 細胞、T 細胞或 FAB ALL、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、慢性淋巴球性白血病（CLL）、毛細胞白血病、骨髓發育不良症候群（MDS）、淋巴瘤、霍奇金氏病、惡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、伯奇氏淋巴瘤（Burkitt's lymphoma）、多發性骨髓瘤、原發性或轉移性疾病之固態腫瘤、卡波西氏肉瘤、大腸直腸癌、胰臟癌、腎細胞癌、包括間皮瘤之肺癌、乳癌、鼻咽癌、惡性組織球病、腫瘤相關症候群（paraneoplastic syndrome）/惡性高鈣血症、腺癌、鱗狀細胞癌、肉瘤、惡性黑色素瘤（尤其是轉移性黑色素瘤）、血管瘤、轉移性疾病、癌症相關的骨吸收、癌症相關的骨痛等等。

心血管疾病

【0074】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療心血管疾病的方法，其包括但不限於調節對相關細胞或輔助細胞

的免疫反應或在以下列舉之至少其中一種中涉及 CD27 之細胞進程：心肌梗塞、鬱血性心衰竭、中風、缺血性中風、出血、動脈硬化、動脈粥狀硬化、再狹窄 (restenosis)、糖尿病性動脈硬化疾病 (diabetic atherosclerotic disease)、高血壓、動脈性高血壓、腎血管性高血壓、暈厥、休克、心血管系統梅毒 (syphilis of the cardiovascular system)、心臟衰竭、肺原性心臟病、原發性肺動脈高血壓、心律不整、心房異位搏動 (atrial ectopic beats)、心房撲動、心房震顫 (持續性或陣發性)、後灌注症候群 (post perfusion syndrome)、心肺循環炎症反應 (cardiopulmonary bypass inflammation response)、紊亂性或多源性前房心搏過速、一般窄的 QRS 心搏過速 (regular narrow QRS tachycardia)、特異性節律不整 (specific arrhythmias)、心室纖維性顫動、希氏束節律不整 (His bundle arrhythmias)、房室傳導阻滯、束支傳導阻滯、心肌缺血性疾病、冠狀動脈疾病、心絞痛、心肌病、擴張性充血性心肌病 (dilated congestive cardiomyopathy)、限制性心肌病 (restrictive cardiomyopathy)、心臟瓣膜疾病、心內膜炎、心包膜疾病、心臟腫瘤、主動脈和週邊動脈瘤 (aortic and peripheral aneurysms)、主動脈剝離、主動脈炎、腹主動脈及其分支的閉塞、周圍血管疾病、動脈阻塞疾病、週邊動脈粥狀硬化疾病 (peripheral atherosclerotic disease)、阻塞血栓性血管炎 (thromboangitis obliterans)、功能性週邊動脈疾病 (functional peripheral arterial disorders)、雷諾氏現象和疾病、手足發紺、肢端紅痛症、靜脈疾病、靜脈栓塞、靜脈曲張、動靜脈瘻管、淋巴水腫 (lymphedema)、脂性水腫 (lipedema)、不穩定型心絞痛、再灌注傷害 (reperfusion injury)、後幫浦症候群 (post pump syndrome)、缺血再灌注傷害等等。

神經性疾病

【0075】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療神經性疾病的方法，其包括但不限於調節對相關細胞或輔助細胞的免疫反應或在以下列舉中涉及 CD27 之細胞進程：神經退化性疾病、多

發性硬化症、偏頭痛 (migraine headache)、愛滋病癡呆複合症狀 (AIDS dementia complex)、髓鞘脫失病 (如多發性硬化症及急性橫貫性脊髓炎)；錐體外和小腦疾病 (如皮質系統病變)；基底神經節的疾病或小腦疾病；過動症 (hyperkinetic movement disorders) (如亨汀頓氏舞蹈症及老年性舞蹈病 (senile chorea))；藥物引起的運動障礙 (如因阻斷 CNS 多巴胺受體之藥物所引起之異常)；運動功能減退的運動障礙 (帕金森氏症)；進行性核上麻痺 (Progressive supranucleo Palsy)；小腦的結構性病變；脊髓小腦變性症 (如脊髓共濟失調 (spinal ataxia)、弗裏德賴希共濟失調 (Friedreich's ataxia)、小腦皮質變性、多系統變性 (Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager 及 Machado-Joseph))；全身性疾病 (雷夫蘇姆氏病症 (Refsum's disease)、無 β 脂蛋白血症 (abetalipoproteinemia)、共濟失調、毛細血管擴張及粒線體多系統疾病)；脫髓鞘核心障礙 (demyelinating core disorders) (如多發性硬化症、急性橫貫性脊髓炎)；及運動單位失調 (如神經性肌肉萎縮 (前角細胞變性 (anterior horn cell degeneration) 如肌萎縮性脊髓側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis)、嬰兒型脊髓性肌萎縮症 (infantile spinal muscular atrophy) 及少年型脊髓性肌萎縮症 (juvenile spinal muscular atrophy)))；阿茲海默症；唐氏症；擴散性路易體症 (diffuse Lewy body disease)；與路易體發育相關之老年癡呆症；高沙可夫症候群 (Wernicke-Korsakoff syndrome)；慢性酒精中毒；庫賈氏症 (Creutzfeldt-Jakob disease)；亞急性硬化泛腦炎、哈雷若登-斯帕茨病 (Hallerorden-Spatz disease)；以及拳擊手型失智症等等。這樣的方法可視情況包含投予一有效量的包含至少一 TNF 抗體或其特定部份或變異體之組合物或醫藥組合物至需要該調節、治療或療法的細胞、組織、器官、動物或病患。

CD27 中和抗體的其它治療用途

【0076】 除了上述的病況和疾病，本發明亦提供一種調節或治療各種病因引起的纖維化狀況的方法，其係藉由調節對相關細胞或輔助細胞的

免疫反應或在例如以下列舉中涉及 CD27 之細胞進程：肝纖維化（包括但不限於酒精引起的肝硬化、病毒引起的肝硬化、自體免疫引起的肝炎）；肺纖維化（包括但不限於硬皮病、特發性肺纖維化）；腎纖維化（包括但不限於硬皮病、糖尿病腎炎、腎絲球腎炎、狼瘡性腎炎）；真皮纖維化（包括但不限於硬皮病、肥厚型及蟹足腫型疤痕、燒傷）；骨髓纖維化；神經纖維瘤病；纖維瘤；腸纖維化；及手術過程中造成的纖維化沾黏。

【0077】 本發明亦提供一種在細胞、組織、器官、動物或病患中調節或治療或改善傳染病的症狀的方法，其係藉由調節對相關細胞或輔助細胞的免疫反應或在例如以下列舉中涉及 CD27 之細胞進程：急性或慢性細菌感染、急性和慢性的寄生或感染過程（包括細菌、病毒和真菌感染）、HIV 感染/HIV 神經病變、腦膜炎、肝炎（A、B 或 C 等等）、敗血性關節炎、腹膜炎、肺炎、會厭炎、大腸桿菌（*E. coli*）、溶血性尿毒症候群、瘧疾、出血性登革熱、利什曼體病、麻瘋、中毒性休克症候群、鏈球菌肌炎（*streptococcal myositis*）、氣性壞疽、結核分枝桿菌、鳥型細胞內的分枝桿菌（*mycobacterium avium intracellulare*）、卡氏肺囊蟲肺炎、盆腔炎、睪丸炎或副睪炎、退伍軍人菌（*legionella*）、萊姆病（*lyme disease*）、流行性感冒、EB 病毒（*Epstein-Barr virus*）、病毒相關之噬血症候群、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎等等。

【0078】 在本申請案全文中所有引用之參考文獻的內容（包括參考文獻、核准的專利、公開的專利申請案、同時申請中的專利申請案）均明確地納入本文中以供參考。

【0079】 在下面一系列用於說明本發明而非意圖對其進行限制之例示性實施例的描述中，本發明之其他特徵將變得顯著。

4. 醫藥配方

【0080】 本發明提供 CD27 中和抗體的穩定配方，其較佳為磷酸鹽緩衝水溶液或混合鹽溶液，以及保存溶液及調配物以及適合用於醫藥或獸醫用途之多用途保存配方，並包含至少一種 CD27 中和抗體在醫藥上可接

受之配方。合適的媒液及其配方（包括其他的人類蛋白，例如人血清白蛋白）在例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5 中有描述。

【0081】 為了形成適合用於有效給藥之醫藥上可接受之組合物，該組合物將包含一有效量的上述化合物以及一合適量的媒液載體。可採用其他的醫藥方法來控制作用期間。可透過使用聚合物來複合或吸收化合物以完成控制釋放製劑。利用控制釋放製劑控制作用期間的另一種可能方法係將本發明化合物併入聚合材料（如聚酯、聚胺基酸，水凝膠、聚(乳酸)或乙烯-醋酸乙烯酯共聚物（ethylene vinylacetate copolymer））之顆粒中。或者，可能可以將這些材料包入製備的微膠囊中（例如分別將如羥甲基纖維素或明膠微膠囊與聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊界面聚合），或膠體藥物傳遞系統中（例如微脂體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊），或巨乳液中，來取代將這些試劑併入聚合物顆粒中。該些技術係揭露於 Remington *supra* (2006)。

5. CD27 中和抗體之投予

【0082】 根據本發明，至少一種在穩定或保存配方或本文所述溶液中之 CD27 中和抗體可透過各種不同傳遞方法被投予至一病患，該傳遞方法包括靜脈注射（I.V.）、肌肉注射（I.M.）；皮下注射（S.C.）；經皮傳遞、肺部傳遞、黏膜傳遞、使用植入物中的配方、滲透泵、匣（cartridge）、微型泵或熟諳此技藝者所理解的其他裝置，如該領域中所習知。

【0083】 在一種投予 CD27 中和抗體的方法中，係經由預先安裝的配備有輸液袋的導管來靜脈注射給予藥物物質。該 CD27 中和抗體係被提供於 20 毫升的單次使用小瓶中，如那些由 ImmunoGen, Inc. (Cambridge, MA) 所提供者。每個小瓶包含在緩衝溶液（pH 6.5 ± 0.5 ）中濃度從 0.05 至約 2.0 mg/ml 的蛋白，該緩衝溶液基本上包含磷酸二氫鉀（0.57 mg/ml）、磷酸二氫鈉一水合物（monobasic sodium phosphate monohydrate）（0.20

mg/ml)、磷酸氫二鈉 (dibasic sodium phosphate) (0.555 mg/ml) 及在純水 (USP) 中的氯化鈉 (8.16 mg/ml)。在滴注該劑量體積進輸液袋後，將該藥物產物通過一低蛋白結合 5- μ 過濾器預過濾兩次，並在 8 小時的準備時間內透過一內部的 0.22 μ m 過濾器投予至病患。輸液後，靜脈注射線應以液體沖洗，以確保全部的藥物劑量都有被傳送。

【0084】 一般來說，如果是投予一種全身性劑量的抗體，提供給該接受者的抗體劑量範圍最好約 1 ng/kg 至 100 ng/kg、100 ng/kg 至 500 ng/kg、500 ng/kg 至 1 ug/kg、1 ug/kg 至 100 ug/kg、100 ug/kg 至 500 ug/kg、500 ug/kg 至 1 mg/kg、1 mg/kg 至 50 mg/kg、50 mg/kg 至 100 mg/kg、100 mg/kg 至 500 mg/kg (接受者的體重)，雖然也可投予較低或較高的劑量。低至約 1.0 mg/kg 的劑量也可預期會表現出一些療效。較佳地，約 5 mg/kg 是一個可以接受的劑量，雖然高達 50 mg/kg 的劑量水平也是優選的，尤其是在用於治療用途時。或者，也可能不基於病患體重來投予一特定量的抗體，如一用量範圍為 1 ug – 100 ug、1 mg – 100 mg 或 1 gm – 100 gm。舉例而言，位點特異性的給藥可能係投予至體隔室或體腔，如關節內、支氣管內、腹腔內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、側腦室、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、腹膜內、心包腔內、腹腔內、胸腔內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、病灶內、陰道、直腸、口腔、舌下、鼻內、或經皮的方法。

【0085】 治療可為單一劑量排程，或較佳為多劑量排程，其中治療的主要療程可為 1 至 10 的不同劑量，接著以需要維持或加強反應的隨後時間間隔給予其他劑量，例如第二劑量為 1 至 4 個月，以及如果需要的話，於數個月後給予後續劑量。合適的治療排程的實例包括：(i) 0、1 個月及 6 個月，(ii) 0、7 日及 1 個月，(iii) 0 及 1 個月，(iv) 0 及 6 個月，或其他足以引出所需反應並被期望以此來減少疾病症狀或降低疾病嚴重性的排程。

6. 包含 CD27 中和抗體的製品

【0086】 本發明包括含有可用於治療上述疾病的材料的製品，其包含一 CD27 中和抗體、一容器及一與該容器結合或插在容器上之標籤或包裝。該製品較佳係含有至少一小瓶，其包含至少一 CD27 中和抗體與指定緩衝劑及/或防腐劑（視情況為一水性稀釋液）的溶液，其中該包裝材料包含一標籤以指出該溶液可保存一段時間。本發明可包含一製品，其包含包裝材料、一包含凍乾的 CD27 中和抗體的第一小瓶以及一包含指定緩衝劑或防腐劑的水性稀釋液的第二小瓶，其中該包裝材料包含一標籤以指示醫生或病患如何在該水性稀釋液中重新構成該 CD27 中和抗體以形成一溶液。

【0087】 合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等等。該容器可由各種不同的材料形成，如玻璃或塑膠。該容器可具有一無菌出入口（例如該容器可為一靜脈輸液袋或一具有塞子的小瓶，視情況能夠被皮下注射針刺穿）。

【0088】 在該組合物中至少有一活性成分為 CD27 中和抗體。該標籤或包裝插入物指出該組合物係用於治療選擇的適應症，如全身性紅斑狼瘡（SLE）。本文中之包裝插入物可指出該抗體或組合物係用來治療在標準護理下對治療無反應或反應不佳之病況，如本文對特定疾病和診斷之概述。在其他實施例中，該包裝插入物可指出該抗體、抗體共軛物或組合物也可用來治療特徵為需要調節涉及 CD27 之細胞進程之免疫反應之疾病。

【0089】 本發明之又一個態樣係一種用於在生物樣品中檢測 CD27 之套組。該套組包括一裝有一或多個抗體之容器（該抗體與 CD27 之表位結合）以及使用該抗體來結合 CD27 以形成一免疫複合物並檢測該免疫複合物之形成使得該免疫複合物的存在或不存在與該樣品中 CD27 的存在或不存在相關聯之說明。容器的實例包括多孔板，其可同時檢測多個樣品中的 CD27。

【0090】 雖然已經籠統描述過本發明，本發明實施例將於以下實例中進一步地被揭露。

實例 1：CD27 試劑和方法

【0091】 為了產生和測試 CD27 結合單株抗體，產生代表人類 CD70 及人類 CD27 及人類 CD27 胞外區域（ECD）全長的蛋白質結構。

【0092】 人類 CD27（SEQ ID NO: 149）係一種 1 型跨膜蛋白，包含一單一胜肽（殘基 1 至 20）、胞外區域（ECD，殘基 21 至 191）、跨膜區域（TM，殘基 191 至 212）及胞內區域（ICD，殘基 213 至 260）。人類 CD70（SEQ ID NO: 2）係一種長度為 193 個胺基酸的 2 型跨膜多肽，從 N 末端開始包含一胞內區域（ICD，殘基 1 至 17）、跨膜區域（TM，殘基 18 至 38）及胞外區域（ECD，殘基 39 至 193）。完整的 CD70 編碼序列係以選殖地方式（clonally）表現在 HEK 293 細胞的表面。

【0093】 用於單株抗體 ELISA 及以 Proteon 為基礎的直接結合分析的該 CD27 ECD 之胺基酸 1-121 係短暫表現於 HEK293 細胞中並在 C 末端帶有 His6-標籤胜肽，並藉由金屬離子層析法純化。用於噬菌體淘選法（phage panning）及 ELISA 分析的該 ECD 之胺基酸 1-173（C 末端帶有 His6-標籤）係由 HEK 表現，並在金屬離子層析法之後接著用使用 Superdex 75 的大小排阻層析法（size exclusion chromatography）純化。以上兩種 CD27 蛋白皆使用化學標靶至蛋白上胺殘基之 NHS-酯來生物素化。用於結晶的胺基酸 1-101（C 末端帶有 His6-標籤）係於一桿狀病毒系統中表現並藉由金屬離子層析法（Protease, Inc）純化。用於免疫小鼠的 CD27-Fc 蛋白係購自 R&D Systems。用於在某些研究中的完整 CD27 編碼序列係以選殖地方式表現在 HEK 293 細胞的表面。

【0094】 人類 CD27 和人類 CD70 cDNA 殖株（clone）係購自 Open Biosystems。使用標準的分子生物學技術來產生表現構造。簡言之，將該 CD27 及 CD70 基因的開放讀碼區（open reading frames）以 PCR 擴增並透過限制性核酸內切酶的消化及連接，或是透過不依賴連接酶的選殖法（ligase independent cloning (LIC)）來選殖進哺乳動物表現載體。將全長的 CD27 及 CD70 基因選殖進表現載體並以選殖地方式表現在哺乳動物細

胞的表面。將 CD27 的胞外區域選殖進哺乳動物表現載體並以尾端帶有六個 His 的形式短暫地表現於 HEK293 細胞中。

實例 2：CD27 中和抗體的產生

【0095】 鼠類抗人類 CD27 抗體係以融合瘤方法 (Kohler and Milstein (1975)) 生成。十隻 12-14 週大的 C3H/HeJ 小鼠係取得自 Charles River Laboratories。在第 1 天，將該小鼠在尾巴基部 (BOT) 以 50 微克的 Hu CD27 Fc (R&D Systems) 各結合使用 0.33×10^5 單位的鼠類干擾素- α 及干擾素- β (Biosource) (最終量為 100 微升) 進行皮下 (SQ) 免疫。在第 2 天及第 3 天，將該小鼠在尾巴基部皮下注射干擾素 (與第 1 天的劑量相同)。在第 14 天 (即取脾臟融合的四天前)，將小鼠在尾巴基部皮下給予在 PBS 中 50 微克的 Hu CD27-Fc 結合使用 50 微克的抗鼠類 CD40 促效劑單株抗體 (R&D Systems, MAB440) 來增強免疫。

