



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108290950 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680065997.6

(22)申请日 2016.09.23

(30)优先权数据

15186468.3 2015.09.23 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/072757 2016.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/051002 EN 2017.03.30

(71)申请人 阿珀吉科吉尼科斯股份公司

地址 德国海德堡

(72)发明人 克里斯汀·吉费斯 奥利弗·希尔

迈诺尔夫·蒂曼

亚罗米尔·希科劳

克里斯汀·默茨 蒂姆·施尼德

哈拉尔德·弗里克

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11371

代理人 王晖 李丙林

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页

序列表51页 附图21页

(54)发明名称

抗CD95L抗体

(57)摘要

本发明涉及特异性CD95L抗体,并且涉及其在治疗或诊断涉及CD95L诱导的信号转导的疾病,例如癌症疾病中的用途。

1. 一种单克隆抗CD95L抗体,特征在于所述抗体特异性地结合人CD95L的表位,并且抑制CD95L诱导的信号转导,所述表位包括氨基酸序列RNSKYP,优选RNSKYPQ或RNSKYPQD。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特异性地结合来源于不同的物种的CD95L,特别是人CD95L,以及猴和小鼠CD95L中的至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的单克隆抗体,其特异性地与CD95L(细胞表面上的和可溶性CD95L)的受体结合结构域相互作用。

4. 根据前述权利要求中的任一项所述的单克隆抗体,其是全长免疫球蛋白,或选自自由以下组成的组的功能性免疫球蛋白片段:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体(scFv)和单结构域抗体。

5. 根据前述权利要求中的任一项所述的单克隆抗体,包括重链氨基酸序列,包括如SEQ ID NO:1或11中所示的CDRH1,如SEQ ID NO:2或12中所示的CDRH2,和如SEQ ID NO:3或13中所示的CDRH3,以及

轻链氨基酸序列,包括如SEQ ID NO:4或14中所示的CDRL1,如SEQ ID NO:5或15中所示的CDRL2,和如SEQ ID NO:6或16中所示的CDRL3。

6. 根据权利要求5所述的单克隆抗体,包括

(i) 重链氨基酸序列,其包括如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1,如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2,和如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;以及轻链氨基酸序列,其包括如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1,如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3,或

(ii) 重链氨基酸序列,其包括如SEQ ID NO:11中所示的CDRH1,如SEQ ID NO:12中所示的CDRH2,和如SEQ ID NO:13中所示的CDRH3;以及轻链氨基酸序列,其包括如SEQ ID NO:14中所示的CDRL1,如SEQ ID NO:15中所示的CDRL2,和如SEQ ID NO:16中所示的CDRL3。

7. 根据前述权利要求中的任一项所述的单克隆抗体,至少包括

具有SEQ ID NO:7或17的氨基酸序列的重链可变区,和

具有SEQ ID NO:8或18的氨基酸序列的轻链可变区,

或者,具有与其至少90%的序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据前述权利要求中的任一项所述的单克隆抗体,包括

SEQ ID NO:9或19的重链氨基酸序列,和

SEQ ID NO:10或20的轻链氨基酸序列,

或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据前述权利要求中的任一项所述的单克隆抗体,其是人源化的或人抗体。

10. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,至少包括

具有SEQ ID NO:30或31或32的氨基酸序列的重链可变区,和

具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区,

或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。

11. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,包括

与SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60的人IGG1重链支架融合的具有SEQ ID NO:30或31或32的氨基酸序列的重链可变区,和

SEQ ID NO:36的轻链氨基酸序列,

或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,包括SEQ ID NO:34或35的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:36的轻链氨基酸序列,或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。
13. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,至少包括具有SEQ ID NO:41、42或43的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链可变区,或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。
14. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,包括与SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60的人IGG1重链支架融合的具有SEQ ID NO:41或42或43的氨基酸序列的重链可变区,和SEQ ID NO:47的轻链氨基酸序列,或者,具有与其至少90%序列同一性的氨基酸序列。
15. 根据权利要求9所述的单克隆抗体,包括SEQ ID NO:45或46的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:47的轻链氨基酸序列,或者,具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。
16. 一种单克隆单链抗体,具有选自SEQ ID NO:37、38、39、40、48、49、50或51的序列。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的单克隆抗体,其中,标记或效应物组共价地连接至所述抗体。
18. 一种分离的核酸分子,包括选自由以下组成的组的核酸序列:
 - (a) 编码根据权利要求1至17中任一项所述的抗体的核酸序列,
 - (b) 与在(a)中的所述序列中的任一种互补的核酸序列,以及
 - (c) 在严格的条件下能够与(a)或(b)杂交的核酸序列。
19. 根据权利要求18所述的分离的核酸分子,包括如SEQ ID NO:21和22中所示或如SEQ ID NO:23和24中所示的核酸序列。
20. 一种载体,包括根据权利要求18或19中所限定的核酸序列。
21. 一种宿主或宿主细胞,包括根据权利要求18或19中所限定的核酸序列,或根据权利要求20中所限定的载体。
22. 根据权利要求1至17中任一项所述的单克隆抗体,或根据权利要求18或19所述的核酸分子,用于治疗选自以下的疾病:自身免疫性病,AIDS,心脏病、如心肌梗塞,移植物抗宿主病,移植排斥,脑损伤、如中风,脊髓损伤,败血症,肝炎,与炎症相关联的病,缺血性再灌注损伤,肾病和过度增殖性病,特别是癌症、例如实体癌症。
23. 根据权利要求1至17中任一项所述的单克隆抗体,或根据权利要求11或12所述的核酸分子,用于与免疫治疗剂,例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗CTLA-4抗体联用治疗癌症。
24. 药物组合物,包括根据权利要求1至17中任一项所述的抗体,或根据权利要求18或19所述的核酸分子。

抗CD95L抗体

[0001] 本发明涉及特异性CD95L抗体,及其在治疗或诊断涉及CD95L诱导的信号转导的疾病(例如癌症疾病)的用途。

[0002] 本发明的领域尤其能够在改善癌症治疗和癌症诊断中看到。

[0003] 本发明提供了特异性结合CD95L的线性表位并且能够抑制CD95L诱导的信号转导的单克隆抗体。令人惊讶地发现,与以前已知的CD95/CD95L的拮抗剂相比,尤其是与其他抗CD95L抗体、可溶性CD95分子或融合蛋白,如APG101相比,本发明的抗体更高效地抑制由CD95/CD95L诱导的信号转导。

[0004] 由此,本发明的第一方面是与包括氨基酸序列RNSKYP的人CD95L的表位特异性结合的单克隆抗CD95L抗体。

[0005] 结合表位包括氨基酸序列RNSKYP,优选地RNSKYPQ,其在许多不同物种的CD95L中被发现。优选地,该抗体结合包括氨基酸序列RNSKYPQD和/或RNSKYPED的CD95L的线性表位。人CD95L以及来自猴(例如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*))的CD95L包括表位RNSKYPQD,而来自小家鼠(*mus musculus*)的小鼠CD95L包括表位RNSKYPED。根据本发明的优选的方面,该抗体能够特异性地结合来源于不同物种,如人、猴和小鼠的CD95L。优选地,该抗体特异性地结合人CD95L,以及猴(如食蟹猕猴(*macaca fascicularis*))和小鼠(小家鼠(*mus musculus*))的CD95L中的至少一种,更优选地是结合人、猴和小鼠CD95L。

[0006] 术语“抗体”具体地指包括至少一个免疫球蛋白重链和至少一个免疫球蛋白轻链的分子。每个重链和轻链可以包括可变结构域和恒定结构域。抗原结合位点可以由重链和轻链的可变结构域形成。可变区(也被称为可变结构域)包括互补决定区(CDR),例如CDR1、CDR2和CDR3区以及侧接CDR的框架区(FR)。

[0007] 技术人员容易理解术语“互补决定区”(参见,如,Harlow and Lane (EDS.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL Press, Cold Spring Harbour, N.Y., 1988),并且指主要与抗原接触并且决定抗体特异性的抗体的可变结构域内的氨基酸段。该区也被称为高变区。

[0008] 本发明包括全长免疫球蛋白,以及如Fab、Fab'、F(ab')₂片段、Fv片段、双抗体、单链抗体分子和单结构域抗体的功能性免疫球蛋白片段两者。还包括其他片段,只要它们表现出期望的与表位结合的能力,该表位包括包含氨基酸序列“RNSKYP”的人CD95L的氨基酸214-219,优选地包括包含氨基酸序列“RNSKYPQ”的氨基酸214-220,并且最优选地包括包含氨基酸序列“RNSKYPQD”的氨基酸214-221。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人, *Nat. Met.* 9:129-134 (2003)。

[0009] “双抗体”是带有可以是二价的或双特异性的两个抗原结合位点的抗体片段(参见如,Hudson等人,2003)。“单链抗体”是包括抗体的重链可变结构域的全部或一部分,或轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。能够通过各种技术制备抗体片段,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化,以及通过如本文所述的重组宿主(例如,大肠杆菌或噬菌体)的制备。

[0010] 本发明还包括人抗体。术语“人抗体”意在包括任何完全地人或人源化的抗体。人

抗体可以从基因工程动物,例如包括异种免疫系统的动物,或从根据已知技术的抗体展示文库来制备。人抗体在Van Dijk and Van De Winkel (Car.Opin.Pharmacol.5:368-74 (2001)) and Lonberg (Car.Opin.Immunol.20:450-459 (2008)) 中做一般性的描述。

[0011] 根据已知技术,人源化抗体可以通过来源于其他物种(例如,小鼠、大鼠、兔)的单克隆抗体的人源化来制备。一般地,人源化非人抗体以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和性。人源化抗体及其制作方法的综述例如:在Alamagro and Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633 (2008) 中。

[0012] 本发明的抗体的特征在于,它们特异性的结合CD95L的表位,该CD95L的表位包括人CD95L的氨基酸序列RNSKYP,优选地是人CD95L的RNSKYPQ,并且更优选地是人CD95L的RNSKYPQD。这种结合表位已经显示出了其适合于抑制CD95L诱导信号转导的独特性。与这种表位结合的抗体直接与CD95L与CD95受体的结合相竞争。除了细胞凋亡之外,相应的受体CD95根据组织和状况介导非细胞凋亡信号(诸如,NF-kB、MAPK或PI3K),该非细胞凋亡信号促进炎症,促成癌变并且调节免疫学参数(例如,肿瘤浸润T细胞群体)。所有这些活动都可能被本文所述的抗体所抑制。

[0013] 术语抗体的“结合(bind)”或“结合(binding)”意指与目标抗原至少暂时性的相互作用或缔合或缔合至目标抗原,该目标抗原即是包括包含本文所述表位的其片段的人CD95L。在某些实施方式中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少、例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M 、例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。对于本领域的技术人员来说确定Kd值的方法是已知的。

[0014] 在一个实施方式中,通过用感兴趣的抗体的Fab形式(version)和其抗原进行放射性标记的抗原结合测定(放射免疫测定分析,RIA)来测量Kd。

[0015] 根据另一实施方式,使用利用固定化抗原的表面等离子体共振测定来测量Kd。根据另一实施方式,通过利用固定化抗原的石英晶体微量天平(QCM)来测量Kd。根据本发明的优选的实施方式,该抗体是针对如本文所述的人CD95L的表位的人单克隆抗体。

[0016] 本发明的抗体可以是各种免疫球蛋白(Ig)型的,例如IgA型的、IgD型的、IgE型的、IgG型的或IgM型的,优选地是IgG型的或IgM型的,其包括但不限于IgG1型、IgG2型、IgG3型、IgG4型、IgM1和IgM2型。在一个优选的实施方式中,该抗体是IgG1型的。

[0017] 优选地,本发明的抗体是单克隆抗体。

[0018] 在本发明的某些实施方式中,该抗体可以包括特异性重链互补决定区CDRH1、CDRH2和/或CDRH3。本文所述的CDR序列使用Kabat方案编号。

[0019] 在一个实施方式中,该抗体包括重链,该重链包括:

[0020] 重链互补决定区1(CDRH1),其具有如在SEQ ID NO:1或11中所示的氨基酸序列,

[0021] 重链互补决定区2(CDRH2),其具有如在SEQ ID NO:2或12中所示的氨基酸序列,和/或

[0022] 重链互补决定区3(CDRH3),其具有如在SEQ ID NO:3或13中所示的氨基酸序列。

[0023] 根据本发明的抗体也可以包括特异性轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和/或CDRL3。

因此,在一个实施方式中,该抗体包括轻链,该轻链包括:

[0024] 轻链互补决定区1(CDRL1),其具有如在SEQ ID NO:4或14中所示的氨基酸序列,

[0025] 轻链互补决定区2(CDRL2),其具有如在SEQ ID NO:5或15中所示的氨基酸序列,

和/或

[0026] 轻链互补决定区3 (CDRL3), 其具有如在SEQ ID NO:6或16中所示的氨基酸序列。

[0027] 在优选的实施方式中, 该抗体包括一条重链内的CDR和/或一条轻链内的CDR的特定组合。因此, 本发明的特别优选的抗体包括

[0028] 重链, 该重链包括如在SEQ ID NO:1或11中所示的CDRH1,

[0029] 如在SEQ ID NO:2或12中所示的CDRH2, 和

[0030] 如在SEQ ID NO:3或13中所示的CDRH3, 以及

[0031] 轻链, 包括

[0032] 如在SEQ ID NO:4或14中所示的CDRL1,

[0033] 如在SEQ ID NO:5或15中所示的CDRL2, 和

[0034] 如在SEQ ID NO:6或16中所示的CDRL3。

[0035] 优选的是包括重链和轻链的抗体, 该重链包括如在SEQ ID NO:1中所示的CDRH1, 如在SEQ ID NO:2中所示的CDRH2, 和如在SEQ ID NO:3中所示的CDRH3; 该轻链包括如在SEQ ID NO:4中所示的CDRL1, 如在SEQ ID NO:5中所示的CDRL2, 和如在SEQ ID NO:6中所示的CDRL3。

[0036] 也优选的是包括重链和轻链的抗体, 该重链包括如在SEQ ID NO:11中所示的CDRH1, 如在SEQ ID NO:12中所示的CDRH2, 和如在SEQ ID NO:13中所示的CDRH3; 该轻链包括如在SEQ ID NO:14中所示的CDRL1, 如在SEQ ID NO:15中所示的CDRL2, 和如在SEQ ID NO:16中所示的CDRL3。

[0037] 在本发明优选的实施方式中, 抗CD95L的抗体包括如在SEQ ID NO:7或17中所示的重链可变区 (VH), 或在整个重链可变区中具有至少90%的序列同一性的序列, 优选地为至少95%的序列同一性, 更优选地为至少96%、97%、98%或99%的序列同一性。此外, 本发明的抗体优选地包括如在SEQ ID NO:8或18中所示的轻链可变区 (VL), 或在整个轻链可变区中具有至少90%的序列同一性的序列, 优选地为至少95%的序列同一性, 更优选地为至少96%、97%、98%或99%的序列同一性。特别优选的是包括如在SEQ ID NO:7或17中所示的重链可变区和如在SEQ ID NO:8或18中所示的轻链可变区。

[0038] 优选地, 本发明的抗体包括如在SEQ ID NO:7中所示的重链可变区和如在SEQ ID NO:8中所示的轻链可变区, 或者如在SEQ ID NO:17中所示的重链可变区和如在SEQ ID NO:18中所示的轻链可变区。

[0039] 根据本发明特别优选的实施方式, 本发明的抗体包括如在SEQ ID NO:9或19中所示的氨基酸序列的重链, 或在整个重链氨基酸序列中具有与其至少90%的序列同一性的氨基酸序列的重链, 以及如在SEQ ID NO:10或20中所示的氨基酸序列的轻链, 或在整个长度的轻链氨基酸序列中具有与其至少90%的序列同一性的氨基酸序列的轻链。该重链和轻链氨基酸序列相对于在SEQ ID NO:9、10、19和20中所示的序列的序列同一性优选地是至少95%, 更优选地是96%、97%、98%或99%。最优选的是包括如在SEQ ID NO:9中所示的重链氨基酸序列和如在SEQ ID NO:10中所示的轻链氨基酸序列的抗体, 以及包括如在SEQ ID NO:19中所示的重链氨基酸序列和如在SEQ ID NO:20中所示的轻链氨基酸序列的抗体。

[0040] 本发明优选的人源化的抗体

[0041] 为了确定由抗体识别的人CD95L上的表位, 可以使用来源于人CD95L的氨基酸序列

的化学制备的短肽的阵列,以定位和鉴别抗体表位(Reinike W.,Methods Mol.Biol.,2004,248:443-63)。为了绘制由本发明的抗体所结合的人CD95L中的表位的另外的方法包括Snaps/SELDI(Wang et al.,Int.J.Cancer,2001,June 15,92(6):871-6)或常规交叉阻断测定,诸如在Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中所描述的可以被执行。

[0042] 如上所述,本发明的抗体示出了关于其结合特异性和生物活性的有利的性质,特别是关于其抑制CD95L诱导信号转导的能力。

[0043] 本发明的抗体可以偶联至异源的物组,如标记物组或效应物组。

[0044] 包括偶联至效应物组的本发明的抗体的抗体缀合物特别适合于治疗应用。如本文所使用的,术语“效应物组”指的是治疗物组、毒素、细胞毒素物组、抗原或本领域已知的其他效应物组。

[0045] 包括偶联至标记物组的本发明的抗体的抗体缀合物特别适合于诊断应用。如本文所使用的,术语“标记物组”指的是可检测的标记,例如放射性标记的氨基酸或生物素部分,荧光标记,酶或本领域已知的任何其他的标记。

[0046] 本发明还涉及编码如上述公开的抗体的核酸分子。术语“核酸分子”包括DNA,例如单链DNA或双链DNA,或者RNA。该DNA可以是基因组的,cDNA或合成来源,或它们的组合。本发明的核酸分子可以与表达控制序列可操作地连接,即连接至实现表达编码核酸序列所必需的序列。这种表达控制序列可以包括启动子、增强子、核糖体结合位点和/或转录终止序列。适合表达控制序列的具体实例在本领域是已知的。

