



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110637032 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201880020143.5

(22)申请日 2018.02.08

(30)优先权数据

10-2017-0035623 2017.03.21 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2018/001711 2018.02.08

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/174408 KO 2018.09.27

(71)申请人 东亚ST株式会社

地址 韩国首尔特别市

(72)发明人 都贤美 李东燮 李汉永 金柳辰

韩京美 郑恩伊 金东贤 宋东燮

申锦珠 禹笑莲

(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟海胜 宋琴芝

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

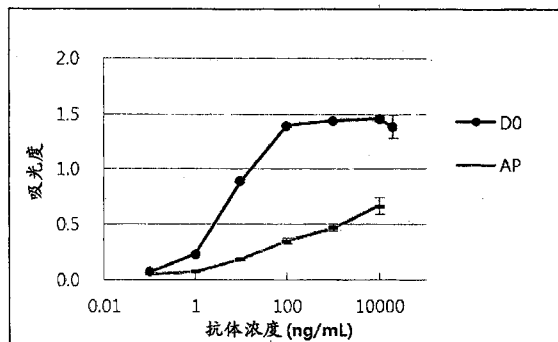
序列表31页 附图29页

(54)发明名称

抗DR5抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及与死亡受体5(DR5)特异性结合并具有杀伤癌细胞功能的抗体。更具体地,提供了抗DR5抗体或其抗原结合片段以及该抗体或该抗原结合片段用于预防或治疗癌症的用途。本发明的特征在于抗DR5抗体或其抗原结合片段在对DR5的亲合性、稳定性和杀伤癌细胞的作用方面有所改善。



1. 一种抗死亡受体5 (DR5) 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体包含:
  - 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽 (V<sub>H</sub>-CDR1),
  - 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽 (V<sub>H</sub>-CDR2),
  - 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多肽 (V<sub>H</sub>-CDR3),
  - 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽 (V<sub>L</sub>-CDR1),
  - 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的多肽 (V<sub>L</sub>-CDR2), 和
  - 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的多肽 (V<sub>L</sub>-CDR3)。
2. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述多肽 (V<sub>H</sub>-CDR3) 具有选自由SEQ ID NO:7、8和9组成的组中的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述多肽 (V<sub>L</sub>-CDR2) 具有选自由SEQ ID NO:10、11和12组成的组中的氨基酸序列。
4. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述多肽 (V<sub>L</sub>-CDR3) 具有选自由SEQ ID NO:13、14、15和16组成的组中的氨基酸序列。
5. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗DR5抗体或其抗原结合片段包含:
  - 重链可变区, 具有选自由SEQ ID NO:17至SEQ ID NO:37组成的组中的氨基酸序列; 和
  - 轻链可变区, 具有选自由SEQ ID NO:38至SEQ ID NO:49组成的组中的氨基酸序列的。
6. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗DR5抗体或其抗原结合片段具有诱导表达DR5的TRAIL (TNF相关凋亡诱导配体) 敏感性癌细胞或表达DR5的TRAIL抗性癌细胞凋亡的活性。
7. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗DR5抗体是单克隆抗体。
8. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗原结合片段选自由抗DR5抗体的scFv、(scFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>组成的组。
9. 根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗DR5抗体是小鼠来源的抗体、小鼠-人嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
10. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物, 所述组合物包含根据权利要求1至9中任一项所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段。
11. 根据权利要求10所述的药物组合物, 其中, 所述癌症选自由以下组成的组: 血癌、肺癌、胃癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌、皮肤黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、结肠直肠癌、结肠癌、乳腺癌、子宫肉瘤、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、喉癌、小肠癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、幼年期实体瘤、分化淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、和垂体腺瘤。
12. 根据权利要求10所述的药物组合物, 还包含TNF相关凋亡诱导配体 (TRAIL)。
13. 根据权利要求12所述的药物组合物, 其中, 所述组合物在一种合并制剂或分开的制剂中包含所述抗DR5抗体或其抗原结合片段和TRAIL。
14. 根据权利要求10所述的药物组合物, 还包含至少一种选自由烷基化抗癌剂、基于代谢拮抗剂的抗癌剂、基于蒽环霉素的抗癌剂; 和基于蛋白酶体抑制剂的抗癌剂组成的组的

抗癌剂。

15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中,所述抗癌剂是选自由卡铂、紫杉醇、吉西他滨、多柔比星和硼替佐米组成的组中的至少一种。

16. 一种编码根据权利要求1至9中任一项所述的抗DR5抗体或抗原结合片段的多核苷酸分子。

17. 一种携带权利要求16所述的多核苷酸分子的重组载体。

18. 一种含有权利要求17所述的重组载体的重组细胞。

19. 一种生产抗DR5抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括表达权利要求16所述的多核苷酸分子的步骤。

20. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段。

21. 一种预防或治疗癌症的方法,所述方法包括将根据权利要求1所述的抗DR5抗体或其抗原结合片段施用于有需要的受试者的步骤。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,所述癌症选自由以下组成的组:血癌、肺癌、胃癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌、皮肤黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、结肠直肠癌、结肠癌、乳腺癌、子宫肉瘤、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、喉癌、小肠癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、幼年期实体瘤、分化淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、和垂体腺瘤。

23. 根据权利要求21所述的方法,还包括向所述受试者施用TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)的步骤。

24. 根据权利要求21所述的方法,还包括向所述受试者施用至少一种抗癌剂的步骤,所述抗癌剂选自由烷基化抗癌剂、基于代谢拮抗剂的抗癌剂、基于蒽环霉素的抗癌剂和基于蛋白酶体抑制剂的抗癌剂组成的组。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,所述抗癌剂是选自由卡铂、紫杉醇、吉西他滨、多柔比星和硼替佐米组成的组中的至少一种。

26. 根据权利要求23所述的方法,还包括向所述受试者施用至少一种抗癌剂的步骤,所述抗癌剂选自由烷基化抗癌剂、基于代谢拮抗剂的抗癌剂、基于蒽环霉素的抗癌剂和基于蛋白酶体抑制剂的抗癌剂组成的组。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述抗癌剂是选自由卡铂、紫杉醇、吉西他滨、多柔比星和硼替佐米组成的组中的至少一种。

## 抗DR5抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本公开涉及与死亡受体5 (DR5) 特异性结合并具有杀伤癌细胞功能的抗体,更具体地,涉及抗DR5抗体或其抗原结合片段以及该抗体或该抗原结合片段在预防或治疗癌症中的用途。

### 背景技术

[0002] 通过TNF相关凋亡诱导配体 (TRAIL或Apo2L) 和作为其受体之一的死亡受体5 (DR5) 的细胞凋亡途径诱导癌细胞选择性凋亡而不影响正常细胞,并且该途径被认为是癌症治疗剂的开发的重要靶标 (Ashkenazi等人, Nat Rev Cancer 2:420,2002)。

[0003] 目前,靶向DR5的重组TRAIL和死亡受体特异性抗体被开发为对抗癌细胞的治疗剂。

[0004] 至于TRAIL,其问题在于对DR5的选择性低,这是因为配体不仅与转导细胞凋亡信号的DR4 (死亡受体4, TRAIL-受体1) 和DR5 (死亡受体5, TRAIL-受体2) 结合,还与不能转导凋亡信号的DcR1 (诱饵受体1, TRAIL-受体3) 和DcR2 (诱饵受体1, TRAIL-受体4) 结合。此外,重组TRAIL的稳定性差,并且具有诱导包括星形细胞、肝细胞、角质形成细胞等正常细胞的细胞凋亡的不良作用 (Jo等人, 自然医学6, 564-567, 2000)。因此,对于开发诱导癌细胞选择性凋亡并几乎没有不良作用的抗DR5和抗DR4抗体进行了积极研究。

[0005] 关于死亡受体特异性抗体,已进行临床试验以评估由Genentech Incorporated (U.S.A.) 和Amgen (U.S.A.) 开发的抗DR5抗体的细胞毒活性。人类基因组科学 (美国) 进行了抗DR5抗体HGS-ETR2和抗DR4抗体HGS-ETR1的II期临床试验,但已停止开发。此外,如Apomab、西他土珠单抗 (Conatumumab、替加珠单抗 (tigatuzumab) 等的抗-DR5抗体的开发被终止。

[0006] 细胞凋亡主要通过两种主要机制发生,即外在细胞凋亡途径和内在细胞凋亡途径。大多数化学治疗剂和放射疗法通过p53介导的内在细胞凋亡来诱导癌细胞死亡,而DR5介导的细胞凋亡是通过非p53依赖性外在细胞凋亡途径和内在细胞凋亡途径来诱导的 (Takeda等, Oncogene, 26, 3745-3757, 2007)。在外在细胞凋亡途径中,TRAIL或抗体与DR5结合形成死亡诱导信号传导复合物 (DISC), 该复合物通过衔接蛋白 (FADD) 激活凋亡起始蛋白酶半胱天冬酶-8和半胱天冬酶-10。然后,半胱天冬酶-8激活下游蛋白酶半胱天冬酶-3和半胱天冬酶-7,同时通过线粒体诱导内在细胞凋亡 (Ohtsuka等, 原癌基因, 22, 2034至44年, 2003年)。

[0007] 随着TRAIL作为癌症治疗靶标的重要性日益增加,需要开发更有效和强力的TRAIL靶向药物。

### 发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本公开旨在提供与死亡受体5 (DR5) 特异性结合以有效杀伤各种癌细胞的抗DR5抗

体及其用途。

[0010] 一方面提供了抗DR5抗体或其抗原结合片段。

[0011] 另一方面提供了用于预防或治疗癌症的药物组合物,该组合物包含抗DR5抗体和/或抗原结合片段。

[0012] 另一方面提供了预防或治疗癌症的方法,该方法包括将抗DR5抗体和/或抗原结合片段施用于有需要的受试者的步骤。

[0013] 另一方面提供了抗DR5抗体和/或抗原结合片段在预防或治疗癌症或制备抗癌剂中的用途。

[0014] 另一方面提供了编码抗DR5抗体或抗原结合片段的多核苷酸分子、携带该多核苷酸的重组载体和含有该重组载体的重组细胞。

[0015] 另一方面提供了制备抗DR5抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括表达多核苷酸分子的步骤。

[0016] 技术方案

[0017] 本公开提供了一种与死亡受体5 (DR5) 特异性结合以有效诱导各种癌细胞死亡的抗DR5抗体,以及包含该抗体以预防或治疗癌症的药物组合物。

[0018] 本文提供的抗体是TRAIL非竞争性抗体,其不论TRAIL (TNF相关凋亡诱导配体) 的浓度如何都保持恒定水平的抗原结合活性。因此,与先前开发的抗体药物相比,该抗体可以有效地开发成显示优异功效的创新型新抗体药物或诊断剂。

[0019] 死亡受体5 (DR5),也称为TRAIL受体2 (TRAILR2) 或肿瘤坏死因子受体超家族成员10B (TNFRSF10B),是TNF受体超家族的细胞表面受体,死亡受体5通过转导凋亡信号结合TRAIL并介导细胞凋亡。DR5显示与半胱天冬酶8、半胱天冬酶10、FADD (具有死亡域的Fas相关蛋白) 和TRAIL相互作用。DR5可以源自哺乳动物,并且可以是例如人DR5 (例如,NCBI登录号UniProtKB/Swiss-Prot:Q6FH58)。

[0020] 一方面提供了特异性识别和/或结合DR5的多肽。多肽可以是选自由SEQ ID NO:1至16的氨基酸序列组成的组中的一种。更具体地,该多肽可以具有选自由SEQ ID NO:1、2、4和7至16组成的组中的一种的氨基酸序列。

[0021] 如本文所用,表述“具有氨基酸序列或核苷酸序列的蛋白质、多肽或多核苷酸”旨在涵盖蛋白质、多肽或多核苷酸包括所述序列、基本上由所述序列或由所述序列组成的所有情况。

[0022] 所述多肽可以用作抗DR5抗体的互补决定区 (CDR)。

[0023] 所述多肽及其适用的互补决定区总结于下表1中:

[0024] 表1

	序列	SEQ ID NO	
	V <sub>H</sub> -CDR1	GFTFSSFNML	1
	V <sub>H</sub> -CDR2	GIGKSDRYTGYGSAVKG	2
	V <sub>H</sub> -CDR3	DAGSX1CGX2GGWTGACIDT (X1=G 或 P; X2=S 或 K)	3
		DAGSGCGSGGWTGACIDT	7
		DAGSPCGSGGWTGACIDT	8
		DAGSPCGKGGWTGACIDT	9
[0025]	V <sub>L</sub> -CDR1	SGGDSYAGSYYYG	4
	V <sub>L</sub> -CDR2	NNNX3X4X5 (X3= R、L 或 K; X4= P、M 或 A; X5= S、P 或 K)	5
		NNNNRPS	10
		NNNNLMP	11
		NNNNKAK	12
	V <sub>L</sub> -CDR3	GSRDSX6X7X8GX9 (X6= S、A 或 D; X7= Y 或 G; X8= V、M、G 或 A; X9= I、A、R 或 G)	6
		GSRDSSYVGI	13
[0026]		GSRDSAGMGA	14
		GSRDSDGGGR	15
		GSRDSSGAGG	16

[0027] (在表1中, V<sub>H</sub>-CDR1、V<sub>H</sub>-CDR2和V<sub>H</sub>-CDR3表示重链互补决定区, V<sub>L</sub>-CDR1、V<sub>L</sub>-CDR2和V<sub>L</sub>-CDR3表示轻链互补决定区)

[0028] 另一方面提供了靶向DR5的多肽分子, 所述多肽分子包含选自上述多肽组成的组中的至少一种。靶向DR5的多肽分子具有在不与DR5配体TRAIL竞争的情况下用于引发癌细胞死亡(例如, 癌细胞凋亡)的特征。

[0029] 靶向DR5的多肽分子可包含上述的抗DR5抗体重链互补决定区或轻链互补决定区、或其组合; 或包含重链互补决定区的重链可变区、包含轻链互补决定区的轻链可变区、或其组合。

[0030] 靶向DR5的多肽分子可以用作(但不限于)抗DR5抗体、抗体的抗原结合片段或抗DR5抗体类似物(具有与抗体相似的支架和功能的结构, 例如肽体、纳米抗体等), 或用作多特异性抗体的前体或组件(例如CDR)。

[0031] 如本文所用, 术语“肽体”是指在构架和功能方面模拟抗体的融合蛋白(肽+抗体), 其中肽与抗体的部分或完整恒定区(例如Fc)融合。在本文中, 如上所述的一种或多种肽可以充当抗原结合片段(重链和/或轻链CDR或可变区)。

