



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111808190 A

(43)申请公布日 2020.10.23

(21)申请号 202010275368.4 *C12N 15/13*(2006.01)
(22)申请日 2020.04.09 *A61K 39/395*(2006.01)
(66)本国优先权数据 *A61P 35/00*(2006.01)
201910286677.9 2019.04.10 CN *A61P 35/02*(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 百奥泰生物制药股份有限公司
地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号A6栋第五
层

(72)发明人 岳海涛 林键 裴树军 梁世忠
李胜峰

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理
有限公司 11728
代理人 吕鹏云

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页
序列表27页 附图2页

(54)发明名称
结合PD-1的抗体

(57)摘要

本发明公开了结合PD-1的抗体,其包含一个或多个选自具有以下所示的氨基酸序列的CDR: SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18。这些抗体对PD-1具有高亲和力和低解离速率,并具有在体外中和PD-1的活性。本发明的抗体可以是全长抗体或是其抗原结合部分,其可以用于检测PD-1等用途。

1. 一种抗体或抗体片段,其包含一个、两个、三个、四个、五个或六个选自具有以下所示的氨基酸序列的CDR:SEQ ID NO:13、14、15、16、17和18。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其特征在于:所述抗体或抗体片段包含一个、两个或三个选自具有以下所示的氨基酸序列的重链CDR:SEQ ID NO:16、17和18;和/或,

所述抗体或抗体片段包含一个、两个或三个选自具有以下所示的氨基酸序列的轻链CDR:SEQ ID NO:13、14和15。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或抗体片段,其特征在于:所述抗体或抗体片段包含具有以下所示的氨基酸序列的轻链CDR:SEQ ID NO:13、14和15以及具有以下所示的氨基酸序列的重链CDR:SEQ ID NO:16、17和18。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的抗体或抗体片段,其特征在于:所述抗体或抗体片段为分离的抗体或抗体片段。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的抗体或抗体片段,其特征在于:所述抗体或抗体片段包含重链可变区和轻链可变区;其中

所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或,

所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的抗体或抗体片段,其特征在于:所述抗体或抗体片段进一步包含人 γ 4重链恒定区或其变体,和/或人 κ 轻链恒定区或其变体。

7. 一种抗体或抗体片段,其包含重链和轻链,所述重链包含如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述轻链包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

8. 权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段的变体,其包含一个、两个或三个保守替换的氨基酸取代。

9. 与权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求8所述的变体相关的生物材料,为如下B1)或B2):

B1) 编码权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求8所述的变体的核酸分子;

B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组细胞或重组微生物。

10. 根据权利要求9所述的生物材料,其特征在于: B1)所述核酸分子包含如下1)或2)或3)所示的核酸片段:

1) 如下DNA分子:

SEQ ID NO:1中第91-108位所示的核酸片段;

SEQ ID NO:1中第148-192位所示的核酸片段;

SEQ ID NO:1中第292-327位所示的核酸片段；
SEQ ID NO:2中第73-114位所示的核酸片段；
SEQ ID NO:2中第160-177位所示的核酸片段；
SEQ ID NO:2中第271-303位所示的核酸片段；
SEQ ID NO:1所示的核酸片段；
SEQ ID NO:2所示的核酸片段；
SEQ ID NO:73所示的核酸片段；或
SEQ ID NO:74所示的核酸片段；

2) 与1)限定的核酸片段杂交且编码权利要求1-6任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求7所述的变体的核酸片段；

3) 与1)或2)限定的DNA分子具有90%以上的同一性且编码权利要求1-6任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求7所述的变体的核酸片段。

11. 制备权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求8所述的变体的方法，所述方法包括：

在能使权利要求9中B1)所述的核酸分子表达的条件下于培养基中培养含有所述核酸分子的重组细胞，以制备所述抗体或抗体片段或变体。

12. 一种药物组合物，其包含权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求8所述的变体以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体或它们的混合物。

13. 权利要求1-7任一项所述的抗体或抗体片段或权利要求8所述的变体在制备如下任一所示的产品中的应用：

- (1) 检测PD-1的产品；
- (2) 刺激或提高免疫应答的产品；
- (3) 治疗癌症的产品。

结合PD-1的抗体

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及结合PD-1的抗体。

背景技术

[0002] 程序性死亡受体-1 (PD-1) 是在活化的T细胞、B细胞和髓样细胞上表达的免疫抑制性受体,是CD28免疫球蛋白超家族成员。PD-1为55kDa的I型跨膜糖蛋白,其含有与配体结合的Ig可变型结构域和负责结合信号转导分子的胞质尾区。PD-1胞质尾区含有两个基于酪氨酸的信号转导模体ITIM(免疫受体酪氨酸抑制基序)和ITSM(免疫受体酪氨酸转换基序)。

[0003] 现已鉴定了PD-1的两种配体,PD-L1和PD-L2,为组成型表达,或在多种细胞类型中可被诱导,这些细胞类型包括非造血组织以及各种肿瘤。PD-L1 在B细胞、T细胞、髓样细胞和树突状细胞上表达,但也在外周细胞(例如微血管内皮细胞)和非淋巴器官(如心脏、肺等)中表达。与此相反,PD-L2仅在巨噬细胞和树突状细胞中存在。

[0004] 在文献中已确定了PD-1在癌症中的作用。显示PD-1与其配体相互作用会负调节抗原受体信号转导,减弱T细胞应答。PD-1减弱调节T细胞应答的机制与CTLA-4有相似也有不同之处,因为这两种分子都调控重叠的一系列信号转导蛋白。PD-L1在多种人肿瘤中都很丰富(并在大多数PD-L1阴性肿瘤细胞系中可由IFN γ 诱导)。迄今有大量的研究显示PD-1和PD-L1之间的相互作用导致渗入肿瘤的淋巴细胞减少、T细胞受体介导的增殖减少和癌细胞的免疫逃避。阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用显示可增加T细胞增殖和细胞因子产生,提高肿瘤特异性CD8+T细胞的免疫性,因此,有助于免疫系统清除肿瘤细胞。

[0005] 通过免疫组织化学评估活组织检查业已在人的很多原发性肿瘤中发现 PD-1(在肿瘤浸润淋巴细胞上)和/或PD-L1(在肿瘤细胞上)。这样的组织包括肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、结肠癌、神经胶质瘤、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食道癌、胃癌、口腔鳞状细胞癌、尿道上皮细胞癌和胰腺癌以及头颈肿瘤的病变组织。PD-1配体在多种肿瘤类型的肿瘤细胞上的表达与癌症患者预后不良相关联。

[0006] 总之,PD-1/PD-L1途径是开发癌症治疗的抗体疗法的被充分证实的靶标。因此,需要识别PD-1的试剂和使用此类试剂的方法。

发明内容

[0007] 本发明提供一种结合PD-1的抗体或其片段。

[0008] 为了解决以上技术问题,在本发明的一个方面,提供一种抗体或抗体片段,其包含一个、两个、三个、四个、五个或六个选自包含具有以下所示的氨基酸序列的CDR:SEQ ID NO:13、14、15、16、17和18;或与其相比具有一个、两个或三个保守替换的氨基酸取代的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗体或抗体片段结合PD-1。

[0010] 在一些实施方案中,所述抗体或抗体片段结合人PD-1(hPD-1)。

[0011] 在一些实施方案中,所述抗体或抗体片段阻断hPD-L1(人PD-L1)与hPD-1的结合

和/或破坏hPD-1/hPD-L1介导的下游信号通路。

[0012] 在一些实施方案中,上述抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO:13的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第73-114位所示。

[0013] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 14的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第160-177位所示。

[0014] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 15的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第271-303位所示。

[0015] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 16的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第91-108位所示。

[0016] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 17的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第148-192位所示。

[0017] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 18的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第292-327位所示。

[0018] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含一个、两个或三个选自具有以下所示的氨基酸序列的重链CDR:SEQ ID NO:16、17和18;和/或,

[0019] 所述抗体或抗体片段包含一个、两个或三个选自具有以下所示的氨基酸序列的轻链CDR:SEQ ID NO:13、14和15。

[0020] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含具有以下所示的氨基酸序列的轻链CDR:SEQ ID NO:13、14和15 以及具有以下所示的氨基酸序列的重链CDR:SEQ ID NO:16、17和18。

[0021] 在一些实施方案中,所述抗体或抗体片段为分离的抗体或抗体片段。

[0022] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含重链可变区和轻链可变区;所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少90%,或至少95%,至少98%或者至少99%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或,所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,与SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列具有至少90%,或至少95%,至少98%或者至少99%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列,轻链可变区包含具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO: 7的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,编码SEQ ID NO:8的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0025] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段进一步包含人 γ 4重链恒定区或其变体和/或人 κ 轻链恒定区或其变体。

[0026] 为了解决以上技术问题,本发明还提供一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含重链和轻链,所述重链包含如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列,与SEQ ID NO:71所

示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述轻链包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列,与SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:71所示的重链和/或SEQ ID NO:72所示的轻链。

[0028] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:71所示的重链和SEQ ID NO:72所示的轻链。

[0029] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,编码SEQ ID NO:71的核苷酸序列如SEQ ID NO:73所示,编码SEQ ID NO:72的核酸序列如SEQ ID NO:74所示。

[0030] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段为人抗体或人抗体片段。

[0031] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体片段为Fab、Fv或scFv抗体。

[0032] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述抗体或抗体片段为单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0033] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或抗体片段中,所述变体包含至多20个、至多10个、至多5个或至多3个保守替换的氨基酸取代。

[0034] 为了解决以上技术问题,在本发明的另一个方面,还提供上述任一项所述的抗体或抗体片段的变体,其包含一个、两个或三个保守替换的氨基酸取代,同时保持与所述抗体或抗体片段相同的功能。

[0035] 为了解决以上技术问题,在本发明的另一个方面,还提供如下B1)或B2)的生物材料:

[0036] B1) 编码上述任一项所述的抗体或抗体片段或变体的核酸分子;

[0037] 所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或hnRNA等;

[0038] B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组细胞或重组微生物。

[0039] 该生物材料与上面所述的抗体或抗体片段或变体相关,比如可以用来产生上面所述的抗体或抗体片段或变体。

[0040] 在一些实施方案中,本发明提供包含如下1)或2)或3)所示的分子:

[0041] 1) 如下核酸片段:

[0042] SEQ ID NO:1中第91-108位所示的核酸片段;

[0043] SEQ ID NO:1中第148-192位所示的核酸片段;

[0044] SEQ ID NO:1中第292-327位所示的核酸片段;

[0045] SEQ ID NO:2中第73-114位所示的核酸片段;

[0046] SEQ ID NO:2中第160-177位所示的核酸片段;

[0047] SEQ ID NO:2中第271-303位所示的核酸片段;