[0047] 根据优选的实施方式,本发明涉及包括核酸序列的分离的核酸分子,该核酸序列选自自由以下构成的组

[0048] (a) 编码如上述所限定的抗体或其功能性片段的核酸序列,

[0049] (b) 与在(a)中的序列中的任一相互补的核酸序列,和

[0050] (c) 在严格的条件下能够与(a)或(b)杂交的核酸序列。

[0051] 根据本发明的特别优选的实施方式,核酸分子包括编码抗体的重链的可变区的氨基酸序列的序列,和编码抗体的轻链的可变区的氨基酸序列的序列。在可替代的实施方式中,提供两种核酸分子的组合,其中一种核酸分子编码抗体的轻链的氨基酸序列,并且另一核酸分子编码该抗体的重链的氨基酸序列。本发明的优选的核酸分子是包括如在SEQ ID NO:21-24中的任一个中所示的核酸序列的分离的核酸分子。例如,分离的核酸分子可以包括如在SEQ ID NO:21和22中所示的核酸序列,或如在SEQ ID NO:23和24中所示的核酸序列。

[0052] 术语“在严格条件下杂交”意指在例如在Sambrook等人,“Expression of cloned Genes in E.coli”in Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1989),Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,USA中所表述的标准化杂交条件下,两种核酸片段彼此杂交。例如,这种条件是在约45°C中在 $6.0 \times \text{SSC}$ (盐水柠檬酸钠)中杂交,然后在50°C中用 $2.0 \times \text{SSC}$ 来洗涤,优选地是在65°C中 $2.0 \times \text{SSC}$ 或在50°C中 $0.2 \times \text{SSC}$,优选地是在65°C中 $0.2 \times \text{SSC}$ 。

[0053] 本发明的核酸分子可以位于可以附加地包含复制起始点和/或选择标记基因的载体上。载体的实例例如:质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。因此,本发明的另一实施方式是包括如

本文所公开的核酸序列的载体。优选地,该载体是表达载体。例如,所述载体可以是噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是有复制能力的或复制缺陷的。在后一种情况中,病毒的繁殖通常仅在补充宿主/细胞中发生。

[0054] 本发明的核酸分子可以连接至包含用于在宿主中繁殖的可选择标记的载体。通常,将质粒载体引入到沉淀物中,诸如,磷酸钙沉淀物或氯化铷沉淀物,或引入到带有荷电脂质的复合物中,或引入到碳基簇中,如富勒烯。如果载体是病毒,可以在施加至宿主细胞之前使用合适的包装细胞系来在体外包装。

[0055] 优选地,本发明的载体是表达载体,其中,将核酸分子可操作地连接至一种或多种控制序列,该控制序列允许在原核的和/或真核的宿主细胞中转录和任选地表达。所述核酸分子的表达包括核酸分子的转录,优选地转录为可翻译的mRNA。确保在真核细胞,优选地是哺乳动物细胞中表达的调控元件是本领域中的技术人员所熟知的。它们通常包括确保转录起始的调控序列,和任选地确保转录终止和转录物稳定的poly-A信号。附加的调控元件可以包括转录以及转录增强子。来源于病毒,诸如逆转录病毒、牛痘病毒、与腺体相关联的病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可以被用于将本发明的多核苷酸或载体递送进入目标细胞群体中。本领域的技术人员所熟知的方法可以被用于构建重组的病毒载体;例如参见在Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001, 3rd edition), N.Y. and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994) 中所表述的技术。可替代地,本发明的核酸分子可以被重新构建为用于递送至目标细胞的脂质体。

[0056] 此外,本发明涉及包括以上所描述的核酸分子或载体的宿主。可以通过根据本领域已知的任一方法转化、转染或转导,将核酸分子或载体引入到宿主中。

[0057] 所述的宿主可以是原核的或真核的细胞或非人的转基因动物。存在于宿主中的本发明的核酸或载体或可以被整合到该宿主的基因组中,或可以保持在染色体外。在这方面,还应理解的是本发明的核酸分子可以被用于“基因靶向”和/或“基因置换”,用于恢复突变基因或用于经由同源重组来产生突变基因;例如参见Mouellic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, *Gene Targeting, A Practical Approach*, Oxford University Press。

[0058] 宿主可以是任何原核的或真核的细胞,诸如细菌、昆虫、真菌、植物、动物、哺乳动物或优选地是人细胞。根据本领域已知的技术可以将所转化的宿主在发酵罐中生长和培养,以实现最佳的细胞生长。然后本发明的抗体、抗体片段或其衍生物可以从生长培养基、细胞裂解物或细胞膜部分中分离。本发明的微生物表达的或其他表达的抗体、抗体片段或其衍生物的分选或纯化可以通过任一常规手段进行,诸如例如制备层析分离,和免疫学分离诸如涉及使用单克隆的或多克隆的抗体的那些。

[0059] 根据本发明的一个实施方式,该宿主是人的、细菌的、动物的、真菌的、两栖动物的或植物的细胞。优选的动物细胞包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)和许多其他细胞系,包括人细胞。在特别优选的实施方式中,所述动物细胞是CHO细胞。

[0060] 在特别优选的实施方式中,所述动物细胞是兔细胞。优选的昆虫细胞包括但不限

于来自SF9细胞系的细胞。

[0061] 可以通过方法制备本发明的抗体,其中,所述抗体从如上文中所述的宿主中获取。由此,本发明的另一实施方式是用于制备抗体的方法,该方法包括在允许合成所述抗体的条件下培养本发明的宿主细胞,并且从所述培养物中回收所述抗体。

[0062] 根据本领域已知的技术可以将所转化的宿主在发酵罐中生长和培养,以实现最佳的细胞生长。此外,新合成的蛋白质的有效表达和加工可以取决于其他氨基酸结构域,如信号肽的存在。在另一实施方式中,本发明的抗体可以包括N端信号序列,其允许在重组表达之后从宿主细胞分泌。尽管信号肽是异源的,并且许多原核的和真核的信号肽是功能上可互换的,但是技术人员知道根据所使用的表达系统选择的合适的信号肽的手段。因此,如非限制性实例,参照SEQ ID NO:52的信号肽。一旦被表达,本发明的整个抗体、其二聚体、个体的轻链和重链、或其他免疫球蛋白形式可以根据本领域的标准过程来纯化,该过程包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析法、凝胶电泳法等;参见Scopes,“Protein Purification”, Springer-Verlag,N.Y. (1982)。然后本发明的抗体或其对应的免疫球蛋白链可以从生长培养基、细胞裂解物或细胞膜部分中分离。例如,本发明的微生物表达的抗体或免疫球蛋白链的分离和纯化可以通过任何常规的手段,诸如例如制备层析分离,和免疫学分离诸如涉及使用例如针对本发明的抗体的恒定区的单克隆的或多克隆的抗体的那些。

[0063] 对于本领域的技术人员,显而易见的是,本发明的抗体还可以偶联至其他部分,例如药物靶向和成像应用,即本文所限定的效应物或标记物组。将抗体或抗原表达之后,化学地与连接物侧进行这种偶联,或者在DNA水平上可以将偶联产物工程化为本发明的抗体或抗原。然后DNA在适合的宿主系统中表达,并且如果必要的话,收集并复性所表达的蛋白质。

[0064] 根据一个实施方式,如上所述的重组细胞在允许表达编码核酸分子的抗体的条件下培养。可以从培养的细胞或培养物上清液中收集抗体。优选地,由哺乳动物,特别地是从人细胞来制备抗体。在另一优选的实施方式中,从CHO细胞中制备该抗体。

[0065] 本发明的又一方面涉及包括如上所描述的抗体的药物组合物,任选地与药学上可接受的载体一起的药物组合物。根据本发明,该药物组合物适用于治疗用途。

[0066] 术语“载体(carrier)”包括剂,例如稀释剂、稳定剂、佐剂或其他类型的赋形剂,其在所使用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物是无毒的。药学上可接受的载体的实例在本领域是熟知的,并且包括磷酸盐缓冲盐溶液,水,乳液,诸如油/水乳液,各种类型的润湿剂,无菌溶液等。生理上可接受的载体的优选的实例包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸(然而,至于本发明的配方,磷酸盐缓冲液是优选的);抗氧化剂包括抗坏血酸,低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质诸如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精,螯合剂诸如EDTA,糖,醇诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子诸如钠;和/或非离子表面活性剂诸如吐温,聚乙烯或聚乙二醇。

[0067] 该药物组合物可以通过熟知的常规的方法来配制,即通过将活性剂与载体或任选地通常被引入到该配方中的其他剂混合。

[0068] 本发明的另一方面涉及如上所述的药物组合物,其至少包含一种其他的活性剂。使用哪一种活性剂取决于待治疗的指征。例如,细胞毒性剂,诸如阿霉素,顺铂或卡铂,细胞

因子或其他抗肿瘤剂可用于治疗癌症。特别对于癌症治疗而言,与已知的免疫治疗剂相组合是优选的。该组合包括但不限于以下剂,如抗PD-1抗体,抗PD-L1抗体和抗CTLA-4抗体。

[0069] 根据优选的实施方式,根据本发明的单克隆抗体或药物组合物可以被用于抑制CD95信号转导途径。特别地,该抗体或组合物可以被用在预防和/或治疗选自以下的病:自身免疫性病,AIDS,心脏病,例如心肌梗塞,移植物抗宿主病,移植排斥,脑损伤,例如中风,脊髓损伤,败血症,肝炎,NASH,与炎症相关联的病,缺血性再灌注损伤和肾脏病。当然,本文所述的组合物可用于治疗癌症,优选地是实体癌以及淋巴瘤。实体癌包括肉瘤和癌。例如,待治疗的癌症可以是结肠癌,肺癌,乳腺癌,胰腺癌,肾癌,结直肠癌,肝癌或脑癌,例如成胶质细胞瘤和/或其转移。可替换地,待治疗的癌症可以是淋巴或骨髓起源的癌症。

[0070] 本发明的另一方面是治疗癌症的方法,所述方法包括对患者给药本发明的单克隆抗CD95L的抗体。对于治疗用途,可以将CD95L全身性地给药,例如通过输注或注射。

[0071] 本发明的治疗方法优选地包括测定在从患者获得的癌症样品中CD95L表达的前步骤。通过CD95L表达的程度对癌症进行诊断分类使能够对于那些患有表达CD95L的癌症的患者适应性的治疗。优选地,如果已经在癌症样品中检测到CD95L的表达,则仅施用本发明的单克隆抗CD95L抗体。这种策略是有利的,因为仅对那些可以预期到治疗成功的患者给药抗CD95L抗体。这在患有不表达CD95L的癌症的患者是没有不利的,因为这些患者可能将不会从用CD95L抑制剂的治疗中获益。

[0072] 通过任何已知的方法可以测定CD95L的表达。例如,可以测定CD95L或CD95L mRNA。合适的方法的优选的实例是基于组织学、组织化学、免疫组织化学和/或流式细胞术的方法。特别地,可以通过将样品与CD95L特异性结合剂接触来测定CD95L在癌症样品中的表达。例如,与CD95L特异性结合的CD95L抑制剂可以被用于检测CD95L。示例性的CD95L抑制剂包括抗体、可溶性CD95L分子、融合蛋白等。可以通过已知的方法制备合适的抗体。合适的抗体的实例是适合于在基于流式细胞术的分析中检测CD95L的本发明的单克隆抗体。还优选的是抗CD95L特异性抗体或其识别CD95L的片段,其可与细胞内的CD95L的表位结合。根据尤其优选的实施方式,抗CD95L特异性抗体或其识别CD95L的片段与人CD95L的N端13位中的酪氨酸(Y)结合。根据尤其优选的实施方式,诊断性抗CD95L抗体或其识别CD95L的片段识别包括人CD95L的N端第13-19氨基酸的表位。在WO 2014/177576中描述了合适的抗体的实例。

[0073] 根据本发明尤其优选的实施方式,本文所述的抗体可以被用于在第一步骤中测定CD95L的表达,并且如果检测到CD95L的表达,则可以在第二步骤中将本发明的抗体用于治疗目的。

[0074] 在本发明中,通过使用本发明的抗体的任何已知的合适方法测定CD95L的表达。例如,该测定可以包括使用上述抗CD95L抗体的基于组织学、组织化学、免疫组织化学(IHC)和/或流式细胞术的方法。免疫组织化学方法是特别的优选的。

[0075] 在如本文所述的癌症的分类中所采用的样品可以是存档的肿瘤组织,例如已经在疾病的早期阶段中获得的包埋在石蜡中的活组织切片或外科手术材料。

[0076] 根据CD95L的表达水平可以将癌症疾病分类为CD95L阳性癌症疾病或CD95L阴性癌症疾病。

[0077] 特别地,CD95L阳性癌症疾病其特征在于细胞在细胞表面表达CD95L。然而,本文所述的方法也可以基于检测细胞内的CD95L的表位。

[0078] 如果在癌症样品中至少1%、至少2%、至少5%、至少10%、至少20%或至少50%的细胞表达CD95L,则可以将癌症认作CD95L阳性。可以通过在显微切片中计数细胞检测CD95L阳性细胞的数量。

[0079] 如果在组织样品中基本没有检测到表达CD95L的细胞,或者如果样品是不满足本文对CD95L阳性样品所限定的标准的样品(非阳性样品),则认为不存在CD95L的表达(CD95L阴性)。在CD95L阴性样品中,表达CD95L的肿瘤细胞的数量可以低于本文对CD95L阳性样品所限定的阈值,例如低于1%、低于2%、低于3%、低于4%、低于5%或低于10%的肿瘤细胞。

[0080] 如果可以在组织切片中至少1%、至少2%、至少5%、至少10%、至少20%或至少50%的肿瘤组织面积上检测到CD95L,则也可以将癌症认作CD95L阳性。这一值在本文中被称作“肿瘤组织的CD95L阳性面积的百分数”。在这一分析中排除非肿瘤组织。可以通过已知的方法制备组织切片。在WO 2014/177576中描述了检测CD95L的合适的方法。在WO 2014/177576中给出了用于测定CD95L阳性肿瘤组织的面积的示例性的方法和实例。如果基本上不能在组织样品中检测到CD95L,或者如果肿瘤组织的CD95L阳性面积的百分数的值低于对于CD95L阳性样品所限定的阈值,例如低于1%、低于2%、低于3%、低于4%、低于5%或低于10%的肿瘤面积,则可以认为不存在CD95L表达(CD95L阴性)。

[0081] 可以通过已知的方法检测CD95L表达(例如根据在组织切片中的细胞数量或面积),例如通过基于组织切片的自动化分析的方法。

[0082] 通过本发明的方法,任何类型的癌症,特别是实体肿瘤组织可以基于CD95L的表达来诊断。待诊断或/和待治疗的癌症也可以是淋巴或骨髓起源的癌症。

[0083] 基于CD95L表达的诊断对于那些包括CD95L表达亚型的癌症类型的诊断和治疗是特别的重要,由此需要适应于诊断的CD95L表达亚型的特异性的治疗。在本发明中被鉴别的成胶质细胞瘤的CD95L表达亚型的实例是如本文所述的CD95L阳性成胶质细胞瘤和CD95L阴性成胶质细胞瘤。本文所提供的解决方案包括基于本发明中所鉴别的CD95L表达亚型的诊断的特异性治疗。

[0084] 任何类型的癌症,特别是实体肿瘤组织,可以被确定为CD95L表达阳性或CD95L表达阴性。该癌症可以通过侵袭性生长来表征。根据本发明被诊断为CD95L阳性癌症或CD95L阴性癌症的癌症可以选自由以下构成的组:脑癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、肝癌或/和其转移性疾病。具体地,该癌症疾病是神经胶质瘤,更具体的是胶质母细胞瘤。

[0085] 例如,根据本发明,通过迄今已知的诊断方法诊断的脑肿瘤可以根据在肿瘤样品中检测CD95L表达的结果被指定为如本文所述的CD95L阳性脑肿瘤或CD95L阴性脑肿瘤。这种已知的诊断方法包括已知的组织学或组织病理学方法,诸如已知的组织染色的方法和已知的免疫组织化学方法。

[0086] 本发明的再一方面是将本发明的单克隆抗体用于根据CD95L表达的水平分类癌症疾病。在这一方面,通过CD95L表达的水平可以将癌症疾病分类为CD95L阳性癌症疾病或CD95L阴性癌症疾病。CD95L表达的水平优选地以使用本发明的抗体的免疫组织学方法来测定。

[0087] 在这一方面,癌症可以是如本文所描述的任何癌症。具体地,该癌症疾病选自由以下构成的组:脑癌、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、肝癌或/和其转移性疾

病。更具体地,该癌症疾病是神经胶质瘤,最具体地是胶质母细胞瘤。

[0088] 本发明的另一方面是将本发明的抗CD95L的抗体用于通过根据CD95L表达的水平分类患者的癌症疾病来提供关于癌症患者的总体存活时间或/和无复发存活时间的预后。CD95L表达的水平优选地以使用本发明的抗体的免疫组织学方法来测定。

[0089] 在这方面,癌症可以是如本文所描述的任何癌症。具体地,该癌症疾病选自自由以下构成的组:脑癌、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、肝癌或/和其转移性疾病。更具体地,该癌症疾病是神经胶质瘤,最具体地是胶质母细胞瘤。

[0090] 在本发明中,该总体存活时间(OS)表示对于一组患有癌症的个体保持活着的机会。其表示在该组中特定的持续时间之后可能活着的个体的百分比。

[0091] 本发明的又一方面提供关于癌症患者的总体存活时间或/和无复发存活时间的预后的方法,所述方法包括

[0092] (a) 在癌症样品中使用本发明的抗体测定CD95L表达,以及

[0093] (b) 根据CD95L表达的水平来提供关于患者的存活时间或/和无复发存活时间的预后,其中CD95L表达与患者的存活时间呈负相关。

[0094] 通过以下附图和实例来进一步说明本发明。

附图说明

[0095] 图1:抗CD95L的抗体克隆119-4的肽阵列(A)和来源于所述测定的强度曲线图(B)