【0096】 為了效價評估，進行捕獲階段 (capture phase) 的環境影響評估 (EIA)。簡言之，在培養盤 (Nunc-Maxisorp) 上於 4°C 塗布於碳酸氫鹽緩衝液中的 0.1 微克山羊抗 ms Fc (Jackson Immunosci) 並過夜。在阻斷和清洗步驟後，加入稀釋的血清並在室溫下培養該盤 30 分鐘。在清洗步驟後，於室溫下以在阻斷緩衝液中 0.25 微克/mL 生物素化的 Hu CD27-ECD 培養該培養盤 30 分鐘並以 HRP 標記的鏈黴親和素 (Jackson Immunosci) (以 1:40,000 稀釋於 0.4% BSA/PBS) 作為探針於室溫下探測 30 分鐘。如上述所言清洗培養盤；接著加入 OPD (Sigma fast tabs) 受質溶液 (substrate solution)，在室溫下培養 10 分鐘，每孔加入 25 微升的 4N 硫酸以終止呈色受質發展，在 490 nm 測量吸光度。

【0097】 非分泌型 BALB/c 小鼠骨髓瘤融合對象 FO 的細胞庫係購自 ATCC (# CRL-1646)。將一 FO 細胞的冷凍小瓶解凍並以添加有 10% (v/v) FBS (Hyclone) 的 Glutamax™ (配方經過修改) 培養基 (Invitrogen) 重新懸浮於 DMEM 中。由 Charles River 實驗室將該細胞擴張、凍存並視作無菌且沒有黴漿菌。此融合中亦使用 C1833A (Centocor) 細胞株。該細

胞株係藉由在 FO 細胞株中抑制 CHOP 基因的表現來自行產生，因此其需要在遺傳黴素的選擇下生長。如上述 FO 細胞處理方式處理細胞，除了細胞是生長在具有添加 10% (v/v) FBS (Hyclone) 及 500 ug/mL 遺傳黴素 (Gibco) 的 Glutamax™ (配方經過修改) 培養基的 DMEM 中。在融合前將 FO 及 C1833A 細胞株都進行細胞同步化。簡言之，將 $1.5-2 \times 10^8$ 個細胞種進 180 mL 的 DMEM (含有添加 0.25% (v/v) FBS (Hyclone) 的 Glutamax™ (配方經過修改) 培養基) 中並在 37°C 培養 13 小時。加入額外 20 mL 的 FBS 使最終 FBS 濃度為 10%，並在使用前於 37°C 再額外培養 13 小時。在整個細胞同步過程，C1833A 細胞係不斷地經遺傳黴素選擇。在融合前將骨髓瘤細胞以 PBS 清洗、計數並透過 Guava Viacount 軟體測定活力 (>78%)。

【0098】 在融合當天，將動物以 CO₂ 窒息來安樂死。在無菌條件下取出脾臟並浸泡在 10 mL 的含有抗生素 (PSA) (Sigma) 的冰冷磷酸鹽緩衝液 (PBS) 中。

【0099】 製備脾細胞的單一細胞懸浮液並利用紅血球裂解緩衝液 (RBC lysis buffer (Sigma)) 將其中的紅血球裂解。按照製造商的說明，將清洗過的細胞使用抗鼠類 Thy1.2、抗鼠類/人類 CD11b 及抗鼠類 IgM 磁珠 (Miltenyi Biotec 編號分別為 130-049-101、130-149-601 及 130-047-301) 標記以用於磁珠分選 (magnetic sorting)，並接著使用 AutoMacs Pro 儀器運行 Deplete 程式進行分選。收集未標記的 (富含漿母細胞階段的 B 細胞) 及標記的細胞分層並接著用 Guava PCA 計數。丟棄明確具有標記的細胞。將未標記的細胞分成兩半以用於分別融合至融合對象 FO 與 C1833A。根據 De St. Groth (J Immunological Methods. 35:1-21. 1980) 的方法，將鼠類骨髓瘤細胞與活的脾細胞以 1:1 的比率進行融合。簡言之，將脾細胞與骨髓瘤細胞混合在一起，使其沈澱成小丸 (pellet) 並以 50 mL 的 PBS 清洗一次。於 37°C 將該小丸重新懸浮於 1 mL 的聚乙二醇 (PEG) 溶液 (2 g 分子量為 4000 的 PEG、2 mL DMEM 以及 0.4 mL DMSO) 中 30 秒。接著將該細胞融合混合物浸泡於 37°C 的水浴中並輕輕搖動約 60 秒。在 1 分鐘

的時間內緩慢加入 37°C DMEM 以終止該融合反應。將該融合細胞在室溫下靜置 5 分鐘，接著以 150 × g 離心 5 分鐘。接著將細胞重新懸浮於 HAT 培養基【DMEM 中含 Glutamax™ (配方經過修改)，添加有 20% FBS、5% Origen、25 µg/mL 建它黴素 (gentamicin) (Sigma) 以及 HAT (100 µM 次黃嘌呤、0.4 µM 胺蝶呤及 16 µM 胸苷 (thymidine) (Sigma)】並種進 96 孔的平底聚苯乙烯組織培養盤 (Corning # 3997) 或含有約 2.25 µg/mL 的 AF488 人類 CD27 (Janssen Research & Development, LLC) 的甲基纖維素培養基 (StemCell Technologies, MediumD cat# 03804)。在加濕的 37°C 培養箱以 7% CO₂ 培養培養盤 7 至 10 天。從甲基纖維素培養盤中選出單一群落並利用 ClonepixFL 或在白光顯微鏡下篩選。

實例 3：重組單株抗體之生物活性

【0100】 如下所述，利用各種不同的體外分析試驗來分析源自鼠類抗體的結合區域結合至 CD27 以及阻斷某些 CD27 生物活性的能力。

【0101】 使用一固相 EIA 以在融合瘤上清液中篩選能夠與人類 CD27 結合之抗體。於 4°C，將培養盤 (Nunc-Maxisorp #446612) 以碳酸氫鹽緩衝液 O/N 中的 4 µg/mL Fab 山羊抗 huFc (Jackson #109-006-098) 塗佈並過夜。之後不經過清洗，在室溫下將培養孔以 200 微升在 PBS 中的 0.4% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 阻斷 1 小時。以含 0.02% (w/v) Tween 20 的 0.15 M 鹽水清洗過後，在室溫下加入 50 微升於 0.4% BSA/PBS 中的 huCD27-Fc 至培養盤 1 小時。再次清洗過後，於室溫下將 50 微升未稀釋的融合瘤上清液培養在塗佈過的培養盤上 30 分鐘。清洗培養盤三次並接著於室溫下以 50 微升經 1 : 10,000 稀釋的山羊抗鼠類 Fc HRP (Jackson # 115-036-071) 培養 30 分鐘。再次清洗培養盤並使其如上述生長以進行效價評估。為了評估融合瘤單株抗體的相對結合能力，使用 Maxisorp 384 孔培養盤 (NUNC 464718) 與連續稀釋的融合瘤上清液 (標準化到 5 microg/mL 的起始濃度) 進行相似的分析試驗。該分析試驗確定了 386 個陽性反應的融合瘤。

【0102】 利用生化結合分析試驗，使用 IM-9 細胞（一種被發現會內源性表現人類 CD70 的 B 淋巴母細胞株（B-lymphoblastoid cell line））將所有 386 個 CD27 特異性融合瘤篩選出具備抑制 huCD27 與 huCD70 結合能力者。將 Maxisorp 培養盤（VWR # 62409-314）塗佈 250 毫微克（ng）/mL 的重組人類 CD27/Fc（R&D Systems, Cat# 382-CD）並於 4°C 培養過夜。隔天將培養盤以阻斷緩衝液（Pierce, Cat#37543）阻斷並接著以清洗緩衝液 I（含有無 Ca⁺⁺或無 Mg⁺⁺的 PBS、0.01% Tween-20）清洗。每個培養盤中也包括有對照組（小鼠對 hCD27 之單株抗體，R&D Systems, Cat# MAB382；小鼠 IgG1 同型對照，R&D Systems, Cat# MAB002；小鼠 IgG2a 同型對照，R&D Systems, Cat# MAB003）。將每孔 50 uL 的融合瘤樣品或對照組與每孔 50 μ L 的捕獲 IM-9 細胞（人類 B 淋巴母細胞株（ATCC, CCL-159））混合並在室溫下不搖動培養 1 小時。培養結束時，將培養盤以清洗緩衝液 II 清洗以移除所有未結合的細胞，並接著以每孔 50 uL 的 Cell Titer Glo 試劑（Promega, Cat# G7571）溶解細胞。在 10 分鐘的搖動培養後，將培養盤以 Envision（PerkinElmer, 2102 多標記讀取機（Multilabel reader））讀取。產生的冷光訊號與 ATP 存在的量成比例並與培養孔中被 CD27 結合抓住的活細胞存在的數量直接相關。根據該生化結合分析試驗的結果，約 50% 的 CD27 特異性殖株被中和。

【0103】 為了消除多餘的中和殖株，進行競爭結合分析以將該抗體分至競爭組。在該分析試驗中，個別評估融合瘤上清液是否能與面板上每個陽性反應融合瘤作為捕獲和檢測試劑。互相之間形成有效捕獲/檢測試劑的抗體很可能會辨識 CD27 蛋白上空間分隔的表位，因此可以使兩個抗體同時結合至標的蛋白。在整個面板上展現類似活動模式的殖株群很可能會結合至相似的表位。因此，從不同群組選擇殖株會提供辨識不同表位的抗體。簡言之，於 4°C 以塗佈緩衝液中的山羊抗小鼠 Fc（JIR115-005-071）塗佈 384 孔的 Nunc Maxisorp 盤（464718）並過夜。接著在室溫下以 PBS 中的 0.4% BSA 阻斷培養盤 30 分鐘。在此步驟以及所有接下來的步驟中，以 PBS、0.02% Tween-20 清洗培養盤。一系列的各孔中（每個上清液一列）

均給予 20 uL 的上清液（初步篩選時使用純上清液，但是當再篩選時該亞植株（supes）係標準化至 2 ug/ml 單株抗體）並伴隨有對照組（小鼠抗 huCD27，R&D Systems，Cat# MAB382；小鼠同型對照 Cat#555439，Becton-Dickenson），接著在室溫下培養 30 分鐘。清洗後，製備 25 uL 在 PBS 中的未標記 Hu CD27-ECD-His 標籤並且在所有培養孔中加入 0.3（或在濃度標準化時為 0.8）ug/ml 的 10% 小鼠血清（Bioreclamation 小鼠血清 CD-1 lot#MSEBREC.18565），接著在室溫下培養 30 分鐘並隨後清洗。將每個上清液加入單欄中並與 25 uL 如下製備之混合液在室溫下培養 30 分鐘：將上清液與山羊抗小鼠 Fc HRP（Jackson 115-036-008）預先培養，方法為將 150 uL 的 1:1000 山羊抗小鼠 Fc HRP 與各個 1000 uL 上清液混合（初步篩選時）或將 90 uL 的 1:2000 山羊抗小鼠 Fc HRP 與各個 600 uL 上清液混合再調整至 2 ug/mL（再篩選亞植株時）。在室溫下培養 30 分鐘後，每毫升加入 200 uL 的 100% 正常小鼠血清並在室溫下額外培養 30 分鐘。清洗培養盤，接著每孔以 100 uL 的檸檬酸鹽-磷酸鹽受質溶液（0.1 M 檸檬酸及 0.2 M 磷酸鈉、0.01% H₂O₂ 以及 1 mg/mL OPD）在室溫下培養 15 分鐘。加入 25 uL 的 4N 硫酸以終止受質生長，並使用自動培養盤讀取機在 490 nm 測量吸光度。此分級分析試驗確認有三個群組會辨識 huCD27 抗原上的非重疊結合位點。將來自所有三組的選擇抗體按比例增加以用於抗體生產、純化及進一步在功能分析中的試驗。

細胞訊號傳遞的抑制

【0104】 CD70 與 CD27 的結合會誘導訊號傳遞而導致下游轉錄因子 NF- κ B 的活化。建立 NF- κ B 報導子分析試驗已用於進一步的抗體特性分析。該分析試驗係以兩種模式進行：（1）藉由中和 CD70 誘導的 CD27 活化來評估抗體的拮抗作用，及（2）藉由在沒有 CD70 接合的情況下活化 CD27 訊號傳遞來評估抗體的拮抗作用。將全部 36 ng 含有人類 CD27 及螢光素酶構造的 DNA 在 NF- κ B 啟動子的控制下轉染進 HEK-293F 細胞。將 HEK-293F 轉染細胞以每孔 5×10^4 個細胞（於 40 uL Freestyle 培養

基 (Gibco) 中) 塗在 96 孔培養盤上。在該分析培養盤中加入 CD27 中和融合瘤單株抗體的稀釋液 (於 Freestyle 培養基 (Gibco) 中, 用 1:3 稀釋, 最終濃度為 50 ug/mL) 並將培養盤於 37°C (95% O₂/5% CO₂) 培養一小時。為了測試融合瘤單株抗體中和 CD70:CD27 訊號傳遞的能力, 在該分析培養盤中加入數量為 CD27 轉染細胞數 20% 的經定期照射 (4000 rads) 的 HEK-293E CD70 游離細胞。為了測試融合瘤單株抗體的促效活性, 省去 CD70 游離細胞的添加。將分析培養盤於 37°C (95% O₂/5% CO₂) 培養過夜並根據廠商說明使用 Steady-Glo® 螢光素酶分析系統 (Promega) 使其生長。選擇四種 CD27 中和融合瘤單株抗體 C2177、C2186、C2191 及 C2192 (其會劑量依賴性阻斷 CD70 調介的 CD27 訊號傳遞且在缺乏 CD70 刺激的情況下不會造成 CD27 受體顯著的劑量依賴性促效活化) 用於進一步的特性分析。這四種抗體阻斷 IM-9 細胞與 CD27 結合以及在 NF- κ B 報導基因分析試驗中阻斷 CD70 調介的訊號傳遞的 IC₅₀ 係總結於表 1 中。在缺少 CD70 的刺激下, NF- κ B 報導基因分析試驗中的促效活性在抗體的最高測試濃度相對於一個不相干的同型對照抗體 (小鼠 IgG1 對大鼠 EMP 蛋白), 於 CD27 的訊號傳遞顯示出成倍增加。

對 CD27 的親和力

【0105】 藉由 Biacore 測量抗體 C2177、C2186、C2191 及 C2192 對單體可溶性 CD27 於 25°C 的 K_D 並報導於表 1。在 BIACORE 3000 (BIAcore, Inc.) 表面電漿子共振 (SPR) 儀器上進行分析。該樣品係製備於含 0.005% 界面活性劑 (聚山梨醇酯 20) 的 Dulbecco's 磷酸鹽緩衝液中 (pH 7.4)。將山羊抗小鼠 Fc 特異性抗體 (Jackson Immunoresearch laboratories Prod # 115-005-071) 共價連接到塗佈有羧甲基葡聚糖的黃金表面 (CM-5 Chip, Biacore)。在固定化之前, 將該晶片以 50 mM NaOH、100 mM HCl 及 0.1% 十二基硫酸鈉預處理並在每次預處理之間注射去離子水。使用廠商對胺耦合化學之說明, 將該抗體以 10 mM 醋酸鈉緩衝液 (pH 4.5) 稀釋並耦合至該晶片之羧甲基葡聚糖表面。利用鹽酸乙醇胺

(ethanolamine-HCl) 將該表面上剩餘的反應性基團去活化。在感測器表面透過 Fc 結構域捕捉單株抗體。監測以遞增濃度 (0.6-150 nM, 連續 4 倍稀釋) 注射進的人類 CD27 ECD 的結合三分鐘且監測解離十分鐘。使用兩種 100 mM 磷酸的 3 秒脈衝 (pulse) 將捕捉表面再生至基線最佳化。使用 Scrubber 軟體 (版本 1.1 g (BioLogic Software)) 處理數據。進行數據的雙重參考減法 (Double reference subtraction) 以校正緩衝液對訊號之貢獻以及儀器雜訊。使用 Biaevaluation 4.0.1 軟體 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) 進行處理數據之動力學分析。表示 CD27 單價結合的結合外型以 1 : 1 的結合模型來描述。

表 1

		Biacore	IM-9 結合 ¹	NF-κβ 報導子	
		K _D	IC ₅₀	IC ₅₀ ²	促效作用 ³
單株抗體	同型	nm	ug/ml	ug/ml	在 50 ug/ml
C2177	mIgG1	3.07	0.063	0.040	1.850
C2186	mIgG1	2.55	0.059	0.105	2.547
C2191	mIgG1	2.62	0.059	0.080	3.053
C2192	mIgG2a	0.21	0.054	0.232	5.394

- 1 單株抗體抑制 IM-9 細胞結合至固定化 CD27 的 IC₅₀
- 2 在報導基因分析試驗中單株抗體抑制的 IC₅₀
- 3 在缺乏 CD70 的情況下，單株抗體於 50 ug/ml 的促效活性測量值相對於同型對照抗體在報導基因訊號有成倍增加。

細胞增殖的抑制

【0106】 在培養中以抗 CD3 加上抗 CD28 抗體次佳活化的 T 細胞增殖係經由 CD70 接合表現在 T 細胞上的 CD27 來增強。評估該四種鼠類中和抗體在 CD70 的存在下抑制 T 細胞增殖的能力以及在缺乏 CD70 的情況下誘導增殖的能力。冷凍的 CD4+ T 細胞係購自 AllCells, LLC。將細胞解凍並放進含 10% FBS、1%左旋麩醯胺酸及 1%青黴素-鏈黴素的 IMDM

培養基中。在將細胞放進培養盤之前，於 4°C 將 1 ug/78.mL 於 PBS 中的抗 CD3 (OKT3) 抗體塗佈在一 U 型底培養盤上過夜。計數細胞，將濃度調為每毫升 1×10^6 個細胞並每孔放進 1×10^5 個細胞。每孔加入 1 ug/mL 的可溶性抗 CD28 作為第二活化訊號。將轉染有人類 CD70 或空載體 (mock) 的經照射的 (6000 rads) HEK 細胞以每孔 2×10^4 個細胞 (20%) 加入至適當的培養孔中。刺激細胞 3 天，加入 0.9 uCi 胸苷[甲基-3H]至所有樣品孔中並將該細胞培養 18-24 小時。刺激後的第四天，使用 PE Filtermate Harvester 將細胞捕獲至一過濾培養盤 (filter plate) 上。使該培養盤乾燥並加入 30 uL 的 MicroScintTM-20 至所有樣品孔中。在 PE TopCount NXT 上讀取該培養盤，收集的數據為 CPM。在缺乏 CD70 的情況下，抗體 C2177 顯示出會劑量依賴性抑制 CD70 調介的 T 細胞增殖以及非常微弱的內在促效活性 (圖 1)。在 C2186、C2191 及 C2192 抗體也觀察到相似的結果。這些抗體的 IC₅₀ 及最大抑制%係報導於表 2。在缺乏 CD70 接合的情況下，所有這些抗體均未顯示出對增殖有一致的刺激，表示缺少內在促效活性。