[0048] SEQ ID NO:1所示的核酸片段;

[0049] SEQ ID NO:2所示的核酸片段;

[0050] SEQ ID NO:73所示的核酸片段;或

[0051] SEQ ID NO:74所示的核酸片段;

[0052] 2) 与1)限定的核酸片段杂交且编码上述任一项所述的抗体或抗体片段或变体的核酸片段;

[0053] 3) 与1)或2)限定的核酸片段具有90%以上的同一性且编码上述任一项所述的抗体或抗体片段或变体的核酸片段。

[0054] 上述核酸分子可用于上述的生物材料的一部分。

[0055] 这里使用的术语“同一性”可以用肉眼或计算机软件(比如Ausubel et al. eds. (2007)在Current Protocols in Molecular Biology中所述的软件程序)进行评价。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同一的。两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。多聚核苷酸序列或氨基酸序列与另一序列有具有一定百分比(例如90%、95%、98%或者99%)的“序列同一性”是指当序列比对时,所比较的两个序列中该百分比的碱基或氨基酸相同。

[0056] 在一些实施方案中,用抗PD-1抗体或抗体片段治疗可与放疗组合。放疗诱导癌细胞死亡,并增加用于呈递和激活免疫细胞的肿瘤抗原的有效性。

[0057] 在另一些实施方案中,用抗PD-1抗体或抗体片段治疗可与手术组合以从受治疗者中去除癌细胞。

[0058] 在其它实施方案中,抗PD-1抗体或抗体片段可与能同PD-1阻断产生协同作用的疗法组合,所述疗法包括用于激素消除或抑制血管生成的靶向药物,或靶向在肿瘤细胞中具有活性的蛋白质的靶向药物,所有这些均导致肿瘤细胞死亡增加和免疫刺激性肿瘤抗原的有效性提高。在与抗PD-1抗体或抗体片段联合的情况下,T细胞活化作用的提高可导致对癌症的持久免疫控制。

[0059] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抗体片段可与用于治疗癌症或感染性疾病的另一种治疗性抗体联合。提供的非限制性方案为抗PD-1与靶向 Her2/neu或靶向EGF受体的抗体的组合。在另一个非限制性方案中,抗PD-1 抗体或抗体片段与靶向VEGF或其受体的治疗组合。在另一个实施方案中,抗 PD-1抗体或抗体片段与抗CTLA-4抗体组合。在又一个非限制性方案中,抗 PD-1抗体与靶向RSV的抗体组合。

[0060] 在本发明的另一个方面,还提供制备上述任一所述的抗体或抗体片段或变体的方法,所述方法包括:

[0061] a. 在能使编码上述任一抗体或抗体片段或其变体的核酸分子表达的条件下于培养基中培养含有所述核酸分子的重组细胞,以制备所述抗体或抗体片段或变体。

[0062] 在一些实施方案中,所述方法还包括:

[0063] b. 从所述重组细胞或培养基中回收所述抗体或抗体片段或变体。

[0064] 在本发明的另一个方面,还提供上述任一项所述的抗体或抗体片段或变体在制备如下任一所示的产品中的应用:

[0065] (1) 检测PD-1的产品;

[0066] (2) 刺激或提高免疫应答的产品;

[0067] (3) 治疗癌症的产品。

[0068] 在一些实施方案中,检测PD-1的产品为检测hPD-1的产品,例如体外检测hPD-1在特定的细胞、组织或血清中的表达的产品,或体内检测hPD-1的产品。

[0069] 在一些实施方案中,在刺激或提高免疫应答的产品中,免疫细胞与抗原和所述抗体或抗体片段或变体接触,以便提高刺激或提高对抗原的免疫应答。

[0070] 在一些实施方案中,所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答。

[0071] 在一些实施方案中,在治疗癌症的产品中,所述癌症为黑素瘤(例如恶性转移性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难控制的前列腺腺癌)、胰腺腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤和其它恶性肿瘤。

[0072] 在本发明的另一个方面,还提供一种药物组合物,其包含上述任一项所述的抗体或抗体片段或变体作为治疗活性成分以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体或它们的混合物。

[0073] 在本发明的另一个方面,还提供治疗癌症比如上述癌症的方法,该方法包括对需要其的个体给予有效剂量的本发明所述的抗体或抗体片段或变体或药物组合物,所述个体可以是(比如)啮齿目动物、犬科动物、猪、灵长目动物或人。

[0074] 在一些实施方案中,本发明提供的抗体或抗体片段与hPD-1结合并表现出较多优良特性,这些特性包括以下方面:

[0075] 1、本发明提供的抗体或抗体片段与hPD-1高亲和力结合,可调控免疫应答。具体地,本发明的抗体或抗体片段可以以约20pM或更低的KD结合 hPD-1。

[0076] 2、本发明提供的抗体或抗体片段可以以约 1.98×10^6 1/Ms或更快的 $k_{结合}$ 结合hPD-1。

[0077] 3、本发明提供的抗体或抗体片段可以以约 4.11×10^{-5} 1/s或更慢的 $k_{解离}$ 结合 hPD-1。可用生物膜层光学干涉测量法(例如ForteBio Octet法)来测量解离常数,也可以用表面等离子共振技术(例如Biacore)来测量解离常数。

[0078] 4、本发明提供的抗体或抗体片段还可以以约1nM或更低的IC₅₀阻断 hPD-L1与hPD-1的结合。可用本领域任何已知的方法测量配体结合的阻断情况并计算IC₅₀,例如FACS法。

[0079] 5、本发明提供的抗体或抗体片段可以通过阻断hPD-1与hPD-L1的结合来破坏hPD-1/hPD-L1介导的下游信号通路。

附图说明

[0080] 图1为在蛋白ELISA中抗hPD-1抗体与纯化的hPD-1剂量依赖性结合的曲线图。

[0081] 图2为描述由生物膜层光学干涉测量法(Biolayer Interferometry)测定的 CL1抗体的 $k_{结合}$ 和 $k_{解离}$ 的曲线图。其中,各曲线代表不同浓度的CL1抗体与hPD-1结合的动态过程。

[0082] 图3为流式细胞术检测CL1抗体对hPD-1/hPD-L1结合的阻断。

[0083] 图4为PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay检测抗hPD-1抗体的功能活性。

具体实施方式

[0084] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0085] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0086] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0087] 缩写和定义

[0088] 除非另作说明,下列术语应当具有下文所述的含义。其他术语或缩写具有本领域公知的含义。

[0089] “抗体”是指表现所需生物学活性(例如抑制配体与其受体的结合或通过抑制配体诱导的受体信号转导)的抗体的任何形式。因此,“抗体”以其最广泛的意义来使用,并明确包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多特异性抗体(例如双特异性抗体)、全人源、人源化、灵长类化、嵌合抗体,单链抗体等。

[0090] “抗体片段”指抗体的一部分,例如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。不管其结构如何,抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体。术语“抗体片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

[0091] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0092] “Fc区”含有包含抗体的CH2和CH3结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。

[0093] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0094] “单链Fv抗体”(或“scFv抗体”)是指包含抗体的VH和VL结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般而言,Fv多肽另外在VH和VL结构域之间包含多肽接头,该接头使得scFv能形成用于抗原结合的所需结构。对于scFv综述,可参见美国专利第6423538号。

[0095] 本领域技术人员将会理解,抗体重链的类别包括gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ),其中还有一些亚类(例如 γ 1- γ 4)。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已被充分表征并且赋予的功能特异性也已知。所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。在一些实施方案中,免疫球蛋白分子为IgG种类。IgG通常包含分子量约23,000道尔顿的两条相同的轻链多肽和分子量约为53,000-70,000的两条相同的重链多肽。这四条链通过二硫键以“Y”构型连接,其中轻链从“Y”口开始并延续通过可变区包围重链。IgG4形式的抗体为IgG的一种亚类,其重链为 γ 4亚型。在一些实施方案中,本发明公开的抗体为IgG4。

[0096] “超变区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。超变区包含以下氨基酸残基:来自序列比对所界定的“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“构架”残基或“FR”残基为除本文定义的超变区残基之外的可变结构域残基。

[0097] 本发明公开的抗体可以来源于任何动物,包括鸟类和哺乳动物。较佳地,抗体是人源、鼠源、驴源、兔源、山羊源、骆驼源、美洲驼源、马源或鸡源抗体。在另一实施方案中,可变区可以是软骨鱼纲(condricthoid)来源(例如来自鲨鱼)。“人抗体”为其氨基酸序列对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体,和/或业已用任何用于制备本文所示的人抗体的技

术制备的抗体。该定义明确排除了包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。

[0098] “分离的抗体”为与全部或部分的天然环境组分分离的抗体。其天然环境的污染组分是干扰所述抗体的诊断性或治疗性应用的物质，可包括酶、激素和其它蛋白质溶质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中，将所述抗体纯化到以下程度：(1) 超过95%重量的抗体，如超过99%重量，其由Lowry法测定；(2) 足以通过用旋杯式测序仪获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度；或(3) 通过在还原或非还原条件下用考马斯蓝或银染色的SDS-PAGE确定为同质。分离的抗体包括在重组细胞内的原位的抗体，因为抗体自然环境中的至少一种组分将不存在。分离的抗体通常由至少一个纯化步骤制备。在一些实施方案中，分离的抗体的纯度至少为约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%，或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点) 或其中任何值。

[0099] “核酸”或“多核苷酸”是指由单个核苷酸：腺嘌呤(a)、胞嘧啶(c)、鸟嘌呤(g)、胸腺嘧啶(t) (或RNA中的尿嘧啶(u)) 组成的聚合物分子，例如DNA, RNA或其修饰。核酸分子可以是天然的核酸分子或合成的核酸分子或一种或多种天然的核酸分子与一种或多种合成的核酸分子的组合。核酸的实施例包括但不限于：基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。

[0100] “分离的核酸分子”为被鉴定并与至少一种污染性核酸分子分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于其天然存在的形式或环境。因此，分离的核酸分子与在其天然细胞中存在的核酸分子有区别。然而，分离的核酸分子包括在如常表达抗体的细胞中所含的核酸分子，例如，所述核酸分子所处的染色体位置不同于天然细胞的染色体位置。

[0101] “单克隆抗体”是指从基本上同种抗体群中获得的抗体，构成所述群的各个抗体是一致的。单克隆抗体具有高度特异性，可针对单个的抗原位点。此外，与通常包括针对多个不同的决定簇(表位)的多种不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物相反，每种单克隆抗体仅针对抗原上的单个决定簇。

[0102] “免疫细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞包括：B淋巴细胞和T淋巴细胞；天然杀伤细胞；单核细胞、巨噬细胞、嗜酸细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。