[0096] 图2:抗CD95L的抗体克隆145-12的肽阵列(A)和来源于所述测定的强度曲线图(B)

[0097] 图3:抗CD95L的抗体克隆103-7的肽阵列(A)和来源于所述测定的强度曲线图(B)

[0098] 图4:基于流式细胞术使用抗体119-4、145-12和103-7来检测CD95L。虚线直方图:兔同型对照;实心直方图:亚克隆上清液

[0099] 图5:与特异性竞争物APG296的竞争ELISA

[0100] 图6:与非特异性竞争物APG707的竞争ELISA

[0101] 图7:通过亚克隆119-4、103-7和145-12中和APG101与CD95L的结合

[0102] 图8:ELISA评估亚克隆与来自三种不同物种的CD95L的结合

[0103] 图9:CD95L阻断剂的生物活性:对人CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0104] 图10:CD95L阻断剂的生物活性:对固定化人CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0105] 图11:CD95L阻断剂的生物活性:对固定化猴CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0106] 图12:CD95L阻断剂的生物活性:对固定化小鼠CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0107] 图13:ELISA法绘制119-4肽的表位

[0108] 图14:ELISA法绘制145-12肽的表位

[0109] 图15:ELISA法绘制103-7肽的表位

[0110] 图16:确定抗体119-4和145-12的 K_D

[0111] 图17:包括兔单克隆抗体145-12的或原始的或修饰的CDR-H三种人源化的可变重

(V_H) 结构域的氨基酸序列与所用的人V_H共有框架 (hum III、重亚组III) 氨基酸序列的比对。互补决定区 (CDR) 在括号中。接受者hum III的CDR以斜体打印, 并且标记重要的重链框架残基 (H28、H31a、H50、H71)。在人源化的过程中描述的所有修饰以小写字母和下划线打印。示出了SEQ ID NO:53的Hum III; SEQ ID NO:30的huVH145_A; SEQ ID NO:31的huVH145_B和SEQ ID NO:32的huVH145_C

[0112] 图18: 包括兔单克隆抗体119-4的或原始的或修饰的CDR-H三种人源化的可变重 (V_H) 结构域的氨基酸序列与所用的人V_H共有框架 (hum III、重亚组III) 氨基酸序列的比对。互补决定区 (CDR) 在括号中。接受者hum III的CDR以斜体打印, 并且标记重要的重链框架残基 (H28、H31a、H50、H71)。在人源化的过程中描述的所有修饰以小写字母和下划线打印。示出了SEQ ID NO:53的Hum III; SEQ ID NO:41的huVH119_A; SEQ ID NO:42的huVH119_B和SEQ ID NO:43的huVH119_C

[0113] 图19: 兔单克隆抗体119-4和154-12的人源化的可变轻链 (V_L) 结构域的氨基酸序列与人V_L共有框架的氨基酸序列的比对。互补决定区 (CDR) 在括号中。接受者序列的CDR以斜体打印。示出了SEQ ID NO:54的hu_k1; SEQ ID NO:44的hu119_4; SEQ ID NO:33的hu145_12

[0114] 实施例1: 抗CD95L的免疫/筛选策略

[0115] 为了生成CD95L抗体, 用重组CD95L (APG296; SEQ ID NO:26) 免疫兔。选择通过ELISA显示出对CD95L (APG296) 高血清效价的动物用于生成兔单克隆抗体。对于该过程, 从兔的脾脏中分离淋巴细胞, 并与兔骨髓瘤细胞融合。在细胞培养物上清液中筛选存在抗体的生长的杂交瘤细胞, 随后测试它们识别CD95L的特异性。总之, 在作为首要筛选的基于ELISA的测定中, 测试生长的杂交瘤细胞的163份上清液用于检测CD95L。大约70个克隆显示出与CD95L的相互作用, 并通过ELISA、IHC、Western-Blot和FACS分析进一步详细表征。三个克隆 (103、119和145) 被选择出, 并经由有限稀释进行亚克隆以确保单克隆性。(亚) 克隆103-7、119-4、145-12最终被选择用于进一步表征。

[0116] 实施例2: 肽阵列

[0117] 用稀释度为1:5000的山羊抗兔IgG (H+L) DyLight680二抗对肽阵列进行预染色, 以研究可能干扰主测定的背景相互作用。随后将肽微阵列与兔单克隆抗体克隆103-7、119-4和145-12以1:1000和1:100 (103-7和145-12) 的稀释度在温育缓冲液中的温育, 然后通过山羊抗兔IgG (H+L) DyLight680二抗染色并读出荧光强度。

[0118] 斑点强度和肽注释的定量用PepSlide®分析仪完成并在Excel文件中列出。软件算法将每个点的荧光强度分解为原始信号、前景信号和背景信号, 并计算前景中值强度的标准偏差。基于平均的前景中值强度, 生成强度图并突出肽图中的结合物

[0119] 用针对从N端至C端的人CD95L序列的兔单克隆抗体103-7、119-4和145-12来绘制该测定的平均斑点强度, 以显现总体的斑点强度和信噪比 (参见图1、2和3)。最终, 使强度曲线图与肽和强度图相关联, 以及与微阵列扫描的目视检查相关联, 以鉴别与单克隆抗体样品相互作用的肽和共有基序。

[0120] 实施例3: 兔单克隆抗体的表位绘制

[0121] 肽微阵列之一与兔单克隆抗体119-4以1:1000稀释度温育 (左), 然后用山羊抗兔IgG (H+L) DyLight680二抗染色。观察到由相邻的肽的行形成的强且非常明确的三重

(threefold) 斑点图案。这与在肽图中示出的微阵列布局一致,其中10aa的肽在顶部,12aa的肽在中间并且15aa的肽在肽微阵列的底部。

[0122] 数据量化之后是生成肽图和强度图以及强度曲线图。根据微阵列扫描,与兔单克隆抗体119-4以1:1000的稀释度的温育缓冲液中温育之后,观察到强且非常明确的三重表位样的斑点图案。在所有肽长度处的邻近的斑点的行与形成兔单克隆抗体119-4的表位的共有基序相关(图1)。对抗体145-12和103-7进行类似的阵列(图2和图3)。

[0123] 对于抗体119-4和145-12,可以分配编码氨基酸RNSKYPQD的共有表位。

[0124] 没有表位可以分配给克隆103-7。相对应的抗体具有非线性结构表位。

[0125] 实施例4:CD95L表达的FACS分析

[0126] 对KFL9细胞进行CD95L表达的流式细胞分析术。在用第一抗体温育之前,用FACS缓冲液(PBS,5%FCS,1/100Gammunex)封闭细胞。随后,加入第一抗体103-7、119-4和145-12(或相应的同型对照抗体)并温育30分钟。用PBS洗涤三次之后,加入山羊抗兔生物素二抗。具体地,通过加入PE缀合的链霉亲和素来检测结合的抗体。整个方案在冰上或4°C进行。流式细胞分析术用Guava EasyCyte Mini进行。图4的直方图示出了与兔同型对照抗体(虚线)相对比的克隆103-7、119-4和145-12的荧光强度。所有克隆均能够特异性检测KFL9细胞表面上的CD95L。

[0127] 实施例5:与特异性竞争物APG296的竞争ELISA

[0128] 对于竞争ELISA,将96孔微量滴定板用10µg/ml的APG296(CD95L-RB69;SEQ ID NO:26)包被。在用StartBlock封闭之后,与在1:200的最终稀释度下的来自亚克隆119-4、103-7和145-12的抗体在不存在或存在特异性竞争物APG296(0、0.1、1、10或10µg/ml)的情况下在孔中温育。通过与山羊抗兔IgG过氧化物酶(Sigma;稀释度为1:5000)温育,并随后在ELISA酶标仪(ELISA reader)中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,来检测兔单克隆抗体的结合(图5)。

[0129] 对于来自克隆119-4、103-7和145-12的抗体,在特异性竞争物存在的情况下观察到ELISA信号的剂量依赖性竞争。在测试的最高浓度(100µg/ml)下,ELISA信号降低到背景水平。

[0130] 实施例6:与非特异性竞争物APG707的竞争ELISA

[0131] 对于竞争ELISA,将96孔微量滴定板用10µg/ml的APG296(CD95L-RB69)包被。在用StartBlock封闭之后,与以1:200的最终稀释度的来自亚克隆119-4、103-7和145-12的抗体在不存在或存在非特异性竞争物APG707(LIGHT-RB69;SEQ ID NO:27;0、10或10µg/ml)的情况下在孔中温育。通过与山羊抗兔IgG过氧化物酶(Sigma;稀释度为1:5000)温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,来检测兔单克隆抗体的结合(图6)。

[0132] 在非特异性竞争物存在的情况下没有看到对来自克隆119-4、103-7和145-12的抗体的竞争。甚至在最高浓度的APG707中没有显示出ELISA信号的明显竞争。

[0133] 实施例7:通过来自亚克隆119-4、103-7和145-12的抗体中和CD95(受体)与CD95L的结合

[0134] APG101是包括人IgG1的Fc部分和CD95的细胞外的“配体结合结构域”的融合蛋白。APG101显示出与CD95L的强结合,特别适用于分析CD95L抗体干扰CD95L/CD95相互作用的能

力:

[0135] 亚克隆119-4、103-7和145-12对APG101与CD95L的结合的中和通过ELISA来评估。将96孔微量滴定板用5 μ g/ml的StrepMabImmo (IBA) 包被。用StartingBlock封闭之后,包含被StrepMabImmo捕获的Strep标签 (StrepTag) 的1 μ g/ml的CD95L-T4 (APG293) 在孔中温育。然后与1:10、1:50和1:250的稀释度的亚克隆119-4、103-7和145-12在孔中温育。在下一个温育步骤中,加入浓度为1 μ g/ml的APG101。通过与山羊抗人IgG-过氧化物酶 (Sigma; 稀释1:5000) 温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone来检测APG101与CD95L的结合。数据表示为相对ELISA信号,其中100%值表示没有中和APG101与CD95L的结合,0%值表示APG101与CD95L的结合完全中和 (图7)。

[0136] 来自亚克隆103-7和145-12的抗体以剂量依赖性方式示出了对APG101结合的中和。相比之下,来自亚克隆119-4的抗体示出了对APG101结合的更有效的中和。

[0137] 实施例8:ELISA评估抗体亚克隆与来自三种不同物种的CD95L的结合

[0138] 为了ELISA评估三种不同亚克隆的物种特异性,将96孔微量滴定板用0.5 μ g/ml的人CD95L-T4 (黑色) 或0.5 μ g/ml的食蟹猕猴 (*macaca fascicularis*) CD95L-T4 (深灰色) 或0.5 μ g/ml的小家鼠 (*mus musculus*) CD95L-T4 (浅灰色) 包被。用StartingBlock封闭之后,与亚克隆119-4、103-7和145-12以1:200的最终稀释度在孔中温育。通过与山羊抗兔IgG-过氧化物酶 (Sigma; 稀释1:5000) 温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm的波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,从而检测兔单克隆抗体的结合 (图8)。

[0139] 克隆119-4示出了与来自所有测试物种的CD95L的强结合。来自克隆103-7和119-4的抗体示出了对人和猴CD95L的强结合,仅与来源于小鼠的CD95L弱结合。

[0140] 实施例9:CD95L阻断剂的生物学活性:对人CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0141] 为了细胞测定以评估三种不同亚克隆 (103-7、119-4、145-12) 对比于APG101的生物活性,对96孔微量滴定板用移液器每孔吸取100000个Jurkat A3细胞。然后,用最终浓度恒定为250ng/ml的APG293 (人CD95L-T4; SEQ ID NO:25) 和如x轴所示滴定度的CD95L拮抗剂来补充孔。在37 $^{\circ}$ C温育3小时后,用裂解缓冲液 (250mM的HEPES, 50mM的MgCl₂, 10mM的EGTA, 5%的曲拉通X-100, 100mM的DTT, 10mM的AEBSF, pH为7.5) 裂解细胞,并且板置于冰块上30分钟至2小时。使用半胱天冬酶底物Ac-DEVD-AFC的切割以确定细胞凋亡的程度:将20 μ l的细胞裂解物转移至黑色96孔微量滴定板;在加入包含50mM的HEPES、1%的蔗糖、0.1%的CHAPS、50 μ M的Ac-DEVD-AFC和25mM的DTT, pH为7.5的80 μ l缓冲液之后,将板转移到Tecan微量滴定板酶标仪中,监测荧光强度的增加 (激发态为400nm, 发射态为505nm) (图9)。

[0142] 所有四种CD95L拮抗剂都显示出对半胱天冬酶诱导的剂量依赖性的抑制。与APG101相比,三种抗体 (亚克隆103-7、119-4、145-12) 显示了更高的拮抗活性。

[0143] 实施例10:CD95L阻断剂的生物学活性:对固定化人CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0144] 为了细胞测定以评估三种不同亚克隆 (103-7、119-4、145-12) 对比于APG101的生物活性,将96孔StrepTactin微量滴定板 (IBA) 用250ng/ml的人CD95L-RB69 (APG296) 温育1小时,该人CD95L-RB69被固定化Streptactin经其Strep标签捕获。洗涤板后,将如x轴所示的不同浓度的CD95L拮抗剂温育1小时。洗涤后,每孔加入100000个Jurkat A3细胞。在37 $^{\circ}$ C

温育3小时后,用裂解缓冲液(250mM的HEPES,50mM的MgCl₂,10mM的EGTA,5%的曲拉通X-100,100mM的DTT,10mM的AEBSF,pH为7.5)裂解细胞,并且板置于冰块上30分钟至2小时。使用半胱天冬酶底物Ac-DEVD-AFC的切割以测定细胞凋亡的程度:将20 μ l的细胞裂解物转移至黑色96孔微量滴定板;在加入包含50mM的HEPES、1%的蔗糖、0.1%的CHAPS、50 μ M的Ac-DEVD-AFC和25mM的DTT,pH为7.5的80 μ l缓冲液之后,将板转移到Tecan微量滴定板酶标仪中,监测荧光强度的增加(激发态为400nm,发射态为505nm)(图10)。

[0145] 所有测试的抗体显示出对由重组人CD95L(APG296)诱导的细胞凋亡的有效抑制。与已知的CD95L拮抗剂APG101相比,抗体显示出更高的功效。

[0146] 实施例11:CD95L阻断剂的生物学活性:对固定化猴CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0147] 为了细胞测定以评估三种不同亚克隆(103-7、119-4、145-12)对比于APG101的生物活性,将96孔StrepTactin微量滴定板(IBA)用250ng/ml的猴CD95L-RB69(食蟹猕猴(*macaca fascicularis*);APG1249)温育1小时,该猴CD95L-RB69被固定化StrepTactin经其Strep标签捕获。洗涤板后,将如x轴所示的不同浓度的CD95L拮抗剂温育1小时。洗涤后,每孔加入100000个Jurkat A3细胞。在37 $^{\circ}$ C温育3小时后,用裂解缓冲液(250mM的HEPES,50mM的MgCl₂,10mM的EGTA,5%的曲拉通X-100,100mM的DTT,10mM的AEBSF,pH为7.5)裂解细胞,并且板置于冰块上30分钟至2小时。使用半胱天冬酶底物Ac-DEVD-AFC的切割以确定细胞凋亡的程度:将20 μ l的细胞裂解物转移至黑色96孔微量滴定板;在加入包含50mM的HEPES、1%的蔗糖、0.1%的CHAPS、50 μ M的Ac-DEVD-AFC和25mM的DTT,pH为7.5的80 μ l缓冲液之后,将板转移到Tecan微量滴定板酶标仪中,监测荧光强度的增加(激发态为400nm,发射态为505nm)(图11)。

[0148] 所有测试的抗体显示出对由重组的猴CD95L(APG1249)诱导的细胞凋亡的有效抑制。与已知的CD95L拮抗剂APG101相比,抗体显示出更高的功效。

[0149] 实施例12:CD95L阻断剂的生物学活性:对固定化小鼠CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

[0150] 为了细胞测定以评估三种不同亚克隆(103-7、119-4、145-12)对比于APG101的生物活性,将96孔StrepTactin微量滴定板(IBA)用250ng/ml的小鼠CD95L-RB69(小家鼠(*mus musculus*);APG1250)温育1小时,该小鼠CD95L-RB69被固定化StrepTactin经其Strep标签捕获。洗涤板后,将如x轴所示的不同浓度的CD95L拮抗剂温育1小时。洗涤后,每孔加入100000个Jurkat A3细胞。在37 $^{\circ}$ C温育3小时后,用裂解缓冲液(250mM的HEPES,50mM的MgCl₂,10mM的EGTA,5%的曲拉通X-100,100mM的DTT,10mM的AEBSF,pH为7.5)裂解细胞,并且板置于冰块上30分钟至2小时。使用半胱天冬酶底物Ac-DEVD-AFC的切割以确定细胞凋亡的程度:将20 μ l的细胞裂解物转移至黑色96孔微量滴定板;在加入包含50mM的HEPES、1%的蔗糖、0.1%的CHAPS、50 μ M的Ac-DEVD-AFC和25mM的DTT,pH为7.5的80 μ l缓冲液之后,将板转移到Tecan微量滴定板酶标仪中,监测荧光强度的增加(激发态为400nm,发射态为505nm)。

[0151] 所有测试的抗体显示出对由重组的小鼠CD95L(APG1250)诱导的细胞凋亡的有效抑制。与已知的CD95L拮抗剂APG101相比,该抗体显示出更高的功效。然而,只有亚克隆119-4能够将由小鼠CD95L诱导的胱天蛋白酶活性降低至基线水平(图12)。

[0152] 实施例13:ELISA法绘制119-4肽的表位

[0153] 对于评估克隆119-4的表位的ELISA,将96孔微量滴定板用 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人CD95L (APG296) 或 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人LIGHT (APG707) 或固定于BSA或卵白蛋白的包括人CD95L的细胞外氨基酸序列的一部分的肽包被。用StartingBlock封闭之后,将孔用浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的克隆119-4温育。通过与山羊抗兔IgG-过氧化物酶 (Sigma; 稀释1:5000) 温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,从而检测兔单克隆抗体的结合(图13)。