【0107】 此外，該 C2177、C2186、C2191 及 C2192 抗體顯示出會劑量依賴性抑制 CD70 調介的 T 細胞增殖，如在 CSFE 分析試驗中所測量，且在缺乏 CD70 刺激的情況下對增殖沒有影響。冷凍的 CD3+ T 細胞係購自 AllCells, LLC。將細胞解凍並放進含 10% FBS、1% 左旋麩醯胺酸及 1% 青黴素-鏈黴素的 IMDM 培養基中。將細胞預先以 2.5 mM CFSE (Invitrogen) 標記，以 FBS 中止反應並以 T 細胞培養基清洗。CFSE 係一種染料，其會被動擴散進入細胞並且在與細胞內的胺結合後變成帶有高度螢光。細胞分裂後每個子細胞將包含母細胞一半的 CFSE 標記，因此藉由追蹤具不同 CFSE 強度的細胞數量可以監測細胞的增殖。將細胞濃度調整為每毫升具有 1×10^6 個細胞，並每孔放進 1×10^5 個細胞。在將細胞放進培養盤之前，於 4°C 將 0.5 ug/mL 於 PBS 中的抗 CD3 (OKT3) 抗體塗佈在一 U 型底培養盤上過夜。每孔加入 0.1 ug/mL 的可溶性抗 CD28 作為第二活化訊號。將轉染有人類 CD70 或空載體 (mock) 的經照射的 (6000 rads)

HEK 細胞以每孔 2×10^4 個細胞（20%）加入至適當的培養孔中。刺激細胞 4 天並藉由 FACS 分析以計數含有不同強度級別的 CFSE 標記的分裂細胞。

血漿芽細胞（plasma blast）分化的抑制

【0108】 在血漿芽細胞分化分析試驗中，以原發性人類 B 細胞測試該 CD27 中和融合瘤單株抗體。將自正常供體的週邊血液（取得自 AllCells）負選擇之 CD19+ 人類 B 淋巴球在 1 ug/mL 抗 CD40 抗體（殖株 MAB89，Abcam）及 100 ng/mL 介白素 21（Invitrogen）或是 1 ug/mL 可溶性人類重組 CD40 配體及 2 ug/mL 「配體增強子」（均來自 Alexis Biochemicals）及 100 ng/ml 介白素 21 的存在下，於 96 孔培養盤中培養 6 天，每孔 10^5 個 B 細胞。在 2×10^4 經照射的（6000 rads）CD70 表現 HEK 293 細胞或 MOCK 轉染 HEK 293 細胞的存在（或不存在）下，加入 CD27 中和融合瘤或同型對照抗體。CD27 中和融合瘤單株抗體以及匹配的同型對照使用量為 25，2.5 及 0.25 ug/mL。在第 6 天，以流式細胞儀分析細胞樣品且血漿芽細胞的部份係被鑑定為前向散射/高、無 IgD、CD38 明亮、低 CD20。CD27 中和單株抗體的效力係以在含 CD70 表現細胞和融合瘤單株抗體之 B 細胞培養液中的血漿芽細胞頻率來計算，其係標準化至含 mock 轉染細胞之對應 B 細胞培養液中的血漿芽細胞頻率。C2177、C2186、C2191 或 C2192 單株抗體在 2.5 ug/mL 的抑制百分比係顯示於表 2 中。在缺乏 CD70 的刺激下並未觀察到任何這些單株抗體有促效活性。

表 2

單株抗體	T 細胞增殖- CD4+細胞		血漿芽細胞分化
	IC ₅₀ ug/ml	在最高濃度（30 ug/ml） 的抑制% （平均值± SEM）	在 2.5 ug/ml 的抑制% （平均值± SEM）
C2177	0.245	75.4±4.1 (n=6，2 供體)	78 ±20 (n = 4)
C2186	0.775	65.3±4.4 (n=6，2 供體)	93 ± 27 (n = 4)
C2191	0.3	58.3±6.0 (n=6，2 供體)	105 ± 9 (n = 4)
C2192	0.445	75.7±5.7 (n=6，2 供體)	74 ± 0 (n = 2)

實例 4：表位分佈製圖 (MAPPING) 及分類 (GROUPING)

【0109】 為了更小心地評估一開始的分級 (binning)，以一些純化的中和單株抗體以及該 CD27 中和抗體 (MAB 382 (R&D Systems)) 進行競爭分析試驗。簡言之，在室溫下將 5 μ l (10 μ g/mL) 的 CD27-Fc 嵌合蛋白 (R&D Systems, Cat# 382-CD) 塗佈在一 MSD HighBind 培養盤 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 上的每個培養孔 2 小時。加入 5% MSD Blocker A 緩衝液 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 至每個培養孔中並在室溫下培養 2 小時。將培養盤以 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 清洗三次，接著加入 10 nM 經標記的 CD27 抗體與不同濃度競爭者抗體 (1 nM 至 2 μ M) 之混合物。將抗體以 MSD Sulfo-Tag™ NHS-酯 (一種胺反應的 N-羥基丁二醯亞胺酯 (amine-reactive N-hydroxysuccinimide ester))，其會耦合至蛋白上的一級胺基以形成一穩定的醯胺鍵) 標記。在室溫下輕輕搖動培養 2 小時後，以 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 清洗培養盤 3 次。將 MSD Read Buffer T 以蒸餾水稀釋 (4 倍) 並以每孔 150 μ L 的量分配。使用 SECTOR Imager 6000 分析培養盤，其係透過 Sulfo-Tag 標記偵測電化學發光，該標記會在 MSD 微量盤的電極表面起始的電化學刺激後發光。

【0110】 該競爭性研究將表 3 中概括的抗體界定為三個競爭群組，證實了一開始的分級分析試驗。C2179、C2192 及 MAB382 構成一組；C2177、C2182、C2186 及 C2193 係第二組；以及 C2191 單獨構成另外一組。

表 3

競爭者	經標記的抗體				
	C2179	C2177	C2182	C2186	C2191
C2177	-	+	+	+	-
C2179	+	-	-	-	-
C2182	-	+/-	+	+	-
C2186	-	+	+	+	-
C2191	-	-	-	-	+
C2192	+	-	+	+	-
C2193	-	+/-	+	+	-
MAB382	+	-	-	-	-

實例 5：以 X 射線晶體學鑑定表位和補位

【0111】 抗體 C2177 及 C2191 詳細的表位和補位係藉由將彼等對應的 Fabs 與 CD27 ECD 片段（殘基 1-101）共結晶成三聚體複合物並以 X 射線晶體學確認結構來鑑定。帶 His 標籤的 C2177 Fab 及 C2191 Fab 嵌合形式（小鼠變異區，人類恆定區）係表現於 HEK293 細胞中並使用親和性及大小排阻層析法來純化。人類 CD27 之帶 His 標籤的 ECD 片段（殘基 1-101）係進一步以陰離子交換層析純化。該三元複合物 CD27:C2177 Fab:C2191 Fab 係藉由將 CD27 與過量的 Fabs 混合來製備，莫耳比為 1:1.25:1.25。將該複合物於 4°C 培養 2 小時，使用大小排阻層析法將其與未複合的種類分離，並於 20 mM Tris（pH 8.5）、250 mM NaCl 中濃縮至 12 mg/mL。以坐式液滴（sitting drop）之蒸氣擴散法於 20°C 進行該複合物之結晶。從 24% PEG 3350、0.2 M 氯化銨、0.1 M Tris 緩衝液（pH 8.5）中取得該複合物之結晶。關於 X 射線數據的收集，將一晶體於抗凍劑溶液（含添加 20%甘油的結晶溶液）中浸泡幾秒鐘，並在 100 K 的氮氣流中快速冷凍。以裝有 Saturn 944 CCD 偵測器及 X-stream 2000 低溫冷凍系統（Rigaku）的 Rigaku MicroMax™-007HF X 射線產生器收集繞射數據，晶體旋轉超過 240°，每 0.25°影像暴露 2 分鐘，並以 XDS 程式處理該數據

(Kabsch W. 2010. *Acta Crystallogr.* D66:125-132)。該晶體屬於單斜晶系空間群 P21，晶胞參數為： $a = 141.1 \text{ \AA}$ ， $b = 53.0 \text{ \AA}$ ， $c = 143.4 \text{ \AA}$ ， $\alpha = 90^\circ$ ， $\beta = 112.2^\circ$ ， $\gamma = 90^\circ$ 。

【0112】 該三元複合物之晶體結構係以 $3.5 \text{ \AA}$ 分辨率確認並細化至晶體學 R 因子為 26%。C2177 及 C2191 的 Fabs 結合至 CD27 空間上不同的非重疊表位 (圖 2)。C2177 Fab 結合至 CD27 的 N 端末端 (細胞表面的遠側) 部份。該表位佔位 $700 \text{ \AA}^2$ 並包括 9 個殘基：K5、S6、P8、H11、W13、G16、K17、H36、R37 (圖 3)。該補位係界定為與該抗原接觸 ($4 \text{ \AA}$ 內) 之抗體殘基。該 C2177 補位包括來自 VL 的 5 個殘基 (Y31、Y36、Y53、N57、N96) 及來自 VH 的 9 個殘基 (S31、W33、Y52、D55、D57、Y101、Y102、D104、Y105) (圖 3)。所有 6 個 CDR 均涉及抗原辨識。H36 及 R37 為該表位之中心殘基。他們堆疊對上 VL 的 Y31 及 VH 的 Y102；H36 亦形成一鹽橋至 VH 的 D104。

【0113】 C2191 Fab 結合至 CD27 的「側」表面 (圖 2) 並佔該表面的 $800 \text{ \AA}^2$ 。該表位包括 10 個殘基：F28、D43、P44、I46、P47、G48、V49、H60、S63、H66。該 C2191 補位包括 7 個來自 VL 的殘基 (Y34、F36、Y53、L54、R96、L98、W100) 以及 8 個來自 VH 的殘基 (S31、Y32、Y50、N57、Y59、R100、G101、N102) (圖 4)。該抗體-抗原交互作用主要來自 CD27 的殘基 44-49 與 VL CDR 上的一小塊疏水性表面之間的疏水性交互作用。

【0114】 C2177 及 C2191 表位的位置不同暗示著這些抗體有不同的作用機制。C2191 可能直接與 CD70 ECD 競爭 CD27「側」表面上的重疊表位。相反地，C2177 抗體並不競爭相同的表位而是防止帶有 CD27 及帶有 CD70 的細胞互相接近。事實是，C2191 會防止可溶性 CD70 ECD 結合至 CD27，但 C2177 不會，這支持了該觀察結果。

實例 6：抗體調節人類淋巴球反應

【0115】 培育一種免疫缺陷的小鼠模型：無 NOD/SCID-IL2R γ (NSG) 小鼠以研究 T 細胞反應對人體免疫系統的控制方面 (Markus G Manz & James P Di Santo Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology *Nature Immunology* 10, 1039 - 1042 (2009))。將人類 PBMC 授受性轉移(adoptive transfer)進免疫受損的(NSG)小鼠以評估抗-CD27 抗體對人類細胞植入及/或增殖的效用。該模型可用來評估抗體製造時標靶人類 CD27 的影響以及 T 細胞調介的反應。

【0116】 在細胞轉移的時間投予抗體 C2177 及 C2191，接著一星期投予兩次，共 3 星期。在第 21 天犧牲小鼠，從血液和脾臟中純化細胞並接著以流式細胞儀確認細胞特性。CTLA4-Ig (Orencia, BMS) 係納入作為免疫抑制的陽性對照組。藉由評估血液和脾臟樣品中人類 CD45⁺細胞的存在來測量人類細胞植入/擴張。

【0117】 密切監測該小鼠並依據動物福利指導準則 (animal welfare guidelines) 基於 XGVH 症狀決定犧牲時間。用來評估抗-CD27 處理效果的實驗讀數包括：體重(每週兩次)；XGVH 可觀察到的徵狀(每週兩次)，如姿勢、活動水平、儀容打扮、皮膚損傷(尤其是眼睛及耳朵周圍)，使用 1-5 的評分系統；人體細胞亞群的絕對計數和活化狀態，其係使用流式細胞儀分析 (1) 注射的人類 PBMC、(2) 小鼠 PB (每週一次) 及 (3) 脾臟和骨髓；利用 ELISA 測定血清、脾臟及 BM 中所有的人類 Ig、IgM 及 IgG，並在犧牲後利用組織學或免疫組織化學法測定標靶器官中(如肝、腎、肺及脾臟)的人類滲透水平。

【0118】 處理組別係如下：

1. PBMC (每隻小鼠 2000 萬至 4000 萬個細胞，i.p.)
2. PBMC + CTLA4-Ig (10 mg/kg)
3. PBMC + 同型對照抗體，每週 2 次，共 3 週
4. PBMC + 抗-CD27 抗體，每週 2 次，共 3 週

【0119】 以 10 mg/kg 抗-CD27 單株抗體、C2177 及 C2191（嵌合在人類 IgG₄（ala/ala, ser->pro）支架上的融合瘤單株抗體）給藥的小鼠，與從該血液或脾臟樣品中分離的單獨 PMBC 或 PMBC 中的同型對照相比，有統計學上明顯較少的人類 CD45⁺細胞。

實例 7：C2177 及 C2191 單株抗體的人類框架改編（HUMAN FRAMEWORK ADAPTATION）

【0120】 將用來從 C2177 及 C2191 抗體轉移抗原特異性至人類框架的抗原結合位點以及區域重新分類，如 Raghunathan G.在 2009 年的 US20090118127 A1 中所概述。簡言之，該抗原結合區域已被用各種不同的術語來定義（可在 Almagro and Fransson, *Front Biosci* **13**: 1619-1633, 2008 中複習）。術語「互補決定區（CDR）」係基於序列變異度（Wu and Kabat, *J. Exp. Med.* 132:211-250, 1970）。有六個互補決定區；三個在 V_H（H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3）且三個在 V_L（L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3）（Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）。「高變區」、「HVR's」或「HVL's」意指一抗體變異區，其在結構上為可變的，如 Chothia and Lesk 所定義（Chothia and Lesk, *Mol. Biol.* 196:901-917, 1987）。有六個高變區，三個在 V_H（H1、H2 及 H3）且三個在 V_L（L1、L2 及 L3）。

【0121】 在 HFA 法中，轉移非人類抗體之特異性至人類框架（HFR）的目標區域係如 Kabat 所定義之互補決定區（Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991），除了對應至 V_H之 CDR-1 的區域。對於這個區域，CDR 和 HVL 的組合（延長的 V_H之 CDR-1）係從非人類抗體轉移至人類框架（如表 30、31、34、35 所提供）。此外，產生並測試具有較短轉移的 CDR-H2 之變異體（稱為 Kabat-7 [Raghunathan G. US20090118127 A1, 2009]）。

人類框架選擇

【0122】 人類框架（定義為 V 區內不含抗原結合位置之區域）係選自功能性人類生殖系 IGHV、IGKV、IGKJ 及 IGHJ 基因之基因譜。藉由搜尋 IMGT 資料庫（Kaas, et al., Nucl. Acids. Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005）並將所有的「01」對偶基因如 Oct 01, 2007 中編譯，取得人類生殖系基因序列之基因譜。從這個編譯，將冗餘基因（胺基酸 100%相同）和那些具有未成對半胱氨酸殘基的基因從編譯中移除掉。

【0123】 HFR 中人類序列的初步選擇係根據人類 IGHV 生殖系基因對小鼠 V_H 區域（包括 FR-1 至 FR-3 以及 H-CDR-1 和 H-CDR-2）總長度的序列相似性。在下一階段，考慮 CDR 的長度及小鼠 CDR 與人類序列之間的序列相似性，用分數將該選擇的人類序列排序等級。使用一個標準的突變矩陣（如 BLOSUM 62 替代矩陣（Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 10915-9, 1992））來給分小鼠 CDR 與人類序列的序列比對，如果在 CDR 環中有插入及/或缺失，則給予一巨大懲罰。基於 IGHJ 生殖系基因（Kaas, et al., Nucl. Acids. Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005）與小鼠抗體 C2177 及 C2191 序列的序列相似性來選擇 FR-4。使用一類似的步驟來為 V_L 選出人類框架。生殖系基因 IGVK 係用於選擇 FR 1 至 FR 3 及 L-CDR 1 至 L-CDR 3。生殖系基因 IGJK 係用於選擇 FR-4。

【0124】 除了序列準則（sequence criteria），使用 Accelrys, Inc 程序套件中的 Modeler（Sali and Blundell. J. Mol. Biol. 234: 779, 1993）來建構該 Fv 片段之 3D 同源模型。利用該模型來分析該 HFR 變異體，包括確認 CDR 特性以及評估可發展性傾向（developability liabilities）。選擇 HFR 變異體的其他考慮因素包括最小化暴露的甲硫胺酸和色胺酸殘基數量，消除潛在的 N-糖基化位點以及偏向在電腦模擬中（*in silico*）具有最高基因表現圖譜的人類生殖系基因（de Wildt, J. Mol. Biol. 185: 895, 1999）。

【0125】 關於 C2177 的路徑 1 框架改編及最佳化，在基因庫中包括六種 V_H 以及四種 V_L HFR 變異體。將該 V_H 及 V_L HFR 變異體以組合的方式配對以產生 24 個 HFR 變異體對再加上 10 個對照組（將所有 HFR 變異體與對應的 C2177 的 V 區配對），再加上母體 C2177 本身，一共有 35 種組合。同樣地，對於 C2191，將五種 V_H 及四種 V_L HFR 變異體以組合的方式配對以產生 20 個 HFR 再加上 9 個對照組（將所有 HFR V 變異體與對應的 C2191 的 V 區配對），再加上母體 C2191 本身，一共有 30 種組合。利用標準方法重組編碼該選擇變異體區域之 DNA，以組裝成具有人類 IgG1 及 κ 恆定區的完整單株抗體。所生成的 C2177 參考嵌合抗體（命名為 M40）包含變異區 H7 及 L18。對應的 C2191 嵌合抗體（命名為 M41）包含變異區 H10 及 L20。於 48 孔培養盤內的 HEK 293E 細胞中短暫表現該單株抗體。轉染後 96 小時，以培養盤中的上清液測試表現及結合活性。利用 Octet 技術評估所分泌的單株抗體之表現水平以測量抗體與蛋白 A（Protein A）生物感測器之結合比率。藉由與已知抗體濃度的標準樣品比較，將該表現水平量化。作成由 1：2 同型對照抗體的連續稀釋所組成之一 8 點標準曲線，起始點為 100 ug/ml。在用過的培養基中水合（hydrate）生物感測器 10 分鐘，並測量標準樣品與未知樣品的結合比率 2 分鐘。使用 5 參數加權的劑量反應方程式以及初始斜率結合率演算法（initial slope binding rate algorithm）分析數據。將表現量 >1 ug/ml 的樣品以用過的培養基稀釋至 1 ug/ml 並利用單點 ELISA 篩選。在此 ELISA 中，將 96 孔黑色 Maxisorp 培養盤以 50 uL 稀釋於碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液（pH 9.4）中的 3 ug/ml 山羊抗人類 IgG FC 於 4°C 塗佈過夜並接著以清洗緩衝液（含 0.05% Tween-20 的 PBS）清洗三次，以 300 μ l StartingBlock（Thermo Scientific）溶液阻斷 1 小時，接著像之前一樣清洗。將樣品或標準品以 100 ng/ml 用過的培養基稀釋，並在室溫下一邊搖動一邊將 50 ul 加入至該分析培養盤中歷經 1 小時。將培養盤清洗三次，每孔加入 50 ul 帶 His 標籤的人類 CD27 ECD，濃度為 60 ng/ml（稀釋於分析緩衝液（含 1% FBS 及 0.05% Tween-20 的 PBS）中），並在室溫下培養 1 小時。清洗後，每孔加入 50 ul 與五個