[0032] 如本文所用, 术语“纳米抗体”, 也称为单域抗体, 是指具有抗体的单体单可变域并显示类似于全长抗体的对某些抗原的选择性的抗体片段。纳米抗体的分子量通常为约12kDa至约15kDa, 远小于全长抗体(包括两个重链和两个轻链)的分子量(约150kDa至约160kDa), 并且在一些情况下甚至比Fab或scFv片段的分子量还小。

[0033] 如本文所用, 术语“多特异性抗体”(包括双特异性抗体)是指识别和/或结合两种或更多种不同抗原, 或识别和/或结合相同抗原的不同位点的抗体, 多特异性抗体的抗原结合位点之一可以包括上述多肽。

[0034] 一方面提供了抗DR5抗体或其抗原结合片段, 所述抗DR5抗体包含选自上述多肽组成的组中的至少一种多肽作为互补决定区。本文提供的具有DR5激动剂功效的抗DR5抗体

用于聚集在细胞表面上分开存在的DR5分子,以在细胞内产生和转导凋亡信号,从而诱导细胞死亡。

[0035] 抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含选自由以下组成的组中的至少一种作为重链互补决定区:

[0036] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR1),

[0037] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR2),和

[0038] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR3)。

[0039] SEQ ID NO:3的氨基酸序列与以下通式1的氨基酸序列相同:

[0040] [通式1] (SEQ ID NO:3)

[0041] D-A-G-S-X1-C-G-X2-G-G-W-T-G-A-C-I-D-T

[0042] 其中,

[0043] X1是G或P,和

[0044] X2是S或K。

[0045] 在一种实施方式中,可用作抗DR5抗体或其抗原结合片段的重链CDR3的SEQ ID NO:3的多肽可具有选自由例如SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列组成的组中的至少一种(在以下氨基酸序列中,粗体和下划线字母表示从SEQ ID NO:7的氨基酸序列修饰的氨基酸残基):

[0046] SEQ ID NO:7:DAGSGCGSGGWTGACIDT

[0047] SEQ ID NO:8:DAGSPCGSGGWTGACIDT

[0048] SEQ ID NO:9:DAGSPCGKGGWTGACIDT

[0049] 在另一种实施方式中,抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含选自由以下组成的组中的至少一种作为轻链互补决定区:

[0050] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR1),

[0051] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR2),和

[0052] 具有SEQ ID NO:6多肽的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR3)。

[0053] SEQ ID NO:5和6的氨基酸序列分别与以下通式2和3的氨基酸序列相同。

[0054] [通式2] (SEQ ID NO:5)

[0055] N-N-N-N-X3-X4-X5

[0056] 其中,

[0057] X3是R、L或K,

[0058] X4是P、M或A,和

[0059] X5是S、P或K;

[0060] [通式3] (SEQ ID NO:6)

[0061] G-S-R-D-S-X6-X7-X8-G-X9

[0062] 其中,

[0063] X6是S、A或D,

[0064] X7是Y或G,

[0065] X8是V、M、G或A,和

[0066] X9是I、A、R或G。

[0067] 在一种实施方式中,可以作为抗DR5抗体的轻链CDR2或其抗原结合片段获得的SEQ ID NO:5的多肽可以具有选自由SEQ ID NO:10、11和12的氨基酸序列组成的组中的至少一种(在以下氨基酸序列中,粗体和下划线字母表示从SEQ ID NO:10的氨基酸序列修饰的氨基酸残基):

[0068] SEQ ID NO:10:NNNNRPS

[0069] SEQ ID NO:11:NNNNLMP

[0070] SEQ ID NO:12:NNNNKAK

[0071] 在一种实施方式中,可以作为抗DR5抗体的轻链CDR3或其抗原结合片段获得的SEQ ID NO:6的多肽可以具有选自由SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列组成的组中的至少一种(在以下氨基酸序列中,粗体和下划线字母表示从SEQ ID NO:13的氨基酸序列修饰的氨基酸残基):

[0072] SEQ ID NO:13:GSRDSSVYVGI

[0073] SEQ ID NO:14:GSRDSAGMGA

[0074] SEQ ID NO:15:GSRDSDGGGR

[0075] SEQ ID NO:16:GSRDSSGAGG

[0076] 在一种实施方式中,抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含:

[0077] 至少一个重链互补决定区,其选自由具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR1)、具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR2)和具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR3)组成的组;或包含上述至少一个重链互补决定区的重链可变区;

[0078] 至少一个轻链互补决定区,其选自由具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR1)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR2)和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR3)组成的组;或包含上述至少一个轻链互补决定区的轻链可变区;

[0079] 上述重链互补决定区和轻链互补决定区的组合;或

[0080] 上述重链可变区和轻链可变区的组合。

[0081] 更具体地,抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含:

[0082] 至少一个重链互补决定区,其选自由具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR1)、具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR2)和具有选自由SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:9组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR3)组成的组;或包含上述至少一个重链互补决定区的重链可变区;

[0083] 至少一个轻链互补决定区,其选自由具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR1)、具有选自由SEQ ID NO:10至SEQ ID NO:12组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR2)和具有选自由SEQ ID NO:13至SEQ ID NO:16组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR3)组成的组;或包含上述至少一个轻链互补决定区的轻链可变区;

[0084] 上述重链互补决定区和轻链互补决定区的组合;或

[0085] 上述重链可变区和轻链可变区的组合。

[0086] 在一种实施方式中,抗DR5抗体或抗原结合片段可包含:

[0087] 重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR1)、具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR2)和具有选自由SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:9组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>H</sub>-CDR3);和

[0088] 轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR1)、具有选自由SEQ ID NO:10至SEQ ID NO:12组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR2)和具有选自由SEQ ID NO:13至SEQ ID NO:16组成的组中的氨基酸序列的多肽(V<sub>L</sub>-CDR3)。

[0089] 在一种实施方式中,抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含下表2和3中给出的重链可变区和轻链可变区的组合。

[0090] 表2

[0091] 重链互补决定区(CDR)的序列

SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR1	SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR2	SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR3
1	GFTFSSFNML	2	GIGKSDRYTG YGSAVKG	7	DAGSGCGSGGWT GACIDT
1	GFTFSSFNML	2	GIGKSDRYTG YGSAVKG	8	DAGSPCGSGGWT GACIDT
1	GFTFSSFNML	2	GIGKSDRYTG YGSAVKG	9	DAGSPCGKGGWT GACIDT

[0093] 表3

[0094] 轻链CDR的序列

SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR1	SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR2	SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR3
4	SGGDSYAGSY YG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
4	SGGDSYAGSY YG	11	NNNNLMP	13	GSRDSSYVGI
4	SGGDSYAGSY YG	10	NNNNRPS	14	GSRDSAGMGA
4	SGGDSYAGSY YG	12	NNNNKAK	13	GSRDSSYVGI
4	SGGDSYAGSY YG	10	NNNNRPS	15	GSRDSDGGGR
4	SGGDSYAGSY YG	10	NNNNRPS	16	GSRDSSGAGG

[0096] 另一方面提供了包含重链互补决定区的重链可变区、包含轻链互补决定区的轻链可变区或其组合。例如,重链可变区可包含选自由SEQ ID NO:17至SEQ ID NO:37组成的组中的氨基酸序列,轻链可变区可包含选自由SEQ ID NO:38至SEQ ID NO:49组成的组的氨基酸序列。

[0097] 因此,抗DR5抗体或其抗原结合片段可包含:

[0098] 重链可变区,具有选自由SEQ ID NO:17至SEQ ID NO:37组成的组中的氨基酸序列;

[0099] 轻链可变区,具有选自由SEQ ID NO:38至SEQ ID NO:49组成的组中的氨基酸序列;或

[0100] 其组合。

[0101] 在一种实施方式中,抗DR5抗体可以是动物来源的抗体(例如小鼠来源的抗体)、嵌合抗体(例如小鼠-人嵌合抗体)或人源化抗体。抗体或抗原结合片段可以是活体分离的

或非天然存在的。抗体或抗原结合片段可以是重组的或合成的。

[0102] 在另一种实施方式中,抗体可以来源(分离)自任何动物,例如哺乳类动物(包括人)、鸟类等。例如,抗体可以是人抗体、小鼠抗体、驴抗体、绵羊抗体、兔抗体、山羊抗体、豚鼠抗体、骆驼抗体、马抗体或鸡抗体。本文中,人抗体是具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库中分离的抗体或从已经转基因至少一种人免疫球蛋白并且不包含内源免疫球蛋白的动物中分离的抗体。

[0103] 抗DR5抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,并且可以是例如单克隆抗体。可以使用本领域公知的方法制备单克隆抗体,例如,使用噬菌体展示技术。可供选择地,可以以小鼠来源的单克隆抗体的形式构建抗DR5抗体。

[0104] 除了如上定义的重链CDR和轻链CDR部分或重链可变区和轻链可变区之外,抗DR5抗体或其抗原结合片段可以来源于免疫球蛋白的任何亚型(例如IgA、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM等),例如,来源于构架部分和/或轻链恒定区和/或重链恒定区。

[0105] 全长抗体(例如IgG型)具有两条全长轻链和两条全长重链的结构,其中每条轻链经二硫键与相应的重链连接。抗体的恒定区分为重链恒定区和轻链恒定区,重链恒定区为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ 类型,并且具有亚类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 。轻链恒定区是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 型。

[0106] 如本文所用,术语“重链”旨在涵盖全长重链及其片段,全长重链包含包括足以提供对抗原特异性的氨基酸序列在内的可变区 $V_H$ 、三个恒定区 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ 以及铰链。术语“轻链”旨在涵盖全长轻链及其片段,全长轻链包含包括足以提供对抗原特异性的氨基酸序列在内的可变区 $V_L$ 、以及恒定区 $C_L$ 。

[0107] 术语“互补决定区(CDR)”是指在免疫球蛋白的重链或轻链的超可变区中发现的氨基酸序列。重链和轻链可分别包括三个CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3;以及CDRL1、CDRL2和CDRL3)。CDR可以提供在抗体与抗原或表位的结合中起重要作用的接触残基。如本文所用,术语“特异性结合”和“特异性识别”具有与本领域普通技术人员已知的一般含义,并且表明抗体和抗原彼此特异性相互作用以导致免疫反应。

[0108] 本文使用的术语“抗原结合片段”是指完整免疫球蛋白的包括作为抗原结合位点的一部分多肽的片段。抗原结合片段可以是scFv、(scFv)<sub>2</sub>、scFvFc、Fab、Fab'或F(ab')<sub>2</sub>,但不限于此。

[0109] 在抗原结合片段中,包含轻链可变区和重链可变区、轻链恒定区和第一重链恒定区 $C_{H1}$ 的Fab具有一个抗原结合位点。

[0110] Fab'与Fab的不同之处在于Fab'包括在 $C_{H1}$ 的C末端具有至少一个半胱氨酸残基的铰链区。

[0111] F(ab')<sub>2</sub>抗体通过桥接Fab'铰链区中的半胱氨酸残基的二硫键而形成。Fv是仅由重链可变区和轻链可变区组成的最小抗体片段。产生Fv片段的重组技术在本领域中是众所周知的。

[0112] 双链Fv包括通过非共价键彼此连接的重链可变区和轻链区。单链Fv通常包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区经肽接头通过共价键彼此连接或在C末端连接以具有如双链Fv的二聚体结构。

[0113] 抗原结合片段可以使用蛋白酶来获得(例如,可以通过用木瓜蛋白酶限制性切割完整抗体来获得Fab,以及可以通过用胃蛋白酶切割获得F(ab')<sub>2</sub>片段),或者可以通过使用

基因重组技术来制备。

[0114] 如本文所用,术语“铰链区”是指抗体重链内CH1和CH2域之间的区域,其功能是为抗原结合位点提供灵活性。

[0115] 另一方面提供了药物组合物,其包含抗DR5抗体或其抗原结合片段作为预防和/或治疗癌症的有效成分。

[0116] 另一方面提供了预防和/或治疗癌症的方法,该方法包括将药学有效量的抗DR5抗体或其抗原结合片段施用于有需要的受试者的步骤。用于预防和/或治疗癌症的方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要预防和/或治疗癌症的患者(例如,诊断或选择待治疗的受试者)的步骤。

[0117] 抗DR5抗体可有效地用于预防或治疗癌症。因为,如上所述,本文提供的抗DR5抗体用作DR5激动剂,可能有利的是,癌细胞表达DR5使得当应用于其的时候抗DR5抗体发挥足够的功效(例如,抗癌功效,例如癌细胞死亡)。此外,癌症可以是TRAIL敏感性癌症或TRAIL抗性癌症。在一种实施方式中,癌症的具体实例包括血癌、肺癌、胃癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌、皮肤黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、结肠直肠癌、结肠癌、乳腺癌、子宫肉瘤、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、喉癌、小肠癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、幼年期实体瘤、分化淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、和垂体腺瘤,但不限于此。

[0118] 在一种实施方式中,与单独使用抗DR5抗体或其抗原结合片段相比,抗DR5抗体或其抗原结合片段与TRAIL组合使用产生协同效应,并引发对TRAIL抗性癌症以及TRAIL敏感性癌症的抗癌作用(参见实施例13)。

[0119] 因此,除了抗DR5抗体或其抗原结合片段之外,药物组合物可以包含TRAIL (TNF相关的细胞凋亡诱导配体)。

[0120] 也就是说,药物组合物可包含以下作为有效成分:

[0121] (1) 抗DR5抗体或其抗原结合片段;和

[0122] (2) TRAIL。

[0123] 药物组合物可在一种合并制剂中或在分开的制剂中包含(1)抗DR5抗体或其抗原结合片段和(2)TRAIL。

[0124] 另外,除了施用抗DR5抗体或其抗原结合片段的步骤之外,用于预防和/或治疗癌症的方法还可以包括施用药学有效量的TRAIL的步骤。

[0125] 也就是说,用于预防和/或治疗癌症的方法可包括将(1)药学有效量的抗DR5抗体或其抗原结合片段和(2)药学有效量的TRAIL组合施用于需要预防和/或治疗癌症的患者的步骤。

[0126] 组合施用的步骤可以通过同时施用配制成一种剂型的(1)药学有效量的抗DR5抗体或其抗原结合片段和(2)药学有效量的TRAIL来进行,或同时或不考虑顺序地依次施用配制成分开的剂型的(1)药学有效量的抗DR5抗体或其抗原结合片段和(2)药学有效量的TRAIL来进行。

[0127] TRAIL (TNF相关凋亡诱导配体),也称为CD253 (分化簇253) 或TNFSF10 (肿瘤坏死因子(配体)超家族,成员10),是一种用作诱导细胞死亡(细胞凋亡)过程的配体的蛋白质。

TRAIL是由正常组织细胞广泛产生和分泌的细胞因子。在一种实施方式中,TRAIL可以是人来源的并且可以由例如NCBI登录号NP\_001177871.1、NP\_003801.1等表示,但不限于此。