[0154] 抗体119-4显示出与APG296和对除了肽“C-YMRNSKY”之外的所有测试的肽的结合。相应的结合模式表示包含氨基酸“NSKYPQ”的最小表位。

[0155] 实施例14:ELISA法绘制145-12肽的表位

[0156] 对于评估克隆145-12的表位的ELISA,将96孔微量滴定板用 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人CD95L (APG296) 或 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人LIGHT (APG707) 或固定于BSA或卵白蛋白的包括人CD95L的细胞外氨基酸序列的一部分的肽包被。用StartingBlock封闭之后,将孔用浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的克隆145-12温育。通过与山羊抗兔IgG-过氧化物酶 (Sigma; 稀释1:5000) 温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,从而检测兔单克隆抗体的结合(图14)。

[0157] 抗体145-12显示出对APG296的特异性结合。然而,对测试肽的结合很弱或甚至不存在(肽“C-YMRNSKY”)。尽管抗体与克隆119-4共享相同的表位(如肽阵列所示),但可以想象到的是,需要其他可能的CD95L的结构成分以限定145-12抗体的完整表位。

[0158] 实施例15:ELISA法绘制103-7肽的表位

[0159] 对于评估克隆103-7的表位的ELISA,将96孔微量滴定板用 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人CD95L (APG296) 或 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人LIGHT (APG707) 或固定于BSA或卵白蛋白的包括人CD95L的细胞外氨基酸序列的一部分的肽包被。用StartingBlock封闭之后,将孔用浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的克隆103-7温育。通过与山羊抗兔IgG-过氧化物酶 (Sigma; 稀释1:5000) 温育,并随后在ELISA酶标仪中在450nm波长中检测转化的过氧化物酶-底物TMBone,从而检测兔单克隆抗体的结合(图15)。

[0160] 抗体103-7显示了对APG296的特异性结合。所有基于肽的线性表位不被抗体103-7检测到,表明表位是由CD95L的三维结构限定的。

[0161] 实施例16:确定抗体119-4和145-12的 K_D

[0162] 基于用自动化生物传感器系统 (Attana A100) 测定的动力学结合数据 (k_{on} 和 k_{off}) 来计算抗体119-4和145-12与包括表位的肽“YMRNSKYPQD”的平衡结合常数 (K_D)。A100允许基于石英晶体微天平 (QCM) 技术来实时地研究分子间的相互作用。为此目的,将包括各自表位的肽偶联至BSA,并随后固定至羧基活化的QCM芯片的表面。抗体119-4和145-12被用作不同浓度的可溶性分析物。实时地分析结合 (k_{on}) 和解离 (k_{off}),并计算相应的 K_D (参见图16中的表格)。

[0163] 与抗体145-12相比,抗体119-4显示出对包括表位的肽更高的亲和力。不能用所选设置分析克隆103-7的 K_D (数据未示出)。

[0164] 用于免疫和分析的蛋白质:

[0165] 人、小鼠和猴CD95L (CD95L-RBD) 的受体结合结构域被表达为具有C端定位的稳定化结构域的同源三聚体的融合蛋白。生成两种形式的人CD95L-RBD,其与CD95L衍生的序列

完全相同,但在稳定化结构域 (APG293,SEQ ID NO:25和APG296,SEQ ID NO:26)的分子布局上不同。为了鉴别和/或取消选择支架特异性mAB,使用来自包括相同三聚支架的TNF超家族的结构相关蛋白质 (APG707,SEQ ID NO:27)。为了结合分析,用相同的融合蛋白技术表达猴CD95L-RBD (APG1249,SEQ ID NO:28)以及小鼠CD95L-RBD (APG1250,SEQ ID NO:29)。在US8147843B2和US008580273B2中描述了上述蛋白质的总体布局和它们的制备实例。

[0166] 实施例17:计算机中人源化

[0167] 在下面,残基编号遵循Kabat枚举。为了人源化来自于兔mAB 119-4 (SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8)和mAB145-12 (SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18)的兔VH和VL抗体片段,使用以下策略:不以个体的供体兔VH/VL序列高度相似性来检索个体的人VH/VL种系序列,而是选择经常作为受体框架用于鼠科的VH/VL结构域的人源化过程 (Presta等,1997,Adams等,2006)的人受体VH/VL结构域对 (VH子组III,SEQ ID 53和VL κ 子组I SEQ ID54)。

[0168] 为了将两种抗体的兔VL片段人源化,直接在计算机上执行了将兔CDR-L移植到人VL- κ 亚组I框架模板 (SEQ ID 54)中而没有改变 (见图19)。得到的mAB145-12的人源化的VL结构域具有SEQ ID 33,并且得到的mAB119-4的人源化的VL结构域具有SEQ ID 44。

[0169] 为了将两种抗体的兔VH片段人源化,在计算机中执行将兔CDR-H移植到人框架模板中,并对每个供体兔VH结构域创建三个人源化VH序列变体 (参见图17和图18)。在两种人源化变体A序列中,将位置H28、H71和H73从受体 (H28-T、H71-R、H73-N) 切换至供体序列残基 (H28-S、H71-K、H73-S)。变体A是用于进一步修饰以产生变体B的模板。在两种人源化变体B序列中,除了框架残基H28、H71和H73的上述突变之外,CDR-H2的CDR-H2位置H61、H62和H63从兔供体 (H61-S、H62-W、H63-A) 突变为受体残基 (H61-D、H62-S、H63-V)。变体B是用于进一步修饰以产生变体C的模板。在两种人源化变体C序列中,除变体B突变外,将兔CDR-H1 (位置H35a) 中的半胱氨酸突变为丝氨酸,并且兔CDR-H2 (位置H50) 中的半胱氨酸突变成丙氨酸,因为半胱氨酸在人VH结构域中的那些位置是罕见的。两个人源化变体C序列二者中的相邻框架位置H49从丙氨酸突变为丝氨酸,从而可能为变体C中的修饰的CDR-H2给予更好的结构支持。得到的mAB145-12的人源化VH结构域具有SEQ ID 30 (变体A)、SEQ ID 31 (变体B) 和SEQ ID 32 (变体C)。得到的mAB119-4的人源化VH结构域具有SEQ ID 41 (变体A)、SEQ ID 42 (变体B) 和SEQ ID 43 (变体C)。

[0170] 在VH的情况下,Presta等人通过结构方面将CDR-H1限定为包括重链残基H26-H35,然而CDR-H1的基于序列的限定包括残基H31-H35 (Kabat枚举)。由于位置H26-H30涉及CDR-H1环构象并且位置H28的表面是暴露的,所以可能将残基H28突变为供体序列。另外,已知重链位置H69、H71和H73通常对于VH亚组III的CDR-H环的构象而言是关键。对于所选的人VH/VL受体结构域对,发现在上述位置中将人残基替换为供体残基对于使小鼠CDR在功能上能够移植是必要的 (Adams等,2006)。

[0171] 通过目视检查来自单克隆兔抗体的Fab片段的晶体结构 (pdb条目4ZT0,链H,SEQ ID 61),发现了兔VH结构域框架和兔CDR-H的附加的一般特征。首先,SEQ ID 61的兔VH的CDR-H2包括C端的色氨酸 (残基H62-W),其锚定由残基H60-H65形成的环,该残基位于支持在涉及抗原识别的表面的N端CDR-H2构象的VH支架结构处的侧面。由于其相对位置靠近表面,这种包含H62-色氨酸的序列基序可能在用于治疗目的的人源化抗体中具有潜在的免疫原性。类似的CDR-H2环形成序列是mAb119-4以及mAb145-12的一部分。因此,用如上所述的人

残基H61-H63替换兔残基H61-H63以降低得到的抗体片段在人的免疫原性风险,如在SEQ ID 31、SEQ ID 32、SEQ ID 42和SEQ ID 43中实施的。在上述结构中观察到的附加的结构特征是由兔残基H35a和H50形成的二硫键桥。有趣的是,该二硫键桥被埋在兔VH/VL结构域界面中,并连接该结构域的两个反向平行的 β 桶。由于这些 β 桶支持CDR-H1和CDR-H2,因此共价键可能约束了CDR-H1和CDR-H2的结构灵活性。这可能导致能够和/或增强与识别的抗原结合的结构特征。为了证明其中存在H35a和H50半胱氨酸的mAB119-4和mAB145-12的假设,在替换的这些半胱氨酸残基的情况下生成人VH变体C(SEQ ID 32和SEQ ID 43)。

[0172] 实施例18:m145-12和119-4的人源化VH和VL结构域的功能性筛选

[0173] 对于基于化合物的计算机中的人源化程序的验证,选定scFv-微抗体(minibodies)形式。根据2004年Olafsen等人,创建含有呈递mAb145-12和mAb119-4特异性CDR的人源化的VH/VL对的无铰链的scFv-微抗体。实施了以下修饰:用较短的16个残基(GGGS) \times 4接头生成VH-VL排列的scFv。在该构造中不存在人VH的C端丝氨酸和人VL的C端精氨酸。所使用的CH3支架包括N端5残基接头元件和C端Strep标签II,用于在中性pH下的有效亲和纯化的目的。作为对照,产生了包括mAb145-12和mAb119-4的VH/VL结构域的对应的scFv-微抗体。在兔VL结构域中,与兔 κ 恒定结构域形成二硫键桥的单一半胱氨酸突变为丝氨酸。对于基于哺乳动物类分泌途径的制备,产生对感兴趣的scFv-微抗体在框内编码合适的信号肽的合成的cDNA盒,并被克隆至适于在哺乳动物细胞中稳定表达的表达载体。通过如下所述的方法进行scFv-微抗体的制备。制备的所有scFv-微抗体最终通过尺寸排阻层析法进行纯化,从而在进一步分析之前确保除尽多聚体和聚集体,由此排除在随后进行的活性测定中的亲和性效应。分析SEC纯化的抗CD95L特异性scFv-微抗体中和CD95L诱导的Jurkat A3细胞的细胞凋亡的能力。用mAB145-12或mAB119-4CDRs生成的人源化的scFv-微抗体中的CD95L表位识别的功能性的重新构建被假定为直接以EC50值来解释,其比得上或低于包括兔供体VH/VL结构域的兔对照scFv-微抗体的EC50值。

[0174] 实施例19:用于克隆、表达和纯化重组全长抗体或抗体片段的方法

[0175] 上述全长抗体或抗体片段通常在两种不同的真核宿主细胞中重组表达:

[0176] 为了对前述全长抗体或抗体片段进行初始分析,将在补充有10%的FBS,100单位/ml的青霉素和100 [mu]g/ml的链霉素的DMEM+GlutaMAX (Gibco) 中生长的Hek293T细胞用包含重组多肽和适当的选择标记的表达盒的质粒瞬时转染,该表达盒例如包括杀稻瘟素、嘌呤霉素或潮霉素抗性基因的功能性表达盒。在那些需要多个多肽链以获得最终产物(如完整形式抗体)的情况下,表达盒在转染期间或被结合在一个质粒上或被定位在不同的质粒上。转染后三天收获包含重组融合多肽的细胞培养物上清液,并通过300 \times g离心来澄清,随后通过0.22 μ m无菌过滤器过滤。

[0177] 为了在体内更大规模地表达上述待使用的全长抗体或抗体片段,将编码上述蛋白质的合成DNA盒插入真核表达载体中,该真核表达载体包括适当的选择标记(如包括杀稻瘟菌素、嘌呤霉素或潮霉素抗性基因的功能性表达盒)和适于在宿主细胞基因组内增加转录活性插入位点(如人 β -珠蛋白基质结合区(MAR))数量的遗传元件。通过电穿孔将序列验证的表达载体导入悬浮适应的中国仓鼠卵巢细胞(CHO-S, Invitrogen)。转染后三天对转染的细胞施加适当的选择压力。通过随后在选择压力下培养来回收携带载体来源的抗性基因的存活细胞。所选定的细胞群在轨道震荡培养箱(100rpm, 50mm摇瓶)中在37 $^{\circ}$ C和7%的CO₂气

氛中在化学上限定的培养基 (PowerCHO2-CD, Lonza) 中稳定生长后,通过检测上述蛋白质的 ELISA测定来分析个体的上清液,并且在蛋白质制备之前,具有最高比产能的细胞群在摇瓶中扩增(轨道摇床,100rpm,震荡甩动50mm)。

[0178] 为了在实验室规模制备蛋白质,在Wave生物反应器20/50EHT (GE-Healthcare) 中,在化学上限定的培养基 (PowerCHO2-CD, Lonza) 中在37℃和7%的CO₂气氛中培养单个细胞群7-12天。基础培养基是补充有4mM Glutamax的PowerCHO2-CD。Wave培养始于活细胞浓度为 0.3×10^6 至 0.4×10^6 个细胞/ml和以下设置(对于五升或十升袋子):震荡频率为18rpm,震荡角度为7°,气流流量为0.2-0.3L/min,7%的CO₂,36.5℃。在Wave运行期间,向细胞培养物补料PowerFeed A (Lonza) 两次,通常在第2天(20%补料)和第5天(30%补料)。第二次补料后,震荡频率提升到22rpm,以及震荡角度提升到8°。

[0179] 当细胞活力降至低于80%,通常在第7天至第12天之间收获生物反应器。首先,使用手动深度过滤系统 (Millipore Millistak Pod, MC0HC 0.054m²) 澄清培养物上清液。对于有Strep标签的蛋白质,添加抗生物素蛋白至最终浓度为0.5mg/L。最终,将包含上述全长抗体或抗体片段的培养物上清液用瓶顶过滤器(0.22μm, PES, Corning) 无菌过滤,并储存于2-8℃直至进一步处理。

[0180] 为了亲和纯化,将链霉Streptactin琼脂糖凝胶填充到柱(凝胶床1ml)中,用15ml缓冲液W(100mM的Tris-HCl, 150mM的NaCl, pH为8.0)或pH为7.4的PBS平衡,并以4ml/min流速将细胞培养物上清液过柱。随后,用15ml的缓冲液W洗涤柱,并且通过加入7×1ml的缓冲液E(100mM的Tris HCl, 150mM的NaCl, 2.5mM的脱硫生物素, pH为8.0)逐步洗脱结合的多肽。可替代地,包含2.5mM的脱硫生物素的pH为7.4的PBS可以用于该步骤。

[0181] 对于基于Streptactin琼脂糖凝胶的方法,可替代地,采用具有作为亲和配体的固定化蛋白质A的柱和Akta层析系统 (GE-Healthcare) 来进行亲和纯化。选择对融合蛋白质的FC结构域具有高亲和力的固相材料:MABSelect Sure™ (GE Healthcare)。简而言之,将澄清的细胞培养物上清液加载到在洗涤缓冲液-1(20mM的Pi, 95mM的NaCl, pH为7.2)中平衡的HiTrap MabSelectSure柱(CV=5ml)上,该上清液不超过10mg融合蛋白质/ml柱-床的加载量。用十倍柱体积(10CV)的上述平衡缓冲液洗涤该柱,接着用四倍柱体积(4CV)的洗涤缓冲液-2(20mM的Pi, 95mM的NaCl, pH为8.0)以除尽宿主-细胞蛋白质和宿主-细胞DNA。然后用洗脱缓冲液(20mM的Pi, 95mM的NaCl, pH为3.5)洗脱该柱,并且以多至十个级分收集洗脱液,且每个级分具有的体积等于柱-床体积(5ml)。用等体积的上述洗涤缓冲液-2中和每个级分。在上述亲和层析法期间,线速度设定为150cm/h并保持恒定。

[0182] 定量洗脱液级分的蛋白质的量,并通过超滤来浓缩峰级分,并通过尺寸排阻层析法 (SEC) 来进一步纯化。

[0183] 使用Akta层析系统 (GE-Healthcare) 在葡聚糖凝胶200 10/300GL或HiLoad 26/60柱上进行SEC。用磷酸盐缓冲盐水平衡该柱,并且将浓缩的亲和纯化的多肽加载到SEC柱上,该SEC柱的样品体积不超过柱体积的2% (v/v)。在葡聚糖凝胶200 10/300GL柱 (GE Healthcare) 的情况下,施加的流速为0.5ml每分钟。在HiLoad 26/60葡聚糖凝胶200柱的情况下,施加的流速为2.5ml每分钟。根据280nm处的吸光度来监测多肽的洗脱曲线。

[0184] 实施例20:CD95L阻断剂的效力

[0185] 根据实施例9的标准效力测定被用于分析scFv-微抗体形式中人源化VH/VL-结构

域的拮抗CD95L的活性。用mAb145-12或mAb119-4CDR生成的人源化scFv-微抗体中的CD95L表位识别的功能性的重新构建被假定直接以EC50值解释,其比得上或低于兔对照scFv-微抗体的EC50值(SEQ ID 37代表mAb145-12特异性,并且SEQ ID 48代表mAb119-4特异性)。选择的人源化策略允许保存初始兔抗体范围内的活性,如通过具有SEQ ID 38和49的scFv-微抗体中示例的未修饰的CDR所代表的。出人意料地,在SEQ ID 39中示例的mAb145-12的CDRH2的去免疫化提升了效力。mAb119-4的CDRH2的去免疫化也起作用,因为与具有SEQ ID 49的scFv-微抗体相比,scFv-微抗体SEQ ID 50的相对活性是可比较的。相反,CDRH1中的H35a和CDRH2中的H50的修饰显著地降低效力,如用基于SEQ ID 40和SEQ ID 51的scFv-微抗体所证明的。

[0186]

化合物	测定1	测定2	测定3	测定4	测定5	测定6	平均值	STABW
APG101	774	789	707	714	-	-	746	42
maB145-12	187	198	225	192	-	-	201	16.9
SEQ ID 37	124	117	-	-	113	118	118	4.7
SEQ ID 38	118	114	-	-	95.7	111	110	9.7
SEQ ID 39	99.4	105	-	-	86.5	83.4	93	10.2
SEQ ID 40	532	591	-	-	701	571	599	72.5
SEQ ID 48	-	-	116	90,8	84,4	97,5	97	13.8
SEQ ID 49	-	-	172	144	117	127	140	24
SEQ ID 50	-	-	169	136	128	140	143	18
SEQ ID 51	-	-	1549	2256	1479	1737	1755	351