[0103] 本文所用序列“变体”是指在一个或多个氨基酸残基处不同于所示的序列但保留所得到的分子的生物学活性的序列。

[0104] “氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物，比如 α -氨基酸，其可直接或以前体的形式由核酸编码。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。相同氨基酸可由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(三字母代码:ala, 一字母代码:A)、精氨酸(arg, R)、天冬酰胺(asn, N)、天冬氨酸(asp, D)、半胱氨酸(cys, C)、谷氨酰胺(gln, Q)、谷氨酸(glu, E)、甘氨酸(gly, G)、组氨酸(his, H)、异亮氨酸(ile, I)、亮氨酸(leu, L)、赖氨酸(lys, K)、甲硫氨酸(met, M)、苯丙氨酸(phe, F)、脯氨酸(pro, P)、丝氨酸(ser, S)、苏氨酸(thr, T)、色氨酸(trp, W)、酪氨酸(tyr, Y)和缬氨酸(val, V)。

[0105] “保守替换的变体”或“保守替换的氨基酸取代”是指本领域技术人员已知的氨基

酸取代,进行这种取代通常不改变所得到的分子的生物学活性。一般而言,本领域技术人员公认在多肽非必需区的单个氨基酸取代基本上不改变生物学活性。保守替换可以是由含有化学性质相似侧链的氨基酸取代,比如:1) 脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2) 脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸。

[0106] 本文所用术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。或者,“约”可意味着至多 $\pm 20\%$ 的范围,比如 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 范围。除非另外说明,否则当具体值在本申请和权利要求中出现时,“约”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

[0107] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时,“特异性”结合是指在蛋白和/或其它生物试剂的异质群体中确定是否存在所述蛋白例如PD-1的结合反应。因此,在所指定的条件下,特定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合,并且并不以显著量与样品中存在的其它蛋白结合。特异性结合可以用平衡解离常数(KD)来描述,较小的KD意味着较紧密的结合。确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域内众所周知的,并包括例如平衡透析、表面等离子共振、生物膜层光学干涉测量法等。“特异性结合”PD-1的抗体包括与PD-1平衡解离常数KD小于或等于约100nM、小于或等于约10nM、小于或等于约5nM、或小于或等于约1nM的抗体。

[0108] 本文所用术语“生物材料”包括但不限于核酸分子、表达盒、重组载体、重组细胞或重组微生物。

[0109] 当用“给予”和“治疗”提及动物、人、实验对象、细胞、组织、器官或生物液时,是指将外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受治疗者、细胞、组织、器官或生物液接触。“给予”和“治疗”可指例如治疗方法、药理学方法、诊断方法、研究方法和实验方法。治疗细胞包括让试剂与细胞接触以及让试剂与流液接触,其中所述流液与细胞接触。“给予”和“治疗”还意味着例如通过试剂、诊断剂、结合组合物或通过其他细胞对细胞进行体外和离体治疗。

[0110] 本文所用“抑制”或“治疗(treat或treatment)”包括延缓与疾病有关的症状的发展和/或减轻所述疾病将要或预期发展的这些症状的严重程度。所述术语还包括减缓已有症状、防止另外的症状和减缓或防止这些症状的潜在原因。因此,所述术语表示业已将有有益结果赋予患有疾病的脊椎动物对象,比如人。

[0111] 本文所用术语“治疗有效量”或“有效量”是指当将抗PD-1抗体或其片段单独给予或与另外的治疗剂联合给予细胞、组织或受治疗者时,其有效防止或减缓待治疗的疾病或病症的量。治疗有效剂量进一步指所述抗体或其片段足以导致症状减缓的量,所述减缓症状例如为治疗、治愈、防止或减缓相关医学状态,或提高对所述病症的治疗率、治愈率、防止率或减缓率。对具体受治疗者的有效量可视多种因素而变化,例如待治疗的疾病、患者的整体健康状况、给药的方法途径和剂量及副作用的严重性。有效量可为避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。当施用给个体单独给予的活性成分时,治疗有效量是指该单独的成分。当施用组合时,治疗有效量是指产生治疗效果的活性成分的联合的量,而不论其是联合给予、连续给予还是同时给予。治疗有效量将减轻症状通常至少10%;通常至少

20%；优选至少约30%；更优选至少40%和最优选至少50%。在一些实施方案中，将抗PD-1抗体或者其片段的有效量为0.01mg~1g。在一些实施方案中，将抗PD-1抗体或者其片段的有效量为10mg~750mg。本文所述抗体可以通常方法途径给药，比如静脉或皮下注射。

[0112] 单克隆抗体

[0113] 可根据本领域知识和技能来制备针对PD-1的单克隆抗体，抗体或抗体片段可分离自scFv酵母呈现文库。

[0114] 用常规方法便可容易地分离编码单克隆抗体的DNA并测定其序列。所述DNA一经分离便可将其置于表达载体中，然后将该载体转染到宿主细胞中以实现重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成，所述宿主细胞例如有大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不会另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。抗体的重组制备将在下文更详细地阐述。

[0115] 嵌合抗体

[0116] 还可对抗体DNA进行修饰，例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源性鼠序列，或通过使编码免疫球蛋白的序列与编码非免疫球蛋白物质(例如蛋白质结构域)的全部或部分序列共价连接。通常用所述非免疫球蛋白物质取代抗体的恒定结构域，或被取代抗体的一个抗原结合位点的可变结构域，以产生二价嵌合抗体，所述二价嵌合抗体包含对抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同的抗原具有特异性的另一抗原结合位点。

[0117] 抗体纯化

[0118] 当使用重组技术时，抗体可产生在细胞内、周质空间或直接分泌到培养基中。若抗体在细胞内或周质空间产生，在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯基甲基磺酰氟(PMSF)存在下在约30分钟内使细胞泥浆冻融，通过离心去除细胞碎片。当抗体分泌到培养基中时，可以首先用市售的蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自所述表达系统的上清液。可在任何前述步骤中使用蛋白酶抑制剂(例如PMSF)以抑制蛋白水解，可使用抗生素以防止外来污染物生长。

[0119] 可用例如羟基磷灰石、凝胶电泳、透析和亲和色谱从细胞制备抗体组合物，并且亲和色谱是优选纯化技术。蛋白A是否适合作为亲和配体，取决于抗体中存在的免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。可将蛋白A用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等，1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13)。亲和配体所依附的基质通常为琼脂糖，也可利用其它基质。机械稳定的基质例如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基苯)，可比琼脂糖能获得的流速更快且处理时间更短。当抗体包含CH3结构域时，用Bakerbond ABXTM树脂来纯化。根据待回收的抗体，还可利用其它蛋白质纯化技术，例如离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)色谱法、色谱聚焦法和SDS-PAGE。

[0120] 本发明抗体及抗体片段的治疗应用

[0121] 与PD-1特异性结合的本发明抗体或抗原结合片段可用于刺激或提高免疫应答。本发明抗体及抗体片段尤其适用于治疗罹患可通过提高T细胞介导的免疫应答来治疗的疾病的受治疗者。在一些实施方案中，受治疗者包括需要提高免疫应答的人患者。

[0122] 在一些实施方案中，本发明还提供一种通过增加T细胞介导的免疫应答来治疗疾病的方法。所述方法包括向有需要的患者施用本发明所述的有效治疗量的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，所述通过增加T细胞介导的免疫应答来治疗的疾病为癌症。

[0123] 癌症

[0124] 本发明抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症(即抑制肿瘤细胞的生长或存活)。在一些实施方案中,可用本发明抗体抑制其生长的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症,但还包括迄今与免疫疗法尚无关联的癌症。在一些实施方案中,用于治疗癌症的非限制性方案包括黑素瘤(例如恶性转移性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难控制的前列腺腺癌)、胰腺腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤和其它恶性肿瘤。另外,本发明包括可用本发明抗体或抗原结合片段抑制其生长的难治性或复发性癌。

[0125] 本发明抗体及抗体片段的非治疗性应用

[0126] 非治疗性应用的抗PD-1抗体商品已经存在,比如由R&D Systems of Minneapolis, MN, USA所售的Mab1086抗hPD-1单克隆抗体,可用于流式细胞术、Western Blot和ELISA。本发明抗体可用于Mab1086所提供的任何非治疗目的。

[0127] 本发明抗体可用于诊断测定,例如用于检测PD-1在特定的细胞、组织或血清中的表达。为了诊断应用,通常用可检测的部分(直接或间接)标记抗体。可利用众多标记物,其通常分为以下类别:生物素、荧光染料、放射性核苷酸、酶、碘和生物合成标记物。

[0128] 本发明抗体还可用于体内诊断测定。通常用放射性核素(例如¹¹¹In、⁹⁹Tc、⁴C、¹²⁵I、³H、³²P、³⁵S或¹⁸F)标记抗体,以使可用免疫显像(immunoscintigraphy)或正电子成像术定位抗原或表达抗体的细胞。

[0129] 药物组合物

[0130] 本发明还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效剂量的抗体或抗体片段以及药学上可接受的载体。

[0131] 在一些实施方案中,术语“药学上可接受的载体”是指由政府的监管机构批准的或其他公认的药典中列出的用于动物(特别是用于人类)的物质。此外,“药学上可接受的载体”通常将是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂助剂。

[0132] 术语“载体”是指与活性成分一起使用的用于治疗稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这此类药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施方案中,当药物组合物静脉内给药时,载体可以是水。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物载体的实例在E.W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述,在此通过引用并入本发明。此类组合物将含有临床有效剂量的抗体或抗体片段,连同合适的载体,以提供适合于患者的给药形式。该制剂应该适用于给药模式。制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0133] 在一些实施方案中,根据常规步骤将组合物配制成适合静脉内注射于人体的药物组合物。用于静脉内给药的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。药物组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因,从而缓解注射部位的疼痛。一般而言,有效成分以单位剂量形式单独供给或混在一起供给,如以干燥的冻干粉末或无水浓缩物的形式装在可指示活性剂份量的密封容器(如安瓿瓶或小袋)中。在通过输注施用组合物的情况下,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶来分装组合物。在通过注射施用组合物的情况下,可

以使用注射用的无菌水或盐水的安瓿瓶,使得可以在施用之前混合有效成分。

[0134] 本发明的抗体或抗体片段包括其盐的形式。药学上可接受的盐包括衍生自如与盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐,以及衍生自如与钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0135] 试剂或材料