[0128] 利用细胞凋亡途径的抗DR5抗体或其抗原结合片段(或与TRAIL组合)可以与至少一种化学治疗剂(例如卡铂或紫杉醇(Recka等人,Lung Cancer,82,441-448,2013)、吉西他滨(Torres等人,Cancer Medicine,2(6),925-932,2013)等)组合使用,从而增强抗癌/抗肿瘤作用(参见实施例15)。

[0129] 为了对癌症发挥预防和/或治疗作用,抗DR5抗体或其抗原结合片段或包含其的药物组合物可以单独给药或与手术、激素疗法、药物疗法和/或生物反应调节剂组合给药。

[0130] 在一种实施方式中,除了抗DR5抗体或其抗原结合片段(或与TRAIL组合)之外,药物组合物可包含至少一种熟知的具有抗癌作用的有效成分(化疗药物)。此外,用于预防和/或治疗癌症的方法可以包括除了抗DR5抗体或其抗原结合片段(或与TRAIL结合使用)之外,还给药至少一种熟知的具有抗癌作用的有效成分(化疗药物)的步骤。

[0131] 可与抗DR5抗体或其抗原结合片段一起使用的化疗药物可以是选自由以下组成的组中的至少一种:烷基化抗癌剂,例如卡铂、紫杉醇(Recka等人,Lung Cancer,82,441-448,2013)等;基于代谢拮抗剂的抗癌剂,例如吉西他滨(Torres等人,Cancer Medicine,2(6),925-932,2013)等;基于蒽环类的抗癌剂,例如多柔比星(HM Amm等人,Mol Cancer Res April,9;403,2011)等;基于蛋白酶体抑制剂的抗癌剂,例如硼替佐米(ShankerA等人,J Natl Cancer Inst,May 7;100(9):649-62,2008)等,但不限于此。

[0132] 为了适当施用有效成分例如抗DR5抗体、抗原结合剂等,至少一种药学上可接受的载体可以被包含在药物组合物中,或者可以与有效成分一起施用。药学上可接受的载体的实例可包括盐水、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水、右旋糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇及其一种或多种组分的混合物。如果需要,可以进一步添加其他常规添加剂,例如抗氧化剂、缓冲剂或抑菌剂。此外,通过添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂或润滑剂,可以将药物组合物配制成可注射剂型,例如水溶液、悬浮液或乳液,或配制成丸剂、胶囊剂、颗粒剂或片剂。此外,可以根据疾病或组分,使用与本领域相关的方法或在雷明顿药科学(Remington's Pharmaceutical Science)(最新版),Mack出版公司,Easton PA中公开的方法适当地配制药物组合物。

[0133] 有效成分如抗DR5抗体、抗原结合片段等,或药物组合物可以口服或肠胃外给药。对于肠胃外给药,可以进行静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮给药、局部给药、鼻内给药、肺内给药和直肠内给药。由于口服给药导致蛋白质或肽的消化,因此可以涂覆或配制用于口服给药的组合物中的活性成分以防止胃中的消化。另外,可以使用能够将活性成分递送至靶细胞的任意的装置来施用组合物。

[0134] 根据诸如制备(配制)方法、施用方法、患者年龄、体重、性别、病理状况和饮食、施用时间、施用间隔、施用途径、排泄速度和反应敏感性等因素,可以以各种量规定抗DR5抗体或其抗原结合片段的药物有效量。例如,抗DR5抗体或其抗原结合片段的日剂量可以为0.001至1000mg/kg,特别是0.01至100mg/kg,更特别是0.1至50mg/kg,甚至更特别是0.1至20mg/kg,但不限于此。每日剂量可以配制成单位剂型的单一制剂或配制成适当分开的制剂,或者可以制成被包含在多剂量容器中。药物组合物可以与其他药物组合施用,并且可以根据患者的状态对剂量、施用方法和其他药物的种类作出适当的规定。

[0135] 药物组合物可以配制成油或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆、乳液、提取物、粉末、颗粒、片剂或胶囊的形式，并且还可以包括用于配制的分散剂或稳定剂。

[0136] 特别地，包含抗DR5抗体或其抗原结合片段的药物组合物可以配制成免疫脂质体，因为它含有抗体或抗原结合片段。含有抗体的脂质体可以使用本领域广泛已知的任何方法制备。免疫脂质体可以是包含磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇衍生的磷脂酰乙醇胺的脂质组合物，并且可以通过反相蒸发法制备。例如，抗体的Fab'片段可以通过二硫化物交换反应与脂质体缀合。

[0137] 同时，由于抗DR5抗体或其抗原结合片段与DR5特异性结合，抗体或片段可用于检测DR5（即存在和/或水平（浓度））和/或诊断DR5相关疾病（即DR5的存在或水平变化（相对于正常状态显示出水平增加或减少的疾病））。

[0138] 因此，一种实施方式设想了包含抗DR5抗体或其抗原结合片段的DR5检测组合物。另一方面提供DR5检测方法，包括以下步骤：用抗DR5抗体或其抗原结合片段处理生物样品；并确定抗原-抗体反应的存在。如果鉴定出抗原-抗体反应，则可以确定生物样品含有DR5，并且可以通过测量生物样品中抗原-抗体反应的程度来测量DR5的水平（浓度）。

[0139] 生物样品可以选自由获得自患者（例如哺乳动物，例如人）的细胞、组织和体液以及其培养物组成的组。正常样品可选自由获得自未患DR5相关疾病的正常受试者（例如哺乳动物，例如人）获得的细胞、组织和体液及其培养物组成的组。

[0140] 可以使用本领域已知的各种方法进行鉴定抗原-抗体反应的存在步骤或测量抗原-抗体反应的步骤。举例来说，可以通过普通酶反应、荧光、发光和/或放射性检测来检测抗原-抗体反应，并且特别地可以通过选自由免疫色谱法、免疫组织化学、酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）、酶免疫测定（EIA）、荧光免疫测定（FIA）、发光免疫测定（LIA）、蛋白质印迹等方法测量，但不限于此。

[0141] 另一方面提供了：

[0142] 编码重链互补决定区的多核苷酸、编码轻链互补决定区的多核苷酸、或其组合；编码重链可变区的多核苷酸、编码轻链可变区的多核苷酸、或其组合；或编码重链的多核苷酸、编码轻链的多核苷酸、或其组合，其中互补决定区、重链可变区和轻链可变区、以及重链和轻链如以上对DR5抗体所描述；

[0143] 携带多核苷酸或其组合的重组载体；和

[0144] 含有重组载体的重组细胞。

[0145] 在一种实施方式中，上述重组载体可以在携带每种多核苷酸的单个载体或分开的载体中包含分别编码以下的多核苷酸：抗DR5抗体中的重链互补决定区和轻链互补决定区；重链可变区和轻链可变区；或重链和轻链。

[0146] 术语“载体”是指在宿主细胞中表达靶基因的工具，例如质粒载体、粘粒载体和病毒载体（例如噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体）。重组载体可以由本领域常用的质粒（例如pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19）、噬菌体（例如 $\lambda$ gt4 $\lambda$ B、 $\lambda$ -Charon、 $\lambda$   $\Delta$  z1和M13）或通过操纵病毒（例如，SV40等）来构建。

[0147] 在重组载体中，多核苷酸可以与启动子可操作地连接。术语“可操作地连接”旨在涉及目标核苷酸序列和表达调控序列（例如启动子序列）之间的功能性连接。当“可操作地

连接”时,调控元件可以控制目标核苷酸的转录和/或翻译。

[0148] 重组载体通常可以构建为克隆载体或表达载体。对于重组表达载体,可以使用本领域通常可用于在植物、动物或微生物细胞中表达外源蛋白的载体。本领域熟知的各种方法可用于构建重组载体。

[0149] 为了在宿主(例如原核或真核细胞)中使用,可以相应地构建重组载体。例如,当载体被构建为用于原核宿主的表达载体时,载体通常包括用于转录的强启动子(例如pL $\kappa$ 启动子、CMV启动子、trp启动子、lac启动子、tac启动子、T7启动子等)、用于启动翻译的核糖体结合位点和转录/翻译终止序列。另一方面,用于真核宿主的表达载体包括可在真核细胞中起作用的复制起点,例如f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、腺病毒复制起点、AAV复制起点和BBV复制起点,但不限于此。此外,表达载体通常包括源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子和HSV的tk启动子)以及作为转录终止序列的聚腺苷酸化序列。

[0150] 可以通过将重组载体导入合适的宿主细胞中来制备重组细胞。可以在本公开中使用的本领域已知的任何宿主细胞,只要该宿主细胞允许以稳定方式顺序克隆和表达重组载体。可用于本公开的原核宿主细胞的实例包括大肠杆菌(*E. coli*)、芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*) (例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*))以及肠杆菌科菌株(例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和各种假单胞菌物种(*Pseudomonas species*))。可用于转化的真核宿主细胞可包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*)、昆虫细胞和动物细胞,例如Sp2/0、CHO(中国仓鼠卵巢)K1、CHO DG44、PER.C6、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、Huh7、3T3、RIN和MDCK。

[0151] 可以使用本领域熟知的方法将核酸分子或携带核酸分子的重组载体导入

[0152] (转染)到宿主细胞中。当宿主细胞是原核细胞时,可以使用CaCl<sub>2</sub>或电穿孔方法进行该转染。对于真核宿主细胞,可以使用但不限于显微注射、磷酸钙沉淀、电穿孔、脂质体介导的转染或粒子轰击来实现遗传引入。

[0153] 为了选择转化的宿主细胞,可以根据本领域熟知的方法利用与选择标记物相关联的表型。例如,当选择标记物是赋予对某种抗生素抗性的基因时,宿主细胞可以在抗生素存在下在培养基中生长以选择目标转化体。

[0154] 另一方面提供了生产抗DR5抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括在相关宿主细胞中表达多核苷酸或重组载体的步骤。在一种实施方式中,生产方法可包括在其中培养含有多核苷酸或重组载体的重组细胞,并任选地从培养基中分离和/或纯化抗体。

[0155] 有益效果

[0156] 本公开提供了用于靶向治疗表达DR5的疾病的抗DR5抗体。本公开的抗体是TRAIL非竞争性抗体,其不论TRAIL的浓度如何都保持恒定水平的抗原结合亲和力。因此,与先前开发的抗体药物相比,抗体可以有效地开发成显示出优异功效的创新型新抗体药物或诊断剂。

## 附图说明

- [0157] 图1是描述抗体D0的缔合和解离速率的缔合和解离传感图。
- [0158] 图2a至2f是抗体D0和DA1至DA35与对照抗体AP在对DR5的结合活性方面进行比较的图。
- [0159] 图3a和3b显示了根据本公开的代表性抗体的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果。
- [0160] 图4a至4h是根据本公开的代表性抗体的尺寸排阻色谱图 (SEC)。
- [0161] 图5显示了根据本公开的抗体的药代动力学分布图。
- [0162] 图6a至6r证明了根据本公开的抗体在肿瘤细胞中具有细胞毒活性。
- [0163] 图7a和7b显示了根据本公开的抗体在异种移植动物模型中的肿瘤生长抑制的结果。
- [0164] 图8a和8b证明了根据本公开的抗体不与TRAIL竞争结合DR5。
- [0165] 图9a和9b是描绘在诱导细胞死亡的测定中根据本公开的抗体和TRAIL的协同效应的图。
- [0166] 图10a至10c是显示根据本公开的抗体通过细胞凋亡诱导细胞死亡的图。
- [0167] 图11a和11b显示了根据本公开的抗体当与某些浓度的吉西他滨组合使用时的细胞毒活性。

## 具体实施方式

[0168] 在下文中,将参考实施例详细描述本发明。这些实施例仅用于更具体地说明本发明,对本领域技术人员显而易见的是,本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0169] 实施例1.DR5免疫和cDNA文库构建

[0170] 为了选择与DR5特异性结合的抗体,构建了动物免疫的抗体文库。通过从用抗原免疫的动物的免疫细胞中获得mRNA,使用针对抗体基因的引物组合通过PCR扩增抗体基因,并将抗体基因克隆到噬菌体展示载体中来构建文库。

[0171] 简而言之,将与完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂 (Sigma,U.S.A) 混合的人DR5 (R&D systems,U.S.A) 以三周的规律间隔五次皮下注射至三只白色来亨鸡。将来自免疫动物的血清在PBSB (3%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水溶液) 中以1:100、1:500、1:2500和1:12500的浓度稀释,然后储存。进行酶联免疫吸附测定以检查血清是否与人DR5结合。将ELISA板用1 $\mu$ g/ml人DR5 (R&D systems,U.S.A.) 在4 $^{\circ}$ C下包被过夜,然后与稀释的血清反应2小时。将板用PBST (0.1%吐温-20的PBS溶液) 洗涤三次,然后与抗鸡免疫球蛋白-HRP (辣根过氧化物酶) (1:3000) 一起温育1小时。用PBST洗涤三轮后,用ABTS (Thermo,U.S.A.) 显色20分钟。在酶标仪上读取405nm处的吸光度。免疫前的血清不与DR5结合。选择产生与人DR5强结合的血清的动物。

[0172] 最后一次注射后5天,从所选择的鸡中收集骨髓、脾脏和法氏囊。将组织与10ml TRI试剂 (Molecular research Center,U.S.A.) 混合,并用匀浆器匀浆。添加20ml TRI试剂,然后离心。将由此获得的上清液与3ml的1-溴-3-氯丙烷 (BCP) 混合并离心以获得上清液。通过添加15ml异丙醇来沉淀总RNA。使用SuperScript转录系统 (Invitrogen,U.S.A.) 以随机六聚体作为引物进行逆转录 (65 $^{\circ}$ C下5分钟;4 $^{\circ}$ C下5分钟;50 $^{\circ}$ C下50分钟;85 $^{\circ}$ C下5分钟;

以及4℃下)。将含有所得cDNA的5μl (微升) 逆转录反应混合物上样到1%琼脂糖凝胶上并电泳以检测各种长度的cDNA条带。

[0173] 实施例2. 抗体文库的构建

[0174] (2-1) 免疫抗体基因的扩增

[0175] 为了扩增鸡抗体的重链可变区V<sub>H</sub>和轻链可变区V<sub>L</sub>, 如下进行PCR。对于PCR, 用实施例1中制备的cDNA作为模板, 并且如下表4所示, 使用针对重链可变区、轻链可变区和连接重链可变区和轻链可变区的scFv (单链Fv) 设计的引物组合。将V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub> cDNA文库各0.5μl、30pmol正向引物、30pmol反向引物、10×PCR缓冲液、200μM dNTP和0.5μl TaqDNA聚合酶混合并调节至最终体积为50μl, 并进行PCR。在94℃下变性5分钟, 接着进行30个循环: 94℃下15秒, 56℃下30秒, 72℃下90秒。通过1%琼脂糖凝胶电泳根据大小分离PCR扩增的抗体DNA, 并使用凝胶提取试剂盒(Qiagen, U.S.A.) 纯化。