His 共軛的 Qiagen 過氧化酶（以 1:2000 稀釋於分析緩衝液中）並在室溫下搖動培養 1 小時。依照廠商說明混合 BM ChemiLum Substrate (BM Chemilum, POD, Roche) 並在最終清洗後將 50 ul 加入至該培養盤中。10 分鐘後，以 Perkin Elmer Envision 讀取機讀取該培養盤。

【0126】 該 C2177 組合庫的篩選結果顯示所有的 V 區以各種不同的強度結合至 CD27。幾種 HFR 變異體比起母體 C2177 有較高的結合訊號，而其他變異體的結合則顯示與母體相當或比母體更低。所有的 VL 均在可檢出的水平結合抗原，並且不影響 HFR 變異體的結合，其表現量水平可以接受但與母體相比較低。二十四種該 C2177 HFR 抗體（VH 與 VL 的組合）顯示會與 CD27 結合且表現量>1 ug/ml。

【0127】 該 C2191 組合庫的篩選結果顯示所有的 VH（只有一個例外）以各種不同的訊號結合至 CD27。除了與該 VH 配對的 VL，所有的 VL 均顯示會結合至 CD27。幾種 HFR 變異體比起母體 C2177 有較高的結合訊號，而其他變異體的結合則顯示與母體相當或比母體更低。十七種 C2191 HFR 抗體（VH 與 VL 的組合）證實會與 CD27 結合且表現量>1 ug/ml。

【0128】 根據 ELISA 測得的對 CD27 的相對親和力，選擇十五種 C2177 變異體與十一種 C2191 變異體用於先導性規模（pilot-scale）的表現及純化。於 CHO-S 細胞中完成先導性規模的短暫表現，表現量為 750 ml。讓收穫之上清液透過蛋白質 A 層析法進行純化，接著評估純化後蛋白質的親和力和功能活性。

【0129】 藉由表面電漿子共振（SPR），利用 ProteOn XPR36 蛋白質交互作用陣列系統（BioRad）測量該 HFR C2177 人類單株抗體變異體的親和力。測量每個變異體之 CD27 結合比率和解離比率。使用廠商對胺耦合化學之說明，將山羊抗人類 IgG(Fc)抗體共價耦合至 GLC 晶片(BioRad)的表面以製備該生物感測器表面。約 5,000 RU（反應單位）的抗體被固定化。於 25°C 在電泳緩衝液（PBS，0.01% P20，0.01% BSA）中進行動力學實驗。從起始濃度 300 nM 在電泳緩衝液中以 1:3 連續稀釋製備人類 CD27

ECD 的連續稀釋液。在感測器晶片的每個通道上捕捉到約 350 RU 的單株抗體。在通道 6 中固定化一同型匹配的抗體對照組並用作為一參考表面。捕捉單株抗體後，以每分鐘 30 μ L 注射（結合階段）抗原三分鐘，接著進行 10 分鐘的緩衝液流動（解離階段）。藉由每分鐘注射 100 μ L 的 0.85% 磷酸來再生該晶片表面。以該儀器的軟體處理數據。進行數據的雙重參考減法，將來自分析物注射的參考減法曲線（reference-subtracted curve）減掉由緩衝液注射產生的曲線。使用 1:1 的 Langmuir 結合模型，以整體擬合進行數據的動力學分析。將每個單株抗體的結果以 K_a （離開速率）、 K_d （連接速率）、 K_D （解離平衡常數）以及百分比活性的型式報導。該 C2177 HFR 變異體的親和力與母體 M40 單株抗體相似，所有變異體的 K_D 均顯示不到三倍改變。同樣地，該 HFR C2191 人類單株抗體變異體的親和力與母體 M41 單株抗體相差不到兩倍。

【0130】 在螢光素酶報導子分析試驗中，以 HFR 變異體對 CD70 調介的 NF κ B 誘發的抑制來測量該 HFR 變異體的生物活性。將 HEK 細胞以可被 NF κ B 誘導的螢光素酶表現載體 pGL4-32-NF κ B-Luc2（Promega）以及 CD27 表現質體或空載體轉染，在 Freestyle 表現培養基（Gibco, #12338）中培養過夜。隔天將 40 μ L 的細胞放進 96 孔培養盤中，每孔有 50,000 個細胞。接著將 40 μ L 的抗體或對照組，以起始濃度 30 μ g/ml 連續以 1:3 稀釋後加入至細胞中使最終濃度為孔中濃度，並培養 1 至 2 小時。於該培養期間，準備用於刺激的 CD70 游離細胞。簡言之，使用標準細胞培養技術將附著型細胞再懸浮並以 25 μ g/mL 的絲裂霉素 C（Mitomycin C）培養 1 小時以停止細胞增生。培養後，將 CD70+細胞在培養基中清洗，稀釋，並加入 40 μ L 至每孔中使每孔有 10,000 個細胞。將該培養盤培養過夜。隔天，依照廠商說明準備 Steady Glo 試劑（Promega）並在每孔中加入 120 μ L。將培養盤在室溫下搖動培養 20 分鐘。在 Perkin Elmer Envision 讀取機上測量發光度。該 C2177 HFR 變異體的 IC_{50} 與母體單株抗體 M40 及彼此相似，範圍在 0.11 nM 至 0.21 nM。該 C2191 HFR 變異體的 IC_{50} 亦與母體 M41 及彼此相似，範圍在 0.13 nM 至 1.39 nM。

【0131】 考量到親和力、生物活性和生物物理特性，選擇該 C2177 變異體 M69（其包含變異區 H28（SEQ ID NO: 111）及 L35（SEQ ID NO: 82））以及該 C2191 變異體 M91（其包含變異區 H31（SEQ ID NO: 131）及 L42（SEQ ID NO: 140））用於親和力成熟化（affinity maturation）。K_D、純化產量、細胞培養上清液與 CD27 ECD 的結合（「ELISA」）以及母體 M40 及其 M69 HFR 變異體及母體 M41 及其 M91 變異體藉由 CD70 對 CD27 調介的 NFκβ 反應的抑制（IC₅₀）的總結係顯示於表 4 中。

表 4

蛋白質識別碼	VH	VL	Protein KD (nM)	產量(mg)	ELISA 訊號	NFκB IC50 (nM)
C2177 母體 M40	H7	L18	0.96	n.d.	1.00	0.14
M69	H28	L35	0.77	10.08	1.09	0.11
C2191 母體 M41	H10	L20	10.3	n.d.	1.00	0.30
M91	H31	L42	7.9	5.64	1.09	0.28

實例 8：C2177 HFR MAB M69 的最佳化

【0132】 M69 對人類 CD27 ECD 的親和力約 1 nM 並含有與 C2177 及 HFA 母體 CD27M40 同樣的互補決定區。M69 的最佳化涉及多個資料庫以增加親和力並在過程中移除引入或確定的 PTM 位點。

【0133】 如實例 9 所述，一用於 HFR 及 C2177 最佳化的相似噬菌體呈現庫（phage display library）方法確認了在 CDR-H2 之 52a 位置的脯胺酸多樣性。在基因庫設計中該位置並非隨機。該 C2177 及 C2191 Fabs 與 CD27 的共同結構（實例 5）顯示 P52a 不直接參與抗原結合。然而，該位置的突變可改變 CDR-H2 環的構形並使周圍的殘基 D27 能與 CD27 有更優化的交互作用。因此，使用 NNK 突變誘發設計一基因庫以隨機多樣化 P52a 及其鄰近殘基 Y52、G53 及 D54（基因庫 C27H28L2）。同樣地，在路徑 2 最佳化中，CDR-L1 中 Y32 到 F 的突變顯示出結合增強。因此，

設計一在 Y32 具有隨機多樣性以及在殘基 Y30a、D30d、A50（其座落在與 Y32 相同的結構平面）具有多樣性的第二基因庫（基因庫 C27L35L2）。

【0134】 此外，使用多樣性有限的基因庫評估完整的 CDR-H3 及 CDR-L1 環。表 5 及表 6 顯示這些基因庫的設計。

表 5 CDR-H3 之有限多樣性的親和力成熟化設計（C27H28L3）

VH 母體胺基酸及位置	多樣性
Ser95	A,S
Asp96	A,D
Tyr97	A,D,S,Y
Tyr98	A,D,S,Y
Gly99	A,G
Asp100	A, D
Tyr100a	A,D,S,Y
Gly100b	A,G
Phe100c	A,F,S,V
Ala101	A,G
Tyr102	A,D,S,Y

表 6 CDR-L1 之有限多樣性的親和力成熟化設計（C27L35L3）

VH 母體胺基酸及位置	多樣性
Lys24	A,K,E,T
Ala25	A,G
Ser26	A,S
Gln27	A,Q,E,P
Ser28	A,S
Val29	A,V
Asp30	A,D
Tyr30a	A,D,S
Ala30b	A,G
Gly30c	A,G
Asp30d	A,D

Ser31	A,S
Tyr32	A,D,S
Met33	A,M,T,V
Asn34	A,N,D,T

【0135】 在一 pIX 噬菌體 Fab 呈現系統中建構 Fab 基因庫，如在 WO2009/085462、Shi et al, J Mol Biol 397: 385-396 (2010)及 Tornetta et al. J Immunol Methods 360: 39-46 (2010)中所述，並在限制酶位點稍作修改。根據該領域中習知之淘選方針（panning scheme），針對生物素化的 CD27-ECD 淘選該些基因庫，如在 WO2009/085462 及 Shi et al, J Mol Biol 397: 385-396 (2010)中所述，其係關於藉由選擇較慢的離開速率（off-rate）或較快的連接速率（on-rate）來增加親和力。噬菌體係藉由輔助噬菌體感染而產生。添加珠珠以形成一珠珠/抗原/噬菌體複合體，藉以回收結合劑（binder）。最後一次清洗後，噬菌體係因倍增生長之 TG-1 大腸桿菌細胞的感染而救出。噬菌體係再次產生，然後進行額外的淘選回合。

【0136】 在接下來的篩選中，從噬菌體淘選回合的甘油儲存液中準備 DNA 並以 NheI/SpeI 消化切割該 pIX 基因。接合後，將該 DNA 轉染進 TG-1 細胞並生長在 LB/瓊脂培養盤上過夜。第二天，撿出菌落、過夜生長，然後將培養基用在(i)菌落 PCR 和 V-區域定序，及(ii) Fab 的生產誘發。為了 Fab 的生產，在新的培養基中將過夜的培養液稀釋成 10 至 100 倍，然後在攝氏 37 度下生長 5 至 6 小時。添加含有 IPTG 的新鮮培養基以誘導 Fab 的生產，然後讓培養液在攝氏 30 度下過夜進行生長。第二天，讓培養液短暫離心，接著將含可溶性 Fab 蛋白質的上清液用在 Fab ELISA。關於該 ELISA，該可溶性 Fab 蛋白係被多株抗 Fd(CH1)抗體補捉到培養盤上。在清洗及阻斷後，加入濃度為 0.2 nM 的生物素化的人類 CD27 ECD。這種濃度能夠將界定為母體的結合百分比之 Fab 變異體排序，其中出現在所有培養盤中當作對照組的母體 Fab 係定義成 100%結合。該生物素化的 CD27 ECD 係藉由 HRP 共軛的鏈黴親和素偵測，並在一培養盤讀取機讀取化學發光。在該濃度的 CD27，可以做 Fab 變異體的排序（標準化至母

體 Fab)。藉由這個準則，選擇與人類 CD27 結合為 100%或更高（相對於 M69 Fab）的 10 個重鏈和 6 個輕鏈。

【0137】 該母體的 Y 主要在位置 52 從 CDR-H2 基因庫(C27H28L2) 選擇，表示該殘基為偏好的選擇。在位置 52a，將 P 以 Fabs 中具有最佳結合活性的殘基 A、S、V 及 G 取代。在位置 53，該母體的 G 與 R 及 N 一起選擇。在位置 54，只有該母體的 D 被復原。將來自該基因庫的九個殖株（表 7）次選殖進 IgG 載體以表現並確認作為單株抗體的特性。

表 7 選自全多樣性基因庫 C27H28L2 的九個 VH 殖株

胜肽識別號	Y52	P52a	G53	D54
H237	F	V	R	D
H238	y	V	G	D
H239	y	A	G	D
H240	y	A	R	D
H241	y	G	R	D
H242	y	A	n	D
H243	y	G	G	D
H244	y	S	G	D
H245	y	S	R	D

【0138】 對於 CDR-H3 基因庫 (C27H28L3)，僅有 S95A 及 A101G 的多樣性被復原。來自該基因庫的一個含有兩種突變的殖株（表 8）被次選殖進 IgG 載體中以表現並確認作為單株抗體的特性。

表 8 選自 C27H28L3 的單一 VH 殖株

胜肽識別號	S95	D96	Y97	Y98	G99	D100	Y100a	G100b	F100c	A101	Y102
H236	A	D	Y	Y	G	D	Y	G	F	G	Y

【0139】 關於四個位置的 L-CDR1 基因庫 (C27L35L2)，位置 30a 顯示富含有母體的 Y 及 W。在位置 30d，富含有殘基 S、H 及 E 與母體的 D。在位置 32，該母體的 Y 係以 F 及 W 取代。在位置 50，比起母體的 A 較為偏好 T。一般而言，最佳的殖株與母體相比有更多的疏水性側鏈。將來自該基因庫的五個殖株 (表 9) 次選殖進 IgG 載體以表現並確認作為單株抗體的特性。

【0140】 對於多樣性有限的完整 CDR-L1 基因庫 (C27L35L3)，僅有一個序列被復原，其與母體僅有一處不同，即 Y32 改變為 F，相似於上述四個位置的 VL 基因庫。該完整的 CDR-L1 基因庫在位置 32 不包括 F，因此該復原的殖株可能為來自該四個位置的 VL 基因庫的污染物。將該殖株 (L255) 次選殖進 IgG 載體以表現並確認作為單株抗體的特性 (表 9)。

表 9 選自 C27L35L1 及 C27L35L2 的六個 VL 殖株

胜肽識別號	Y30a	D30d	Y32	A50
L255	y	D	F	A
L256	y	D	W	V
L257	y	D	W	T
L258	y	S	F	T
L260	W	H	W	T
L261	y	S	F	E

【0141】 將該 6 個變異體輕鏈與該 10 個變異體重鏈配對以得出 60 個組合，並以 HEK293E 細胞表現。篩選上清液的表現水平，與人類 CD27 ECD 的結合如 ELISA 所測量，且親和力如在 ProteOn 儀器上所測量。所有變異體的表現水平均足以用於篩選。一些變異體的親和力增加高達 40 倍。兩個單株抗體 M596 及 M600 被選擇來進一步突變誘發以移除轉譯後修飾的潛在位點。這些單株抗體之 VH 鏈及 VL 鏈的組合係提供於表 10 中。該些抗體只有在輕鏈上有兩個殘基不同。

表 10 選擇的 C2177 親和力成熟領先者之重鏈和輕鏈的配對

抗體識別號	輕鏈胜肽識別號	CDR-L1 (SEQ ID NO)	CDR-L2 (SEQ ID NO)	重鏈胜肽識別號	CDR-H2 (SEQ ID NO)
M596	L257	KASQSVDYAGDSWMN (26)	TASNLES (39)	H239	RIYAGDGD TN (15 個殘基中的 1-10)
M600	L255	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	H239	RIYAGDGD TN (15 個殘基中的 1-10)

【0142】 M596 在三個位置與母體分子 M69 不同：在 CDR-H2 中的 P52aA、在 CDR-L1 中的 Y32W 以及在 CDR-L2 的 A50T。M600 在兩個位置與 M69 不同：在 CDR-H2 的 P52aA 突變與在 CDR-L1 的 Y32F。

【0143】 在 M596 及 M600 中確認三個共享的潛在轉譯後修飾位點。在 CDR-H2 中的位置 N58 有一個潛在的 N-連接糖基化位點且在 CDR-H2 及 CDR-L1（分別由「DG」及「DS」編碼）有兩個潛在的異構化位點。此外，M596 在 CDR-L1 含有一非生殖系的色胺酸殘基，其可能容易被氧化。

【0144】 為了移除該糖基化風險，在 N58 創建三個個別的單一取代以及在 S60 創建一個取代（表 11）。該建構係表現於 HEK293E 細胞中，並使用 ProteOn 儀器評估上清液對 CD27 的親和力。所有的變異體均具有與母體相近的親和力，分別為 25 pM（M596）及 49 pM（M600）。選擇變異體 M680 及 M678（兩者均源自 M600）評估進一步的取代以消除該異構化位點。變異體 M680 及 M678 分別在位置 60 及 58 具有 A，並在 CDR-L1 缺乏色胺酸（其在 M596 母體中則存在），因此有額外的優勢。

表 11

VH 母體胺基酸及位置	多樣性
Asn58	N, A, R, T
Ser60	S, A

【0145】 為了評估在 M678 及 M680 中突變潛在異構化位點的影響，設計一小的基因庫以同時移除兩個位點。在該重鏈的 CDR-H2 或該共同輕鏈的 CDR-L1 中每個突變均單獨地被取代，並接著在一組合基因庫中配對。該基因庫的多樣性係顯示於表 12 中。

表 12

VH 母體胺基酸及位置	多樣性
Asp54	D, E
Gly55	G, A
VL 母體胺基酸及位置	多樣性
Asp34	D, E

【0146】 表現這些單株抗體並像糖基化位點變異體一樣地評估親和力。在 CDR-L1 潛在異構化位點的 D34E 突變會導致親和力一致增加兩倍，因此該位點被成功移除。在 CDR-H2 潛在異構化位點的 D54E 突變會降低親和力十倍以上。然而，該 G55A 突變並不會顯著影響親和力。變異體 M703 及 M706 保留了 M600 母體的親和力，且 PTM 對功能影響的風險降低。表 13 顯示 PTM 風險評估中各階段的選擇變異體，其重鏈和輕鏈配對、親和力以及互補決定區中的序列修飾。選擇用來移除該潛在糖基化位點的突變係加上底線表示。用來移除該兩個潛在異構化位點的突變係以粗體加上雙底線表示。