[0136] hPD-1为北京义翘神州科技有限公司产品,产品目录号为10377-H03H-B。

[0137] hIgG为金斯瑞生物科技有限公司产品,产品目录号为A01006。

[0138] 表达hPD-1的Jurkat细胞为Promega公司产品,产品目录号为J1252。

[0139] 未标记的hPD-L1为北京义翘神州科技有限公司产品,产品目录号为 10084-HNAH。

[0140] PE标记的山羊抗人Fc为Thermofisher公司产品,产品目录号为 12-4998-82。

[0141] CHO-K1细胞为Promega公司产品,产品目录号为J1252。

[0142] F-12为Thermofisher公司产品,产品目录号为11765062。

[0143] Bio-Glo Luciferase Assay System为Promega公司产品,产品目录号为 G7940。

[0144] 实施例1:抗hPD-1抗体的制备及其序列测定

[0145] 首先根据人淋巴细胞mRNA制备人VL和VH cDNA,再由此制备scFv 酵母呈现文库,通过筛选该文库分离本文公开的CL1和CL1相关抗体。本领域已知道制备和筛选这种文库的方法学。可以在以下文献中找到特别适用于制备和筛选抗体呈现文库的方法和试剂:例如Wittrup等的美国专利6423538号。

[0146] 用基因测序方法,测定编码由酵母表达的scFv可变区的DNA序列。用 Seqman分析用于每个克隆的每个测序反应结果。序列在序列表中公开并在表 1中列出。

[0147] 表1本发明抗hPD-1抗体的DNA或氨基酸序列

[0148]

SEQ ID NO:	说明	序列
1	CL1 重链 可变区 (DNA)	caggTgcagctggTgcagTccggcgtggaggtgaagaagcctggcgcagcgtgaaggtgtcctg taaggccagcggctacaccttaccaatfactatatgtattgggtgcggcaggcccccggcagggga ctggagtggatgggagggcatcaatcccagcaacggcggcaccacttcaatgagaagttaagaac cgggtgacctgaccaccgatagcagcaccaccaccgcttacctggagctgaagagcctgcagttt gacgataccgctgtgtactatfgcgtgccccgggatcaggctggacatgggcttcgagttctggggc cagggcaccaccgtgaccgtgtccagc
2	CL1 轻链 可变区 (DNA)	gagatcgtgctgaccagTccccgctaccctgagcctgtccccggagagcgggctaccctgtctt gtcgggctccaaggcgtgagcaccagcggatactctatctgactggTaccagcagaagccccg gccaggctcccaggctgctgatctacctggcttctacctggagagcggcgtgcccgctaggttag cggcagcggcagcggaaaccgatttaccctgacctcagctcctggagcccaggattttgccgt gtactactccagcagcgttacgacctgcccctgaccttggcggcggcaccaggTggagatcaag
3	CL5 重链 可变区 (DNA)	caagttcaattagTccaaagtggTgtcgaagtaaagaagccaggTgcctcagTcaaaagtcagttgtaa agcctcaggttatacttacaactactacatgTactgggttagacaagccccaggTcaaggtttgga atggatgggtggTatcaatccttcaaacggTggcaccactcaacgaaaagTcaagaacagagtaa ctttgactacagattcttcaaccactacagcatacTggaattgaaatctttacaattcgatgacacagct gtttactactgtgcagcgcgtgattacagattcgacatgggtttcgaatactggggtcaaggtaccact gttactgtctctct
4	CL5 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtcttgactcaatctccagctacattgtcttaagtctgTgaaagagccacattgtcatgcag agcttccaaaggTtatctacctcaggttactcttacttgcattgTatcaaaaaagccaggTcaagca cctagattgTgatctacttggcagTtacttggaaictggtgttccagctagattttccggtagTggttctg gtactgacttcacattgaccatacttattagaacctgaagatttcgagctctattactgccaacattcta tgacctccacttacattcggaggtgtacaaggTtagaaataaaa
5	CL9 重链 可变区 (DNA)	caagttcaattagTccaaagtggTgtcgaagtaaagaagccaggTgcctcagTcaaaagtcagttgtaa agcctcaggttatacttacaactactacatgTactgggttagacaagccccaggTcaaggtttgga atggatgggtggTatcaatccttcaaacggTggcaccactcaacgaaaagTcaagaacagagtaa ctttgactacagattcttcaaccactacagcatacTggaattgaaatctttacaattcgatgacacagct

[0149]

		ggttactactgtgcagcacgtgattacaaattcgacatgggttcgaattctggggcaaggtaccactg ttactgtctcctct
6	CL9 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtcttgactcaatctccagctacattgtcctaagtctggtgaaagagccacattgtcatgcag agcttccaaaggtgatctacctcagggtactcttacttgattggtatcaaaaaagccagggtcaagca cctagattgtgatctactggccagttactggaatctggtgtccagctagattttccggtagtgggtctg gtactgacttcacattgaccatacttcattagaacctgaagattcgcagctctattatgccaacattccta tggcctccagttacattcgggtgggtacaaaaggtagaaataaaa
7	CL1 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKRFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYRLDMGFYWGQGTTVTVSS
8	CL1 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESVGPARGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYY CQHAYDLPLTFGGGTKVEIK
9	CL5 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKRFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEYWGQGTTVTVSS
10	CL5 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESVGPARGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYY CQHSYDLPLTFGGGTKVEIK
11	CL9 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKRFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYKFDMGFEYWGQGTTVTVSS
12	CL9 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESVGPARGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYY CQHSYGLPVTFGGGGTKVEIK
13	CL1 轻链 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH

[0150]

14	CL1 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
15	CL1 轻链 CDR3 (AA)	YCQHAYDLPLT
16	CL1 重链 CDR1 (AA)	NYYMYW
17	CL1 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTFNEKF
18	CL1 重链 CDR3 (AA)	ARDYRLDMGFEF
19	CL5 轻链 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
20	CL5 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
21	CL5 轻链 CDR3 (AA)	YCQHSYDLPLT
22	CL5 重链 CDR1 (AA)	NYYMYW
23	CL5 重链	GINPSNGGTFNEKF

[0151]

	CDR2 (AA)	
24	CL5 重链 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFY
25	CL9 轻链 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
26	CL9 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
27	CL9 轻链 CDR3 (AA)	YCQHSYGLPVT
28	CL9 重链 CDR1 (AA)	NYYMYW
29	CL9 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTFNEKF
30	CL9 重链 CDR3 (AA)	ARDYKFDMGFY
31	CL2 重链 可变区 (DNA)	caagttcaattagtc ca aagtgggtgcgaagtaaagaagccaggtgcctcagtcaagtcagttgtaa agcctcaggttatacat tt acaaactactacatgtactgggttagacaagccccaggtcaaggttggga atggatgggtggtatcaatccttcaaacggtggcaccac ct caacgaaaagtcaagaacagagtaa cttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatcttacaattcga tg acacagct gttactactgtgcagcccgtgattacaaatcgacatgggttcgagtactgggtcaaggtaccactg

[0152]

		ttactgtctcctct
32	CL2 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtcttgactcaatcctccagctacattgccttaagtctggtgaaagagccacattgcatgcag agcttccaaaggtgatctacctcagggtactcttacttgcatgggatcaacaaaagccagggtcaagca cctagattgtgatctactggccagttactggaaatctggtgtccagctagatttccggtagtggttctg gtactgacttcacattgaccatattctcattagaacctgaagattcgcagctctatttggcaacattccta tggcttccacttacattcgggtgggtacaaaggtagaataaaaa
33	CL7 重链 可变区 (DNA)	caagttcaattagtcxaaagtggtgtcgaagtaaagaagccaggtgcctcagtcxaaagtcagttgtaa agcctcaggttatacatattacaaactactacatgtactgggttagacaagccccaggtcaaggttggga atggatgggtggatcaatccttcaaacgggtggcaccacttcaacgaaaagtcaagaacagagtaa cttgactacagattctcaaccactacagcatacatggaattgaaatcttacaattcgatgacacagct gttactactgtgcagcccgtgattaccgattcgacatgggttccagtttggggcaaggtaccactgt tactgtctcctct
34	CL7 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtcttgactcaatcctccagctacattgccttaagtctggtgaaagagccacattgcatgcag agcttccaaaggtgatctacctcagggtactcttacttgcatgggatcaacaaaagccagggtcaagca cctagattgtgatctactggccagttactggaaatctggtgtccagctagatttccggtagtggttctg gtactgacttcacattgaccatattctcattagaacctgaagattcgcagctctatttggcaacattccta tagtttccactcacattcgggtgggtacaaaggtagaataaaaa
35	CL6 重链 可变区 (DNA)	caagttcaattagtcxaaagtggtgtcgaagtaaagaagccaggtgcctcagtcxaaagtcagttgtaa agcctcaggttatacatattacaaactactacatgtactgggttacacaagccccaggtcaaggttggga atggatgggtggatcaatccttcaaacgggtggcaccacttcaacgaaaagtcaagaacagagtaa cttgactacagattctcaaccactacagcatacatggaattgaaatcttacaattcgatgacacagct gttactactgtgcagcccgtgattacagattgacatgggttccagttctggggcaaggtaccactgt tactgtctcctct
36	CL6 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtcttgactcaatcctccagctacattgccttaagtctggtgaaagagccacattgcatgcag agcttccaaaggtgatctacctcagggtactcttacttgcatgggatcaacaaaagccagggtcaagca cctagattgtgatctactggccagttactggaaatctggtgtccagctagatttccggtagtggttct gggtactgacttcacattgaccatattctcattagaacctgaagatgtcgcagctctatttggcaacattcc tatgacctccacttacattcgggtgggtacaaaggtagagataaaaa

[0153]

37	CL2 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYKFDMGFEYWGQGTTVTVSS
38	CL2 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQHSYGLPLTFGGGTKVEIK
39	CL7 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEFWGQGTTVTVSS
40	CL7 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQHSYSFPLTFGGGTKVEIK
41	CL6 重链 可变区 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEFWGQGTTVTVSS
42	CL6 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQHSYDLPLTFGGGTKVEIK
43	CL2 轻链 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
44	CL2 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
45	CL2 轻链 CDR3 (AA)	YCQHSYGLPLT
46	CL2 重链	NYYMYW

[0154]

	CDR1 (AA)	
47	CL2 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTFNEKF
48	CL2 重链 CDR3 (AA)	ARDYKFDMGFY
49	CL7 轻链 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
50	CL7 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
51	CL7 轻链 CDR3 (AA)	YCQHSYSFPLT
52	CL7 重链 CDR1 (AA)	NYMYW
53	CL7 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTFNEKF
54	CL7 重链 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFY
55	CL6 轻链 CDR1	ASKGVSTSGYSYLH

[0155]