[0176] 为获得scFv DNA, 将纯化的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub> DNA各50ng用作模板, 并与30pmol正向引物, 30pmol反向引物, 10×PCR缓冲液, 200μM dNTP和0.5μl TaqDNA聚合酶混合至终体积为50μl。PCR通过以下进行: 在94℃下变性5分钟, 然后进行20个循环: 94℃下30秒, 56℃下30秒和72℃下2分钟。在1%琼脂糖凝胶电泳上根据大小分离PCR扩增的DNA, 并使用凝胶提取试剂盒(Qiagen, U.S.A.) 纯化。

[0177] PCR中使用的引物总结在下表4中。

[0178] 表4

[0179] PCR中使用的引物

	引物	序列	SEQ ID NO
V <sub>H</sub>	正向	GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GGC GGT GGT GGC AGC TCC GGT GGT GGC GGT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG	50
	反向	CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC	51
V <sub>L</sub>	正向	GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC	52
	反向	GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G	53
scFV	正向	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG	54
	反向	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG	55

[0181] (2-2) 抗体DNA的限制酶消化

[0182] 将以上制备的scFv和噬菌粒载体pComb3X (Scripps Research Institute, CA, U.S.A) 用限制酶Sfi I (Roche, U.S.A) 消化。将10μg编码scFv的PCR片段, 360单位Sfi I (Roche, U.S.A.) 和20μl 10×缓冲液的混合物体积调节至最终体积为200μl, 并使其在50℃下反应过夜。另外, 将20μg pComb3X载体、120单位Sfi I和20μl 10×缓冲液的混合物体积调节至200μl, 并在50℃下反应过夜。将每种所得消化物在琼脂糖凝胶上电泳, 并使用凝胶提取试剂盒(Qiagen, U.S.A.) 纯化。

[0183] (2-3) 抗体DNA的连接和文库构建

[0184] 为了将scFv片段插入pComb3X,将在(2-2)中用限制酶SfiI消化的700ng编码scFV的PCR片段和1.4μg pComb3X的混合物在T4 DNA连接酶(Invitrogen,U.S.A.)存在下于16℃下反应过夜。将由此获得的连接混合物通过乙醇沉淀纯化,并通过电穿孔转化到大肠杆菌ER2738(New England Biolab,U.S.A.)中。在46μg/ml羧苄青霉素和70μg/ml卡那霉素存在下培养大肠杆菌,以构建复杂度为 $5 \times 10^9$ 的文库。

[0185] 实施例3.携带抗DR5 scFv的噬菌体克隆的选择

[0186] 从实施例2中获得的具有scFV形式的随机化重链和轻链的文库中,使用固相固定的DR5选择与人DR5结合的抗体。

[0187] (3-1) 选择与DR5结合的抗体

[0188] 首先,将10μg人DR5(R&D systems,U.S.A)与磁珠缀合。通过将实施例2中获得的scFv型抗体与噬菌体外壳蛋白PIII融合以使噬菌体表面上的抗体表达来构建抗体DNA文库。用抗体文库DNA通过电穿孔转化后,将大肠杆菌ER2738(New England Biolab)在37℃下培养,然后在SB培养基(30g/L胰蛋白胨,20g/L酵母提取物和10g/L MOPS,pH7.0)中,在46μg/ml羧苄青霉素和70μg/ml的卡那霉素存在下与VCSM13辅助噬菌体(Stratagene,U.S.A)温育过夜。将得到的含有大肠杆菌和噬菌体的培养肉汤离心以沉淀并除去大肠杆菌。回收上清液并在添加40mg/ml聚乙二醇8000和30mg/ml NaCl后离心。收集PEG沉淀的噬菌体并重悬于PBS中。使噬菌体在室温下与缀合至磁珠的人DR5反应2小时,以捕获对DR5具有亲和力的噬菌体。此后,用0.5%吐温20的PBS溶液洗涤珠子,用0.1M甘氨酸(pH 2.2)洗脱结合的噬菌体,并用2M Tris中和。使洗脱的噬菌体感染大肠杆菌ER2738并培养过夜以进行下一轮淘选。该淘选程序重复四次。重复的淘选轮次导致具有高结合亲和力的噬菌体的积累。将选自第四次淘选的平板的单个克隆与VCSM13辅助噬菌体(1:1000)在37℃下在100μl/ml羧苄青霉素和70μg/ml卡那霉素存在下在96深孔板中温育过夜以诱导扩增表达抗体的噬菌体。离心所得到的培养肉汤后,将上清液中的噬菌体与TRAIL预结合,然后接种到涂有DR5的ELISA板中。在37℃下温育2小时,然后使用HRP缀合的抗M13抗体进行ELISA以鉴定DR5结合抗体。

[0189] (3-2) 所选抗体的测序

[0190] 在实施例(3-1)的选择条件下显示含有DR5反应性克隆的大肠杆菌ER2738在SB培养基中培养过夜,并通过离心收获。使用DNA min-prep试剂盒(GeneAll,Korea)制备质粒DNA并测序。使用下表5中给出的测序引物进行测序。

[0191] 表5

[0192] PCR中使用的引物

引物	序列	SEQ ID NO
正向	ACA CTT TAT GCT TCC GGC TC	56
反向	CAA AAT CAC CGG AAC CAG AG	57

[0194] 实施例4.抗体优化-人源化和亲和力改善

[0195] 在从动物免疫抗体文库获得的抗体克隆中,选择具有高亲和力和活性的亲本克隆D0(嵌合抗体)。将抗体构架转换为人抗体构架(Nishibori等人,Molecular Immunology,43(2006))。为了改善亲和力,构建了在重链和轻链区的CDR序列中具有随机突变的新噬菌体文库。以与实施例2相同的方式获得噬菌体文库,在室温下与固定在磁珠上的10μg人DR5反应2小时,并用0.5%吐温20的PBS溶液洗涤5次。此后,用0.1M甘氨酸(pH 2.2)洗脱结合的噬

菌体,然后用2M Tris溶液中中和。为了增加选择压力,在第二轮淘选中,将1 $\mu$ g人DR5固定在磁珠上并用吐温20的PBS溶液洗涤10次,同时在第三轮淘选中,固定0.1 $\mu$ g人DR5并用吐温20的PBS溶液洗涤20次。除了上述人源化和亲和力改善方法之外,还通过取代预测在免疫细胞中具有高免疫原性的亲本克隆的可变区构架序列中的氨基酸来构建去免疫化变体。如上所述获得的亲本克隆的人源化或去免疫化变体命名为“DA1至DA35”。

[0196] 获得自D0和DA1至DA35克隆的互补决定区和可变区的序列总结于下表6至9中:

[0197] 表6

[0198] 重链CDR的序列

[0199]

克隆编号	SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR1	SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR2	SEQ ID NO	V <sub>H</sub> -CDR3
D0	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA1	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA2	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA3	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA4	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA5	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA6	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA7	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA8	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA9	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA10	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA11	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA12	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA13	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA14	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA15	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA16	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT

[0200]

DA17	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA18	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA19	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA20	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA21	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA22	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	8	DAGSPCGSGGW TGACIDT
DA23	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	9	DAGSPCGKGGW TGACIDT
DA24	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA25	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA26	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA27	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA28	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA29	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA30	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA31	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA32	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA33	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA34	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT
DA35	1	GFTFSSF NML	2	GIGKSDRYT GYGSAVKG	7	DAGSGCGSGGW TGACIDT

[0201] 表7

[0202] 轻链CDR的序列

[0203]

克隆 编号	SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR1	SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR2	SEQ ID NO	V <sub>L</sub> -CDR3
D0	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA1	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI

[0204]

DA2	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA3	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA4	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA5	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA6	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA7	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA8	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA9	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA10	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA11	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA12	4	SGGDSYAGSYYYG	11	NNNNLMP	13	GSRDSSYVGI
DA13	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	14	GSRDSAGMGA
DA14	4	SGGDSYAGSYYYG	12	NNNNKAK	13	GSRDSSYVGI
DA15	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	15	GSRDSDGGGR
DA16	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	16	GSRDSSGAGG
DA17	4	SGGDSYAGSYYYG	12	NNNNKAK	13	GSRDSSYVGI
DA18	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	15	GSRDSDGGGR
DA19	4	SGGDSYAGSYYYG	11	NNNNLMP	13	GSRDSSYVGI
DA20	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	14	GSRDSAGMGA
DA21	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	16	GSRDSSGAGG
DA22	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA23	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA24	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA25	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA26	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA27	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA28	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA29	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA30	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA31	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA32	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA33	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA34	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI
DA35	4	SGGDSYAGSYYYG	10	NNNNRPS	13	GSRDSSYVGI

[0205] 表8

[0206] 重链可变区的序列

[0207]

克隆	VH-FW1	VH-CDR1	VH-FW2	VH-CDR2	VH-FW3	VH-CDR3	VH-FW4	SEQ ID NO
D0	AVTLDES GGGLQT	GFTFS SFM	WVRQ APGKG	GIGKSD RYTGY	RATISRDDG QSTVRLQLN	DAGSGCG SGGWTGA	WG HGT	17

[0208]

	PGGGLSL VCKGS	L	LEWVA	GSAVKG	NLRAEDTGT YYCVK	CIDT	EVI VSS	
DA 1	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 2	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 3	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK STVYLQMN SLRAEDTAV YYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	19
DA 4	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KNTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	20
DA 5	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTAYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	21
DA 6	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCAR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	22
DA 7	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	23
DA 8	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 9	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTLYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	24
DA 10	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	25
DA 11	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCAR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	26

[0209]

DA 12	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	27
DA 13	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	27
DA 14	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	27
DA 15	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	27
DA 16	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDTSK NTAYLQMN SLRAEDTAV YYCSR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	27
DA 17	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 18	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 19	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 20	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 21	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	18
DA 22	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RFTISRDDS KSTVYLQM NSLRAEDTA VYYCVR	DAGSPCG SGGWTGA CIDT	WG QGT LVT VSS	28
DA 23	EVQLVES GGGLVQ	GFTFS SFNM	WVRQ APGKG	GIGKSD RYTGY	RFTISRDDS KSTVYLQM	DAGSPCG KGGWTG	WG QGT	29

	PGGSLRL SCAAS	L	LEWVA	GSAVKG	NSLRAEDTA VYYCVR	ACIDT	LVT VSS		
[0210]	DA 24	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTVRLQLN NLRAEDTGT YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	17
	DA 25	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTVYLQM NSLRAEDTG TYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	30
	DA 26	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTVYLQM NSLRAEDTG TYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	30
	DA 27	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTVRLQLN NLRAEDTGT YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	17
	DA 28	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTARLQLN NLRAEDTGT YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	31
	DA 29	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTARLQLN NLRAEDTGT YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	31
	DA 30	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTAYLQM NSLRAEDTG TYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	32
	DA 31	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTARLQM NSLRAEDTG TYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	33
	DA 32	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTVRLQLN NLRAEDTAV YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	34
	DA 33	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTARLQLN NLRAEDTAV YYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	35
	DA 34	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTAYLQM NSLRAEDTA VYYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	36
[0211]	DA 35	AVTLDES GGGLQT PGGGLSL VCKGS	GFTFS SFNM L	WVRQ APGKG LEWVA	GIGKSD RYTGY GSAVKG	RATISRDDG QSTARLQM NSLRAEDTA VYYCVK	DAGSGCG SGGWTGA CIDT	WG HGT EVI VSS	37

[0212] (在上表8中, VH-FW1、VH-FW2和VH-FW3代表重链可变区的构架)

[0213] 表9

[0214] 轻链可变区的序列

[0215]

克隆	VL-FW1	VL-CD R1	VL-FW2	VL-CD R2	VL-FW3	VL-CD R3	VL-FW 4	SEQ ID NO
D0	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EAVYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	38
DA 1	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 2	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	40
DA 3	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 4	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 5	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 6	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 7	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	39
DA 8	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLQPE	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	41

[0216]

	TITC				DFATYYC			
DA 9	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	40
DA 10	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	40
DA 11	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	40
DA 12	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNL MP	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	42
DA 13	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS AGMG A	FGQG TKVEI K	43
DA 14	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNN KAK	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	44
DA 15	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS DGGG R	FGQG TKVEI K	45
DA 16	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SGAG G	FGQG TKVEI K	46
DA 17	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNN KAK	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	44
DA 18	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS DGGG R	FGQG TKVEI K	45
DA 19	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQKP GKAPKT LIY	NNNNL MP	GVPSRFSG SRSGTDFT LTISSLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	42
DA	DIQMTQ	SGGDS	WYQQKP	NNNNR	GVPSRFSG	GSRDS	FGQG	43

[0217]

20	SPSSLSA SVGDRV TITC	YAGS YYYG	GKAPKT LIY	PS	SRS GTDFT LTIS SLQPE DFATYYC	AGMG A	TKVEI K	
DA 21	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG SRS GTDFT LTIS SLQPE DFATYYC	GSRDS SGAG G	FGQG TKVEI K	46
DA 22	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTIS SLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	47
DA 23	DIQMTQ SPSSLSA SVGDRV TITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK GKAPKT LIY	NNNNR PS	GVPSRFSG STSGTDFT LTIS SLQPE DFATYYC	GSRDS SYVGI	FGQG TKVEI K	47
DA 24	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYYC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	48
DA 25	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EAVYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	38
DA 26	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYYC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	48
DA 27	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	49
DA 28	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EAVYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	38
DA 29	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	49
DA 30	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYYC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	48
DA 31	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	49

					EATYFC				
[0218]	DA 32	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EAVYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	38
	DA 33	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	49
	DA 34	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYYC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	48
	DA 35	LTQPSSV SANLGG TVEITC	SGGDS YAGS YYYG	WYQQK APGSAP VTVIY	NNNNR PS	NIPSRFSGS TSGSTATLT ITGVQAED EATYFC	GSRDS SYVGI	FGAG TTLTV L	49

[0219] (在表9中, VL-FW1、VL-FW2和VL-FW3代表轻链可变区的构架)

[0220] 实施例5. 抗体的产生

[0221] 生产免疫球蛋白 (IgG) 蛋白质以用于测定上面获得的抗体的亲和力和活性。从携带scFv核苷酸的pComb3x, 使用表10中所示的引物组合和实施例2中使用的条件通过PCR获得重链和轻链的可变区和恒定区片段。