[0187] 表示出了不同CD95L中和试剂的生物体外活性。活性根据化合物对250ng/ml可溶性CD95L-T4对Jurkat A3细胞的细胞凋亡的诱导的拮抗活性确定。细胞凋亡诱导通过半胱天冬酶3/7切割底物Ac-DEVD-AFC来测量。值以ng/ml的EC50表示。

[0188] 实施例21:全长抗体形式的产生

[0189] 通过将人源化VH和VL结构域融合在包括抗体恒定区的适当的支架上,可以产生全长人抗体形式。在SEQ ID 58中给出人恒定κ轻链的适当实例序列。在SEQ ID 59和SEQ ID 60中给出IGG1恒定重链区的适当实例序列。作为实例,将mAb145-12(SEQ ID 33)的人源化的VL融合到κ恒定轻链,这产生了代表适合于产生具有mAb145-12特异性的完整形式的人抗体的全长κ轻链的SEQ ID 36。因此,通过将mAb119-4(SEQ ID NO 44)的人源化VL融合到κ恒定轻链SEQ ID 58,这产生了代表适合于产生具有mAb119-4特异性的完整形式人抗体的全长κ轻链的SEQ ID 47。类似地,通过将SEQ ID 42与SEQ ID 59或SEQ ID 60融合生成必需的人重链,这产生了适合于产生具有mAb119-4特异性的完整形式人抗体的全长人重链(SEQ ID 46和SEQ ID 45)。

[0190] 因此,将SEQ ID 31与SEQ ID 59或SEQ ID 60融合产生了适合于产生具有mAb145-12特异性的完整形式的人抗体的全长的人重链(SEQ ID 35和SEQ ID 34)。在哺乳动物细胞培养物中产生完整形式的重组抗体的表达技术在本领域中已经很好地建立。

[0191] 对于本领域的普通技术人员来说,显而易见的是,可以通过采用人源化VH/VL结构域来施加其他抗体支架技术,以产生具有期望抗体特异性的不同形式。

序列表

<110> 阿珀吉科吉尼科斯股份公司(Apogenix AG)

<120> 抗CD95L抗体

<130> PN18011136P

<160> 60

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H1

<400> 1

Asp His Tyr Trp Met Cys

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H2

<400> 2

Cys Ile Tyr Thr Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3

<400> 3

Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-L1

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser Leu Val

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-L2

<400> 5

Lys Ala Ser Asp Leu Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-L3

<400> 6

Gln Ser Tyr Asp Phe Arg Asp Thr Ile Asn Asn Gly His Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 区

<222> 1..29

<223> HFR1

<220>

<223> vH

<220>

<221> 区

<222> 30..35

<223> CDR-H1

<220>

<221> 区

<222> 36..49

<223> HFR2

<220>

<221> 区

<222> 50..66

<223> CDR-H2

<220>

<221> 区

<222> 67..97

<223> HFR3

<220>

<221> 区

<222> 98..109

<223> CDR-H3

<220>

<221> 区

<222> 110..119

<223> HFR4

<400> 7

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

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 区

<222> 1..23

<223> LFR1

<220>

<223> vL

<220>

<221> 区

<222> 24..34

<223> CDR-L1

<220>

<221> 区

<222> 35..49

<223> LFR2

<220>

<221> 区

<222> 50..56

<223> CDR-L2

<220>

<221> 区

<222> 57..88

<223> LFR3

<220>

<221> 区

<222> 89..102

<223> CDR-L3

<220>

<221> 区

<222> 103..113

<223> LFR4

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser

20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

		165						170						175			
Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Thr	Leu	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Phe		
		180						185						190			
Pro	Ser	Val	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val		
		195						200						205			
Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro		
		210						215						220			
Ala	Thr	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser		
225								230						235			240
Lys	Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
								245						250			255
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
								260						265			270
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Val		
								275						280			285
Gln	Phe	Thr	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro		
								290						295			300
Pro	Leu	Arg	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser	Thr		
305								310						315			320
Leu	Pro	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys		
								325						330			335
Lys	Val	His	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
								340						345			350
Lys	Ala	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro		
								355						360			365
Pro	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile		
								370						375			380
Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly		
385								390						395			400
Lys	Ala	Glu	Asp	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
								405						410			415
Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	Ser	Glu	Trp		
								420						425			430
Gln	Arg	Gly	Asp	Val	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His		
								435						440			445
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys				
								450						455			460

<210> 10

<211> 239

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 轻链 (119-1)
 <220>
 <221> 区
 <222> 24..136
 <223> vL
 <400> 10
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser
 20 25 30
 Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asp Leu Pro Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110
 Ser Tyr Asp Phe Arg Asp Thr Ile Asn Asn Gly His Ser Phe Gly Gly
 115 120 125
 Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu
 130 135 140
 Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu
 165 170 175
 Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro
 180 185 190
 Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr
 210 215 220
 Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 225 230 235

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H1

<400> 11

Ser Gly Tyr Asp Met Cys

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H2

<400> 12

Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3

<400> 13

Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-L1

<400> 14

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Asp Leu Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR-L2
<400> 15
Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5
<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR-L3
<400> 16
Ala Gly Gly Tyr Thr Ala Ser Ile Tyr Ala
1 5 10
<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 区
<222> 1..29
<223> HFR1
<220>
<223> vH
<220>
<221> 区
<222> 30..35
<223> CDR-H1
<220>
<221> 区
<222> 36..49
<223> HFR2
<220>
<221> 区
<222> 50..66
<223> CDR-H2
<220>

<221> 区
 <222> 67..97
 <223> HFR3
 <220>
 <221> 区
 <222> 98..107
 <223> CDR-H3
 <220>
 <221> 区
 <222> 108..118
 <223> HFR4
 <400> 17
 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Thr Val Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Thr Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 18
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 区
 <222> 1..22
 <223> LFR1
 <220>
 <223> vL
 <220>

<221> 区
 <222> 23..35
 <223> CDR-L1
 <220>
 <221> 区
 <222> 36..50
 <223> LFR2
 <220>
 <221> 区
 <222> 51..57
 <223> CDR-L2
 <220>
 <221> 区
 <222> 58..89
 <223> LFR3
 <220>
 <221> 区
 <222> 90..99
 <223> CDR-L3
 <220>
 <221> 区
 <222> 100..110
 <223> LFR4
 <400> 18
 Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn
 20 25 30
 Asp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Gly Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Cys Asp Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Thr Ala Ser
 85 90 95
 Ile Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
 100 105 110
 <210> 19

<211> 460
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重链 (145-12)
 <220>
 <221> 区
 <222> 20..137
 <223> vH
 <400> 19
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Phe Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Thr
 85 90 95
 Val Leu Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Ala Thr Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu Trp Gly
 115 120 125
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val
 145 150 155 160
 Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser
 180 185 190
 Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val
 195 200 205
 Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro

225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Pro	Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Ile Phe	
	245	250	255
Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu Val	
	260	265	270
Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser Gln Asp Asp	Pro Glu Val Gln Phe	
	275	280	285
Thr Trp Tyr Ile Asn	Asn Glu Gln Val Arg Thr	Ala Arg Pro Pro Leu	
	290	295	300
Arg Glu Gln Gln Phe	Asn Ser Thr Ile Arg	Val Val Ser Thr Leu Pro	
305	310	315	320
Ile Ala His Gln Asp	Trp Leu Arg Gly Lys	Glu Phe Lys Cys Lys Val	
	325	330	335
His Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
	340	345	350
Arg Gly Gln Pro Leu	Glu Pro Lys Val Tyr Thr	Met Gly Pro Pro Arg	
	355	360	365
Glu Glu Leu Ser Ser	Arg Ser Val Ser Leu Thr	Cys Met Ile Asn Gly	
	370	375	380
Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ser Val Glu Trp Glu	Lys Asn Gly Lys Ala	
385	390	395	400
Glu Asp Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Ala Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
	405	410	415
Tyr Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Ser Val Pro Thr	Ser Glu Trp Gln Arg	
	420	425	430
Gly Asp Val Phe Thr	Cys Ser Val Met His Glu	Ala Leu His Asn His	
	435	440	445
Tyr Thr Gln Lys Ser	Ile Ser Arg Ser Pro Gly	Lys	
	450	455	460

<210> 20

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链 (145-12)

<220>

<221> 区

<222> 24..133

<223> vL

<400> 20

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

<210> 21

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链 (119-1)

<400> 21

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60

tcgttggagg agtccggggg agacctggtc aagcctggag gaacctgac actcacctgc 120
acaacctctg gattctcctt cagtgacat tactggatgt gctgggtgcg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtggat cgcatgcatt tatactgctg atagtgactc ttactacgcg 240
agctggggcga aaggccgatt caccatctcc aagacctcgt cgaccacggg gactctgcaa 300
atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acctatttct gtgcgcggaa tggtgcttat 360
gctggtggtc cttatgggga cttgtggggc ccaggcacc tggtcaccgt ctectcaggg 420
caacctaaagg ctccatcagt cttcccactg gccccctgct gcggggacac acccagctcc 480
acggtgaccc tgggctgcct ggtcaaaggg tacctcccgg agccagtgac cgtgacctgg 540
aactcgggca ccctaccaa tggggtacgc accttcccgt ccgtccggca gtcctcaggc 600
ctctactcgc tgagcagcgt ggtgagcgtg acctcaagca gccagcccgt cacctgcaac 660
gtggccccacc cagccaccaa caccaaagtg gacaagaccg ttgcgcccctc gacatgcagc 720
aagcccacgt gcccaccccc tgaactcctg gggggaccgt ctgttctcat ctcccccca 780
aaaccaagg acacctcat gatctcacgc acccccagg tcacatgctg ggtggtggac 840
gtgagccagg atgaccccga ggtgcagttc acatggtaca taaacaacga gcaggtgcgc 900
accgcccggc cgccgctacg ggagcagcag ttcaacagca cgatccgctg ggtcagcacc 960
ctccccatcg cgcaccagga ctggetgagg ggcaaggagt tcaagtgcaa agtccacaac 1020
aaggcactcc cgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccagagggca gcccctggag 1080
ccgaaggctc acaccatggg ccctccccgg gaggagctga gcagcaggtc ggtcagcctg 1140
acctgcatga tcaacggctt ctacccttcc gacatctcgg tggagtggga gaagaacggg 1200
aaggcagagg acaactacaa gaccacgccg gccgtgctgg acagcgacgg ctctacttcc 1260
ctctacagca agctctcagt gcccacgagt gagtggcagc ggggcgacgt ctacacctgc 1320
tccgtgatgc acgaggcctt gcacaaccac tacacgcaga agtccatctc ccgctctccg 1380
ggtaaataga 1389

<210> 22

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链 (119-1)

<400> 22

atggacacga gggcccccaac tcagetgctg gggetectac tgctctgget cccaggtgcc 60
agatgtgctg acatttgtat gaccagact ccatectccg tggaggcagc tgtgggaggc 120
acagtacca tcaagtgcca ggccagtcag agcattagga cttcattagt ctggtatcag 180
cagaaaccag ggcagcctcc caagetctg atctacaagg catecgatct gccatctggg 240
gtcccatcgc ggttcaaggg cagtggatct gggacacagt tcaactctac catcagcagc 300
ctggagtgtg ccgatgctgc caettactac tgtaaaagct atgattttcg cgatactatt 360
aacaatggcc attctttcgg cggagggacc gaggtggtgg tcaaaggtga tccagttgca 420
cctactgtcc tcacttccc accagctgct gatcaggtgg caactggaac agtcaccatc 480
gtgtgtgtgg cgaataaata ctttcccgat gtcaccgtca cctgggaggt ggatggcacc 540

acccaaacaa ctggcatcga gaacagtaaa acaccgcaga attctgcaga ttgtacctac 600
aacctcagca gcactctgac actgaccage acacagtaca acagccacaa agagtacacc 660
tgcaaggtga cccagggcac gacctcagtc gtccagagct tcaatagggg tgactgttag 720

<210> 23

<211> 1383

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链 (145-12)

<400> 23

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgt tcaaaggttc ccagtgtcag 60
tcgttggagg agtccggggg agacctggtc aagcctgggg catecctgac actcacctgc 120
acagcctctg gattctcctt cagtagcgge tacgacatgt gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtggat cgcattgcatt gatactgata atgatgccac ttactacgcg 240
agttggggcga aaggccgatt caccatctcc aaacctctgt cgaccacggt gcttctgcag 300
ataaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acctatttct gtgcgacaac tcatggtgat 360
tatgtggcgt ttaagtgtg gggcccagge acctgtgta cegtctctc agggcaacct 420
aaggctccat cagtcttccc actggcccc tgctgcgggg acacaccag ctccacggtg 480
accctgggct gcctggtaaa aggggtacct ccggagccag tgaccgtgac ctggaactcg 540
ggcacctca ccaatggggg acgcacctc ccgtccgtcc ggcagtctc aggcctctac 600
tcgctgagca gcgtggtgag cgtgacctca agcagccage ccgtcactg caacgtggcc 660
caccagcca ccaacaccaa agtggacaag accgttgcgc cctcgacatg cagcaagccc 720
acgtgcccac cccctgaact cctgggggga ccgtctgtct tcattctccc cccaaaacce 780
aaggacacce tcatgatctc acgcacccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 840
caggatgacc ccgaggtgca gttcacatgg tacataaaca acgagcaggt gcgcaccgcc 900
cggccgccgc tacgggagca gcagttcaac agcacgatcc gcgtggtcag caccctcccc 960
atcgcgcacc aggactggct gaggggcaag gaggttcaagt gcaaagtcca caacaaggca 1020
ctcccggccc ccatcgagaa aacctctcc aaagccagag ggcagcccct ggagccgaag 1080
gtctacacca tgggccctcc ccgggaggag ctgagcagca ggtcggtcag cctgacctgc 1140
atgatcaacg gcttctacce ttccgacatc tcggtggagt gggagaagaa cgggaaggca 1200
gaggacaact acaagaccac gccggccgtg ctggacagcg acggtctcta cttctcttac 1260
agcaagctct cagtgccacc gagtgagtgg cagcggggcg acgtcttacc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccttgcaaaa ccaactacag cagaagtcca tctcccgtc tccgggtaaa 1380
tga 1383

<210> 24

<211> 711

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链 (145-12)

<400> 24

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgcgc aagtgctgac ccagactgca tcgtccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca attgccagtc cagtcagagt gttataaga acaacgactt atcctggtat 180
 cagcagaaac caaggcagcc tccaagctc ctgatctacc aggcatcaa actggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcggc 300
 gacctggagt gtgacgatgg tgccacttac tactgtgcag gcggttatac tgctagtatt 360
 tatgcttttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaagggtg atccagttgc acctactgtc 420
 ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcacat cgtgtgtgtg 480
 gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctggggagg tggatggcac cacccaaaca 540
 actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcage 600
 agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg 660
 acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711

<210> 25

<211> 202

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白质 CD95L-AT4 (APG293)

<400> 25

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

Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp
 145 150 155 160
 Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr
 165 170 175
 Phe Leu Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser His His His His His His
 180 185 190
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 195 200

<210> 26

<211> 195

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白质 CD95L-RB96 (APG296)

<400> 26

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

Phe Glu Lys
 195
 <210> 27
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIGHT-RB69 (APG707)
 <400> 27
 Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe
 20 25 30
 Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala
 35 40 45
 Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys
 50 55 60
 Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr
 65 70 75 80
 Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro
 85 90 95
 Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe
 100 105 110
 Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg
 115 120 125
 Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Phe Met Val Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Tyr Ile Glu Asp Ala Pro Ser Asp Gly Lys Phe Tyr Val Arg
 165 170 175
 Lys Asp Gly Ala Trp Val Glu Leu Pro Thr Ala Ser Gly Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 195 200 205
 <210> 28
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 猴 CD95L-RB69 (APG1249)

<400> 28

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

Phe Glu Lys

195

<210> 29

<211> 195

<212> PRT

<213> 人工序列 Sequence

<220>

<223> 小鼠 CD95L-RB69 (APG1250)

<400> 29

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

	20		25		30														
Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr				
	35						40						45						
Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Tyr	Phe	Arg	Gly	Gln	Ser	Cys	Asn	Asn	Gln				
	50						55						60						
Pro	Leu	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Met	Arg	Asn	Ser	Lys	Tyr	Pro	Glu	Asp				
65					70				75					80					
Leu	Val	Leu	Met	Glu	Glu	Lys	Arg	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gln				
				85					90					95					
Ile	Trp	Ala	His	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser				
				100					105					110					
Ala	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe				
				115					120					125					
Glu	Glu	Ser	Lys	Thr	Phe	Phe	Gly	Leu	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Ser	Gly				
				130					135					140					
Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ala	Pro	Ser	Asp				
145					150				155					160					
Gly	Lys	Phe	Tyr	Val	Arg	Lys	Asp	Gly	Ala	Trp	Val	Glu	Leu	Pro	Thr				
				165					170					175					
Ala	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln				
				180					185					190					
Phe	Glu	Lys																	
				195															
<210>	30																		
<211>	120																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	VH_hu145_12_A																		
<400>	30																		
Glu	Val	Gln	Leu	Val	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	Ser	Phe	Ser	Ser	Gly				
				20					25					30					
Tyr	Asp	Met	Cys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp				
				35					40					45					
Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Thr	Asp	Asn	Asp	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp				
				50					55					60					
Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu				

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

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH_hu145_12_B

<400> 31

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

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH_hu145_12_C

<400> 32

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

<210> 33

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL_hu145_12

<400> 33

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

<210> 34

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HC_hu145_12_N297S

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 35
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HC_hu145_12
 <400> 35
 Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Thr	His	Gly	Asp	Tyr	Val	Ala	Phe	Lys	Leu	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125		
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			130				135						140		
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145						150					155				160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
						165					170				175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
						180					185				190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
						195							205		
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
						210							220		
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225							230					235			240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
													245		255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
						260									270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
													275		285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
													290		300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305							310								320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
													325		335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
													340		350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
													355		365
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
													370		380
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val