	(AA)	
56	CL6 轻链 CDR2 (AA)	LASYLE
57	CL6 轻链 CDR3 (AA)	YCQHSYDLPLT
58	CL6 重链 CDR1 (AA)	NYYMYW
59	CL6 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
60	CL6 重链 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFEF
61	CL20 重链 可变区 (DNA)	cagggtgcagctggtgcagtcaggggtggaggtcaaaaagcccggctcctcagtc aaagtgtcttcta aagcctctggatatacattactactatatactgactgggtgagcaggcaccaggacagggtctg gagtggatgggcggaatcaaccctctaattgggggtaccaactcaacgaaaagttaaaaaccggg tgacactgaccacagattccagcactaccacagcctatatggagctgaagtcctgcagttcgacgat acagcagtgactattgccaggcgggactacagattcgatatggccttgactattggggccaggg aactaccgtcaccgtgtctagt
62	CL20 轻链 可变区 (DNA)	gaaattgtctgaccagagccccgccactctgtctctgagtcaggagagggccaccctgtcat gccgagctccaagggcgtgtccactccggctacagttatctgactggtaccagcagaaccggg acaggcacctagactgctgatctacctggccagctatctggaatctggcgtgccagtaggtcagcg gctctggaagtgggaccgactttaccctgacaatttcagcctggagcccgaagatttcgagcttact attgccagcattctgtgacctgccctgacattcggcgtggaacaaaagtggaaatcaag
63	CL20 重链	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAP

[0156]

	可变区 (AA)	GQGLEWMGGINPSNGGTFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS
64	CL20 轻链 可变区 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESQVPRFSGSGSGTDFLTLTSSLEPEDFAVYY CQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
65	CL20 轻链 CDR1 (AA)	RASKGVSTSGYSYLH
66	CL20 轻链 CDR2 (AA)	LASYLES
67	CL20 轻链 CDR3 (AA)	QHSRDLPLT
68	CL20 重链 CDR1 (AA)	NYMY
69	CL20 重链 CDR2 (AA)	GINPSNGGTFNEKFKN
70	CL20 重链 CDR3 (AA)	RDYRFDMGFDY
71	CL1 重链 全长 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCAARDYRLDMGFDFWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVD

[0157]

		KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK
72	CL1 轻链 全长 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLAstyleGVPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQHAYDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
73	CL1 重链 全长 (DNA)	cagggtcagctggtcagctccggcgtggaggtgaagaagcctggcggcagcgtgaaggtgcctg taaggccagcggctacacctccaccaattactatatgtattgggtgcggcagggcccccggcagggga ctggagtgatgggagggatcaatcccagcaacggcggcaccactcaatgagaagttaagaac cgggtgacctgaccaccgatagcagcaccaccaccgcttaccatggagctgaagagcctgcagttt gacgataccgctgtgtactattgcgctgccccgggaltacaggctggacatgggcttcgagttctgggg ccagggcaccaccgtgacctgtccagcgttagcaccaaggcccttccgttccccctggcccc ctgtagccggtccacctctgagagcaccgctgctctgggctgtctggtgaaggattcttcccgaac cgggtgacctgtcatggaactccgggctctgacatccggtgtccacacttttctgcagtgctgcagt catccggcctgtacagcctgagctctgtggtcacagtcaccaagtcatccctgggaaccaagacatat acttgcaacgtggatcataaaccagcaataactaaggctgacaaacagtgaggactaagtacggac caccttggccaccatgtccagcactgagttctgggaggaccaagcgtgttctcttctccaaagc ctaaagataccctgatgatcagtcggactcccagggtcacctcgtggtcgtggacgtgtcccagga ggacctgaagtcagttcaactggtacgtggacggcgtcgaagtgcacaatgtaagacaaaacct cgagaggaacagtttaactccacataccgtgtcgtgagcgtcctgactgtgctgcatcaggattggct gaacggcaaggagtataagtgc aaagtgagcaataaggactgccaagctctatcgagaaaactatt tctaaaggctaaaggacagcctagggaaaccaggtgtacacctgccccctagtcaggaggaaatg actaagaaccaggtctcactgacctgtctggtgaaaggttctatccttcagatattgcagtgaggagg

		<p>gaatccaatggtcagccagagaacaattacaagacaactccaccctgctggacagcgatgggtctt tctttctgattctagactgaccgtggacaaaagtcgctggcaggagggaatgtcttttctgtagtgg atgcacgaagccctgcacaaccactacactcagaaaagcctgtcactgtccctgggtaaa</p>
<p>[0158]</p>	<p>74 CL1 轻链 全长 (DNA)</p>	<p>gagatcgtgctgaccagtcctccctgacctgagcctgtccccggagagcgggctaccctgtctt gtcgggctccaagggcgtgagcaccagcggatactcctatctgactggtaccagcagaagccccg gccaggctcccaggctgctgatctacctggcttccctacctggagagcggcgtgcccgctaggttag cggcagcggcagcggaaaccgatttcacctgacctcagctcctggagcccaggattttgccgt gtactactgccagcacgcttacgacctgccctgaccttggcggcggaccaaggtggagatcaag cgtacggtggctgaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcct ctgttgtgctgctgaaacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc ctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct cagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaacacaaaagctacgctcgcgaagtca cccatcaggcctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg</p>

- [0159] 注:表中括号中的DNA是指核苷酸,AA是指氨基酸。
- [0160] 编码SEQ ID NO:13的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第73-114位所示;
- [0161] 编码SEQ ID NO:14的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第160-177位所示;
- [0162] 编码SEQ ID NO:15的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第271-303位所示;
- [0163] 编码SEQ ID NO:16的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第91-108位所示;
- [0164] 编码SEQ ID NO:17的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第148-192位所示;
- [0165] 编码SEQ ID NO:18的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第292-327位所示。
- [0166] 实施例2:构建和表达CL1抗体以及相关抗体
- [0167] 通过将PCR克隆的CL1抗体的VL和VH区DNA分别与人κ轻链恒定区和IgG4恒定区(γ4重链恒定区)连接构建轻链和重链DNA序列。用PCR引物修饰序列的5'和3'端,所述引物设计成为各链增加合适的前导序列,再克隆到现有重组抗体表达载体上,通过测序分析表明载体构建正确。用40μg的表达质粒与700μL的细胞总数为10⁷的CHO混匀,加入0.4cm电转杯,置于电转仪,设置电转参数(电压300V,电脉冲时间17ms,方波)完成电穿孔。电转完成后,在8mL生长培养基中培养这些细胞3天。用ELISA测量转染上清液的抗体浓度,最终确定高表达且细胞生长状况良好的工程细胞株。
- [0168] 细胞在摇瓶中于CD-CHO(Gibco)中生长12天。通过蛋白A亲和层析,洗涤,用1M乙酸洗脱并用3M Tris中和,来纯化细胞上清液中的抗体。最后,将缓冲液换成已用1M Tris调整到pH 5.5的100mM乙酸,得到CL1抗体。
- [0169] CL5、CL9、CL2、CL7、CL6和CL20的构建和表达同样采用与上述类似的方法。
- [0170] 纯化得到的CL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6和CL20抗体的氨基酸序列与预期一致。
- [0171] 实施例3:抗hPD-1抗体与hPD-1的亲合力分析
- [0172] 酶联免疫吸附测定(ELISA)用于测定抗体与hPD-1的结合。通过4℃过夜孵育,将hPD-1固定在96孔板上。包被后,用PBST洗板5次。用PBST制备抗体CL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6、CL20和hIgG的不同浓度的稀释液,将其与固定的hPD-1在室温下孵育1小时。结合后,用

PBST洗板5次,在室温下用含稀释至1/10000的过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠IgG的PBST孵育1小时,再次洗涤,用TMB显色。

[0173] ELISA结果如图1所示。用半最大效应浓度(EC_{50})表示结合亲和力,结果显示于表2。

[0174] 实验结果表明,抗hPD-1抗体CL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6和CL20均结合hPD-1,其中CL1与hPD-1结合的 EC_{50} 为约0.208nM,亲和力最强,明显优于CL5、CL9、CL2、CL7、CL6和CL20。

[0175] 实施例4:抗体CL1与hPD-1结合的动力学分析

[0176] 为了进一步表征抗体的结合特性,在Octet系统(ForteBio,门洛帕克,加利福尼亚州)上用生物膜层光学干涉测量法对抗体CL1进行概况分析,以阐明结合动力学并计算平衡结合常数。通过用生物素让hPD-1融合蛋白与链霉亲和素生物传感器偶联来实施该测定。

[0177] 为便于将hPD-1固定于链霉亲和素生物传感器基质上,需将hPD-1进行生物素化。首先溶解1.0mg生物素于100 μ l二甲基亚砜以制备10mg/ml的生物素溶液,然后在每毫升hPD-1(1.8mg/ml)加入10 μ l生物素溶液,温和搅拌反应物并于黑暗处于室温保温2小时,得到hPD-1-生物素。用25ml冷PBS平衡装有Sephadex G-25M(Pharmacia,目录号17-0851-01)的PD-10柱,并以每根柱2ml hPD-1-生物素上柱。用10 \times 1ml冷PBS洗脱该柱。收集洗脱液,于OD280读数,得到纯化的hPD-1-生物素,将其储存于-80 $^{\circ}$ C直至使用。

[0178] 将链霉亲和素生物传感器浸没在含有PBS的孔中10分钟来使其预湿润,然后用PBS平衡生物传感器2分钟,通过将生物传感器浸没在20 μ g/mL hPD-1-生物素的PBS溶液中5分钟来与hPD-1-生物素偶联,用PBS平衡生物传感器2分钟。通过将生物传感器置于含有各种抗体浓度(0.125-2nM, SDS-PAGE纯度>99%的抗体)的孔中来观察与抗PD-1抗体的结合情况,并监测测量30分钟。在将生物传感器转移到PBS后测量解离,并监测测量90分钟。用包含所有测试浓度的1:1的结合球形拟合模型(binding global fit model)拟合所观察到的结合和解离速率($k_{结合}$ 和 $k_{解离}$),计算平衡结合常数KD。

[0179] 动力学研究结果显示于表2和图2中。

[0180] 实验结果表明,CL1抗体与hPD-1结合的KD为约0.0207nM,如此强的亲和力是由于结合速率比一般抗体要高很多,且解离速率较慢。

[0181] 实施例5:抗体CL1对hPD-1/hPD-L1结合的阻断研究

[0182] 用流式细胞术研究对配体结合的阻断。将表达hPD-1的Jurkat细胞铺在96孔板中,再加入各种浓度的抗体(CL1或hIgG(作为阴性对照))和浓度1 μ g/mL的未标记的hPD-L1。让混合物置于冰上30分钟,用FACS缓冲液(含有0.3%BSA的PBS)洗涤3次,用PE标记的山羊抗人Fc在冰上再孵育30分钟。用FACS缓冲液再次洗涤细胞3次,并用流式细胞仪分析。用Prism软件的非线性回归法分析数据并计算 IC_{50} 值。结果见表2和图3。

[0183] 实验结果证明,抗PD-1抗体CL1能以剂量依赖方式完全抑制hPD-L1与Jurkat细胞的hPD-1的结合, IC_{50} 值为约0.77nM。

[0184] 表2抗hPD-1抗体的亲和力、动力学、配体结合阻断和功能活性

[0185]