[0222] 使用表10中的HC和LC引物的组合, 通过PCR扩增重链和轻链中可变区 (V<sub>H</sub>至V<sub>L</sub>) 和恒定区 (C<sub>H</sub>至C<sub>k</sub>) 的基因, 并使用pcDNATM3.3-**TOPO**<sup>®</sup>TA克隆试剂盒和p0ptiTMVEC-**TOPO**<sup>®</sup>TA克隆试剂盒 (Invitrogen, U.S.A.) 插入哺乳动物细胞表达质粒中。1μl的各载体 (pcDNATM3.3-**TOPO**<sup>®</sup>载体和p0ptiTM VEC-**TOPO**<sup>®</sup>载体) 和片段添加到含有200mM NaCl和10mM MgCl<sub>2</sub>的缓冲液中直到最终体积为6μl, 并在室温下反应5分钟。通过热休克将载体转化到DH5α大肠杆菌感受态细胞中。将得到的菌落大量培养以获得质粒。将以上制备的质粒转染到HEK293F细胞 (Invitrogen, U.S.A.) 中, 然后培养7天以表达抗体。使用蛋白A柱 (GE, U.S.A.) 纯化抗体。将细胞培养上清液上样到柱上, 使抗体 (IgG) 与蛋白A结合, 然后用20mM柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0) 洗脱。通过SDS-PAGE证实抗体具有高纯度和与理论大小一致的轻链和重链分子量。

[0223] 表10

	引物	序列	SEQ ID NO
V <sub>H</sub>	正向	GCT AGC CGC CAC CAT GGG C	58
	反向	AGG GGC CCT TGG TGG AGG CCT GGC CGG CCT GGC CAC T	59
C <sub>H</sub>	正向	GCC TCC ACC AAG GGC CCC TC	60
	反向	CGG GAT CCC TTG CCG GCC GT	61
HC (重链)	正向	GCT AGC CGC CAC CAT GGG C	62
	反向	CGG GAT CCC TTG CCG GCC GT	63
V <sub>L</sub>	正向	AAG CTT GCC GCC ACC ATG	64
	反向	AGG GGG CGG CCA CGG TCC GGG AAG ATC TAG AGG ACT G	65
C <sub>k</sub>	正向	CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	66
	反向	GCT CTA GAC TAG CAC TCG C	67
LC (轻链)	正向	AAG CTT GCC GCC ACC ATG	68
	反向	GCT CTA GAC TAG CAC TCG C	69

[0225] 实施例6. 抗体与人DR5的结合亲和力的测定

[0226] 为了测量亲和力,根据制造商的说明将人DR5偶联至羧化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,GE)。通过注射2倍连续稀释至5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM、0.313nM和0.156nM的IgG蛋白来评估缔合和解离速率。

[0227] 在缔合和解离传感图中描述了缔合和解离速率,并使用简单的1:1Langmuir结合模型(BIAcore X100评估软件,版本2.0)计算。平衡解离常数(KD),即解离常数(Kd)与缔合常数(Ka)之比,被证实为在亚纳摩尔范围内。本公开的D0和DA1至DA35抗体与DR5的结合的测量在下表11中给出(抗体名称作为来自该抗体的克隆的名称给出)。D0的代表性传感图在图1中示出。

[0228] 表11

抗体	结合分子	KA (1/MS)	的 Kd (1/s) 的	KD (M)
D0	人 DR5	1.49×10 <sup>6</sup>	2.26×10 <sup>-5</sup>	1.52×10 <sup>-11</sup>
DA1	人 DR5	4.90×10 <sup>6</sup>	1.80×10 <sup>-9</sup>	3.80×10 <sup>-16</sup>
DA2	人 DR5	1.90×10 <sup>6</sup>	4.90×10 <sup>-10</sup>	2.10×10 <sup>-16</sup>
DA3	人 DR5	4.90×10 <sup>6</sup>	1.80×10 <sup>-9</sup>	3.80×10 <sup>-16</sup>
DA4	人 DR5	1.20×10 <sup>6</sup>	1.20×10 <sup>-7</sup>	1.00×10 <sup>-13</sup>
DA5	人 DR5	1.20×10 <sup>6</sup>	2.60×10 <sup>-9</sup>	2.10×10 <sup>-15</sup>
DA6	人 DR5	7.80×10 <sup>6</sup>	4.20×10 <sup>-6</sup>	5.30×10 <sup>-13</sup>
DA7	人 DR5	1.40×10 <sup>6</sup>	2.90×10 <sup>-6</sup>	1.90×10 <sup>-12</sup>
DA8	人 DR5	1.60×10 <sup>6</sup>	2.20×10 <sup>-8</sup>	1.30×10 <sup>-14</sup>

DA9	人 DR5	$5.60 \times 10^6$	$4.00 \times 10^{-7}$	$7.10 \times 10^{-14}$
DA10	人 DR5	$2.30 \times 10^6$	$1.60 \times 10^{-5}$	$7.00 \times 10^{-12}$
DA12	人 DR5	$2.37 \times 10^6$	$2.99 \times 10^{-5}$	$1.27 \times 10^{-11}$
DA13	人 DR5	$2.62 \times 10^6$	$2.94 \times 10^{-5}$	$1.12 \times 10^{-11}$
DA14	人 DR5	$4.27 \times 10^6$	$1.00 \times 10^{-4}$	$2.35 \times 10^{-11}$
DA15	人 DR5	$2.56 \times 10^6$	$2.78 \times 10^{-6}$	$1.09 \times 10^{-12}$
DA16	人 DR5	$2.11 \times 10^6$	$5.53 \times 10^{-5}$	$2.61 \times 10^{-11}$
DA17	人 DR5	$2.54 \times 10^6$	$5.97 \times 10^{-5}$	$2.35 \times 10^{-11}$
DA18	人 DR5	$1.33 \times 10^6$	$3.67 \times 10^{-5}$	$2.77 \times 10^{-11}$
DA20	人 DR5	$1.00 \times 10^6$	$1.21 \times 10^{-5}$	$1.20 \times 10^{-11}$
DA21	人 DR5	$1.11 \times 10^6$	$7.17 \times 10^{-6}$	$6.43 \times 10^{-12}$
DA22	人 DR5	$9.32 \times 10^5$	$3.19 \times 10^{-5}$	$3.42 \times 10^{-11}$
[0230] DA23	人 DR5	$6.96 \times 10^5$	$2.80 \times 10^{-5}$	$4.03 \times 10^{-11}$
DA24	人 DR5	$1.20 \times 10^6$	$1.23 \times 10^{-6}$	$1.02 \times 10^{-12}$
DA25	人 DR5	$1.05 \times 10^6$	$1.71 \times 10^{-6}$	$1.62 \times 10^{-12}$
DA26	人 DR5	$1.09 \times 10^6$	$1.10 \times 10^{-6}$	$1.01 \times 10^{-12}$
DA27	人 DR5	$1.17 \times 10^6$	$2.24 \times 10^{-6}$	$1.92 \times 10^{-12}$
DA28	人 DR5	$1.16 \times 10^6$	$4.52 \times 10^{-6}$	$3.89 \times 10^{-12}$
DA29	人 DR5	$1.21 \times 10^6$	$8.47 \times 10^{-5}$	$6.98 \times 10^{-11}$
DA30	人 DR5	$1.03 \times 10^6$	$7.97 \times 10^{-5}$	$7.74 \times 10^{-11}$
DA31	人 DR5	$1.24 \times 10^6$	$8.79 \times 10^{-5}$	$7.06 \times 10^{-11}$
DA32	人 DR5	$1.14 \times 10^6$	$8.59 \times 10^{-5}$	$7.51 \times 10^{-11}$
DA33	人 DR5	$1.24 \times 10^6$	$9.77 \times 10^{-5}$	$7.88 \times 10^{-11}$
DA34	人 DR5	$1.00 \times 10^6$	$9.50 \times 10^{-5}$	$9.42 \times 10^{-11}$
DA35	人 DR5	$1.13 \times 10^6$	$9.12 \times 10^{-5}$	$8.01 \times 10^{-11}$

[0231] 实施例7. 人DR5的抗体的结合活性的测定

[0232] 通过酶联免疫吸附测定证实了本公开的抗体对人DR5的结合活性。将浓度为10ng/ml的人DR5蛋白以150 $\mu$ l/孔的体积铺到96孔免疫板(Nunc,U.S.A.)上,并在室温下吸附1小时。将板用缓冲溶液洗涤三次后,将抗体的连续稀释溶液(0.1至2000ng/ml)以150 $\mu$ l/孔加入孔中,并在室温下温育1至2小时。用缓冲溶液再次洗涤板。然后,将抗人免疫球蛋白Fc的HRP(辣根过氧化物酶)-缀合的抗体(Serotec,U.S.A.)稀释1:20,000,并以每孔150 $\mu$ l的体积铺板,然后在室温下温育1小时。洗涤后,以每孔100 $\mu$ l的量添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB;Sigma,U.S.A.)溶液,并温育3至10分钟进行显色。当显色达到一定水平时,用1N硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应。使用分光光度计(Molecular Device,U.S.A.)在450nm处读取吸光度,结果示于图2a至2f中。在该测定中,根据PCT/US2006/03577(WO 2006/083971)中公开的抗DR5抗体序列合成抗体AP,并用作对照抗体。如图2a至2f所示,与对照抗体AP相比,观察到抗体D0和DA1至DA35具有更高的抗原结合活性。

[0233] 实施例8. 物理化学性质的分析

[0234] [8-1] 抗体大小的确认

[0235] 使用NuPAGE 4至12%Bis-Tris凝胶 (Invitrogen,U.S.A.) 通过SDS-PAGE分析根据本公开的抗体的大小。在经DTT (Invitrogen,U.S.A.) 处理以去除二硫键后的还原条件下以及不用DTT处理的非还原条件下,对制备的抗DR5抗体 (D0、DA1、DA4、DA16、DA18、DA20、DA23、DA26和DA29) 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),以鉴定完整抗体的轻链和重链的存在。结果如图3a (非还原条件) 和3b (还原条件) 所示。如图3a所示,对于在非还原条件下分析的样品,在98kDa大小标记物和188kDa大小标记物之间的位置处检测到条带,其对应于完整抗体的大小。如图3b所示,对于在还原条件下分析的样品,在49kDa大小标记物和28kDa大小标记物的附近检测到两个条带,其分别对应于抗体的重链和轻链。因此,通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分别检测对应于整个抗体、重链和轻链的条带。

#### [0236] [8-2] 抗体纯度的确认

[0237] 使用TSKgel G3000SWx1柱 (Tosoh, Japan) 通过尺寸排阻色谱 (SEC) 分析抗体纯度和 (可溶性) 聚集体。结果如图4a (对照抗体AP)、4b (D0)、4c (DA1)、4d (DA4)、4e (DA15)、4f (DA23)、4g (DA26) 和4h (DA29) 所示。使用100mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 作为流动相使用梯度洗脱操作SEC并在280nm处测量吸光度。通常,观察到超过94%的高纯度,即单体占总峰面积的94%或更多,聚集峰占不到6%。

#### [0238] 实施例9. 抗体的药代动力学

[0239] 为了检查上文构建的抗体的体内动力学,在小鼠中评估血液半衰期。将抗体以1至10mg/kg的剂量静脉内注射到裸鼠中。注射后5分钟至14天从眼眶静脉采血。使用肝素化毛细管进行血液采集。将通过离心血液样品获得的血浆以一定比例稀释,并用作ELISA评估的样品。将稀释至10ng/ml浓度的人DR5以100 $\mu$ l/孔接种到96孔免疫板 (Nunc,U.S.A.) 上并吸附到孔中12至14小时。将板用含有0.1%吐温20的缓冲溶液洗涤三次,并在室温下用含有牛血清白蛋白 (Sigma,U.S.A.) 的缓冲溶液封闭1小时。用缓冲溶液洗涤三轮后,将板与每种小鼠血浆稀释溶液和标准物质的连续稀释溶液在室温下温育2至3小时。用缓冲溶液洗涤三次后,以每孔100 $\mu$ l的体积添加1:20000稀释的HRP缀合的抗人免疫球蛋白Fc (Fc-HRP) 抗体 (Bethyl,U.S.A.),并在室温下温育1小时。洗涤三次后,向每个孔中添加100 $\mu$ l TMB溶液 (Sigma,U.S.A.) 并使其反应。当显色达到一定水平时,用0.2N硫酸溶液终止反应。使用分光光度计 (Molecular Device,U.S.A.) 测量在450nm处的吸光度。由光密度 (OD) 测量来计算每个血浆样品中的抗体浓度,并使用WinNonLin第6.2.0.495版估计药代动力学参数。结果如图5和下表12所示。

#### [0240] 表12

		单位	D0	DA22	DA23
			10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
Cmax		ug/ml	286.9	227.9	195.8
AUCinf		hr*ug/ml	914.1	1025.3	685.3
t1/2	最初 (-1d)	天	0.57	0.70	0.58
	最终 (2d~14d)	天	6.68	8.37	7.97
Rsq	最初 (-1d)		1.000	1.000	1.000
	最终 (2d~14d)		1.000	0.988	0.990

[0241] 如图5和表12所示,抗体(D0、DA22和DA23)在所用小鼠中显示出6.68至8.37天的血液半衰期。

[0242] 实施例10. 确认肿瘤细胞中抗体的细胞毒性

[0243] 使用体外细胞死亡测定来确定制备的抗体的生物活性。对于该测定,使用人结肠直肠癌细胞系Colo205(ATCC,U.S.A.)、人胰腺癌细胞系Miapaca-2(ATCC,U.S.A.)和人肺癌细胞系H2122(ATCC,U.S.A.)。

[0244] 将每个肿瘤细胞系以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度悬浮,以每孔 $50 \mu\text{l}$ 铺板到96孔细胞培养板中,并在恒温潮湿室中培养16至24小时。将具有一定浓度(0.06至66,000pM)的抗体(单独的Ab)单独施加或与交联抗体(抗人Fc)(Serotec,U.S.A.)(Ab连接)组合施加,然后温育48小时。向每个孔中添加 $10 \mu\text{l}$ 刃天青溶液(Invitrogen,U.S.A.),并在恒温潮湿室中温育1至2小时。此后,使用分光光度计(Molecular Device)在590nm处读取荧光。细胞存活率计算为测试物质处理组(处理的RFU)的相对荧光单位(RFU)与培养基处理组(未处理的RFU)的相对荧光单位的百分比(细胞存活率(%)) = 处理的RFU/未处理的RFU)  $\times 100$ )。结果如图6a至6r所示。为了比较,对对照抗体AP进行与上述相同的测定。