210	215	220
Gly Tyr Thr Ala Ser Ile Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val		
225	230	235
Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	245	250
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	260	265
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	275	280
Gln Gly Ser Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	290	300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
305	310	315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	325	330
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser		
	340	345
Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
	355	360
		365
<210> 38		
<211> 371		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> MB_hu145_12A		
<400> 38		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly		
	20	25
Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	35	40
Val Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp		
	50	55
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu		
65	70	75
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	85	90
Cys Ala Arg Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu Trp Gly Gln		

100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gly
115	120	125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp	Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser	
130	135	140
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg	Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser	
145	150	155
Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Asp	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys	
165	170	175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala	
180	185	190
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
195	200	205
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	
210	215	220
Cys Ala Gly Gly Tyr Thr Ala Ser Ile	Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr	
225	230	235
Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Gly Ser	Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
245	250	255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	
260	265	270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	
275	280	285
Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Ser Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
290	295	300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	
305	310	315
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
325	330	335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
340	345	350
Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln	
355	360	365
Phe Glu Lys		
370		
<210> 39		
<211> 371		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Ser Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 290 295 300
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln
 355 360 365
 Phe Glu Lys
 370
 <210> 40
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MB_hu145_12C
 <400> 40
 Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ser Ala Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr His Gly Asp Tyr Val Ala Phe Lys Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 130 135 140
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser
 145 150 155 160

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

Phe Glu Lys
 370

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH_hu119_4_A

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Asp His
 20 25 30

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

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH_hu119_4_B

<400> 42

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

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH_hu119_4_C

<400> 43

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

<210> 44

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL_hu119_4

<400> 44

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

	100	105	110
Arg			
<210> 45			
<211> 455			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HC_hu119_4_N297S			
<400> 45			
Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Asp His			
	20	25	30
Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
	35	40	45
Val Ala Cys Ile Tyr Thr Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser			
	50	55	60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu			
65	70	75	80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	85	90	95
Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
	115	120	125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
	130	135	140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
145	150	155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
	165	170	175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
	180	185	190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
	195	200	205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
	210	215	220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
225	230	235	240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 46
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HC_hu119_4
 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Asp His
 20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Cys Ile Tyr Thr Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

	340		345		350										
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	355		360		365										
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
	370		375		380										
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
385			390		395										400
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			405		410										415
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
			420		425										430
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			435		440										445
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
	450		455												
<210>	47														
<211>	219														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	LC_hu119_4														
<400>	47														
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	Ile	Arg	Thr	Ser
			20		25									30	
Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35		40									45	
Tyr	Lys	Ala	Ser	Asp	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50		55									60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65			70		75									80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Phe	Arg	Asp	Thr
			85		90									95	
Ile	Asn	Asn	Gly	His	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100		105									110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
			115		120									125	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe

130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 48
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MB_119_4
 <400> 48
 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp His Tyr
 20 25 30
 Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Cys Ile Tyr Thr Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu Trp Gly Pro
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser
 130 135 140
 Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
 145 150 155 160
 Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35	40	45	
Val Ala Cys Ile Tyr Thr	Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr	Ala Ser Trp	
50	55	60	
Ala Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr	Leu	
65	70	75	80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr	
85	90	95	
Cys Ala Arg Asn Gly Ala	Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr	Gly Asp Leu Trp	
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly	
115	120	125	
Ser Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Asp Ile	Gln Met Thr Gln Ser	
130	135	140	
Pro Ser Ser Leu Ser Ala	Ser Val Gly Asp Arg	Val Thr Ile Thr Cys	
145	150	155	160
Lys Ala Ser Gln Ser Ile	Arg Thr Ser Leu Val	Trp Tyr Gln Gln Lys	
165	170	175	
Pro Gly Lys Ala Pro Lys	Leu Leu Ile Tyr Lys	Ala Ser Asp Leu Pro	
180	185	190	
Ser Gly Val Pro Ser Arg	Phe Ser Gly Ser Gly	Ser Gly Thr Asp Phe	
195	200	205	
Thr Leu Thr Ile Ser Ser	Leu Gln Pro Glu Asp	Phe Ala Thr Tyr Tyr	
210	215	220	
Cys Gln Ser Tyr Asp Phe	Arg Asp Thr Ile Asn	Asn Gly His Ser Phe	
225	230	235	240
Gly Gln Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Gly Ser	Gly Ser Ser Gly Gln	
245	250	255	
Pro Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met	
260	265	270	
Thr Lys Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro	
275	280	285	
Ser Asp Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Gln Gly	Ser Pro Glu Asn Asn	
290	295	300	
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu	
305	310	315	320
Tyr Ser Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn Val	
325	330	335	
Phe Ser Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln	
340	345	350	

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp
 355 360 365
 Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 370 375
 <210> 50
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MB_hu119_4B
 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Phe Ser Asp His
 20 25 30
 Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Cys Ile Tyr Thr Ala Asp Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asp Leu Pro
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220

Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Ser Ile Arg Thr Ser Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asp Leu Pro
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Gln Ser Tyr Asp Phe Arg Asp Thr Ile Asn Asn Gly His Ser Phe
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gln
 245 250 255
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 260 265 270
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 275 280 285
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Ser Pro Glu Asn Asn
 290 295 300
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 305 310 315 320
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 325 330 335
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 340 345 350
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp
 355 360 365
 Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 370 375
 <210> 52
 <211> 20
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号肽

<400> 52

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Val Phe Val Leu Leu Val Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Ala Gly Asn Gly
 20

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人VH-模板

<400> 53

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

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 VL-模板

<400> 54

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

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

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (GGGS)4-接头

<400> 55

Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser
1	5	10	15

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 微抗体-支架

<400> 56

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
100 105 110

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep标签 II

<400> 57

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5 10 15

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人κ轻链恒定结构域支架

<400> 58

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IGG1 重链 CH1CH2CH3-支架

<400> 59

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	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	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100						105					110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150				155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175
Glu	Gln	Tyr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180							185				190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195							200				205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210					215						220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230						235				240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260							265				270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275											285	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn

290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr Thr
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys	
	325	330
<210> 60		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人IGG1重链 CH1CH2 (N297S) CH3-支架		
<400> 60		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	100	105
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
	115	120
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
	130	135
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170
Glu Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	195	200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

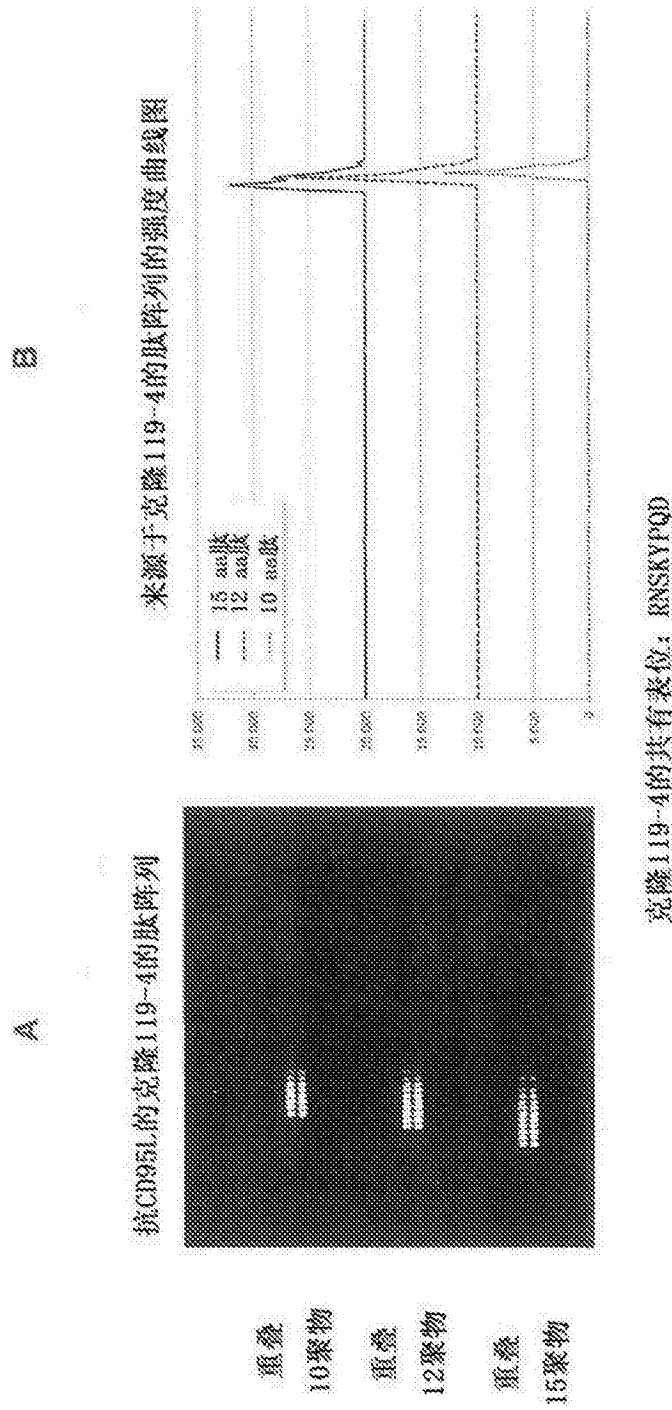
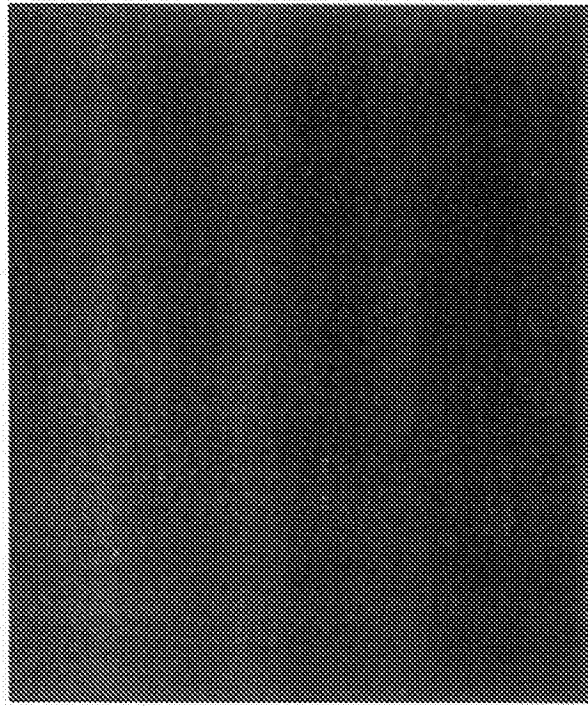


图1

抗CD95L的克隆145-12的肽阵列



重叠
10聚物

重叠
12聚物

重叠
15聚物

图2A

来源于克隆145-12的肽阵列的强度曲线图

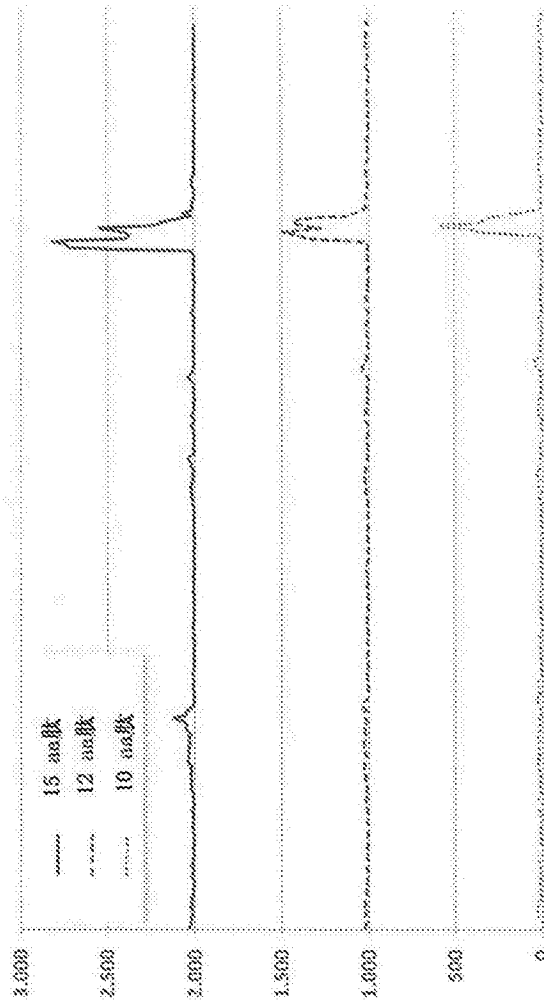
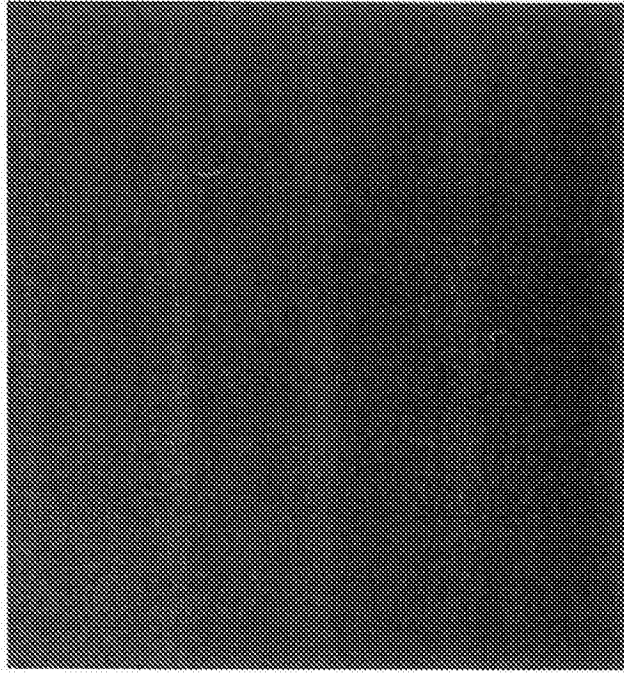