	CL1	CL5	CL9	CL2	CL7	CL6	CL20
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

[0186]	ELISA 亲和力分析 EC ₅₀ (nM)	0.208	0.399	0.594	0.451	0.346	1.336	0.242
	ForteBio 动力学分析 k _{结合} (1/Ms)	1.98×10 ⁶	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	k _{解离} (1/s)	4.11×10 ⁻⁵						
	KD (nM)	0.0207						
	配体结合阻断研究 IC ₅₀ (nM)	0.77	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	功能活性分析 EC ₅₀ (μg/ml)	0.269	0.932	NA	NA	NA	NA	NA

[0187] NA: 未进行相关实验, 无此数据。

[0188] 实施例6: CL1相关抗体的动力学分析

[0189] 按照实施例4所述通过生物膜层光学干涉测量法, 分析与CL1抗体相关的一系列抗体。相关抗体的VL和VH区的氨基酸序列见序列列表。各相关抗体的平衡结合常数KD示于表3中。

[0190] 表3 CL1相关抗体与hPD-1的结合

VH	VL	形式	KD (nM)
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL1 VL (SEQ ID NO: 8)	IgG4	0.0207
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL1 VL (SEQ ID NO: 8)	scFv	0.082
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL5 VL (SEQ ID NO: 10)	IgG4	0.076
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL5 VL (SEQ ID NO: 10)	scFv	0.143
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL9 VL (SEQ ID NO: 12)	IgG4	0.229
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL9 VL (SEQ ID NO: 12)	scFv	0.518
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL2 VL (SEQ ID NO: 38)	IgG4	0.189
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL2 VL (SEQ ID NO: 38)	scFv	0.447
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL7 VL (SEQ ID NO: 40)	IgG4	0.061
CL1 VH (SEQ ID NO: 7)	CL7 VL (SEQ ID NO: 40)	scFv	0.149

[0192] 表3中的结果证明, 相同VH和VL的情况下, scFv形式的抗体与hPD-1的亲和力比IgG4形式的抗体亲和力低。在相同抗体形式时, 即都是IgG4或scFv时, 将抗体CL1的VH氨基酸序列保持不变, 并将抗体CL1的VL替换 (替换为抗体CL5的VL、抗体CL9的VL、抗体CL2的VL或抗体CL7的VL) 后, 亲和力都会下降, 且替换成CL9的VL后, 亲和力下降最多。表明抗体CL1的VL在CL1与hPD-1的结合中起到重要作用, 氨基酸序列改变后可能导致构象改变, 与hPD-1的结合受到影响。

[0193] 实施例7: 抗hPD-1抗体的功能活性分析

[0194] 为检测抗hPD-1抗体的功能活性, 进行该抗体抑制hPD-1活性的能力的体外检测。

[0195] 抗hPD-1抗体阻断hPD-1/hPD-L1相互作用, 激活Jurkat细胞的TCR下游免疫信号通

路。

[0196] 报告基因是一个其表达产物非常容易被检测的基因,把它的编码序列和基因表达调控序列相融合形成嵌合基因,在调控序列控制下进行表达,从而通过检测它的表达产物来间接检测上游信号。PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay系统,适用于抗PD-1单克隆抗体的生物学活性检测。其主要原理是:CHO-K1细胞株的细胞膜上构建了稳定表达的PD-L1和T细胞受体激活蛋白(TCR activator),模拟抗原提呈细胞(APCs);Jurkat是一种人T淋巴细胞系,细胞膜上有PD-1表达,且转染了以NFAT为启动子的Luciferase报告基因载体。当两种细胞共孵育时,CHO-K1细胞的TCR activator与Jurkat细胞表面TCR结合,诱导下游信号通路,最终激活报告基因表达,但同时PD-1/PD-L1的相互作用会阻断这一激活作用;在加入抗PD-1单克隆抗体后,PD-1/PD-L1的相互作用被阻断,Luciferase报告基因恢复表达,产生荧光信号,且信号值与加入的抗PD-1单克隆抗体量呈正相关。

[0197] 如下所述通过共温育抗体与所述细胞,检测评价抗hPD-1抗体。CHO-K1细胞用F-12+10%FBS培养基(含200 μ g/ml Hygromycin B,250 μ g/ml G418)重悬,调整细胞密度为 4.0×10^5 细胞/ml,以每孔100 μ l接种到96孔细胞板中,将96孔板置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养过夜。将含有125 μ l抗体(CL1、CL5和hIgG)的96孔微滴定板用检测稀释液(含有1%胎牛血清(FBS)的RPMI培养基)沿着该板三份进行2.5倍连续稀释。Jurkat细胞用检测稀释液重悬,调整细胞密度为 1.25×10^6 细胞/ml。取出96孔板,倒弃培养基,然后取40 μ l配制好的对照品(hIgG)及待测样品(CL1、CL5)加入96孔板,并取40 μ l Jurkat细胞加到96孔板中。将96孔板置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中6h后,室温放置10min后每孔加入80 μ l Bio-Glo Luciferase Assay System试剂,室温避光放置30min。用多功能酶标仪中的自发荧光检测功能,读取96孔板每孔的荧光值。运用SoftMax Pro 6.5.1软件,以4-parameter模型对对照品和待测样品数据进行曲线拟合,通过标准方法确定EC₅₀。结果示于表2和图4。

[0198] 表2和图4的结果表明,在抗hPD-1抗体存在下,PD-1/PD-L1的相互作用被阻断,受到抑制的Jurkat细胞的TCR下游信号通路重新激活,Luciferase报告基因恢复表达,产生荧光信号,并且抗hPD-1抗体阻断PD-1/PD-L1相互作用具有剂量依赖性。进一步地,抗体CL1和CL5抑制hPD-1活性的能力EC₅₀分别为约0.269 μ g/ml和0.932 μ g/ml,说明CL1对hPD-1活性的抑制能力更强,从细胞水平上再次证明了抗体CL1的功能活性优于CL5,这也和实施例3的结果保持一致。

[0199] 实施例8:抗体CL1以及抗体CL20与hPD-1的结合动力学分析比较

[0200] 在Biacore系统(GE,Boston,MA)上用表面等离子共振技术对抗体CL1以及抗体CL20与hPD-1的结合动力学进行了分析比较。

[0201] 使用Protein A芯片进行检测,浓度5 μ g/ml的抗体CL1或抗体CL20以10 μ l/min的流速通过实验流路,捕获10s使捕获量约为200RU;之后流速调为30 μ l/min,依次进不同浓度的PD-1(0.625nM、1.25nM、2.5nM、5nM、10nM),结合时间180s,解离时间1200s。用1:1Langmuir结合模型拟合得到结合和解离曲线,得出抗体CL1以及抗体CL20与hPD-1的结合动力学参数(k结合:结合速率;k解离:解离速率;KD:结合解离平衡常数)。动力学研究结果显示于表4中。抗体CL1与hPD-1结合的KD为约0.606nM,抗体CL20与hPD-1结合的KD为约4.434nM,抗体CL1与hPD-1的亲合力比抗体CL20高约7倍。

[0202] 表4抗体CL1以及CL20与hPD-1的结合动力学数据

	CL1	CL20
[0203] k 结合 (1/Ms)	8.252×10^5	1.025×10^6
k 解离 (1/s)	4.999×10^{-4}	4.544×10^{-3}
KD (nM)	0.606	4.434

序列表

<110> 百奥泰生物制药股份有限公司

<120> 结合PD-1的抗体

<130> DSP1F200588JW

<150> CN2019102866779

<151> 2019-04-10

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链可变区

<400> 1

cagggtgcagc tgggtgcagtc cggcgtggag gtgaagaagc ctggcgccag cgtgaaggtg 60
 tcctgtaagg ccagcggcta caccttcacc aattactata tgtattgggt gcggcaggcc 120
 cccggccagg gactggagtg gatgggaggc atcaatccca gcaacggcgg caccaacttc 180
 aatgagaagt ttaagaaccg ggtgaccctg accaccgata gcagcaccac caccgcttac 240
 atggagctga agagcctgca gtttgacgat accgctgtgt actattgcgc tgcccgggat 300
 tacaggctgg acatgggctt cgagttctgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtccagc 360

<210> 2

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1轻链可变区

<400> 2

gagatcgtgc tgaccagtc ccccgtacc ctgagcctgt cccccggaga gcgggctacc 60
 ctgtcttgtc gggcctccaa gggcgtgagc accagcggat actcctatct gactggtac 120
 cagcagaagc cggccaggc tcccaggctg ctgatctacc tggettcccta cctggagagc 180
 ggcgtgcccg ctaggtttag cggcagcggc agcggaaacc atttaccct gaccatcagc 240
 tccctggagc ccgaggattt tgccgtgtac tactgccagc acgettacga cctgcccctg 300
 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL5重链可变区

<400> 3

caagttcaat tagtccaaag tgggtgctgaa gtaaagaagc caggtgcctc agtcaaagtc 60
 agttgtaaaag cctcaggta tacatttaca aactactaca tgtactgggt tagacaagcc 120
 ccaggtaag gtttggaatg gatgggtgg atcaatcctt caaacgggtg caccaacttc 180
 aacgaaaagt tcaagaacag agtaactttg actacagatt cttcaaccac tacagcatac 240
 atggaattga aatctttaca attcgatgac acagctgttt actactgtgc agcgcgtgat 300
 tacagattcg acatgggttt cgaatactgg ggtcaaggta ccaactgttac tgtctctctt 360

<210> 4

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL5轻链可变区

<400> 4

gaaattgtct tgactcaatc tccagctaca ttgtccttaa gtcttggta aagagccaca 60
 ttgtcatgca gagcttcaa aggtgtatct acctcaggtt actcttactt gcattgggat 120
 caacaaaagc caggtaagc acctagattg ttgatctact tggccagtta cttggaatct 180
 ggtgttccag ctagattttc cggtagtggt tctggtactg acttcacatt gaccatatct 240
 tcattagaac ctgaagattt cgagctctat tactgccaac attcttatga cttccactt 300
 acattcggag gtggtacaaa gtagaaata aaa 333

<210> 5

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9重链可变区

<400> 5

caagttcaat tagtccaaag tgggtgctgaa gtaaagaagc caggtgcctc agtcaaagtc 60
 agttgtaaaag cctcaggta tacatttaca aactactaca tgtactgggt tagacaagcc 120
 ccaggtaag gtttggaatg gatgggtgg atcaatcctt caaacgggtg caccaacttc 180
 aacgaaaagt tcaagaacag agtaactttg actacagatt cttcaaccac tacagcatac 240
 atggaattga aatctttaca attcgatgac acagctgttt actactgtgc agcacgtgat 300
 taaaattcg acatgggttt cgaattctgg ggtcaaggta ccaactgttac tgtctctctt 360