[0245] 如图6a至6r所示,上述构建的抗体在所有三种人癌细胞系中显示出优异的细胞死亡活性。

[0246] 实施例11. 异种移植模型中抗肿瘤活性的评估

[0247] 通过向已经植入人癌细胞系的裸鼠注射抗体来评估抗肿瘤活性。对于表达人DR5的癌细胞系,使用人肺癌细胞系H2122(ATCC,U.S.A.)和人胰腺癌细胞系Miapaca-2(ATCC,U.S.A.)。将2至5百万个肿瘤细胞植入6至8周龄雌性BALB/c裸鼠(OrientBio)的侧皮下部位,然后使用测径器测量肿瘤体积。当肿瘤生长至平均体积为100至 $300 \text{mm}^3$ 时,将小鼠分组,并将上述构建的抗体(对照抗体AP和抗体D0)注射到指定的组。以0.05至 $2 \text{mg/kg}$ 的剂量,每周三次腹膜内注射(分组当天、第7天和第14天)给予抗体。在初次注射后的28天至50天期间,每周两次测量肿瘤体积。注射缓冲溶液(PBS)作为阴性对照。

[0248] 结果如7a(H2122植入小鼠)和7b(Miapaca-2植入小鼠)所示。如图7a和7b所示,抗体D0显示出优于对照抗体AP的抗肿瘤活性。

[0249] 实施例12. TRAIL-非竞争性结合

[0251] 为了检测实施例3中选择的抗体的抗原结合特性,进行TRAIL竞争性酶联免疫吸附测定。在4℃下用0.1μg/ml人DR5(R&D systems,U.S.A.)包被ELISA板。此后,将平板与0.01nM至1440nM抗体(D0、DA20、DA21、DA21、DA22和DA23)以及0.01至400nM TRAIL蛋白一起温育2小时。将板用PBST(0.1%牛血清白蛋白和吐温-20的PBS溶液)洗涤三次后,向每个孔中添加HRP(辣根过氧化物酶)缀合的抗人免疫球蛋白Fc并温育1小时。用PBST洗涤三次后,用ABTS(Thermo,U.S.A.)进行显色20分钟。当显色达到一定水平时,用1N硫酸终止反应。使用分光光度计(Molecular Device,U.S.A.)在405nm处测量吸光度,并示于图8a和8b中。将实施例(7-1)中公开的抗体AP用作对照。

[0252] 在图8a和8b中,对照抗体AP的抗原结合以TRAIL剂量依赖性方式降低,而抗体D0、DA20、DA21、DA21、DA22和DA23维持一定水平的抗原结合,而与TRAIL浓度无关,暗示本公开的抗体不与TRAIL竞争结合DR5。

[0253] 实施例13. 抗体与TRAIL组合的作用

[0254] 在与构建的抗体和TRAIL共同处理后的细胞死亡活性方面分析根据表位的抗体性质。在该试验中,使用人结肠直肠癌细胞系Colo205(ATCC,U.S.A.)和人胰腺细胞系Miapaca-2(ATCC,U.S.A.)。将肿瘤细胞以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的浓度悬浮,将悬浮液以50μl/孔接种到96孔培养板中,然后在恒温潮湿箱中培养16至24小时。将抗体的系列稀释溶液(0.1至10000ng/ml)和确定浓度的TRAIL蛋白(0.5、1、10ng/ml)组合施加于96孔板。在恒定温度下在潮湿条件下温育48至72小时后,以每孔10μl的量添加刃天青溶液(Invitrogen,U.S.A.)。当反应在1至2小时后达到一定水平时,使用分光光度计(Molecular Device)在590nm处读取荧光。细胞存活率计算为测试物质处理组(处理的RFU)的相对荧光单位(RFU)与培养基处理组(未处理的RFU)的相对荧光单位的百分比(细胞存活率(%) = 处理的RFU / 未经处理的RFU × 100)。

[0255] 代表性的结果如图9a(Colo205)和9b(Miapaca-2)所示。为了比较,基于文献(细胞死亡与分化(Cell Death and Differentiation),15,751-761,2008)中的观察,将上述抗体AP用作对照,该抗体AP具有与TRAIL相似的结合位点。

[0256] 如图9a和9b所见,与单独的抗体相比,当浓度低至10ng/ml的抗体D0或DA23与TRAIL组合使用时,检测到更高的细胞死亡活性,而对于对照抗体AP则没有观察到活性的这种增加。

[0257] 实施例14. 细胞内半胱天冬酶活性的测定

[0258] 为了研究构建的抗体的细胞死亡机制,测定构建的抗体的半胱天冬酶活性。使用Apo-ONE®均质半胱天冬酶-3/7测定试剂盒(Promega,U.S.A.)测量半胱天冬酶-3/7的活性。在该测定中,使用人结肠直肠癌细胞系Colo205(ATCC,U.S.A.)、人胰腺癌细胞系Miapaca-2(ATCC,U.S.A.)和肺癌细胞系H2122(ATCC,U.S.A.)。将浓度为 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的每种肿瘤细胞系的悬浮液以每孔50μl的体积铺到96孔细胞培养板中,并在恒温潮湿室中培养16至24小时。用预定浓度(0.01至10000ng/ml)的抗体单独(仅Ab)或与交联抗体(抗人Fc)(Serotec,U.S.A.)(Ab连接的)组合处理细胞,然后培养4小时。随后,在恒温潮湿室中,每孔用100μl Apo-ONE®半胱天冬酶-3/7试剂(Promega,U.S.A.)温育细胞3至16小时。当反应达到预定水平时,使用分光光度计(Molecular Device)在520nm处读取荧光。半胱天冬酶活性计算为测试物质处理组(处理的RFU)的相对荧光单位(RFU)相对于培养基处理组(未

处理的RFU)的相对荧光单位的倍数增加(半胱天冬酶活性=处理的RFU/未经处理的RFU)。

[0259] 代表性的结果如图10a (Colo205)、10b (H2122)和10c (Miapaca-2)所示。为了比较,以相同的方式处理抗体AP。

[0260] 如图10a和10c所示,在癌细胞系中施加抗体D0或DA29,以引起半胱天冬酶-3/7的活性增加,这意味着本公开的抗体的细胞死亡机制涉及凋亡途径。

[0261] 实施例15. 抗体和药物的组合效果

[0262] 使用体外肿瘤细胞死亡测定评估由用上述构建的抗体和吉西他滨共处理获得的效果。该测定基于文献中的观察结果(J Gastrointest Surg.2006 Nov;10(9):1291-300),其中用吉西他滨和抗DR5抗体共处理胰腺癌细胞导致更大的肿瘤细胞死亡和半胱天冬酶活性。

[0263] 将人胰腺癌细胞系Miapaca-2(ATCC,U.S.A.)和Panc-1(ATCC,U.S.A.)各自以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度悬浮。将悬浮液以50 $\mu$ l的量添加到96孔细胞培养板的每个孔中,并在恒温潮湿室中温育16至24小时。用包括D0的本公开的抗DR5抗体与某些浓度(3nM至300nM)的吉西他滨组合处理癌细胞系,并培养48至72小时。每孔添加10 $\mu$ l刃天青溶液(Invitrogen,U.S.A.)后,将细胞进一步温育1至3小时。当反应进行到预定水平时,使用分光光度计(Molecular Device)在590nm处读取荧光。细胞存活率计算为测试物质处理组(处理的RFU)的相对荧光单位(RFU)与培养基处理组(未处理的RFU)的相对荧光单位的百分比(细胞存活率(%))= $\frac{\text{处理的RFU}}{\text{未经处理的RFU}} \times 100$ 。结果如图6a至6r所示。代表性的结果如图11a (Miapaca-2)和11b (Panc-1)所示。为了比较,以相同方式处理对照抗体AP。

[0264] 如图11a和11b所示,相对于每种物质单独处理,在用抗体D0或DA29和吉西他滨共处理时检测到凋亡活性增加。

[0265] 本领域技术人员将理解,前述描述中公开的构思和具体实施方式可以容易地用作修改或设计用于实施本发明相同目的的其他实施方式的基础。本领域技术人员还将理解,这些等同的实施方式不脱离所附权利要求中阐述的本发明的精神和范围。

- <110> 东亚ST株式会社  
 <120> 抗DR5抗体及其用途  
 <130> OPP20180344KR  
 <150> KR 10-2017-0035623  
 <151> 2017-03-21  
 <160> 69  
 <170> KopatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> VH-CDR1  
  
 <400> 1  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met Leu  
 1 5 10  
  
 [0001] <210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> VH-CDR2  
  
 <400> 2  
 Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> VH-CDR3  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)  
 <223> Xaa是Gly或Pro

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> Xaa是Ser或Lys

<400> 3  
 Asp Ala Gly Ser Xaa Cys Gly Xaa Gly Gly Trp Thr Gly Ala Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Thr

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VL-CDR1

<400> 4  
 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 1 5 10

[0002]

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VL-CDR2

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)  
 <223> Xaa是Arg、Leu或Lys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Xaa是Pro、Met或Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Xaa是Ser、Pro或Lys

<400> 5  
 Asn Asn Asn Asn Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VL-CDR3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Xaa是Ser、Ala或Asp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Xaa是Tyr或Gly

[0003] <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> Xaa是Val、Met、Gly或Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)  
 <223> Xaa是Ile、Ala、Arg或Gly

<400> 6  
 Gly Ser Arg Asp Ser Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VH-CDR3

<400> 7  
 Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Thr

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VH-CDR3

<400> 8  
 Asp Ala Gly Ser Pro Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala Cys Ile  
 1 5 10 15

Asp Thr

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VH-CDR3

[0004] <400> 9  
 Asp Ala Gly Ser Pro Cys Gly Lys Gly Gly Trp Thr Gly Ala Cys Ile  
 1 5 10 15

Asp Thr

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VL-CDR2

<400> 10  
 Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> VL-CDR2  
  
 <400> 11  
 Asn Asn Asn Asn Leu Met Pro  
 1 5  
  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR2  
  
 <400> 12  
 Asn Asn Asn Asn Lys Ala Lys  
 1 5  
  
 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 [0005] <220>  
 <223> VL-CDR3  
  
 <400> 13  
 Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly Ile  
 1 5 10  
  
 <210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3  
  
 <400> 14  
 Gly Ser Arg Asp Ser Ala Gly Met Gly Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> VL-CDR3

<400> 15  
 Gly Ser Arg Asp Ser Asp Gly Gly Gly Arg  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> VL-CDR3

<400> 16  
 Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ala Gly Gly  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

[0006]

<400> 17  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Val Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 18  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 18  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 [0007] Val Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 19  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 19  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 20  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重链可变区

[0008] <400> 20  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 21  
 <211> 127

<212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 21  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

[0009]

<210> 22  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 22  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60

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

<210> 23  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 23  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

[0010] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 24  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链可变区

&lt;400&gt;

24

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

[0011]

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链可变区

&lt;400&gt; 25

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

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

Ser Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 26  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 重链可变区

<400> 26  
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 Phe  
20 25 30

[0012] Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 27  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 重链可变区

<400> 27  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

[0013]

<210> 28  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 重链可变区

<400> 28  
 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 Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Ser Pro Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 29  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 重链可变区

<400> 29  
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 Phe  
20 25 30

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

[0014] Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
50 55 60

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

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

Val Arg Asp Ala Gly Ser Pro Cys Gly Lys Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 30  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 重链可变区

<400> 30  
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

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

[0015] <210> 31  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 31  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 32  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 32  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

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

Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60

[0016] Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110

Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 33  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 33  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

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

<210> 34  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0017]

<220>  
 <223> 重链可变区

<400>	34																		
Ala	Val	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Gly				
	1			5					10					15					
Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe				
			20					25					30						
Asn	Met	Leu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							
Ala	Gly	Ile	Gly	Lys	Ser	Asp	Arg	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ala	Val				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Gly	Gln	Ser	Thr	Val	Arg				
	65				70					75					80				
Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Val	Lys	Asp	Ala	Gly	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Ala				
			100					105					110						
Cys	Ile	Asp	Thr	Trp	Gly	His	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Val	Ser	Ser					
		115					120					125							

<210> 35  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 35  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala  
 100 105 110  
 Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

[0018]

<210> 36  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 重链可变区

<400> 36  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45	
	Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val			
	50	55	60	
	Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
		85	90	95
	Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala			
		100	105	110
	Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser			
		115	120	125
	<210>	37		
	<211>	127		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
[0019]	<223>	重链可变区		
	<400>	37		
	Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe			
		20	25	30
	Asn Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
		35	40	45
	Ala Gly Ile Gly Lys Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Tyr Gly Ser Ala Val			
	50	55	60	
	Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Ala Arg			
	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
		85	90	95
	Val Lys Asp Ala Gly Ser Gly Cys Gly Ser Gly Gly Trp Thr Gly Ala			
		100	105	110
	Cys Ile Asp Thr Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser			
		115	120	125

<210> 38  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

<400> 38  
 Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 20 25 30  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Thr Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly  
 85 90 95

[0020] Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 39  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

<400> 39  
 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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Thr 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 Gly Ser Arg Asp Ser Ser  
85 90 95

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

<210> 40  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 轻链可变区

<400> 40  
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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser  
20 25 30

Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
35 40 45

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

[0021]

Ser Gly Ser Arg 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 Gly Ser Arg Asp Ser Ser  
85 90 95

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

<210> 41  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 轻链可变区

<400> 41  
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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser  
20 25 30

Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Asn Asn Asn Arg Pro 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 Gly Ser Arg Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Tyr Val Gly Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 42  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

<400> 42  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

[0022]

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

Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Met Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Arg 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 Gly Ser Arg Asp Ser Ser  
 85 90 95

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

<210> 43  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

<400> 43  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 44  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

[0023]

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

<210> 45  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 轻链可变区

&lt;400&gt;

45

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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser  
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Arg 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 Gly Ser Arg Asp Ser Asp  
 85 90 95

Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

[0024]

&lt;210&gt;

46

&lt;211&gt;

110

&lt;212&gt;

PRT

&lt;213&gt;

人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 轻链可变区

&lt;400&gt;

46

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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser  
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Arg 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 Gly Ser Arg Asp Ser Ser  
 85 90 95

Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

	100	105	110
<210>	47		
<211>	110		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	轻链可变区		
<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 Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser		
	20 25 30		
	Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr		
	35 40 45		
	Leu Ile Tyr Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
	65 70 75 80		
[0025]	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser		
	85 90 95		
	Tyr Val Gly Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105 110		
<210>	48		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	轻链可变区		
<400>	48		
	Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Glu		
	1 5 10 15		
	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly		
	20 25 30		
	Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr		
	35 40 45		
	Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
	50 55 60		

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

<210> 49  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 轻链可变区

<400> 49  
 Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Glu  
 1 5 10 15

Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly  
 20 25 30

[0026] Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr  
 35 40 45

Asn Asn Asn Asn Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Thr Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly  
 85 90 95

Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 50  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 用于 重链可变区的正向引物

<400> 50  
 ggtcagtct ctagatcttc cggcgggtgt ggcagctccg gtggtggcgg ttccgccgtg 60  
 acgttgacg ag 72