图2B

抗CD95L克隆103-7的肽阵列



重叠
10聚物

重叠
12聚物

重叠
15聚物

图3A

来源于克隆103-7的肌阵列的强度曲线图

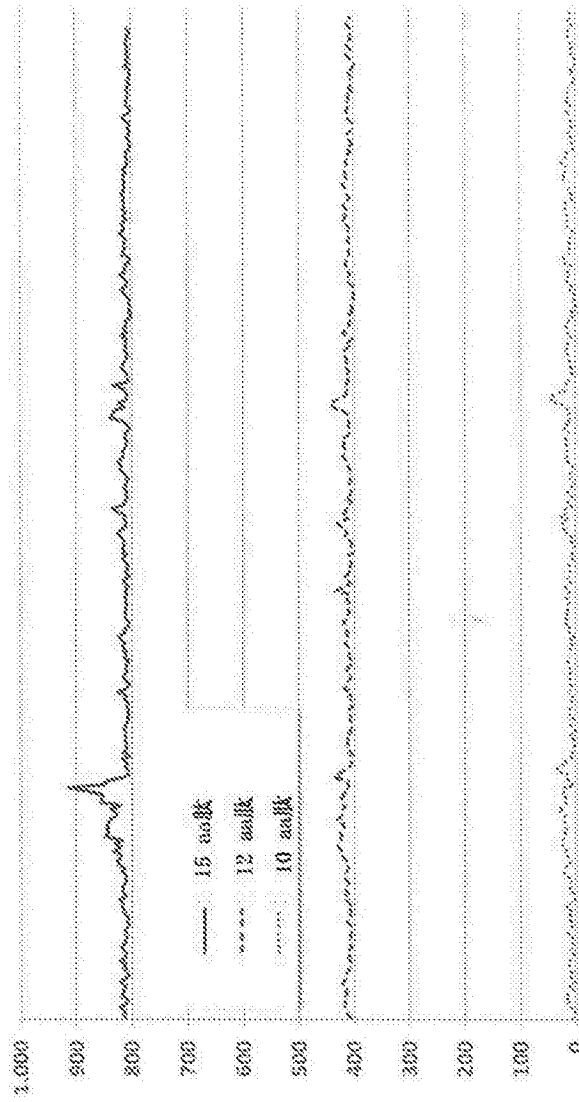


图3B

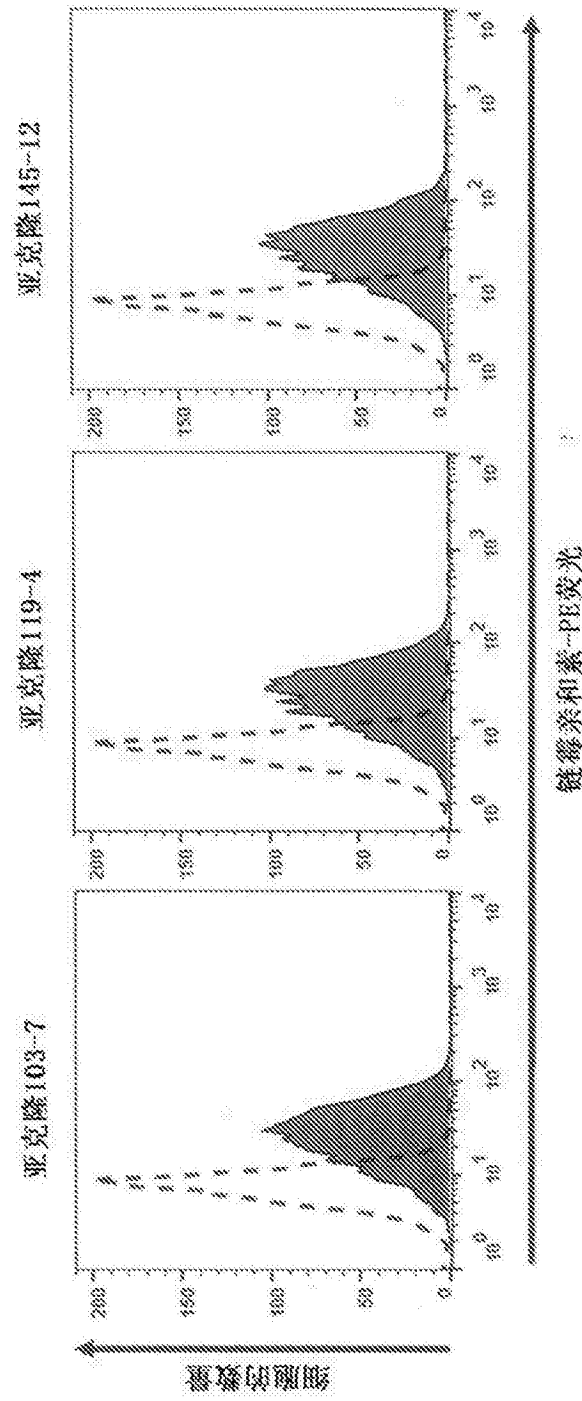


图4

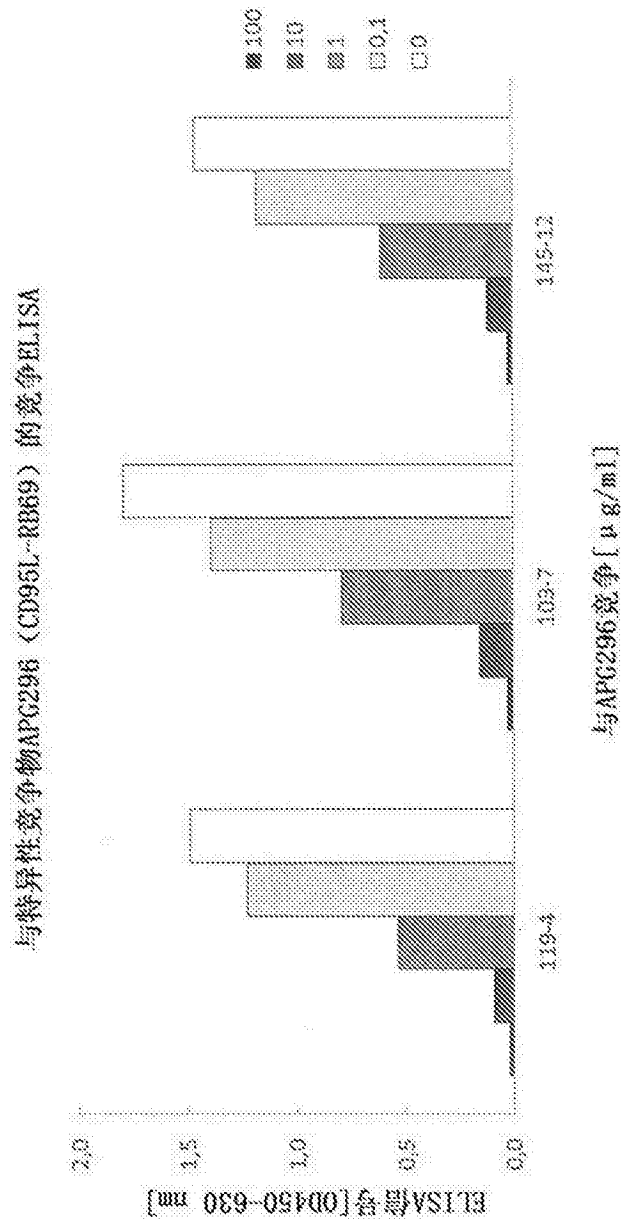


图5

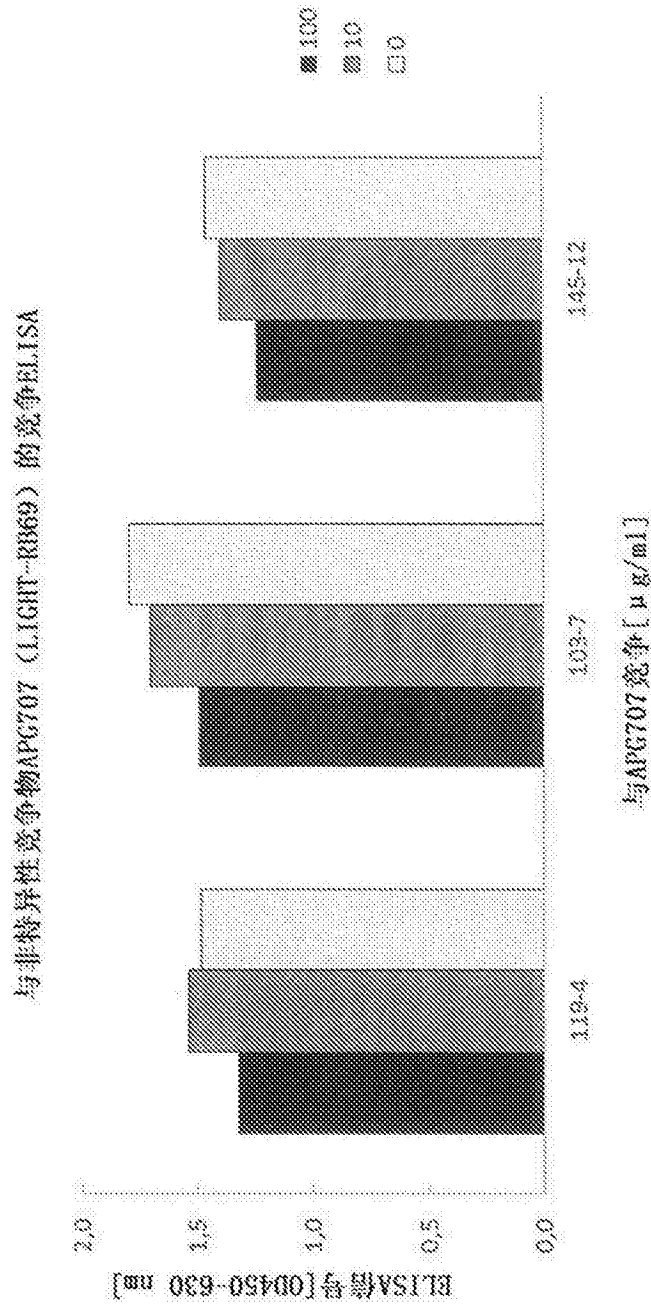


图6

亚克隆119-4、103-7和145-12对APG101与CD95L的结合的中和

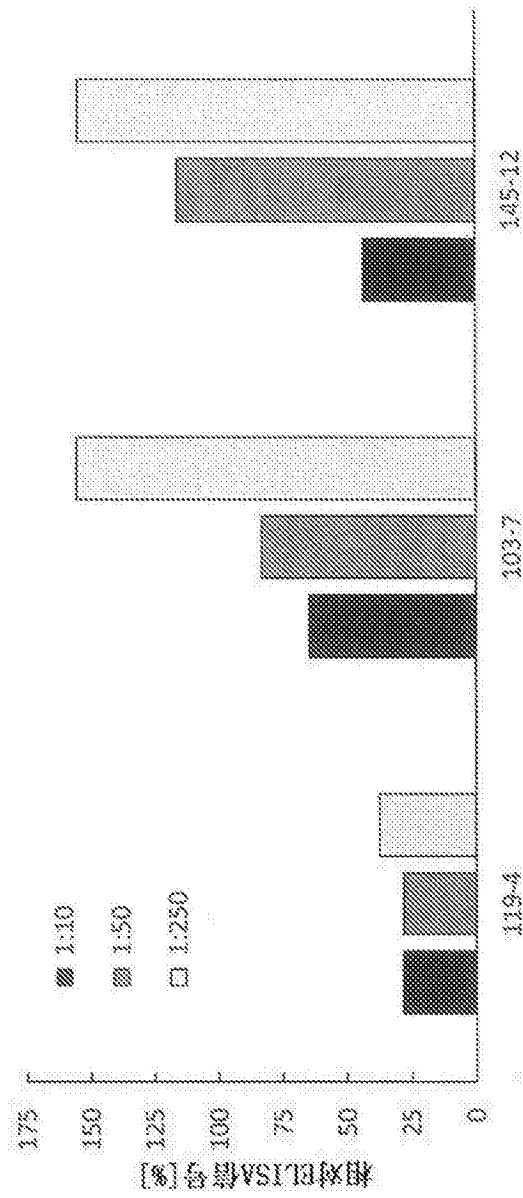


图7

ELISA评估亚克隆与来自三种不同物种的CD95L的结合

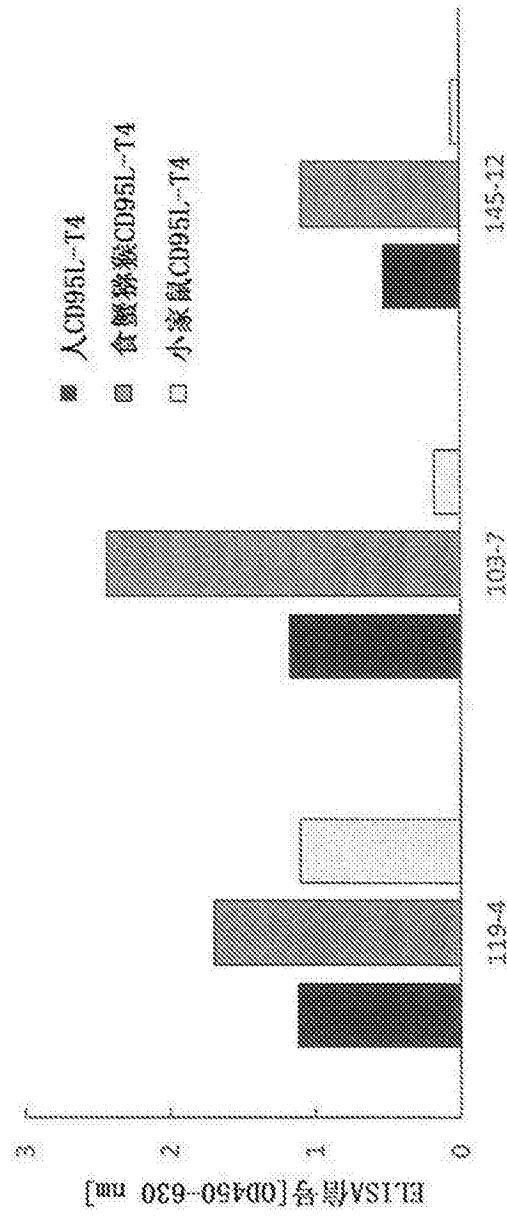


图8

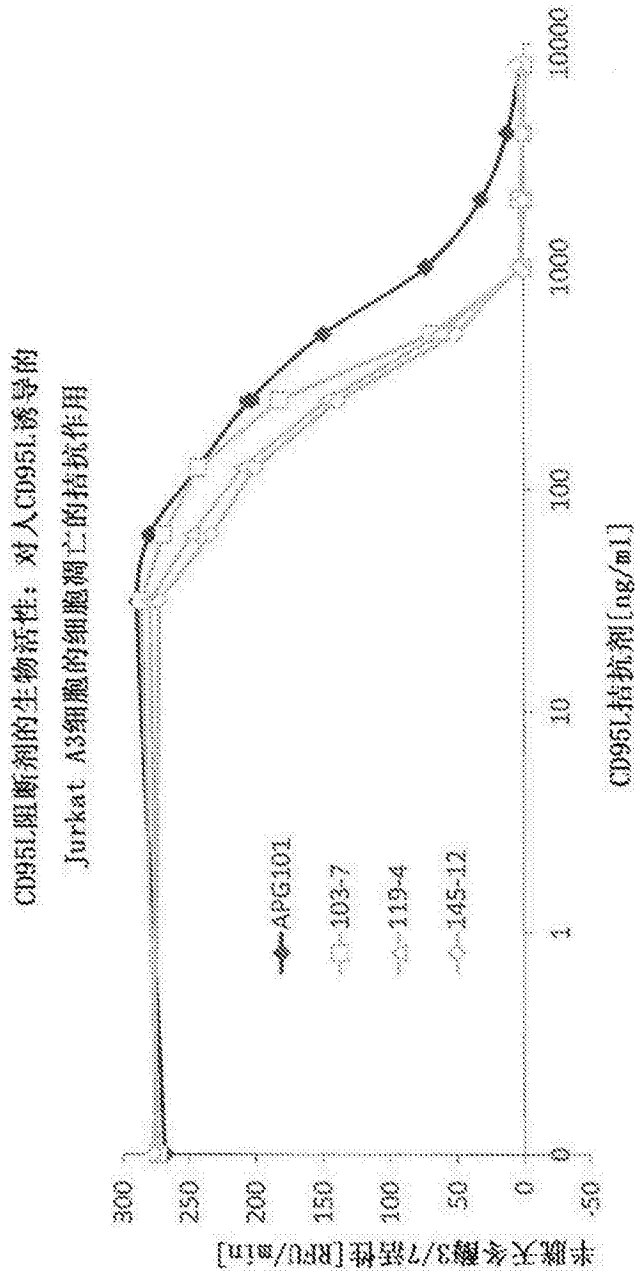


图9

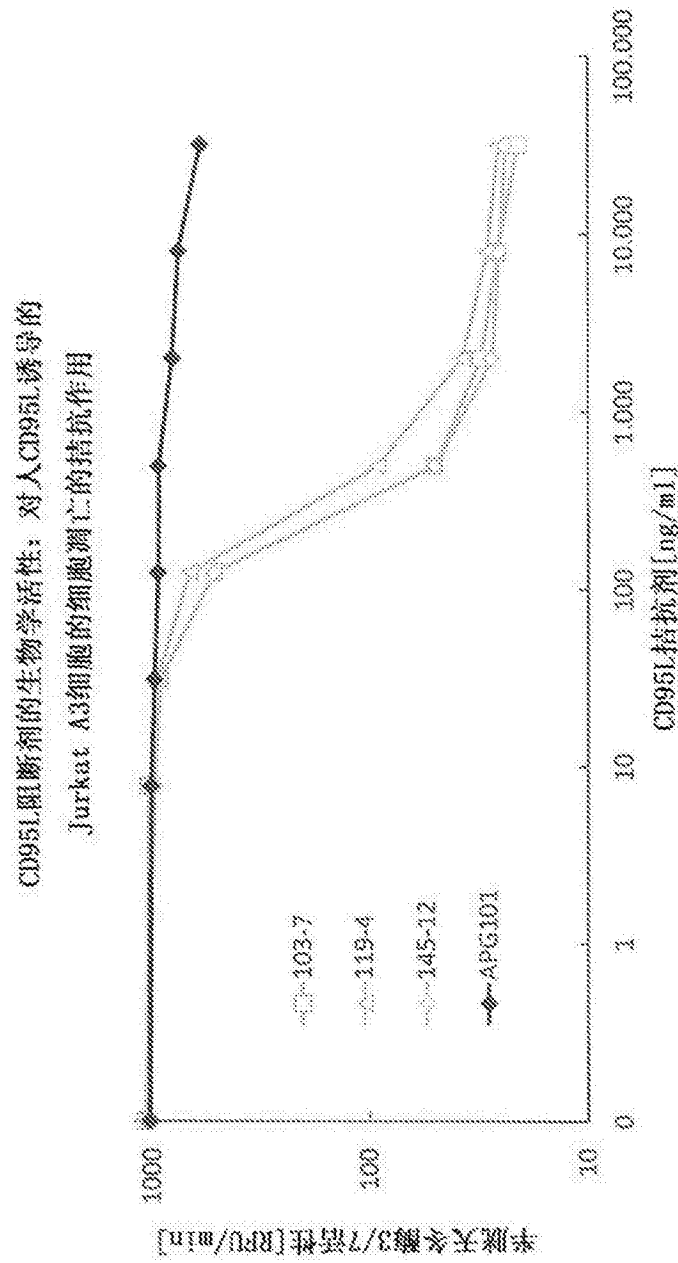


图10

CD95L阻断剂的生物学活性：对猴CD95L诱导的

Jurkat A3细胞的细胞凋亡的拮抗作用

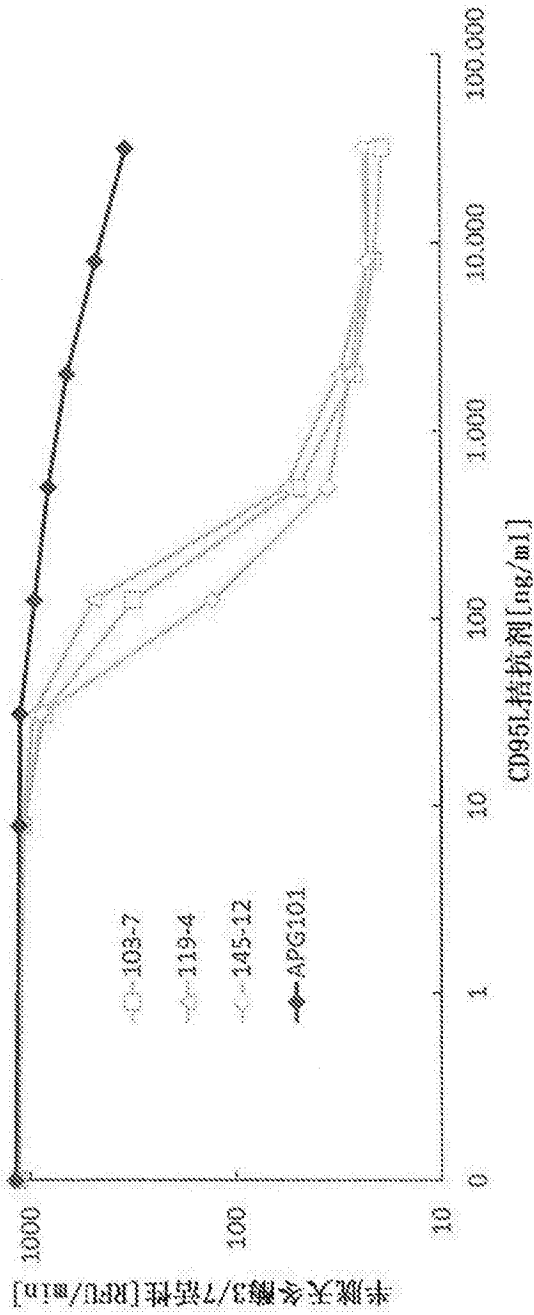


图11

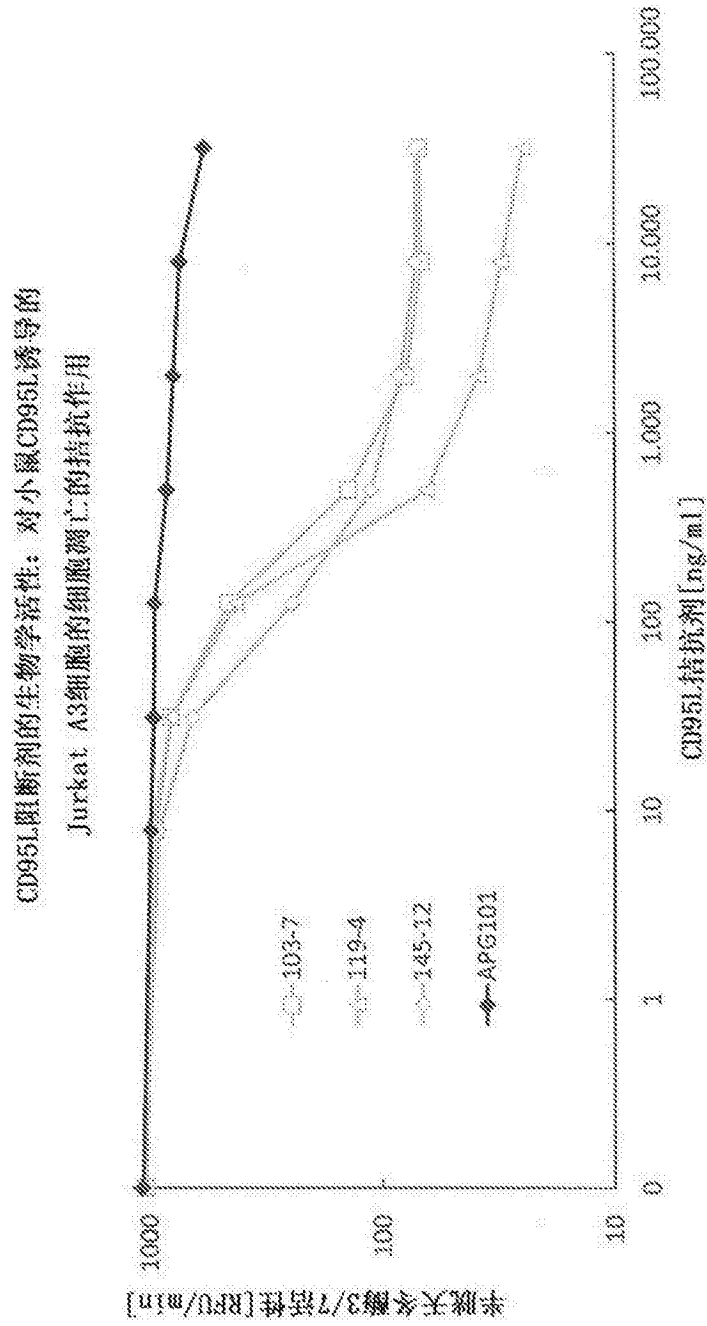


图12

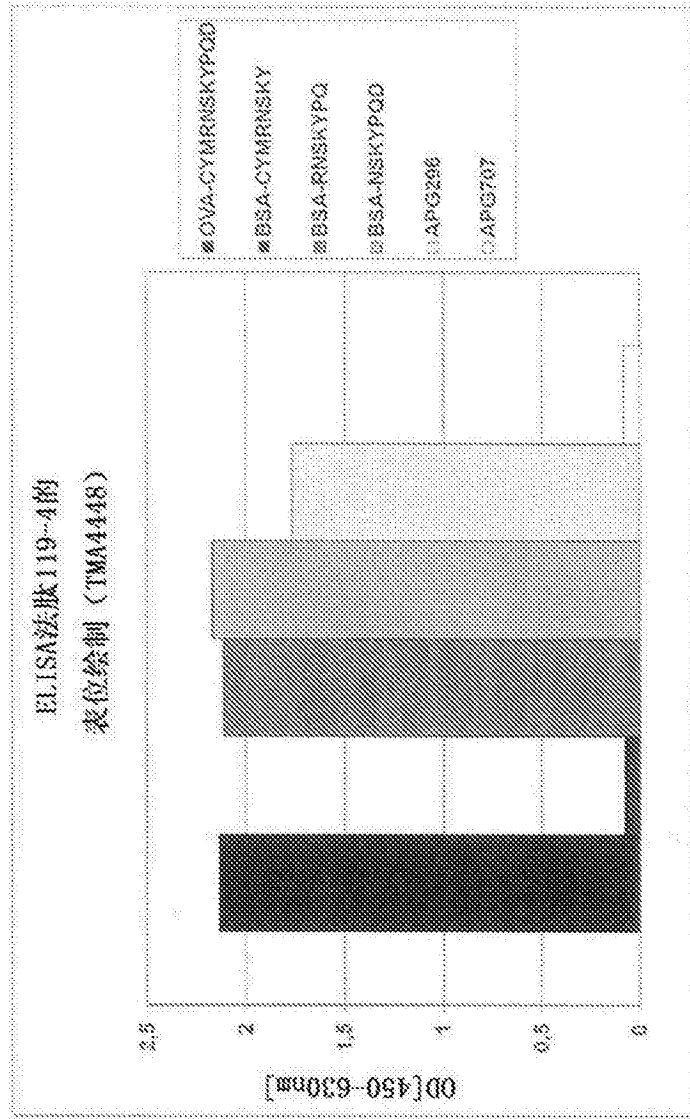


图13

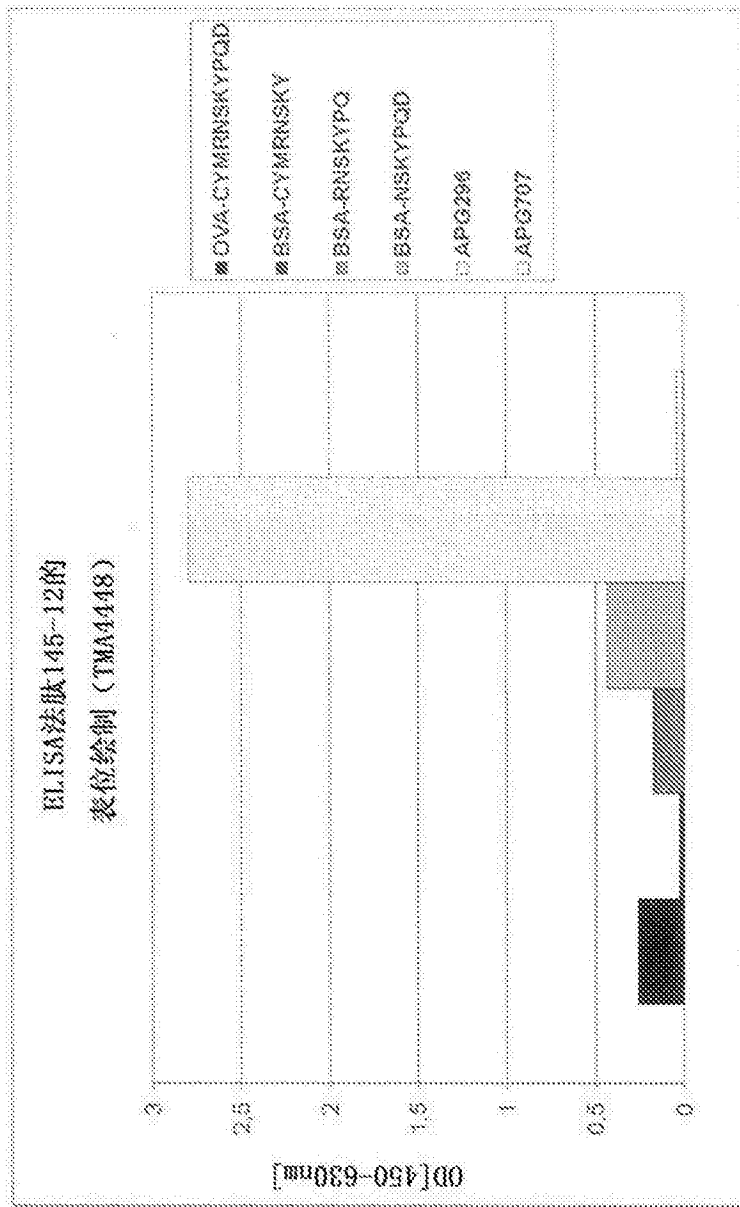


图14

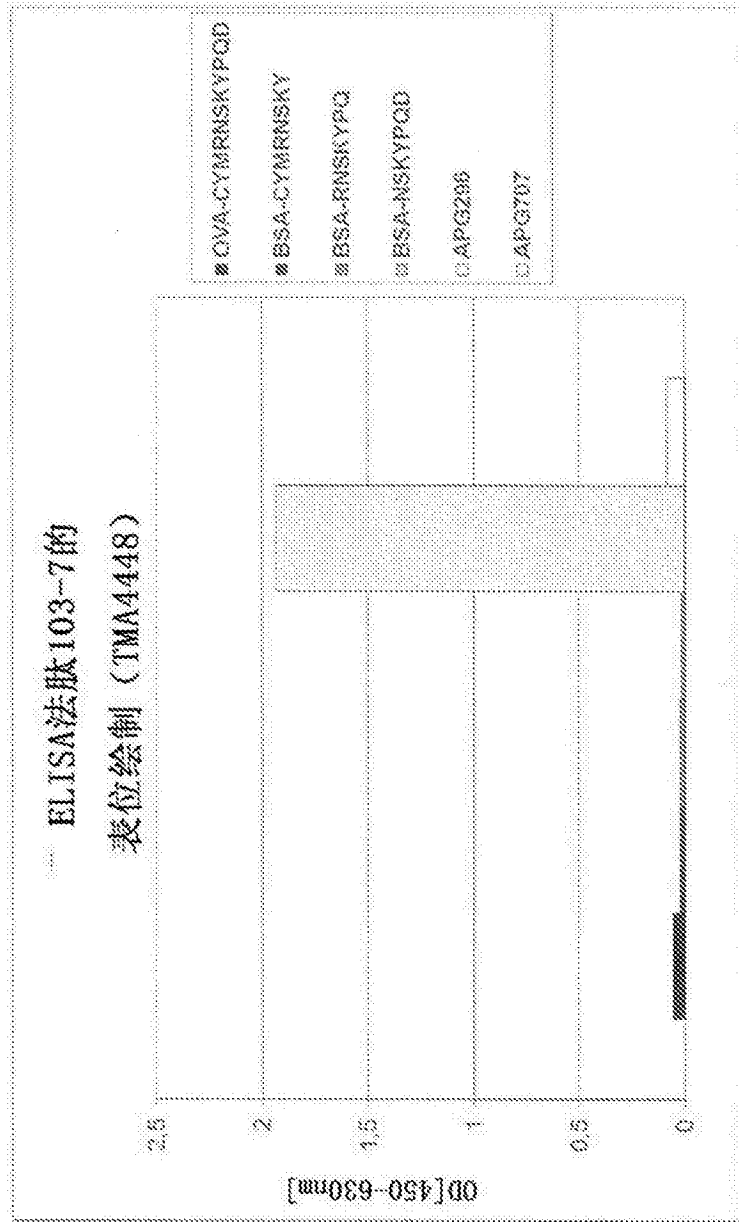


图15

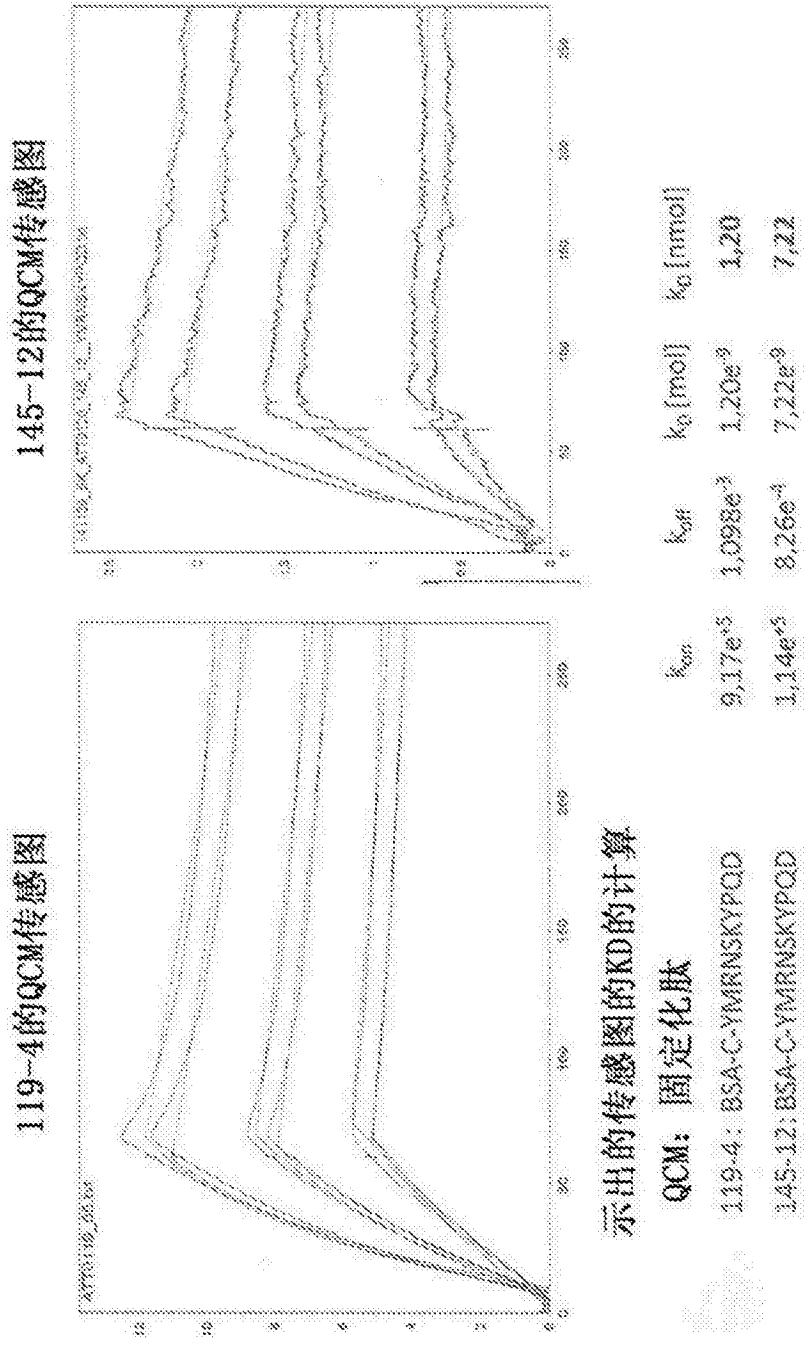


图16

克隆145-12的人源化可变重 (VII) 结构域
和人VII共有框架的比对

			H28	H31a
Hum III				
huVH145_A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	[SYAMS]	WVRQA
huVH145_B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFSFS	[SGYDMC]	WVRQA
huVH145_C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFSFS	[SGYDMC]	WVRQA
			H50	H71
Hum III				
huVH145_A	PKKGLEWVA	[VISGDSSTYYADSVKQ]	RFTISRDNSKNTLYL	
hu145-12B	PKKGLEWVA	[CIDTDNDATYYASWAKG]	RFTISKDSKNTLYL	
hu145-12C	PKKGLEWVA	[CIDTDNDATYYADsvNG]	RFTISKDSKNTLYL	
Hum III				
huVH145_A	QMSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGLVTVSS	
huVH145_B	QMSLRAEDTAVYYCAR	[TRGDYVAFKL]	WGQGLVTVSS	