<210> 6

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9轻链可变区

<400> 6

gaaattgtct tgactcaatc tccagctaca ttgtccttaa gtcctggtga aagagccaca 60
 ttgtcatgca gagcttccaa aggtgtatct acctcaggtt actcttactt gcattggtat 120
 caacaaaagc caggtaagc acctagattg ttgatctact tggccagtta cttggaatct 180
 ggtgttccag ctagattttc cggtagtggg tctggtactg acttcacatt gaccatatct 240
 tcattagaac ctgaagattt cgcagtctat tattgccaac attcctatgg ccttccagtt 300
 acattcgggtg gtggtacaaa ggtagaaata aaa 333

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链可变区

<400> 7

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

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1轻链可变区

<400> 8

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL5重链可变区

<400> 9

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

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL5轻链可变区

<400> 10

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

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9重链可变区

<400> 11

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

	100		105		110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 12					
<211> 111					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>					
<223> CL9轻链可变区					
<400> 12					
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser					
	20		25		30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
	35		40		45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala					
	50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
65	70		75		80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Tyr					
	85		90		95
Gly Leu Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
	100		105		110
<210> 13					
<211> 14					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>					
<223> CL1轻链CDR1					
<400> 13					
Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His					
1	5		10		
<210> 14					
<211> 6					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>					
<223> CL1轻链CDR2					

<400> 14

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1轻链CDR3

<400> 15

Tyr Cys Gln His Ala Tyr Asp Leu Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链CDR1

<400> 16

Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp

1 5

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链CDR2

<400> 17

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

1 5 10 15

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链CDR3

<400> 18

Ala Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Met Gly Phe Glu Phe

1 5 10

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL5轻链CDR1
 <400> 19
 Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL5轻链CDR2
 <400> 20
 Leu Ala Ser Tyr Leu Glu
 1 5
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL5轻链CDR3
 <400> 21
 Tyr Cys Gln His Ser Tyr Asp Leu Pro Leu Thr
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL5重链CDR1
 <400> 22
 Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp
 1 5
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL5重链CDR2
<400> 23
Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
1 5 10 15
<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL5重链CDR3
<400> 24
Ala Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Glu Tyr
1 5 10
<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL9轻链CDR1
<400> 25
Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10
<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL9轻链CDR2
<400> 26
Leu Ala Ser Tyr Leu Glu
1 5
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL9轻链CDR3

<400> 27

Tyr Cys Gln His Ser Tyr Gly Leu Pro Val Thr
1 5 10

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9重链CDR1

<400> 28

Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp
1 5

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9重链CDR2

<400> 29

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
1 5 10 15

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL9重链CDR3

<400> 30

Ala Arg Asp Tyr Lys Phe Asp Met Gly Phe Glu Phe
1 5 10

<210> 31

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2重链可变区

<400> 31

caagttcaat tagtccaaag tgggtgctgaa gtaaagaagc caggtgcctc agtcaaagtc 60
agttgtaaag cctcaggta tacatttaca aactactaca tgtactgggt tagacaagcc 120

ccaggtaag gtttggaatg gatgggtggt atcaatcett caaacggtgg caccaacttc 180
aacgaaaagt tcaagaacag agtaactttg actacagatt cttcaaccac tacagcatac 240
atggaattga aatctttaca attcgatgac acagctgttt actactgtgc agcccgtgat 300
tacaaattcg acatggggtt cgagtactgg ggtcaaggta ccaactgttac tgtctcctct 360

<210> 32

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2轻链可变区

<400> 32

gaaattgtct tgactcaatc tccagctaca ttgtccttaa gtcttgggtga aagagccaca 60
ttgtcatgca gagcttccaa aggtgtatct acctcaggtt actcttactt gcattggtat 120
caacaaaagc caggtaaacg acctagattg ttgatctact tggccagtta cttggaatct 180
gggtttccag ctagattttc cggtagtggg tctgttactg acttcacatt gaccatatct 240
tcattagaac ctgaagattt cgcagtctat tattgccaac attcctatgg tcttccactt 300
acattcgggtg gtggtacaaa ggtagaaata aaa 333

<210> 33

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7重链可变区

<400> 33

caagttcaat tagtccaaag tgggtgctgaa gtaaagaagc cagggtgcctc agtcaaagtc 60
agttgtaaag cctcagggtta tacatttaca aactactaca tgtactgggt tagacaagcc 120
ccaggtaag gtttggaatg gatgggtggt atcaatcett caaacggtgg caccaacttc 180
aacgaaaagt tcaagaacag agtaactttg actacagatt cttcaaccac tacagcatac 240
atggaattga aatctttaca attcgatgac acagctgttt actactgtgc agcccgtgat 300
taccgattcg acatggggtt cgagttttgg ggtcaaggta ccaactgttac tgtctcctct 360

<210> 34

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7轻链可变区

<400> 34

gaaattgtct tgactcaatc tccagctaca ttgtccttaa gtcttgggtga aagagccaca 60
ttgtcatgca gagcttccaa aggtgtatct acctcaggtt actcttactt gcattggtat 120

caacaaaagc caggtcaagc acctagattg ttgatctact tggccagtta cttggaatct 180
 ggtgttccag ctagattttc cggtagtggg tctggtagctg acttcacatt gaccatatct 240
 tcattagaac ctgaagattt cgcagtctat tattgccaac attcctatag ttttccactc 300
 acattcgggtg gtggtacaaa ggtagaaata aaa 333

<210> 35

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL6重链可变区

<400> 35

caagttcaat tagtccaaaag tgggtgctgaa gtaaagaagc caggtgcctc agtcaaagtc 60
 agttgtaaaag cctcagggtta tacatttaca aactactaca tgtactgggt tacacaagcc 120
 ccagggtcaag gtttggaatg gatgggtggg atcaatcctt caaacgggtg caccaacttc 180
 aacgaaaagt tcaagaacag agtaactttg actacagatt cttcaaccac tacagcatac 240
 atggaattga aatctttaca attcgatgac acagctgttt actactgtgc agcccgtgat 300
 tacagatttg acatgggttt cgagttctgg ggtcaaggta ccaactgttac tgtctctctc 360

<210> 36

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL6轻链可变区

<400> 36

gaaattgtct tgactcaatc tccagctaca ttgtccttaa gtctctgggtga aagagccaca 60
 ttgtcatgca gagcttccaa aggtgtatct acctcaggtt actcttactt gcattggtat 120
 caacaaaagc caggtcaagc acctagattg ttgatctact tggccagtta cttggaatct 180
 ggtgttccag ctagatgttc cggtagtggg tctggtagctg acttcacatt gaccatatct 240
 tcattagaac ctgaagatgt cgcagtctat tattgccaac attcctatga ctttccactt 300
 acattcgggtg gtggtacaaa ggtagagata aaa 333

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2重链可变区

<400> 37

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

1

5

10

15

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

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2轻链可变区

<400> 38

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

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7重链可变区

<400> 39

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

<210> 40

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7轻链可变区

<400> 40

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

<400> 46

Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp

1 5

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2重链CDR2

<400> 47

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

1 5 10 15

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL2重链CDR3

<400> 48

Ala Arg Asp Tyr Lys Phe Asp Met Gly Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7轻链CDR1

<400> 49

Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7轻链CDR2

<400> 50

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7轻链CDR3

<400> 51

Tyr Cys Gln His Ser Tyr Ser Phe Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7重链CDR1

<400> 52

Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp

1 5

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7重链CDR2

<400> 53

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

1 5 10 15

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL7重链CDR3

<400> 54

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

1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL6轻链CDR1
 <400> 55
 Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL6轻链CDR2
 <400> 56
 Leu Ala Ser Tyr Leu Glu
 1 5
 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL6轻链CDR3
 <400> 57
 Tyr Cys Gln His Ser Tyr Asp Leu Pro Leu Thr
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL6重链CDR1
 <400> 58
 Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp
 1 5
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL6重链CDR2

<400> 59

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

1 5 10 15

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL6重链CDR3

<400> 60

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

1 5 10

<210> 61

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL20重链可变区

<400> 61

cagggtgcagc tgggtgcagtc aggggtggag gtcaaaaagc ccggtgcctc agtcaaagtg 60
 tcttgtaaag cctctggata tacatttact aactactata tgtactgggt gaggcaggca 120
 ccaggacagg gtctggagtg gatgggcgga atcaaccct ctaatggggg taccaacttc 180
 aacgaaaagt ttaaaaaccg ggtgacactg accacagatt ccagcactac cacagcctat 240
 atggagctga agtccctgca gttcgacgat acagcagtgt actattgctc caggcgggac 300
 tacagattcg atatgggctt tgactattgg ggccaggaa ctaccgtcac cgtgtctagt 360

<210> 62

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL20轻链可变区

<400> 62

gaaattgtgc tgaccagag ccccgccact ctgtctctga gtccaggaga gagggccacc 60
 ctgtcatgcc gagcttccaa gggegtgtcc acctccggt acagttatct gactggtac 120
 cagcagaaac ccggacagge acctagactg ctgatctacc tggccagcta tctggaatct 180
 ggcgtgccag ctaggttcag cggetctgga agtgggaccg actttaccct gacaatttcc 240
 agcctggagc ccgaagattt cgcagtctac tattgccagc attctcgtga cctgccctg 300
 acattcggcg gtggaacaaa agtggaaatc aag 333

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL20重链可变区

<400> 63

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

<210> 64

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CL20轻链可变区

<400> 64

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

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

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

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL20轻链CDR1
<400> 65

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

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL20轻链CDR2
<400> 66

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL20轻链CDR3
<400> 67

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CL20重链CDR1
<400> 68

Asn Tyr Tyr Met Tyr

1 5
 <210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL20重链CDR2
 <400> 69
 Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL20重链CDR3
 <400> 70
 Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 71
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CL1重链全长
 <400> 71
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Met Gly Phe Glu Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

	405		410		415										
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	420		425		430										
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
	435		440		445										
<210>	72														
<211>	218														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	CL1轻链全长														
<400>	72														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5						10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
			35				40					45			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75				80	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ala	Tyr
					85				90				95		
Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105					110		
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
			115					120					125		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
			130				135			140					
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155				160	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
			165						170				175		
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
			195					200				205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						