	<210>	51	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于重链可变区的反向引物	
	<400>	51	
		ctggccggcc tggccactag tggaggagac gatgacttcg gtcc	44
	<210>	52	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链可变区的正向引物	
	<400>	52	
		gtggcccagg cggccctgac tcagccgtcc tcggtgtc	38
[0027]	<210>	53	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链可变区的反向引物	
	<400>	53	
		ggaagatcta gaggactgac ctaggacggt cagg	34
	<210>	54	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于scFv的正向引物	
	<400>	54	
		gaggaggagg aggaggaggt ggcccaggcg gccctgactc ag	42
	<210>	55	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	

	<220>		
	<223>	用于scFv的反向引物	
	<400>	55	
		gaggaggagg aggaggagga gctggccggc ctggccacta gtggagg	47
	<210>	56	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	测序引物(正向)	
	<400>	56	
		acactttatg cttccggctc	20
	<210>	57	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	测序引物(反向)	
[0028]	<400>	57	
		caaaatcacc ggaaccagag	20
	<210>	58	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于重链可变区的正向引物	
	<400>	58	
		gctagccgcc accatgggc	19
	<210>	59	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于重链可变区的反向引物	
	<400>	59	

	aggggccctt ggtggaggcc tggccggcct ggccact	37
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	用于重链恒定区的正向引物	
<400>	60	
	gcctccacca agggcccctc	20
<210>	61	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	用于重链恒定区的反向引物	
<400>	61	
	cgggatccct tgccggccgt	20
[0029]		
<210>	62	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	用于的正向引物	
<400>	62	
	gctagccgcc accatgggc	19
<210>	63	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	用于重链的反向引物	
<400>	63	
	cgggatccct tgccggccgt	20
<210>	64	
<211>	18	

	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链可变区的正向引物	
	<400>	64	
		aagcttgccg ccacatg	18
	<210>	65	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链可变区的反向引物	
	<400>	65	
		agggggcggc cacggtccgg gaagatctag aggactg	37
	<210>	66	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[0030]	<220>		
	<223>	用于轻链恒定区( $\kappa$ )的正向引物	
	<400>	66	
		cggaccgtgg ccgccccctc	20
	<210>	67	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链恒定区( $\kappa$ )的反向引物	
	<400>	67	
		gctctagact agcactcgc	19
	<210>	68	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	用于轻链的正向引物	

---

	<400> 68	
	aagcttgccg ccaccatg	18
	<210> 69	
	<211> 19	
	<212> DNA	
[0031]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 用于轻链的反向引物	
	<400> 69	
	gctctagact agcactcgc	19