huVH145_C	QMSLRAEDTAVYYCAR	[TRGDYVAFKL]	WGQGLVTVSS	

图17

克隆119-4的人源化可变重 (VH) 结构域
和人VH共有框架的比对

```

1
Hum III      H28      H35a
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[SYAMS]WVRQA
huVH119_A   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[DHYVMC]WVRQA
huVH119_B   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[DHYVMC]WVRQA
huVH119_C   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[DHYVMS]WVRQA

Hum III      H50      H71
FGKGLEWVA[VISDGGSTYYADSVKQ]RTTISKDSSKNTLYL
huVH119_A   FGKGLEWVA[CIYTADSDSYVASWAKG]RTTISKDSSKNTLYL
huVH119_A   FGKGLEWVA[CIYTADSDSYADavsvKQ]RTTISKDSSKNTLYL
huVH119_A   FGKGLEWVs[aIYTADSDSYADavsvKQ]RTTISKDSSKNTLYL

Hum III      QMNSLRAEDTAVYICAR[GRVGSLYDY]WGCGTLVTVSS
huVH119_A   QMNSLRAEDTAVYICAR[NGAYAGGPGYGD]WGCGTLVTVSS
huVH119_B   QMNSLRAEDTAVYICAR[NGAYAGGPGYGD]WGCGTLVTVSS
huVH119_C   QMNSLRAEDTAVYICAR[NGAYAGGPGYGD]WGCGTLVTVSS

```

图18

克隆119-4和克隆45-12的人源化可变轻(VL)结构域
和人VL共有框架的比对

```

1
hu_k1      DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC[KASQSLSNILA]WYQQK
hu119_4    DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC[KASQSIKTSLV]WYQQK
hu145_12   DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC[QSSQSVYKNDLS]WYQQK

hu_k1      PGKAPKLLIY[AASLES]GVPSRFSGSGCTFTLTSSLPQ
hu119_4    PGKAPKLLIY[KASDLP]GVPSRFSGSGCTFTLTSSLPQ
hu145_12   PGKAPKLLIY[QASKLAS]GVPSRFSGSGCTFTLTSSLPQ

hu_k1      EDFATYYC[QYNSLPWT]FCQGTKVEIKR
hu119_4    EDFATYYC[QSYDERDFTINNGHS]FCQGTKVEIKR
hu145_12   EDFATYYC[AGCYTASIYA]FCQGTKVEIKR
    
```

图19