210 215

<210> 73

<211> 1341

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1重链全长

<400> 73

caggtgcagc tgggtgcagtc cggcgtggag gtgaagaagc ctggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgtaagg ccagcggcta caccttcacc aattactata tgtattgggt gcggcaggcc 120

cccggccagg gactggagtg gatgggaggc atcaatceca gcaacggcgg caccaacttc 180

aatgagaagt ttaagaaccg ggtgacctg accaccgata gcagcaccac caccgcttac 240

atggagctga agagcctgca gtttgacgat accgctgtgt actattgcgc tgcccgggat 300

tacaggctgg acatgggctt cgagttctgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtccagc 360

gctagcacca agggcccttc cgtgttcccc ctggccccct gtagccggtc cacctctgag 420

agcaccgctg ctctgggctg tctggtgaag gattactttc ccgaaccggt gaccgtgtca 480

tggaactccg gggctctgac atccgggtgc cacacttttc ctgcagtgtc gcagtcattc 540

ggcctgtaca gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg aaccaagaca 600

tataacttgca acgtggatca taaaccagc aatactaagg tcgacaaacg agtggagtct 660

aagtacggac caccttgccc accatgtcca gcacctgagt tcctgggagg accaagcgtg 720

ttcctgtttc ctccaaagcc taaagatacc ctgatgatca gtcggactcc cgaggtcacc 780

tgcgtggctc tggacgtgtc ccaggaggac cctgaagtcc agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtcgaag tgcacaatgc taagacaaa cctcgagagg aacagtttaa ctccacatac 900

cgtgtcgtga gcgtcctgac tgtgctgcat caggattggc tgaacggcaa ggagtataag 960

tgcaaagtga gcaataaggg actgccaagc tctatcgaga aaactatttc taaggctaaa 1020

ggacagccta gggaaccaca ggtgtacacc ctgcccccta gtcaggagga aatgactaag 1080

aaccaggctc cactgacctg tctggtgaaa gggttctatc cttcagatat tgcagtggag 1140

tgggaatcca atggtcagcc agagaacaat tacaagacaa ctccaccctg gctggacagc 1200

gatgggtctt tctttctgta ttctagactg accgtggaca aaagtcgctg gcaggagggt 1260

aatgtctttt cttgtagtgt gatgcacgaa gcctgcaca accactacac tcagaaaagc 1320

ctgtcactgt ccctgggtaa a 1341

<210> 74

<211> 654

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CL1轻链全长

<400> 74

gagatcgtgc tgaccagtc ccccgtacc ctgagcctgt cccccggaga gcgggctacc 60

ctgtcttgtc gggcctccaa gggcgtgagc accageggat actcctatct gactggtac 120
cagcagaagc ccggccaggc tcccaggctg ctgatctacc tggcttccta cctggagagc 180
ggcgtgcccc ctaggtttag cggcagcggc agcggaacg atttcacct gaccatcagc 240
tccctggagc ccgaggattt tgccgtgtac tactgccagc acgcttacga cctgcccctg 300
acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

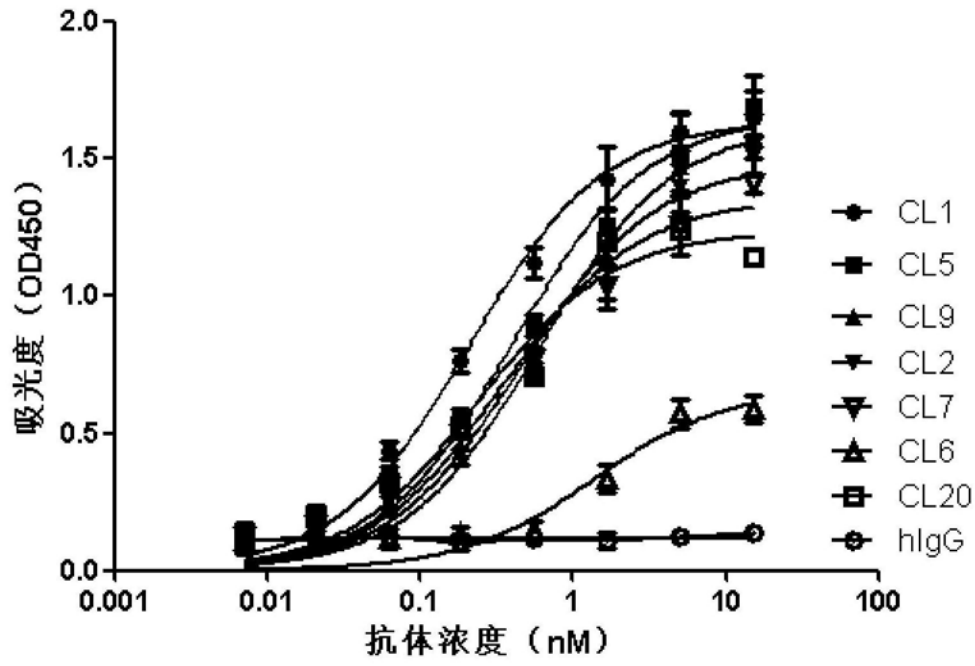


图1

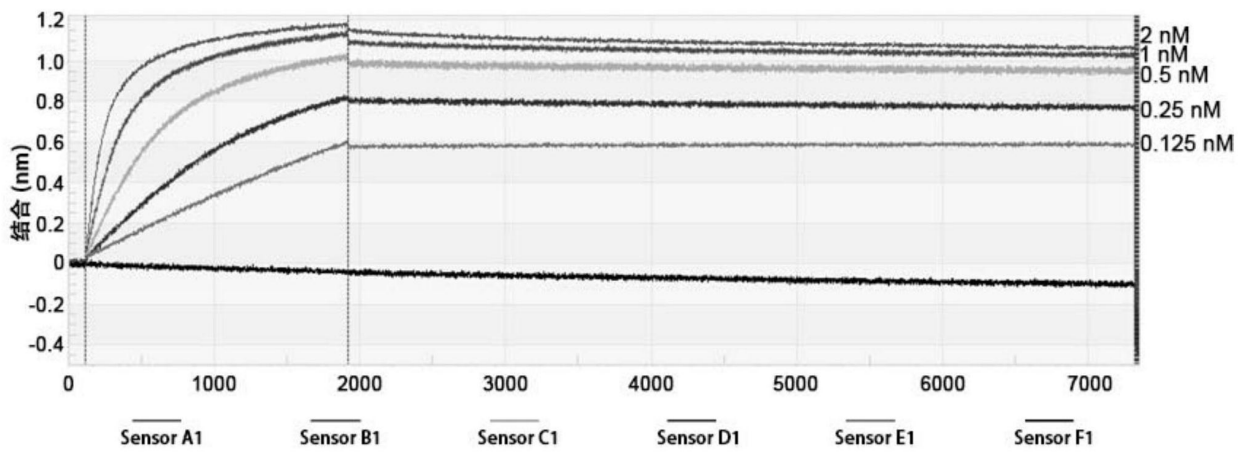


图2

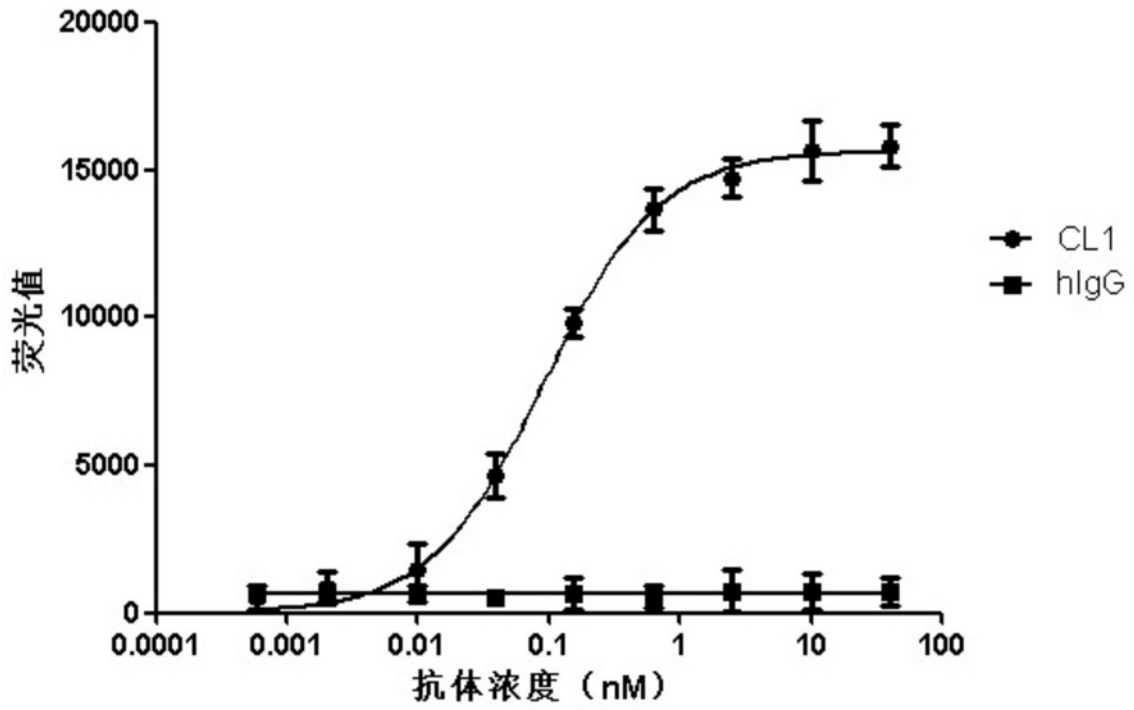


图3

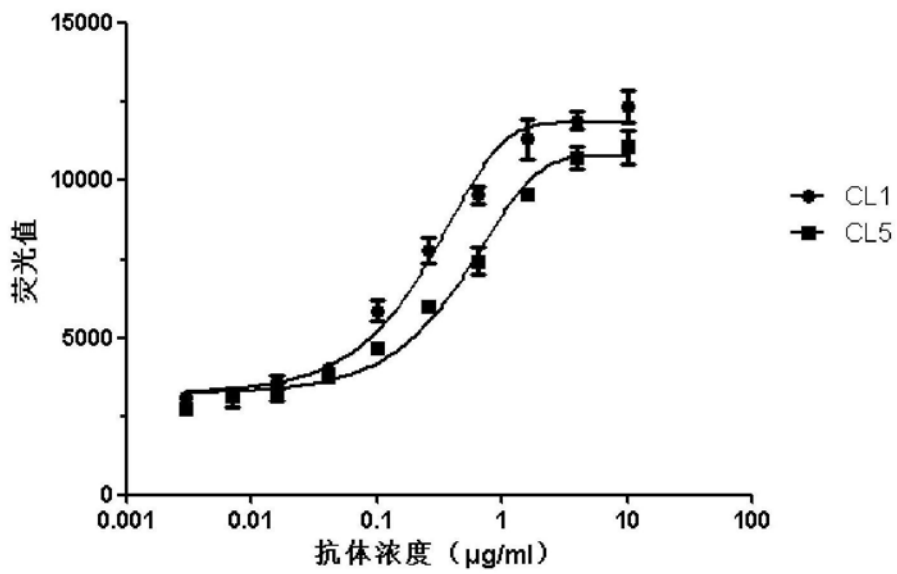


图4