表 13

單株抗體 識別碼	VH	VL	KD (pM)	CDR-H2 (SEQ ID NO)	CDR-L1 (SEQ ID NO)
M596	H239	L257	25	RIYAGDGDTNYSPSFQG (165)	KASQSVDYAGDSWMN (26)
M600	H239	L255	49	RIYAGDGDTNYSPSFQG (165)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M678	H259	L255	53	RIYAGDGDTAYSPSFQG (166)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M680	H260	L255	30	RIYAGDGDTNYAPSFQG (167)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M703	H270	L267	28	RIYAGDADTAYSPSFQG (168)	KASQSVDYAGEFSMN (29)
M706	H272	L267	13	RIYAGDADTNYAPSFQG (169)	KASQSVDYAGEFSMN (29)

實例 9：結合的 HFR 以及 C2177 單株抗體之最佳化

【0147】 在本方法中，評估一組有限 HFR 變異體之用於表現的 Fab 形式、pIX 的展現與結合，接著將最佳候選者進行最佳化。C2177 的互補決定區係在兩個重鏈 VH5-51 (SEQ ID NO: 102 H24) 及 VH1-46 (SEQ ID NO: 106 H25) 與兩個輕鏈 Vk4-1 及 Vk012 (SEQ ID NO: 90 L36) 經過人類框架改編。將這些 HFA 變異體區域在一 2×2 矩陣中互相配對，如在 Fab pIX 噬菌體呈現載體中具有人類 CH1 及 Ck 恆定區的 Fabs。該 VH1-46/Vk012 變異體 (M55, H25/L36) 顯示會與 CD27 結合且有良好的展現特性，其被選擇用來建構親和力成熟化基因庫。

【0148】 如上面實例 8 中所述，建構用於 pIX 噬菌體呈現的 Fab 基因庫。根據 CD27 與 C2191 及 C2177 在實驗上的共同結構 (實例 5)，在該抗體補位中及周圍的 CDR 殘基設計多樣性基因庫。變異的重點在於互補決定區 L1、L3 及 H2。將在一個別 CDR 中的全部 4-6 個殘基以一 NNK 密碼子進行多樣化，該密碼子可用於編碼全部 20 種胺基酸。每個基因庫的大小估計為 $\leq 6 \times 10^7$ 個變異體，其可藉由使用標準基因庫限制性核酸內

切酶選殖技術來涵蓋。表 14 顯示在不同 CDR 基因庫中經過全面多樣化之殘基。

表 14：C2177 的親和力成熟化基因庫設計

VH CDR	母體胺基酸及位置
CDR-H2	Y52
	G53
	D54
	D56
	N58
CDR-H3	Y97
	Y98
	D100
	Y100a
VL CDR	母體胺基酸及位置
CDR-L1	Y30a
	A30b
	G30c
	D30d
	Y32
CDR-L3	Q90
	N92
	E93
	D94
	Y96

【0149】 將在噬菌體外殼蛋白 IX 上呈現之 Fab 基因庫針對生物素化的 hCD27ECD/Fc 淘選。噬菌體係藉由輔助噬菌體感染一變異體質體庫而產生。添加塗佈有鏈黴親和素的磁珠以形成一珠珠/抗原/噬菌體複合體，藉以回收結合劑（binder）。最後一次清洗後，藉由感染倍增生長之 MC1061F’大腸桿菌細胞而救出噬菌體。噬菌體係再次產生，然後進行額外的淘選回合。生產來自選擇植株的可溶性 Fab 並評估其結合親和力，如

關於路徑 1 中所述。只在 CDR-L1 及 CDR-L2 基因庫中有得到目標。來自該兩個基因庫的二十一個殖株證實比起母體 HFR Fab 結合更強。捨棄在多樣性序列中含有 C 或 M 的殖株。轉換十個 Fabs 到 IgG4SPA_{Aa}/κ 背景中表現以進一步確認特性。該 IgG4PAA 重鏈係人類 IgG4，其在絞鏈區中含有絲胺酸到脯胺酸的取代 (Angal et al., Mol Immunol 30: 105 (1993)) 且在 CH2 中的兩個位置含有丙胺酸的取代 (ML Alegre et al, Transplantation; 57: 1537-43 (1994))。於 HEK293E 細胞中產生該單株抗體作為該 Fabs 的複製物並作為重鏈和輕鏈組合之基體。使用培養上清液在 ProteOn 儀器上測量親和力 (表 15)。CDR-H2 中 P52a 到 Q (M158) 或到 S (M157) 的突變與母體單株抗體 (M159) 相比，K_D 減少了 6 倍。在 CDR-L1 (M149) 中的 Y36F 突變會減少 K_D 4 倍且加入 G33H 及 D34E 突變 (M155) 後會導致 K_D 減少 6 倍。P52S 突變與 Y36F (M160) 或 Y36F 加上 G33H 及 D34E 的組合會使 K_D 減少 20 倍至 100 pM。選擇在 M158、M160 及 M166 的取代組合進一步做特性確認。

表 15：源自 Fab 突變基因庫的單株抗體初始分格表

蛋白質 DNA 識別碼	H&L	CDR-H2 (SEQ ID NO)	CDR-L1 (SEQ ID NO)	K _D (nM)
M149	H25,L219	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	0.54
M150	H25,L218	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFGDSL MN (32)	4.04
M151	H25,L224	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYYNSSF MN (36)	1.07
M152	H25,L223	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYWSDSF MN (35)	1.54
M153	H25,L222	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYVGTSF MN (34)	1.41
M154	H25,L221	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFRTSF MN (33)	1.56

M155	H25,L217	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAHESFMN (31)	0.37
M156	H25,L216	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFSESFMN (170)	0.71
M157	H197,L220	RIYQGDGDTNYNGKFKG (22)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	0.39
M158	H196,L220	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	0.36
M159	H25,L220	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	2.23
M160	H196,L219	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	0.12
M161	H196,L218	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYFGDSL MN (32)	1.34
M162	H196,L224	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDY YNS SFMN (36)	0.43
M163	H196,L223	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDY WSD SFMN (35)	0.30
M164	H196,L222	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDY VGT SFMN (34)	0.27
M165	H196,L221	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDY FRT SFMN (33)	0.18
M166	H196,L217	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAHESFMN (31)	0.10
M167	H196,L216	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYFSESFMN (170)	0.91

【0150】 在 750 mL 的 HEK293 細胞培養液中生產 M158、M160 及 M166 蛋白，將其純化並在 Biacore 上分析對 CD27-His 之結合動力學。該 K_D 值比那些由 ProteOn 測量的純上清液高約 1 log，但彼此之間則具有相同數值（表 16）。

表 16

單株抗體識別碼	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D (pM)$
M158	$(1.5\pm0.03)E+06$	$(6.6\pm1.7)E-04$	439 ± 114
M160	$(1.6\pm0.15)E+06$	$(1.8\pm0.01)E-04$	117 ± 11
M166	$(1.62\pm0.04)E+06$	$(2.03\pm0.16)E-04$	126 ± 11

【0151】、當再評估原始的 HFA 組合時，該經 VH5-51 改編的 VH 與該 VH1-46 支架的 K_D 相比低了 2 倍。將 H-CDR2 中的 P52aS 突變引入 VH5-51 VH 中創建出 H221。分別以來自 HFA 母代單株抗體（M159）的 L220、L219 及 L217 輕鏈與親和力提昇的變異體 M160 及 M166 來表現 H221 以產生單株抗體 M171、M169 及 M170。該純化的單株抗體的 BIAcore 動力學測量顯示，與對應的 VH1-46 變異體相比 K_D 增加兩倍（比較表 16 及 17）。

表 17

單株抗體識別碼	H/L 胜肽 ID	$K_{on} Ave (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} Ave (s^{-1})$	$K_D Ave (pM)$
M169	H221,L219	$(1.48\pm 0.13)E+06$	$1.02 \pm 0.07)E-04$	69 ± 8
M170	H221,L217	$1.66E+06$	$1.16E-04$	70
M171	H221,L220	$1.53E+06$	$3.58E-04$	234

【0152】 M160、M169 及 M170 的序列分析在 D54-G55 確認有一個潛在的異構化位點，以及在 H196 及 H221 的 CDR-H2 中的 N61-G62 確認有一個潛在的脫醯胺位點。此外，在 L219 的 CDR-L1 中的 D34 被確認有一個潛在的異構化位點。引入突變以移除這些位點並評估突變對活性的影響（表 18）。在 ProteOn 上分析純化的單株抗體對 CD27-His 的親和力。該些突變對 K_D 沒有影響或有正面影響。例如，M668 及 M671 與彼等之母體單株抗體（分別為 M160 及 CM169）相比， K_D 降低了幾乎 2 倍。

表 18：PTM 序列經過突變的單株抗體變異體

母體單 株抗體	單株抗體 識別碼	H/L 胜肽 ID	CDR-H2 (SEQ ID NO)	CDR-L1 (SEQ ID NO)	k_{on} Ave ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} Ave (s^{-1})	K_D Ave (pM)
M160	M160	H196,L219	RIYSGDGD TN YNGKFK G (19)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	2.07E+06	2.23E-04	108
M166	M166	H196,L217	RIYSGDGD TN YNGKFK G (19)	KASQSVDYAHESFMN (31)	1.84E+06	2.34E-04	127
M169	M169	H221,L219	RIYSGDGD TN YNGKFK G (19)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	2.36E+06	1.39E-04	59
M160	M668	H255,L266	RIYSGDAD TN YAQKFK G (20)	KASQSVDYAGESFMN (29)	2.14E+06	1.29E-04	60
M160	M669	H256,L266	RIYSGDAD TN YNQKFK G (21)	KASQSVDYAGESFMN (29)	2.49E+06	1.45E-04	58
M169	M670	H257,L266	RIYSGDAD TN YAQKFK G (20)	KASQSVDYAGESFMN (29)	1.73E+06	1.13E-04	65
M169	M671	H258,L266	RIYSGDAD TN YNQKFK G (21)	KASQSVDYAGESFMN (29)	2.52E+06	9.73E-05	39
M166	M672	H255,L217	RIYSGDAD TN YAQKFK G (20)	KASQSVDYAGESFMN (29)	1.83E+06	2.64E-04	144
M166	M673	H256,L217	RIYSGDAD TN YNQKFK G (21)	KASQSVDYAGESFMN (29)	1.89E+06	1.89E-04	100

實例 10：C2191 HFR MAB M91 的最佳化

【0153】 用來最佳化 M91 (H31/L42) 的方法如實例 8 中所述，除非另有說明。在一種 Fab 形式中進行 C2191 互補決定區的丙胺酸/生殖系掃描以評估與 CD27 交互作用重要的位置，使用 C2191 母體的 VH 及 VL 區（為具有人類 Ch1 及 Ck 恆定區的 Fab 形式）。該基因庫將互補決定區中的殘基以丙胺酸或存在於對應生殖系序列中的殘基取代。根據模型以及後續的被測定的結構（實例 5），互補決定區中的一些位置因為較少或不會曝露於溶劑中而被排除。將推定的體細胞突變突變回小鼠生殖系胺基酸以評估其對抗體親和力之貢獻。簡言之，將小鼠 V 區選殖進 Fab pIX 呈現載體並以 ELISA 驗證母體與生物素化的人類 CD27-ECD 蛋白之結合。利用定點突變（site-directed mutagenesis）引入單一突變（根據該基因庫設計），基本上如 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 所述進行。從序列確定的

突變中選擇最佳者到新的培養盤中並與母代 Fab 及負對照組 Fabs 一同生長。於 *E. coli* 中產生最終的單一胺基酸取代變異體，並接著以 ELISA 篩選表現量以及與 CD27 的結合。平均該母體殖株之表現及結合訊號並將其設為 1.0，將突變體的訊號相對於該母體做標準化。ELISA 中使用兩種形式的抗原：CD27 ECD（殘基 1-173）及 CD27 ECD-Fc 嵌合體（R&D Systems）。

【0154】 該掃描之結果結合共晶體結構提供了設計親和力成熟化基因庫之基礎。對於該重鏈；選擇變異的位置係在 H-CDR1 中的 T33 以及在 CDR-H2 中的 Y50、S52、S52a、N56 及 Y58（表 23）。T33 並非接觸的殘基但 T33A 的突變卻增強了結合。位置 S52 及 S52a 並非接觸的殘基，但在掃描中該取代顯示會增加些微的結合。在位置 50 及 58 的酪胺酸均為接觸位點，在實例 11 中所述之並行的最佳化路徑中選擇在這些位點做取代。在該丙胺酸/生殖系掃描中並未評估位置 N56，但其係一接觸位點並在晶體結構中與 T33、S52 及 S52a 相鄰。對於該輕鏈，選擇變異的位置係在 CDR-L1 中的 T30a、S30b、G30c 及 Y30d 以及在 CDR-L2 中的 L50 及 N53（表 23）。這些殘基均不與抗原直接接觸而是與接觸的殘基相鄰，而該掃描顯示該接觸的殘基對結合具有重大負面影響。L50A 突變對結合的影響中等，並且在晶體結構中為 CDR-L2 中唯一可能與抗原接觸的殘基。此外，選擇 N53 用於有限的多樣化。建構兩個平行的基因庫，一個將 Y30d 突變為 W，且另一個將 Y30d 保持為 Y，因為 W 可提高補位疏水性並因此較難發育。下面的表 19 及 20 顯示 M91 之 VH 及 VL 親和力成熟化基因庫的設計。

表 19

2191	HC_CDR1	HC_CDR2				
接觸抗原?	否	是	否	否	是	是
於 HC (SEQ ID NO: 131) 的位置	T33	Y50	S52	S52a	N56	Y58
於 HC (SEQ ID NO: 131) 的位置	T33	Y50	S52	S53	N57	Y59
序列差異	所有 20 個 胺基酸	Y	所有 20 個 胺基酸	所有 20 個 胺基酸	所有 20 個 胺基酸	Y
		A				I
		W				L
		H				W

表 20

2191	LC_CDR1				LC_CDR2	
接觸抗原	否	否	否	是	是	否
於 LC (SEQ ID NO: 140) 的位置	T30a	S30b	G30c	Y30d	L50	N53
於 LC (SEQ ID NO: 140) 的位置	T31	S32	G33	Y34	L54	N57
序列差異	所有 20 個 胺基酸	所有 20 個 胺基酸	G	Y*	所有 20 個 胺基酸	N
			R	W*		K
						R

*創建在該位置含有 Y 或 W 的兩個獨立基因庫

【0155】 將在噬菌體外殼蛋白 IX 上呈現之 Fab 基因庫針對生物素化的 CD27-ECD 淘選。選擇總共 12 個重鏈變異體和 12 個輕鏈變異體，其與 CD27 的結合相等於 C2191 母代嵌合的 Fab 或比其更好。將該變異體轉換為 IgG1/ κ 抗體，以 144 種組合生產於 HEK293E 細胞中，並以 ProteOn 評估培養上清液的結合能力。在一些變異體可觀察到親和力有顯著增加 (>100 倍)。在 144 個 VH 與 VL 的配對中，選擇 8 個作進一步的特性確認 (表 21)。將這些單株抗體分類成三個次群組：群組 1 變異體係相同重鏈 (H227、SEQ ID NO: 133) 與四個不同輕鏈的配對，而群組 2 及群組 3 則各為一輕鏈與兩個不同重鏈的配對。該四個選擇的輕鏈在 CDR-L1 (RASKSVSX₁X₂X₃X₄SFMH (SEQ ID NO: 158)；其中 X₁ 係 A、E、H 或

L；X₂ 係 D、G、V 或 W；X₃ 係 G 或 R；及 X₄ 係 W 或 Y）中多樣化的所有四個位置均有所改變。彼等在 CDR-L2（X₁ASX₂LES（SEQ ID NO:171）；其中 X₁ 係 L 或 V；且其中 X₂ 係 K、N 或 R）中多樣化的兩個位置亦有所改變。CDR-L3 來自未改變的 L42 序列（SEQ ID NO: 140），其為 QHSRELPWT。

表 21 選擇的 2191 親和力成熟領先者之重鏈和輕鏈序列的配對

抗體識別號	輕鏈勝肽識別號	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	重鏈勝肽識別號	CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)
M427	C27L244	RASKSVSAWGYSFMH (60)	VASRLES (68)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSV KG (47)
M429	C27L245	RASKSVSHVRWSFMH (61)	LASKLES (69)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSV KG (47)
M488	C27L249	RASKSVSEGRWSFMH (62)	VASRLES (68)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSV KG (47)
M489	C27L250	RASKSVSLDRWSFMH (63)	LASNLES (67)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSV KG (47)
M492	C27L249	RASKSVSEGRWSFMH (62)	VASRLES (68)	C27H228	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSV KG (48)
M493	C27L250	RASKSVSLDRWSFMH (63)	LASNLES (67)	C27H228	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSV KG (48)
M501	C27L250	RASKSVSLDRWSFMH (63)	LASNLES (67)	C27H231	GFTFSSYSMS (45)	HIDAGGGRTWYPDS VKG (49)
M526	C27L249	RASKSVSEGRWSFMH (62)	VASRLES (68)	C27H222	GFTFSSYGMS (44)	YIDRGGGVTIYPDSV KG (50)

【0156】 這八個變異體係藉由於 HEK293E 細胞中短暫表現而生產，體積為 750 ml。將收穫的上清液透過蛋白 A 層析法純化，並藉由 SDS-PAGE 及 SE-HPLC 分析每個變異體以測定樣品純度以及純化樣品中的單體百分比。所有的變異體均大於 90%的純度且大於 90%為單體。為評估該些抗體之結合特性，將每個純化的變異體進行交互作用層析（cross-interaction chromatography）以測定滯留因子（k'）（Jacobs SA, Wu SJ, Feng Y, Bethea D & O'Neil KT (2010) Cross-interaction chromatography:

a rapid method to identify highly soluble monoclonal antibody candidates. *Pharm Res* **27**, 65-71)。在該方法中，將樣品抗體通過一耦合有人類 IgG 的管柱，並評估相對於對照抗體之滯留度。簡言之，依據廠商說明將 50 mg 的人類 IgG (Sigma Aldrich) 耦合至 1 mL 的 NHS-Sepharose 管柱 (GE Healthcare)。以 0.1 M Tris (pH 8)、0.5 M NaCl 清洗以移除未耦合的 IgG，並用相同緩衝液來阻斷未反應的 NHS 基團。使用 Pierce 的 Coomassie Plus Assay Kit (Thermo Pierce) 來測量未反應的耦合緩衝液和清洗液中殘留的蛋白質濃度並從固定前的蛋白質數量中減去以測定耦合效率。使用相同流程製備一對照管柱，但沒有將 IgG 共軛到樹脂上。將該對照管柱以每分鐘流速 0.1 毫升的 PBS (pH7) 平衡後，在 Dionex UltiMate 3000 HPLC 上第一次運行。首先注射 20 μ L 的儲備蛋白質溶液，以確保阻斷非特定異性結合位置，接著以 20 μ L 的 10%丙酮來檢查該管柱的完整性。將欲分析的樣品於 PBS (pH 7) 中稀釋成 0.1 mg/mL。將每個樣品各 20 μ L 注射到每根管柱上，然後讓它在流速每分鐘 0.1 mL 下運行 30 分鐘。記錄滯留時間，然後計算出各變異體的滯留因子 (K')。 k' 值係計算為在 IgG 管柱與空白 (blank) 管柱上滯留時間的差異。根據 SDS-PAGE 及 SE-HPLC，將所有變異體純化至純度大於 90%。所有的 k' 值均被計算出小於 0.3，表示具有良好的溶解特性 (表 22)。

表 22 純化的親和力成熟變異體之批次分析

抗體識別號	HC	LC	濃度 (mg/ml)	全部的蛋白質	單體%	Gel	k'
M427	H227	L244	1.42	15.63	100	OK	0.02
M429	H227	L245	0.97	10.21	100	OK	0.07
M488	H227	L249	2.00	27.06	98.9	OK	0.07
M489	H227	L250	1.59	23.03	100	OK	0.17
M492	H228	L249	2.07	27.96	97.4	OK	0.25
M493	H228	L250	0.58	8.12	100	OK	0.24
M501	H231	L250	2.01	26.08	100	OK	0.28
M526	H222	L249	0.90	10.74	100	OK	0.10

【0157】 藉由 BIAcore 評估該八種變異體單株抗體及該 HFR 母體對 CD27 ECD 的親和力，並在 $\kappa\beta$ 報導子分析試驗中評估彼等之 IC_{50} 。藉由 BIAcore 測量動力學常數和親和力。收集這些變異體的數據並總結於表 23 中。從最初小量培養上清液測量到的表現量及與 CD27 結合之 ELISA 訊號亦包括於此表中。

表 23：C2191 AM 基因庫子集數據總覽

蛋白質識別碼	表現量 (ug/ml)	ELISA 訊號	NF κ B IC_{50} (pM)	k_a	k_d	K_D (pM)
M41	n.d.	n.d.	45	6.20E+05	8.44E-03	13650
M427	14.6	0.93	19	7.18E+05	3.00E-05	41.7
M429	16.1	0.86	42	6.62E+05	2.02E-05	30.4
M488	20.7	0.92	23	1.01E+06	3.96E-05	39.4
M489	24.2	0.96	41	9.06E+05	2.18E-05	24.1
M492	20.1	0.77	15	1.03E+06	1.47E-04	142.0
M493	24.5	0.85	14	7.23E+05	1.05E-04	145.0
M501	30.9	0.77	4	8.31E+05	6.16E-05	74.2
M526	14.3	0.69	6	1.00E+06	1.71E-04	171.0

實例 11：結合的 HFR 以及 C2191 單株抗體之最佳化

【0158】 在本方法中，評估一組有限 HFR 變異體之用於表現的 Fab 形式、pIX 的展現與結合，接著將最佳候選者進行最佳化。C2191 的互補決定區係在兩個重鏈（VH3-23 及 VH3-11）及兩個輕鏈（Vk4-1 及 Vk012）經過人類框架改編。將這些 HFA 變異體區域在一 2×2 矩陣中一起配對，如在 Fab pIX 噬菌體呈現載體中具有人類 CH1 及 Ck 恆定區的 Fabs。該 VH3-23/Vk012 變異體（H39（SEQ ID NO: 145））及 L40（SEQ ID NO: 137）顯示會與 CD27 結合且有良好的展現特性，其被選擇用來建構親和力成熟化基因庫。此 Fab 被稱為「母體」。

【0159】 為了選擇親和力增強之抗體，使用 NNK 退化性密碼子（degenerate codon）在所有互補決定區（除了 H39 的 CDR-H3）進行多個

殘基的完整多樣化（表 24）。每個 CDR 基因庫均單獨建構並以噬菌體淘選來選擇親和力成熟的變異體。

表 24：C2191 變異體的親和力成熟化基因庫設計

VH CDR	母體胺基酸及位置
CDR-H2	Y50
	S52
	S53
	N56
	Y58
CDR-H3	H95
	R96
	G97
	N98
	P99
VL CDR	母體胺基酸及位置
CDR-L1	T30a
	S30b
	G30c
	Y30d
	F32
CDR-L2	L50
	A51
	S52
	N53
	L54
	E55
	S56
CDR-L3	H90
	R92
	E93
	L94
	Y96

【0160】 該 C2191 基因庫（在 CDR-H2、CDR-L1 或 CDR-L2 具有多樣性）產生 50 個獨特的 Fabs，在單點 ELISA 測量中，其與人類 CD27 的結合比起母代 HFR Fab 更強。將該些殖株進一步在多點 ELISA 中排序，並選出十七個殖株用來轉換成人類 IgG4alaala/κ 以用於進一步的特性確認（表 25）。

表 25：選擇用來轉換為 IgG 的親和力成熟 Fabs

Fab 識別碼	HC 胜肽 識別碼	LC 胜肽 識別碼	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)
母體	H39	L40	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F116	H39	L59	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGNRLED (70)
F119	H39	L62	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRRQE (71)
F178	H145	L40	YISGGGGQTLYPDSVKG (54)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F18	H40	L40	AIDHGGGRTYYPDSVKG (51)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F19	H41	L40	AIDHGGGRTWYPDSVKG (52)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F243	H39	L124	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRMAF (72)
F250	H39	L131	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRANW (73)
F256	H39	L137	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRLDY (74)
F279	H39	L160	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSYVRWSFMH (64)	LASNLES (67)
F291	H39	L172	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSHIRWSFMH (65)	LASNLES (67)
F292	H39	L173	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSHVRWSFMH (61)	LASNLES (67)
F295	H39	L176	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VADRVEV (173)
F297	H190	L40	TIDRGGGSTWYPDSVKG (55)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)

F298	H191	L40	AIDGGGGATYYPDSVKG (56)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F299	H192	L40	VIDHGGGSTHYPPDSVKG (57)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F302	H39	L179	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSLIRWSFMH (172)	LASNLES (67)
F57	H79	L40	AIDHGGGQTLYPDSVKG (53)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)

【0161】 將 IgG1/k 單株抗體建構為該 Fabs 的複製物以及重鏈和輕鏈變異區之基體（表 26），並測試親和力及溶解特性。該母體 Fab 之單株抗體形式係表示為 M131。選擇 M141 及 M408 進一步確認特性。

表 26：衍生自 Fab 親和力成熟化的單株抗體

Fab 識別碼	單株抗體識別碼	H & L 胜肽識別碼
母體	M131	H39, L40
F18	M132	H40, L40
F57	M133	H79, L40
F298	M134	H191, L40
F299	M135	H192, L40
F292	M136	H39, L173
F279	M137	H39, L160
F256	M138	H39, L137
組合	M139	C27H40, L173
組合	M140	C27H40, L160
組合	M141	C27H79, L173
組合	M142	C27H79, L160
組合	M143	C27H191, L160
組合	M144	C27H191, L173
組合	M145	C27H192, L173
組合	M146	H192, L160
組合	M408	H192, L137

實例 12：親和力成熟的單株抗體之特性確認

【0162】 選擇源自母代 C2177 和 C2191 融合瘤抗體的親和力成熟單株抗體進行密碼子最佳化，將其引入至一不同的載體中以雙重表現重鏈和輕鏈，表現於 CHO-GS 細胞培養中，並純化以用於進一步的特性確認。與上面實例中所述之成熟變異體相關的這些抗體的識別碼 (ID) 係顯示於表 27 中。

表 27

P 母體	pDNA 識別碼	L 單一基因 DNA 識別碼	LLC 胜肽識別碼	HHC 胜肽識別碼
C2191	M429	M696	C27L245	C27H227
C2191	M492	M695	C27L249	C27H228
C2191	M488	M694	C27L249	C27H227
C2191	M141	M707	C27H79	C27L173
C2191	M408	M708	C27H192	C27L137
C2177	M703	M709	C27H270	C27L267
C2177	M706	M710	C27H272	C27L267
C2177	M671	M711	C27H258	C27L266
C2177	M668	M713	C27H255	C27L266

【0163】 這些單株抗體之彙整數據係顯示如下，包含 Biacore 的 K_D 分析以及在 NF- κ B 報導基因分析試驗中測得之 IC_{50} (表 28 及 29)。關於該 NF- κ B 報導基因分析試驗，將 HEK-293F 細胞以總共 36 ng 的 DNA (含人類 CD27 及螢光素酶構造) 在 NF- κ B 啟動子的控制下轉染。將 HEK-293F 轉染細胞以每孔 5×10^4 個細胞 (於 40 μ L 的 Freestyle 培養基 (Gibco) 中) 置於 96 孔培養盤中。將抗-CD27 融合瘤單株抗體於 Freestyle 培養基中的稀釋液 (用 1:3 稀釋，使最終濃度為 50 μ g/mL) 加入該分析培養盤中並將培養盤於 37°C (5% CO_2) 培養一小時。為了測試單株抗體中和 CD70:CD27 訊號傳遞的能力，在該分析培養盤中加入數量為 CD27 轉染細胞數 20% 的

經定期照射（4000 rads）的 HEK-293E CD70 游離細胞。為了測試融合瘤單株抗體的促效活性，省去 CD70 游離細胞的添加。將分析培養盤於 37 °C（5% CO₂）培養過夜並根據廠商說明使用 Steady-Glo[®] 螢光素酶分析系統（Promega）使其生長。

表 28 源自 C2191 的成熟變異體之特性確認

單株抗體	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	NF- $\kappa\beta$ 分析試驗 IC ₅₀ (pM)
C2191 母代嵌合體 (M41)	4.35E+05	0.0103	23678	2300
M694	4.80E+05	7.60E-05	105	420
M695	5.10E+05	1.70E-04	202	250
M696	3.70E+05	2.1E-05	57	330
M707	5.85E+05	1.24E-04	213	260
M708	6.430E+05	2.25E-04	350	260

表 29 源自 C2177 的成熟變異體之特性確認

單株抗體	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	NF- $\kappa\beta$ 分析試驗 IC ₅₀ (pM)
C2177 母代嵌合體 (M40)	1.06E+06	1.32E-03	1240	466
M709	2.30E+06	5.89E-05	26	272
M710	2.55E+06	4.88E-05	19	320
M711	1.97E+05	5.82E-05	30	258
M713	2.06E+05	1.16E-05	56	296

CDR 及 V 區序列

表 30. 2177 路徑 1

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H7	M40 母體	SSWMN (1)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (3)	SDYYGDYGFAY (23)
		延長的 CDR-H1	Kabat-7 (+2 HFR 殘基以顯示 PMT 突變)	Kabat
H28	HFR(M69)	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDNTNYS (4)	SDYYGDYGFAY (23)
H236		GYAFSSSWMN(2)	RIYPGDGDNTNYS	ADYYGDYGFGY (162)
H237		GYAFSSSWMN(2)	RIYVVDGDNTNYS (5)	SDYYGDYGFAY (23)
H238		GYAFSSSWMN(2)	RIYVGDGDNTNYS (6)	SDYYGDYGFAY (23)
H239	M596, M600	GYAFSSSWMN(2)	RIYAGDGDNTNYS (7)	SDYYGDYGFAY (23)
H240		GYAFSSSWMN(2)	RIYARDGDNTNYS (8)	SDYYGDYGFAY (23)
H241		GYAFSSSWMN(2)	RIYGRDGDNTNYS (9)	SDYYGDYGFAY (23)
H242		GYAFSSSWMN(2)	RIYANDGDNTNYS (10)	SDYYGDYGFAY (23)
H243		GYAFSSSWMN(2)	RIYGGDGDNTNYS (11)	SDYYGDYGFAY (23)
H244		GYAFSSSWMN(2)	RIYSGDGDNTNYS (12)	SDYYGDYGFAY (23)
H245		GYAFSSSWMN(2)	RIYSRDGDNTNYS (13)	SDYYGDYGFAY (23)
H259	M678	GYAFSSSWMN(2)	RIYAGDGDNTAYS (14)	SDYYGDYGFAY (23)
H260	M680	GYAFSSSWMN(2)	RIYAGDGDNTYA (15)	SDYYGDYGFAY (23)
H270	M703=M709	GYAFSSSWMN(2)	RIYAGDADNTAYS (16)	SDYYGDYGFAY (23)
H272	M706=M710	GYAFSSSWMN(2)	RIYAGDADNTYA (17)	SDYYGDYGFAY (23)
			RIX ₁ X ₂ X ₃ DX ₄ DTX ₅ YX ₆ (151)	

對於 SEQ ID NO:151，X₁ 係 F 或 Y；X₂ 係 A、G、S 或 V；X₃ 係 G、N 或 R；X₄ 係 A 或 G；X₅ 係 A 或 N；及 X₆ 係 A 或 S

表 31 2177 路徑 2

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H7	M40 母體	SSWMN (1)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (3)	SDYYGDYGFAY (23)
		延長的 CDR-H1	Kabat-7 (CDR 的其餘部分在小鼠和 HFR 中係相同)	Kabat

H24	HFR(M50)	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (18)	SDYYGDYGFAY (23)
H221	M169, M171, M170	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGDNTYNGKFKG (19)	SDYYGDYGFAY (23)
H257	M670	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	SDYYGDYGFAY (23)
H258	M671=M711	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	SDYYGDYGFAY (23)
H25	HFR (M55); M149-156; M159	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (18)	SDYYGDYGFAY (23)
H196	M158; M160-167	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGDNTYNGKFKG (19)	SDYYGDYGFAY (23)
H255	M668=M713; M672;	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	SDYYGDYGFAY (23)
H256	M669; M673	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	SDYYGDYGFAY (23)
H197	M157	GYAFSSSWMN (2)	RIYQGDGDNTYNGKFKG (22)	SDYYGDYGFAY (23)
			RIYX ₁ GDX ₂ DTNYX ₃ X ₄ KFKG (152)	

對於 SEQ ID NO:152，X₁ 係 P、Q 或 S；X₂ 係 A 或 G；X₃ 係 A 或 N；X₄ 係 G 或 Q。

表 32 2177 路徑 1

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L18	M40 母體小鼠	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L35	HFR (M69)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L255	M600; M678; M680	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L256		KASQSVDYAGDSWMN (26)	VASNLES (38)	QQSNEDPYT (41)
L257	M596	KASQSVDYAGDSWMN (26)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L258		KASQSVDYAGSSF MN (27)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L260		KASQSVDWAGHSWMN (28)	TASNLES(39)	QQSNEDPYT (41)
L261		KASQSVDYAGSSF MN (27)	EASNLES (40)	QQSNEDPYT (41)
L267	M703=M709; M706=M710	KASQSVDYAGESFMN (29)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
		KASQSVDX ₁ AGX ₂ SX ₃ MN (153)	X ₁ ASNLES (154)	

對於 SEQ ID NO:153，X₁ 係 W 或 Y；X₂ 係 D、E、S 或 H；X₃ 係 F、W 或 Y。

對於 SEQ ID NO:154，X₁ 係 A、E、T 或 V；

表 33 2177 路徑 2

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L18	M40 母體小鼠	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L36	HFR (M55; M50)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L216	M156; M167	KASQSVDYFSESYMN (30)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L217	M155; M166; M170; M672; M673	KASQSVDYAHESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L218	M150; M161	KASQSVDYFGDSL MN (32)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L219	M149; M160; M169	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L266	M668=M713; M669; M670; M671=M711;	KASQSVDYAGESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L220	M157; M171; M158; M159	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L221	M154	KASQSVDYFRTSFMN (33)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L222	M153	KASQSVDYVGT S FMN (34)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L223	M152; M163	KASQSVDYWSDSFMN (35)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L224	M151; M162	KASQSVDY YNSSFMN (36)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
		KASQSVDYX ₁ X ₂ X ₃ MSX ₄ MN (155)		

對於 SEQ ID NO:155，X₁ 係 A、F、V、W 或 Y；X₂ 係 G、H、N、R 或 S；X₃ 係 D、E、S 或 T；X₄ 係 F、L 或 Y。

表 34 2191 路徑 1

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H10	M41 母體	SYTMS (42)	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	HRGNPFDY (58)
		延長的 CDR-H1	Kabat	Kabat
H31	HFR (M91)	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTYYPD SVKG (46)	HRGNPFDY (58)
H227	M427, M429=M696; M488=M694; M489	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPD SVKG (47)	HRGNPFDY (58)
H228	M492=M695; M493	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPD SVKG (48)	HRGNPFDY (58)

H231	M501	GFTFSSYSMS (45)	HIDAGGGRTWYPDSVKG (49)	HRGNPFDY (58)
H222	M526	GFTFSSYGMS (44)	YIDRGGGVITIYPDSVKG (50)	HRGNPFDY (58)
H227	Kabat 界定的 CDR-H1	SYGMS (161)		
			X ₁ IX ₂ X ₃ GGGX ₄ TX ₅ YPDSVKG (156)	

對於 SEQ ID NO:156，X₁ 係 H 或 Y；X₂ 係 D 或 S；X₃ 係 A、E、R 或 S；及 X₄ 係 I、W 或 Y。

表 35 2191 路徑 2

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H10	M41 母體	SYTMS (42)	YISSGGGNTIYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
		延長的 CDR-H1	Kabat	Kabat
H39	HFR；M131； M136-138	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTIYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
H40	M132；M139； M140	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTIYPDSVKG (51)	HRGNPFDY (58)
H41		GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTWYPDSVKG (52)	HRGNPFDY (58)
H79	M133； M141=M707； M142	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGQTLYPDSVKG (53)	HRGNPFDY (58)
H145		GFTFSSYTMS (43)	YISGGGGQTLYPDSVKG (54)	HRGNPFDY (58)
H190		GFTFSSYTMS (43)	TIDRGGGSTWYPDSVKG (55)	HRGNPFDY (58)
H191	M134；M143； M144；	GFTFSSYTMS (43)	AIDGGGGATYYPDSVKG (56)	HRGNPFDY (58)
H192	M135；M145； M146； M408=M708	GFTFSSYTMS (43)	VIDHGGGSTHYYPDSVKG (57)	HRGNPFDY (58)
			X ₁ IX ₂ X ₃ GGGX ₄ TX ₅ YPDSVKG (157)	

對於 SEQ ID NO:157，X₁ 係 A、T、V 或 Y；X₂ 係 D 或 S；X₃ 係 G、H、R 或 S；X₄ 係 A、N、Q、R 或 S；及 X₅ 係 H、L、W 或 Y。

表 36 2191 路徑 1

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L20	M41 母體小鼠	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L42	HFR (M91)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L244	M427	RASKSVSAWGYSFMH (60)	VASRLES (68)	QHSRELPWT (75)
L245	M429=M696	RASKSVSHVRWSFMH (61)	LASKLES (69)	QHSRELPWT (75)
L249	M488=M694; M492=M695; M526	RASKSVSEGRWSFMH (62)	VASRLES (68)	QHSRELPWT (75)
L250	M489; M493; M501	RASKSVSLDRWSFMH (63)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
		RASKSVSX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SFMH (158)		

對於 SEQ ID NO:158，X₁ 係 A、E、H、L、T 或 Y；X₂ 係 D、G、I、S、V 或 W；X₃ 係 G 或 R；及 X₄ 係 W 或 Y。

表 37 2191 路徑 2

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L20	M41 母體小鼠	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L59		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGNRLD (70)	QHSRELPWT (75)
L62		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRRQE (71)	QHSRELPWT (75)
L124		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSMAF (72)	QHSRELPWT (75)
L131		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRANW (73)	QHSRELPWT (75)
L137	M138; M408=M708	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRLDY (74)	QHSRELPWT (75)
L160	M137; M160; M142; M143; M146	RASKSVSYVRWSFMH (64)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L172		RASKSVSHIRWSFMH (65)	LASNLES	QHSRELPWT (75)
L173	M136; M139; M141=M707; M144; M145	RASKSVSHVRWSFMH (66)	LASNLES	QHSRELPWT (75)

蛋白質及抗體變異區序列

表 38

SEQ ID NO	殖株	序列 (CDR 序列加上底線)	特徵或來源	註解
174	人類 CD27 ECD	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVK DCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCES CRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRD KECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPY VSEMLEARAGHMQTLADFRQLPARTLSTHW PPQRSCLCSSDFIRILHHHHHH	ECD: 1-173, His6	
175	經截斷之 人類 CD27 ECD	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVK DCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCES CRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRD KECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQLEVLFG GPHHHHHH	ECD: 1-121, 切割位 點, His6	
176	經截斷之 人類 CD27 ECD	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVK DCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCES CRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRD KECTECDGGHHHH	ECD:1-101	Proteos
150	人類 CD70 ECD	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRALVPLVAGLVIC LVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNH TGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQ LRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPCTL AVGICSPASRSISLLRSLFHQGCTIASQRLTPLA RGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP	ECD	
76	C2186 重 鏈(HC)變 異區	<u>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTN</u> <u>YWMNWVKQRPGRGLEWIGRIHPDSETHYN</u> <u>QNFKSKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVY</u> <u>YCARPVLYGDYGFPCWGQGTLVTVSA</u>		鼠類
77	C2186 輕 鏈(LC)變 異區	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYD</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES</u> <u>ARFSGSGGTDFLTNIHPVEEEDAATYYCQOS</u> <u>NEDPYTFGGGTKLEIK</u>		鼠類
78	C2192 重 鏈(HC)變 異區	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSS</u> <u>WMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTNYNG</u> <u>KFKGKATLTADK</u> <u>SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRWDGGNY</u> <u>FFDYWGQGTTTLTVSS</u>		鼠類

79	C2192 輕鏈(LC)變異區	<u>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCMASQDVGT</u> <u>AVAWYQRRPGQSPKLLIYWISTRHTGVPDRF</u> <u>TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSY</u> <u>PLTFGSGTKLEIK</u>		鼠類
80	C2177 重鏈(HC)變異區	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSS</u> <u>WMNWKQRPKGLEWIGRIYPGDGDTNYNG</u> <u>KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY</u> <u>FCARSDYYGDYGFAYWGQGTLLTVSA</u>	H7	鼠類
81	C2177 輕鏈(LC)變異區	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIP</u> <u>ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGGGTKLEIK</u>	L18	鼠類
82	L35	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>	4-1/2	選擇用於 C2177 AM 路徑 1 的 HFR
83	L255	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSFMNWKYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		在 M584、M600 AM 植株中的 VL；在 M678、M680 PTM 變異體中
84	L256	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSWMNWKYQQKPGQPPKLLIYVASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 親和力成熟化路徑 1
85	L257	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GDSWMNWKYQQKPGQPPKLLIYTASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLLAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		在 M558、M596 AM 植株中的 VL
86	L258	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GSSFMNWKYQQKPGQPPKLLIYTASNLESGVPD</u> <u>RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSN</u> <u>EDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 親和力成熟化路徑 1
87	L260	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDWA</u> <u>GHSWMNWKYQQKPGQPPKLLIYTASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 親和力成熟化路徑 1
88	L261	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GSSFMNWKYQQKPGQPPKLLIYEASNLESGVPD</u> <u>RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSN</u> <u>EDPYTFGQGTKLEIK</u>		C2177 親和力成熟化路徑 1

89	L267	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYA</u> <u>GESFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOS</u> <u>NEDPYTFGQGTKLEIK</u>		在 M703、M706 PTM 變異體中的 VL
90	L36	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKLEIK</u>	O12/2	選擇用於 C2177 AM 路徑 2 的 HFR
91	L216	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYFS</u> <u>ESYMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPS</u> <u>RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNE</u> <u>DPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM路徑2
92	L217	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>HESFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		在 M166 AM 殖 株中的 VL
93	L218	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYF</u> <u>GDSL MNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM路徑2
94	L219	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GDSFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		在 M160、M169 AM 殖株中的 VL
95	L219 PTM	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GESFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		在 M668、 M669、M670、 M671 PTM 變異 體中的 VL
96	L266	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GeSFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPS</u> <u>RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSNE</u> <u>DPYTFGQGTKVEIK</u>		在 M668、 M669、M670、 M671 PTM 變異 體中的 VL
97	L220	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYA</u> <u>GDSYMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		在 M158 AM 殖 株中的 VL
98	L221	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYF</u> <u>RTSFMNWWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN</u> <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM路徑2

99	L222	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYV</u> <u>GTSFMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM 路徑 2
100	L223	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYW</u> <u>SDSFMN</u> WYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM 路徑 2
101	L224	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVAITCKASQSVDYY</u> <u>NSSF</u> MNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOSN <u>EDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM 路徑 2
102	H24	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMN</u> WVRQMPGKGLEWMGRIYPGDGDTNYN <u>GKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGT</u> LVTVSS	IGHV5-51/4	選擇用於 C2177 AM 路徑 2 的 HFR
103	H221	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMN</u> WVRQMPGKGLEWMGRIYSGDGDTNYN <u>GKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGT</u> LVTVSS		在 M169 AM 殖 株中的 VH
104	H257	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMN</u> WVRQMPGKGLEWMGRIYSGDaDTNYaq <u>KFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY</u> <u>YCARSDYYGDYGFAYWGQGT</u> LVTVSS		在 M670 PTM 變 異體中的 VH
105	H258	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMN</u> WVRQMPGKGLEWMGRIYSGDaDTNYN <u>qKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGT</u> LVTVSS		在 M671 PTM 變 異體中的 VH
106	H25	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSS</u> <u>SWMN</u> WVRQAPGQGLEWMGRIYPGDGDTNY <u>NGKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> SSLRSED TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGT LVTVSS	IGHV1-46/4	選擇用於 C2177 AM 路徑 2 的 HFR
107	H196	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSS</u> <u>SWMN</u> WVRQAPGQGLEWMGRIYSGDGDTNY <u>NGKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> SSLRSED TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGT LVTVSS		在 M158、M160 AM 殖株中的 VH
108	H255	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSS</u> <u>SWMN</u> WVRQAPGQGLEWMGRIYSGDADTNY <u>AOKFKGRVTMTRDTSTSTVYME</u> SSLRSED TAVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGT LVTVSS		在 M668、M672 PTM 變異體中的 VH

109	H256	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASGYAFSS</u> <u>SWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYSGDADTNY</u> <u>NQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		在 M669、M673 PTM 變異體中的 VH
110	H197	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASGYAFSS</u> <u>SWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYQGDGDTNY</u> <u>NGKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		C2177 AM 殖株
111	H28	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDGDNTYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>	IGHV5-51c/4	選擇用於 C2177 親和力成熟化 (AM) 路徑 1 的 HFR
112	H236	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDGDNTYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARADYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		在 M584 AM 殖 株路徑 1 中的 VH
113	H237	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIFVRDGDNTYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		C2177 AM 殖株 路徑 1
114	H238	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYVGDGDTNYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		C2177 AM 殖株 路徑 1
115	H239	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGDNTYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		在 M596 AM 殖 株路徑 1 中的 VH
116	H240	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYARDGDTNYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		在 M558、M600 AM 殖株路徑 1 中的 VH
117	H241	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGRDGDNTYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		C2177 AM 殖株 路徑 1
118	H242	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYANDGDTNYS</u> <u>PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM</u> <u>YYCARSDYYGDYGFAYWGQGLTLTVSS</u>		C2177 AM 殖株 路徑 1

119	H243	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGGDGTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		C2177 AM 植株 路徑 1
120	H244	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSGDGTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		V2177 AM 植株 路徑 1
121	H245	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSRDGTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		C2177 AM 植株 路徑 1
122	H259	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGTAYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		在 M678 PTM 突 變體中的 VH
123	H260	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDGTNY</u> APSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		在 M680 PTM 突 變體中的 VH
124	H270	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDADTAYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		在 M703 PTM 突 變體中的 VH
125	H272	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSSS</u> <u>WMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAGDADTNY</u> APSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCAR <u>SDYYGDYGFAY</u> WGQGTLTVSS		在 M706 PTM 突 變體中的 VH

表 39

SEQ ID	植株	序列	特徵或來源	註解
126	C2191 重鏈 (HC) 變 異區	<u>EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSY</u> <u>TMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGNTIYPDS</u> <u>VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSED</u> TAMY YCSR <u>H</u> RGNPF <u>DY</u> WGQGTTLTVSS	H10	鼠類
127	C2191 輕鏈 (LC) 變異 區	<u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSG</u> <u>YSFMHWYQQKPGQPPLLILASNLESGVPA</u> RFGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC <u>QH</u> SR ELPWTFGGGTKLEIK	L20	鼠類

128	H30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY <u>TMSWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>YISSGGGNTIYPDS</u> <u>VKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAK <u>HRGNPFDYWGQ</u> GLTVTVSS	IGHV3-23/4	選擇用於 C2191 AM 路徑 2 的 HFR
129	H79	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVSAIDHGGGQTLYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M141 AM 變 異體路徑 2 中的 VH 表 29
130	H192	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVSVIDHGGGSTHYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M408 AM 變 異體路徑 2 中的 VH 表 29
131	H31	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY <u>TMSWIRQAPGKGLEWVS</u> <u>YISSGGGNTIYPDS</u> <u>VKGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCAR <u>HRGNPFDYWGQ</u> GLTVTVSS	IGHV3-11/4	選擇用於 C2191 AM 路徑 1 的 HFR
132	H222	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY GMSWIRQAPGKGLEWVSIDRGGGVTIYPDS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M526 AM 變 異體路徑 1 中的 VH
133	H227	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY GMSWIRQAPGKGLEWVSIDEGGGQTIYPDS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M427、 M429、M488、 M489 AM 變異 體路徑 1 中的 VH
134	H228	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY SMSWIRQAPGKGLEWVSIDAGGGFTIYPDSV KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M492、M493 AM 變異體路徑 1 中的 VH
135	H231	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY SMSWIRQAPGKGLEWVSHIDAGGGRTWYPDS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		在 M501 AM 變 異體路徑 1 中的 VH
136	H232	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY PMSWIRQAPGKGLEWVSHIATGGGNTIYPDS VKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGQGLTVTVSS		C2191 AM 植株 路徑 1
137	L40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC <u>RASKSVSTSG</u> <u>YSFMHWYQQKPGKAPKLLIY</u> <u>LASNLESGVPS</u> RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QHSRE</u> <u>LPWTFGQGTKVEIK</u>	IGKVO12/1	選擇用於 C2191 AM 路徑 2 的 HFR

138	L137	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSG YSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVGSRLDYGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSRE LPWTFGQGTKVEIK		在 M408 AM 變異體路徑 2 中的 VL。表 29
139	L173	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSHV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSR ELPWTFGQGTKVEIK		在 M141 AM 變異體路徑 2 中的 VL。表 29
140	L42	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSG <u>YSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPS</u> <u>RFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHSRE</u> <u>LPWTFGQGTKVEIK</u>	IGKVO8/1	選擇用於 C2191 AM 路徑 1 的 HFR
141	L244	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSAW GYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHSRE LPWTFGQGTKVEIK		在 M427 AM 變異體路徑 1 中的 VL
142	L245	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSHV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASKLESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHSRE LPWTFGQGTKVEIK		在 M429 AM 變異體路徑 1 中的 VL
143	L249	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSEGR WSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLESGVPS RFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHSRE LPWTFGQGTKVEIK		在 M488、M492、M526 AM 變異體路徑 1 中的 VL
144	L250	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSLDR WSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPS RFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQHSRE LPWTFGQGTKVEIK		在 M489、M493、M501 AM 變異體路徑 1 中的 VL
145	H39	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVS ^Y ISSGGGNTYYPD SVKGRFTISRDN ^S KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARHRGNPFDYWGGQGLVTVSS		HFR；在 M131；M136-138 AM 植株路徑 2 中的 VH
146	H40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVS ^A IDHGGGRTYYPD SVKGRFTISRDN ^S KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHRGNPFDYWGGQGLVTVSS		在 M132；M139；M140 AM 植株路徑 2 中的 VH
147	H191	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY TMSWVRQAPGKGLEWVS ^A IDGGGGATYYPD SVKGRFTISRDN ^S KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHRGNPFDYWGGQGLVTVSS		在 M134；M143；M144 AM 植株路徑 2 中的 VH

148	L160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSYV RWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSR ELPWTFGQGTKVEIK	在 M137 ; M160 ; M142 ; M143 ; M146 殖 株路徑 2 中的 VL
-----	------	---	---

表 40 CD27 及 CD70 蛋白

SEQ ID NO:	說明	特徵，縮寫
149	人類 CD27 前多肽 (propeptide)	1-20 訊號，21-191 胞外區域，192-212 跨 膜，213-260 胞內 TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESC RHCNSG LLVRNCTITA NAECACRNGW QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRSLC S SDFI RILVIFSGMF LVFTLAGALF LHQRRKYRSN KGESPVEPAE PCRYSCPREE EGSTIQED YRKPEPACSP
150	人類 CD70 前多肽	1-17 胞內，18-38 跨膜，以及 39-193 胞外 MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQLPL ESLGWDVAEL QLNHTGPQQD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV TLAICSSTA SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN LTGTLLPSRN TDETFFGVQW VRP

表 41 抗體恆定區序列

說明	序列	SEQ ID NO:
重鏈人類 IgG4 Ala/Ala Ser 變 Pro 恆定區	astkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavl qssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpcpap eaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevh naktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskak gqprepvytlppsqeemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykt tppvldsdgsfflysrltvdksrwqegnvfscsvmhcalhnhytqkslsislglk	159
輕鏈人類 κ 恆定區	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqes vteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec	160

表 42 抗體核苷酸序列

說明	序列	SEQ ID NO:
輕鏈編碼序列（編碼序列為 SEQ ID NO: 160 的輕鏈）	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGA GGGGCGATGGAGCTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAG GCCCCAAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAGACTGGAGAGCGGCG TGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGC CAGCACAGCCGGGAGCTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGG TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT	163
重鏈編碼序列（編碼序列為 SEQ ID NO: 159 的重鏈）	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGAAGCCCGGCG GCAGCCTGCGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTACGGGATGAGCTGGATCCGGCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAG TGGGTGAGCTACATCGATGAGGGCGGCGGCCAGACCATCTACCCG ACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAA CAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCGCCCGGCACCGGGGCAACCCCTTCGACTACTGGG GCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTTCCACCAAGGGCCC	164

	ATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCA ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCG CCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACT CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGACGT GAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGG GGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA	
--	---	--

【符號說明】

無

序列表

<110> 健生生物科技公司
<120> 人類抗-CD27抗體、方法及用途
<130> JBI5001USNP
<140> 102109158
<141> 2013-03-15
<150> US 61/611332
<151> 2012-03-15
<160> 176
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR 重鏈可變序列
<400> 1
Ser Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR 重鏈可變序列
<400> 2
Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn
1 5 10

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR 重鏈可變序列
<400> 3

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 4

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 5

Arg Ile Phe Val Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 6

Arg Ile Tyr Val Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 7

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 8

Arg Ile Tyr Ala Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 9

Arg Ile Tyr Gly Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 10

Arg Ile Tyr Ala Asn Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 11

Arg Ile Tyr Gly Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 12

Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 13

Arg Ile Tyr Ser Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 14

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 15

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 16

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 17

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 18

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 19

Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 20

Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 21

Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 22

Arg Ile Tyr Gln Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 23

Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 24

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 25

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asp Ser Trp Met Asn
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 27

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala Gly Ser Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Trp Ala Gly His Ser Trp Met Asn
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 29

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Glu	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 30

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Phe	Ser	Glu	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 31

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	His	Glu	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 32

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 33

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe Arg Thr Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Val Gly Thr Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 35

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Trp Ser Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Asn Ser Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD27 序列

<400> 38

Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 39

Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 40

Glu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 41

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 42

Ser Tyr Thr Met Ser
1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 45

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 46

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 47

Tyr Ile Asp Glu Gly Gly Gly Gln Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 48

Tyr Ile Asp Ala Gly Gly Gly Phe Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 49

His Ile Asp Ala Gly Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 50

Tyr Ile Asp Arg Gly Gly Gly Val Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 51

Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 52

Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 53

Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Gln Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 54

Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gln Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 55

Thr Ile Asp Arg Gly Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 56

Ala Ile Asp Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 57

His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 58

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 59

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Trp Gly Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 60

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Trp Gly Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 61

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Glu Gly Arg Trp Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 62

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Asp Arg Trp Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 63

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Asp Arg Trp Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 64

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Tyr Val Arg Trp Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 65

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	His	Ile	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 66

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	His	Val	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 67

Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 68

Leu	Ala	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 69

Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 70

Val Gly Asn Arg Leu Glu Asp
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 71

Val Gly Asp Arg Arg Gln Glu
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 72

Val Gly Ser Arg Met Ala Phe
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 73

Val Gly Asp Arg Ala Asn Trp
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 74

Val Gly Ser Arg Leu Asp Tyr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 75

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 76
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 76

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

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

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

35

40

45

Gly Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Val Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Pro Cys Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 77
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 77

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

- <210> 78
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 重鏈可變序列

<400> 78

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Trp Asp Gly Gly Asn Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

- <210> 79
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 輕鏈可變序列

<400> 79

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

<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 80

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 81
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 81

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 82
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變序列

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 83
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變序列

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 84
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 85
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 85

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Leu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 86
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Trp Ala
20 25 30

Gly His Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Trp Ala
20 25 30

Gly His Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 88

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Ser Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 89

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 90

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 91
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
20 25 30

Ser Glu Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 92
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

His Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 93

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
20 25 30

Gly Asp Ser Leu Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 94
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 94

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 95
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 96
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 96

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 97
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 98
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 98

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
20 25 30

Arg Thr Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 99
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Val
20 25 30

Gly Thr Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 100
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 100

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

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

Ser Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 101
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 101

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

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ser Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 102
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 102

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

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 103

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

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 104

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 105

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 105

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

151015

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser

202530

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

354045

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65707580

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

859095

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 106

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 106

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 107

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 108

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 109

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 110

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Gln Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 111

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 112

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 113

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Val Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變序列

<400> 114

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Val Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變序列

<400> 115

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 116

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 117

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Gly Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 118
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 118

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Asn Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 119

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

<210> 120
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 120

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

50

55

60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 121
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 121

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ser Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 122
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 122

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 123

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 124

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 125

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 126

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 127

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 128

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 128

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鍵可變序列

<400> 129

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Gln Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 130

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Asp His Gly Gly Gly Ser Thr His Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 131

Gln 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

Thr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 132

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變序列

<400> 132

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

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

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Arg Gly Gly Gly Val Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 133
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 133

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

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

Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Glu Gly Gly Gly Gln Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

859095

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100105110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 134

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
202530

Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

Ser Tyr Ile Asp Ala Gly Gly Gly Phe Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65707580

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100105110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 135
<211> 117

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 135

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

Ser His Ile Asp Ala Gly Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 136
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 136

Gln 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

Pro Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser His Ile Ala Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 137
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 138
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 139
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 139

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser His Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 140

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 140

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 141
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 141

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

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

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 142
<211> 111
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 142

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser His Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 143

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變序列

<400> 143

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Glu Gly
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 144
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變序列

<400> 144

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Asp
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 145
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 145

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

<210> 146
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 146

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變序列

<400> 147

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鍵可變序列

<400> 148

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Tyr Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 149
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 149

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
 35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
 50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
 65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
 85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
 100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His Leu Pro Tyr Val
 115 120 125

Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala
 130 135 140

Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe
 165 170 175

Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His
 180 185 190

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
195 200 205

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
210 215 220

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
225 230 235 240

<210> 150

<211> 193

<212> PRT

<213> 智人

<400> 150

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro

- <210> 151
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> CDR 重鏈可變序列

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (3)..(3)

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (4)..(4)

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (5)..(5)

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (7)..(7)

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (10)..(10)

- <220>
- <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
- <222> (12)..(12)

<400> 151

Arg Ile Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Asp Thr Xaa Tyr Xaa
1 5 10

<210> 152
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR 重鏈可變序列

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (4)..(4)

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (7)..(7)

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (12)..(12)

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (13)..(13)

<400> 152

Arg	Ile	Tyr	Xaa	Gly	Asp	Xaa	Asp	Thr	Asn	Tyr	Xaa	Xaa	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 153
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR 輕鏈可變序列

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (11)..(11)

<220>
 <221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <222> (13)..(13)

<400> 153

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Xaa Ala Gly Xaa Ser Xaa
1 5 10

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<222> (1)..(1)

<400> 154

Xaa Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 155

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<222> (9)..(9)

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<222> (10)..(10)

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<222> (11)..(11)

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<222> (14)..(14)

<400> 155

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Xaa Xaa Xaa Met Ser Xaa Met Asn
1 5 10 15

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (1)..(1)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (3)..(3)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (4)..(4)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (8)..(8)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (10)..(10)

<400> 156

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Gly	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 157
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (1)..(1)

<220>

<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (3)..(3)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (4)..(4)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (8)..(8)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (10)..(10)

<400> 157

Xaa Ile Xaa Xaa Gly Gly Gly Xaa Thr Xaa Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 158
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (8)..(8)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (9)..(9)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (10)..(10)

<220>
<221> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<222> (11)..(11)

<400> 158

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 159
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鍵恆定區

<400> 159

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 160
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈恆定區

<400> 160

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20

25

30

Tyr

Pro

Arg

Glu

Ala

Lys

Val

Gln

Trp

Lys

Val

Asp

Asn

Ala

Leu

Gln

35

40

45

Ser

Gly

Asn

Ser

Gln

Glu

Ser

Val

Thr

Glu

Gln

Asp

Ser

Lys

Asp

Ser

50

55

60

Thr

Tyr

Ser

Leu

Ser

Ser

Thr

Leu

Thr

Leu

Ser

Lys

Ala

Asp

Tyr

Glu

65

70

75

80

Lys

His

Lys

Val

Tyr

Ala

Cys

Glu

Val

Thr

His

Gln

Gly

Leu

Ser

Ser

85

90

95

Pro

Val

Thr

Lys

Ser

Phe

Asn

Arg

Gly

Glu

Cys

100

105

<210> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 161

Ser

Tyr

Gly

Met

Ser

1

5

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 162

Ala

Asp

Tyr

Tyr

Gly

Asp

Tyr

Gly

Phe

Gly

Tyr

1

5

10

<210> 163
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體輕鏈序列

<400> 163

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga ccgggtgacc	60
atcacctgcc gggccagcaa gagcgtgagc gaggggcgat ggagcttcat gcactggtag	120
cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg ctgatctacg tggccagcag actggagagc	180
ggcgtgcccc gccggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcacctt caccatcagc	240
agcctgcagc ccgaggacat cgccacctac tactgccagc acagccggga gctgccctgg	300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	360
atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg	480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654

<210> 164

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體重鏈序列

<400> 164

caggtgcagc tggaggagag cggcggcggc ctggtgaagc ccggcggcag cctgcggctg	60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggga tgagctggat ccggcaggcc	120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcgatgagg gcggcggcca gaccatctac	180
cccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccggcaccgg	300
ggcaaccctt tcgactactg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag cgcttccacc	360
aaggggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc	420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac	540

```

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaaaac ctacacctgc . 600
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 660
cccccatgcc caccatgccc agcacctgag gccgccgggg gaccatcagt ctccctgttc 720
cccccaaaac ccaaggacac tctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gccctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gccctgtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200
ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1260
tcatgtcccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320
tctctgggta aa 1332

```

<210> 165
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR 重鏈可變序列

<400> 165

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 166
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR 重鏈可變序列

<400> 166

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 167
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 167

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 168
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 168

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 169
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 重鏈可變序列

<400> 169

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 170
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe Ser Glu Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 171

Xaa Ala Ser Xaa Leu Glu Ser
1 5

<210> 172
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 172

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Ile Arg Trp Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR 輕鏈可變序列

<400> 173

Val Ala Asp Arg Val Glu Val
1 5

<210> 174

<211> 179

<212> PRT

<213> 智人

<400> 174

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His Leu Pro Tyr Val
115 120 125

Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala
130 135 140

Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro
145 150 155 160

Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu His His His
165 170 175

His His His

<210> 175
<211> 135
<212> PRT
<213> 智人

<400> 175

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
115 120 125

Pro His His His His His His
130 135

<210> 176
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 176

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Gly Gly His His His His
100 105

申請專利範圍

1. 一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異區，該輕鏈變異區包含：
一輕鏈互補決定區 1 (CDRL1) 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 59-66 及 158 所組成之群組；
一 CDRL2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 67-74 所組成之群組；
以及
一 CDRL3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 75。
2. 如申請專利範圍第 1 項之單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，其進一步包含一重鏈變異區，該重鏈變異區包含：
一 CDRH1 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 42-45 及 161 所組成之群組；
一 CDRH2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 46-57、156 及 157 所組成之群組；以及
一 CDRH3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 58。
3. 一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一重鏈變異區，該重鏈變異區包含：
一重鏈互補決定區 1 (CDRH1) 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 42-45 及 161 所組成之群組；
一 CDRH2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 46-57、156 及 157 所組成之群組；以及
一 CDRH3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 58。
4. 一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異區以及一重鏈變異區，該輕鏈變異區包含：
一 CDRL1 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 59-66 及 158 所組成之群組；

- 一 CDRL2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 67-74 所組成之群組；以及
 - 一 CDRL3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 75，且該重鏈變異區包含：
 - 一 CDRH1 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 42-45 所組成之群組；
 - 一 CDRH2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 46-57、156 及 157 所組成之群組；以及
 - 一 CDRH3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 58。
5. 如申請專利範圍第 1-4 項中任一項之單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，其進一步包含一 IgG4 重鏈恆定區及一 IgG4 輕鏈恆定區。
 6. 如申請專利範圍第 5 項之單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:159 之胺基酸序列且該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:160 之胺基酸序列。
 7. 一種單離的人類 CD27 中和抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段結合至一申請專利範圍第 1-4 項中任一項之抗體結合之表位，其係藉由結合至固定化的 CD27 胞外區域所測定。
 8. 如申請專利範圍第 1-4 項中任一項之單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體結合至人類 CD27 的 KD 以表面電漿子共振所測定為 1×10^{-7} M 或更少。
 9. 一種單離的核酸分子，其編碼申請專利範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其抗原結合片段。
 10. 一種單離的核酸載體，包含申請專利範圍第 9 項之單離的核酸分子。
 11. 一種原核或真核宿主細胞，包含申請專利範圍第 10 項之單離的核酸載體。
 12. 如申請專利範圍第 11 項之宿主細胞，其中該宿主細胞係至少一種選自 COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、多發性骨髓瘤或淋巴瘤細胞之細胞，或任何彼等之衍生、永生或轉染之細胞。

- 13.一種製造 CD27 抗體之方法，包含將申請專利範圍第 9 項之核酸分子併入至一載體中，轉染一宿主細胞、轉殖動物或轉殖植物以表現一抗體並回收該表現的抗體。
- 14.一種如申請專利範圍第 1-4 項中任一項之單離的抗體或其抗原結合片段於製備醫藥品的用途，該醫藥品用於在一對象中抑制經 T 細胞調介之 B 細胞抗體產生，其中該抗體或其抗原結合片段在存在有人類 CD70 蛋白或人類 CD70 蛋白之一部分的情況下會抑制該人類 T 細胞上 CD27 之活化。
- 15.如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該對象係患有炎症疾病。
- 16.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該炎症疾病係全身性紅斑狼瘡。
- 17.如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該對象顯示有一抗原特異性的體液免疫反應，其與選自由一種肺部或胸膜系統的疾病、一種中樞或周邊神經系統的疾病、一種眼睛或視覺系統的疾病、一種胃腸道和消化系統的疾病、一種心血管系統的疾病、一種傳染病及一種寄生蟲感染所組成群組之疾病相關。
- 18.如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該抗體或其抗原結合片段係全身性投予至該對象。
- 19.一種如申請專利範圍第 1-4 項中任一項之單離的抗體或其抗原結合片段於製備醫藥品的用途，該醫藥品係藉由在人類 CD70 蛋白或人類 CD70 蛋白之一部分存在下，抑制該人類 T 細胞上 CD27 之活化，而抑制初始 (naïve) T 細胞增生。
- 20.一種製品，包含申請專利範圍第 1-4 項中任一項之抗體之醫藥上可接受的配方。
- 21.一種單離的人類抗體或其抗原結合片段，包含結合至人類 CD27 蛋白上一表位的一抗體變異區，該 CD27 蛋白會被選自由抗體 C2177、CD2186、CD2191 及 CD2192 所組成群組之抗體結合。

- 22.一種單離的人類抗體或其抗原結合片段，包含會與選自由抗體 C2177、CD2186、CD2191 及 CD2192 所組成群組之抗體競爭結合人類 CD27 蛋白的一抗體變異區。
- 23.一種單離的 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異區，該輕鏈變異區包含：
 - 一輕鏈互補決定區 1（CDRL1）胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 24-36、153 及 155 所組成之群組；
 - 一 CDRL2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 37-40 及 154 所組成之群組；以及
 - 一 CDRL3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 41。
- 24.一種單離的 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一重鏈變異區，該重鏈變異區包含：
 - 一重鏈互補決定區 1（CDRH1）胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 1 及 2 所組成之群組；
 - 一 CDRH2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 3-22、151 及 152 所組成之群組；以及
 - 一 CDRH3 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 23 及 162 所組成之群組。
- 25.一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異區以及一重鏈變異區，該輕鏈變異區包含：
 - 一輕鏈互補決定區 1（CDRL1）胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 24-36、153 及 155 所組成之群組；
 - 一 CDRL2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 37-40 及 154 所組成之群組；以及
 - 一 CDRL3 胺基酸序列，其序列為 SEQ ID NO: 41，且該重鏈變異區包含：
 - 一 CDRH1 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 1 及 2 所組成之群組；

- 一 CDRH2 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 3-22、151 及 152 所組成之群組；以及
- 一 CDRH3 胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 23 及 162 所組成之群組。
- 26.一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 137-144 及 148 所組成之群組。
- 27.如申請專利範圍第 26 項之單離的抗體或其抗原結合片段，其進一步包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 128-136 及 145-147 所組成之群組。
- 28.一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 128-136 及 145-147 所組成之群組。
- 29.一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 82-101 所組成之群組。
- 30.如申請專利範圍第 29 項之單離的抗體或其抗原結合片段，其進一步包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 102-125 所組成之群組。
- 31.一種單離的人類 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 102-125 所組成之群組。
- 32.一種單離的 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一輕鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 77、79、81 及 127 所組成之群組。
- 33.如申請專利範圍第 32 項之單離的抗體或其抗原結合片段，其進一步包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 76、78、80 及 126 所組成之群組。
- 34.一種單離的 CD27 抗體或其抗原結合片段，包含一重鏈變異胺基酸序列，其選自由 SEQ ID NOs: 76、78、80 及 126 所組成之群組。

圖式

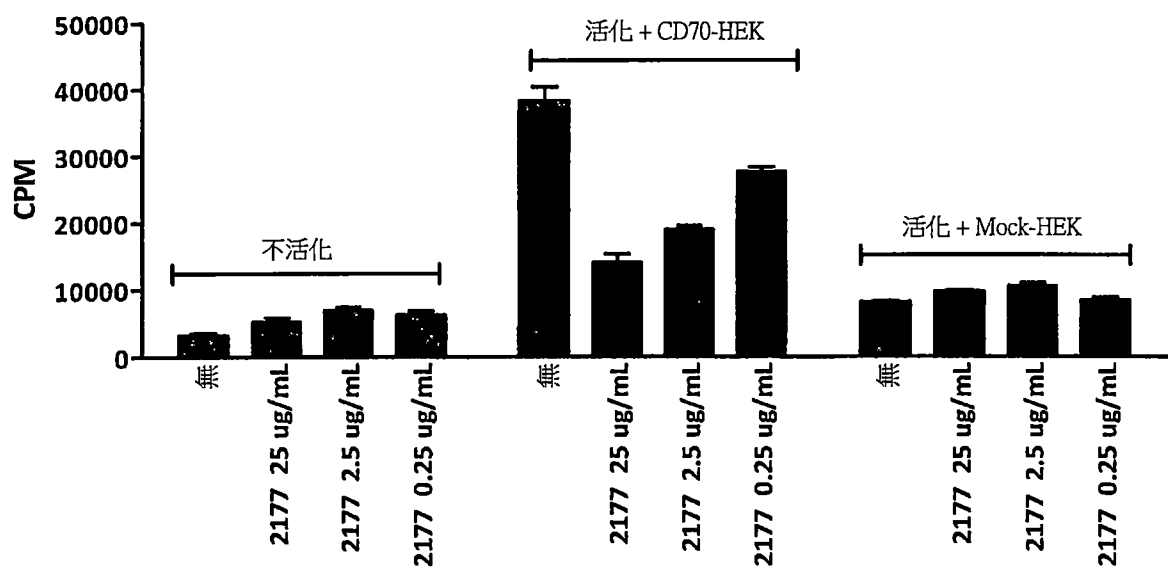


圖1

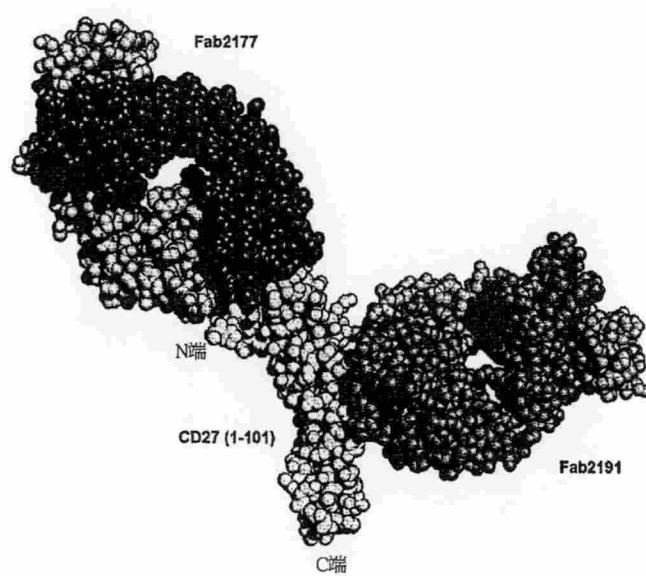


圖2

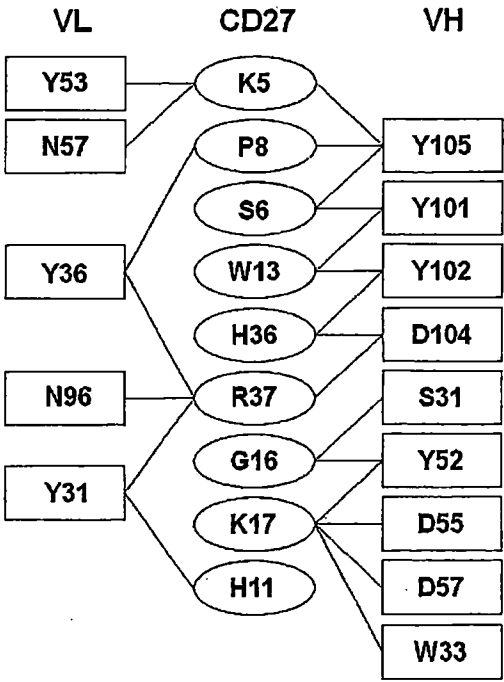


圖3

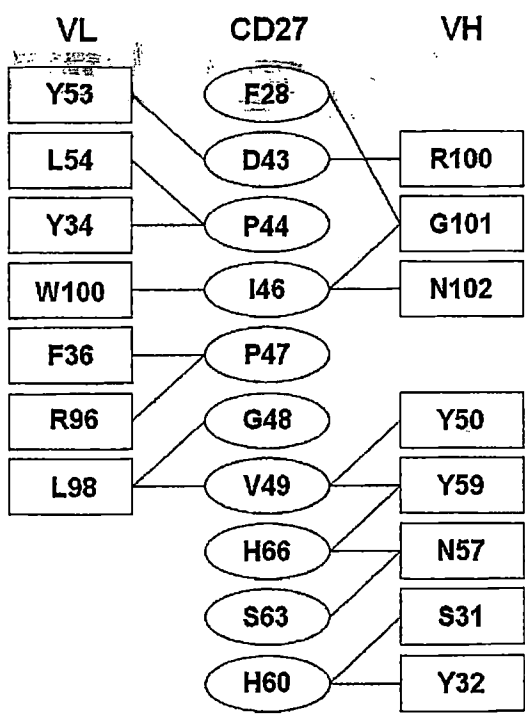


圖4