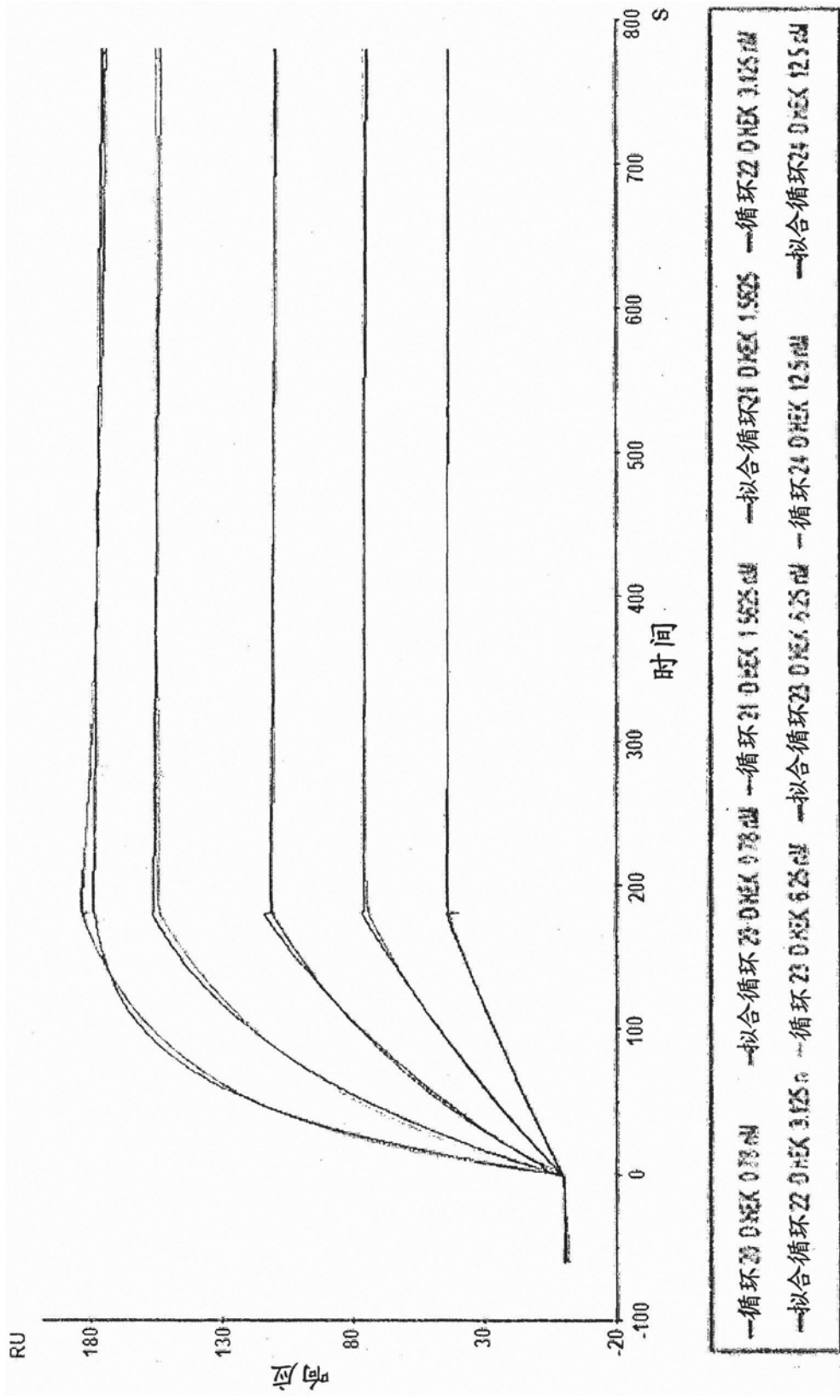


图1

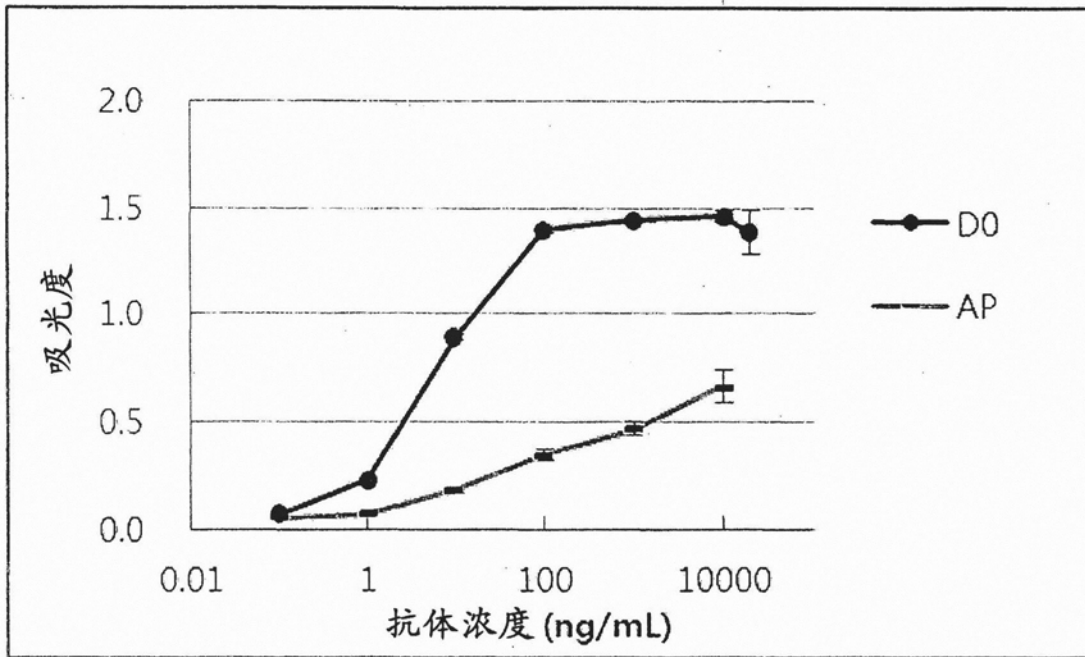


图2a

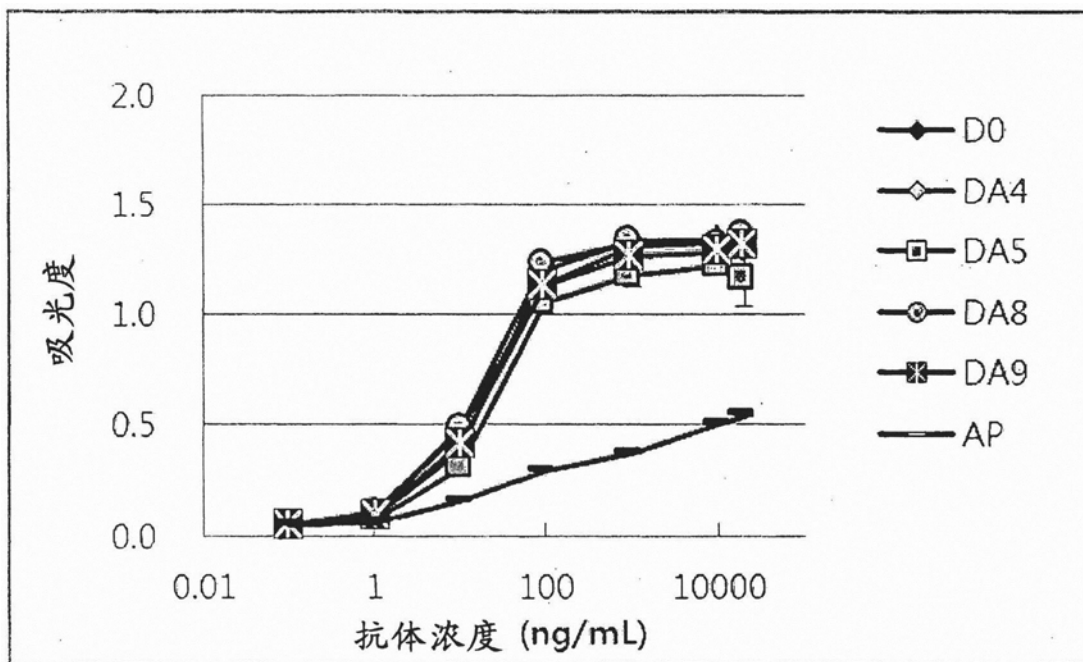


图2b

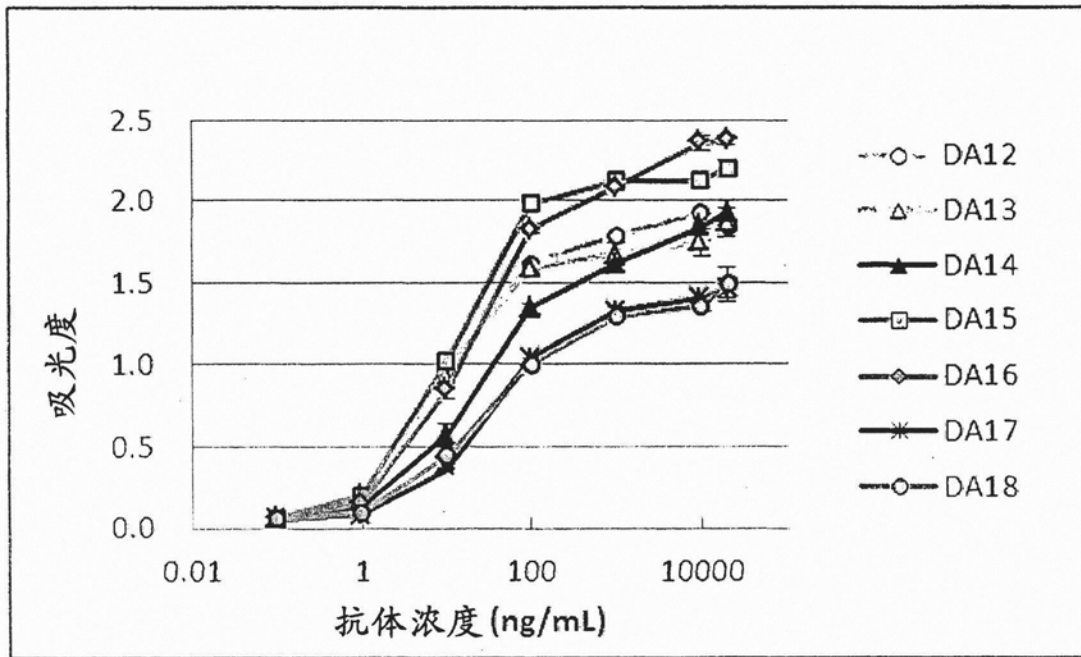


图2c

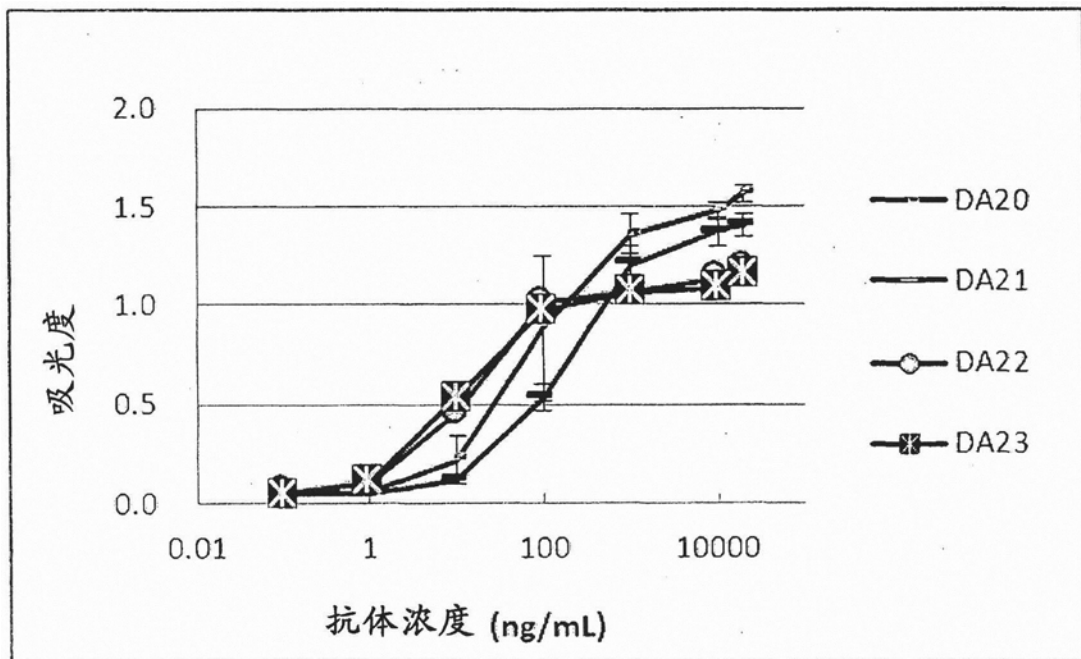


图2d

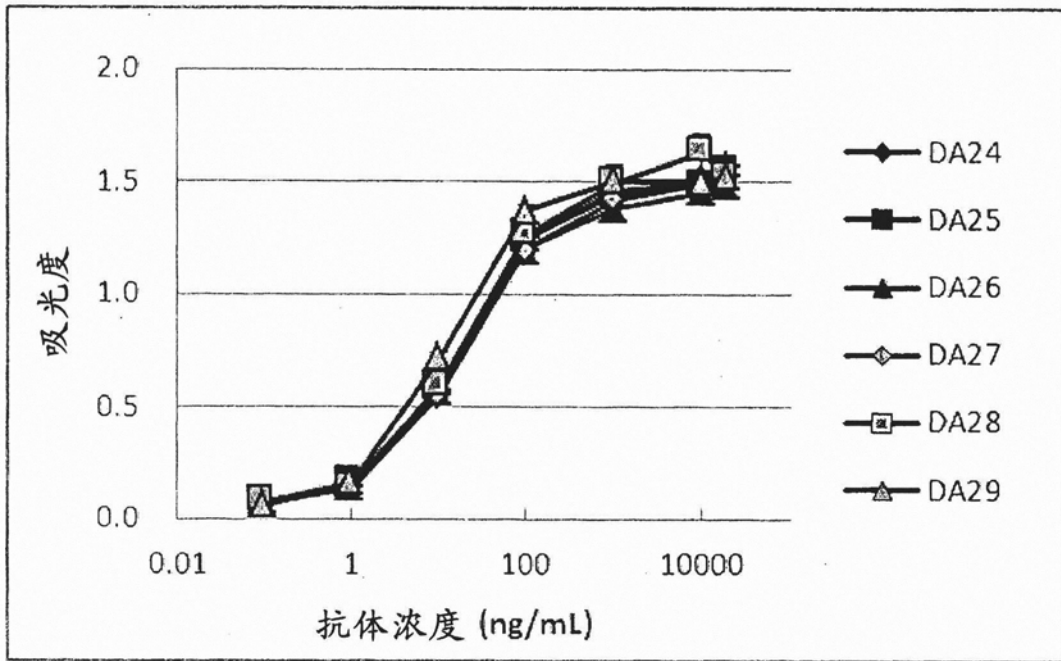


图2e

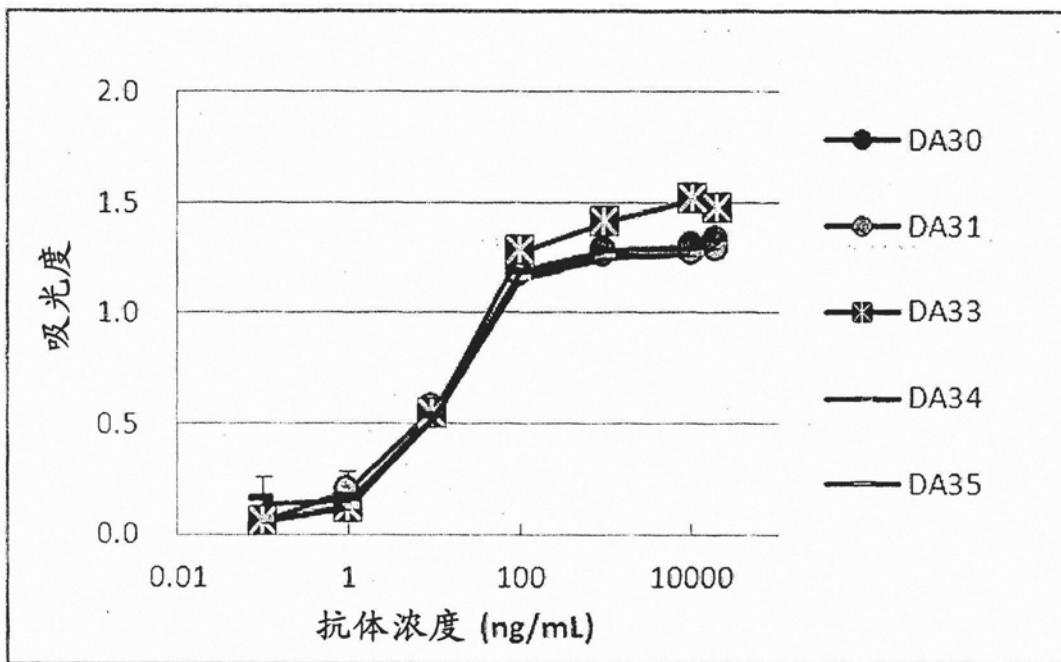


图2f

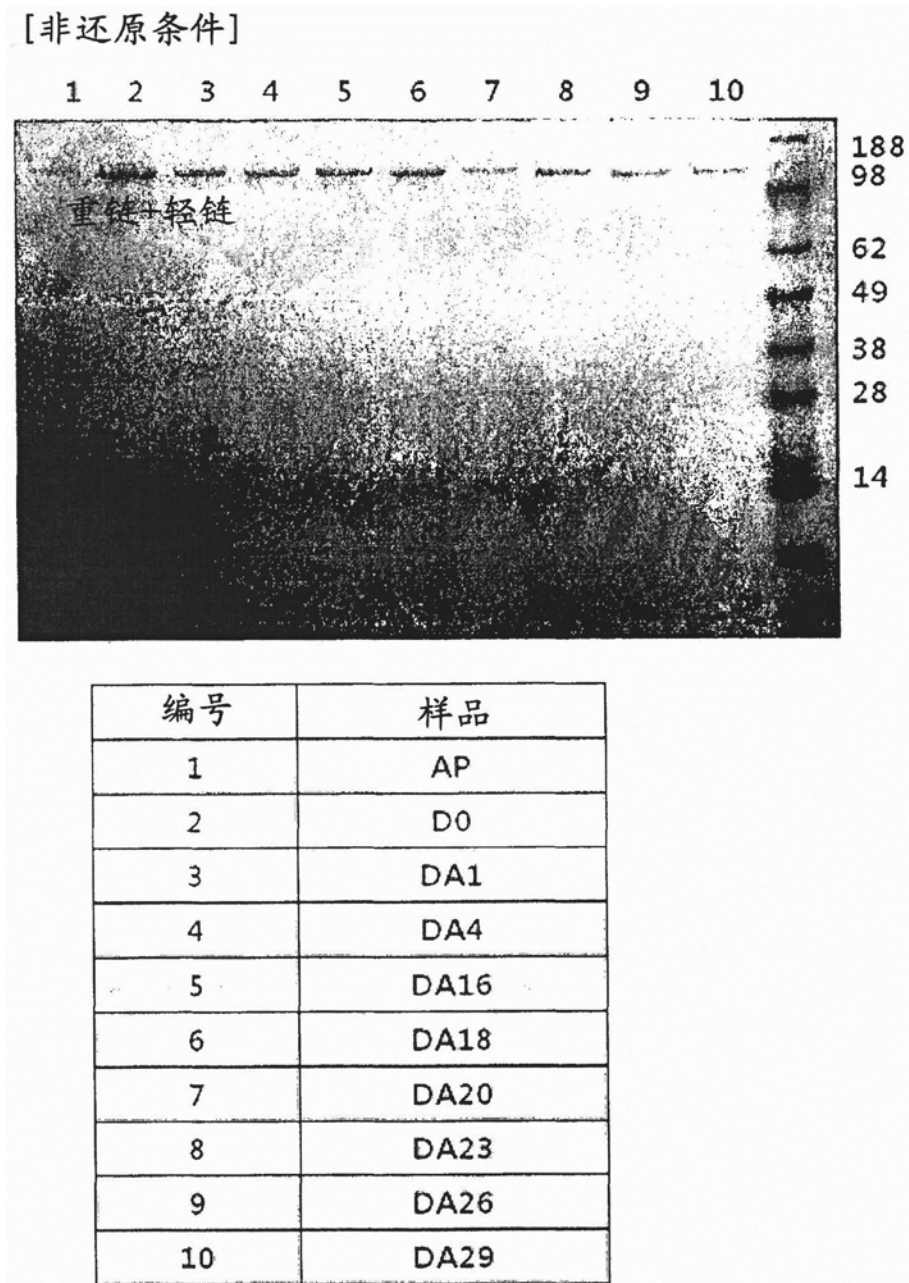
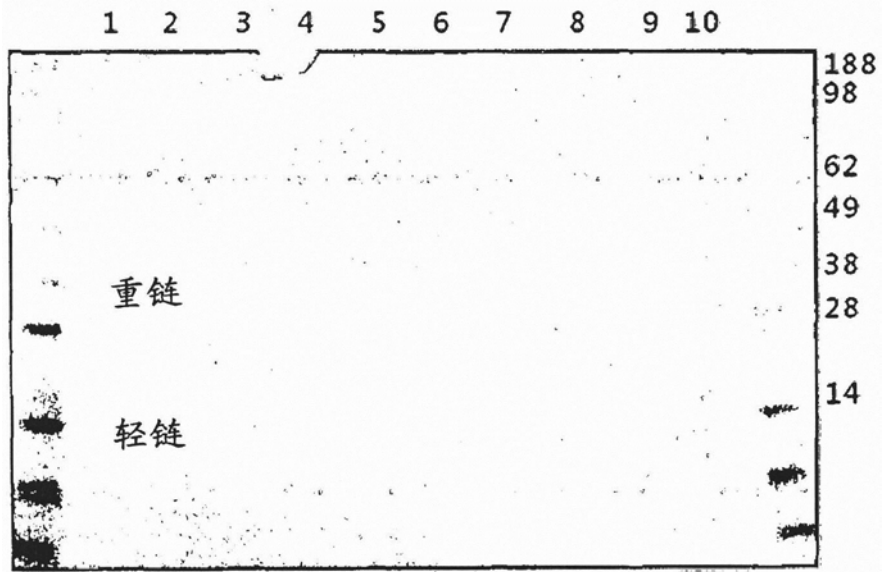


图3a

[ 还原条件 ]



编号	样品
1	AP
2	D0
3	DA1
4	DA4
5	DA16
6	DA18
7	DA20
8	DA23
9	DA26
10	DA29

图3b

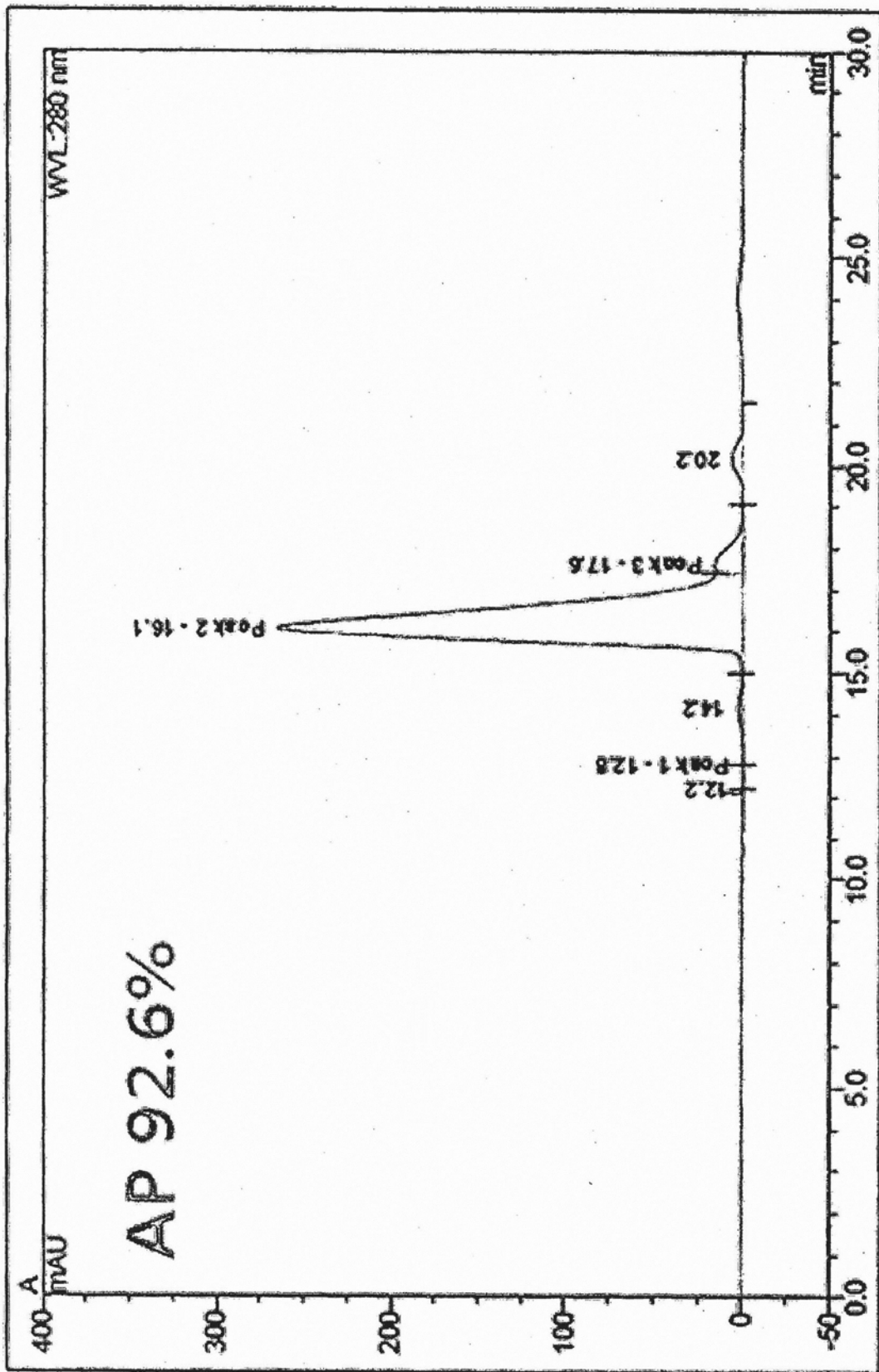


图4a

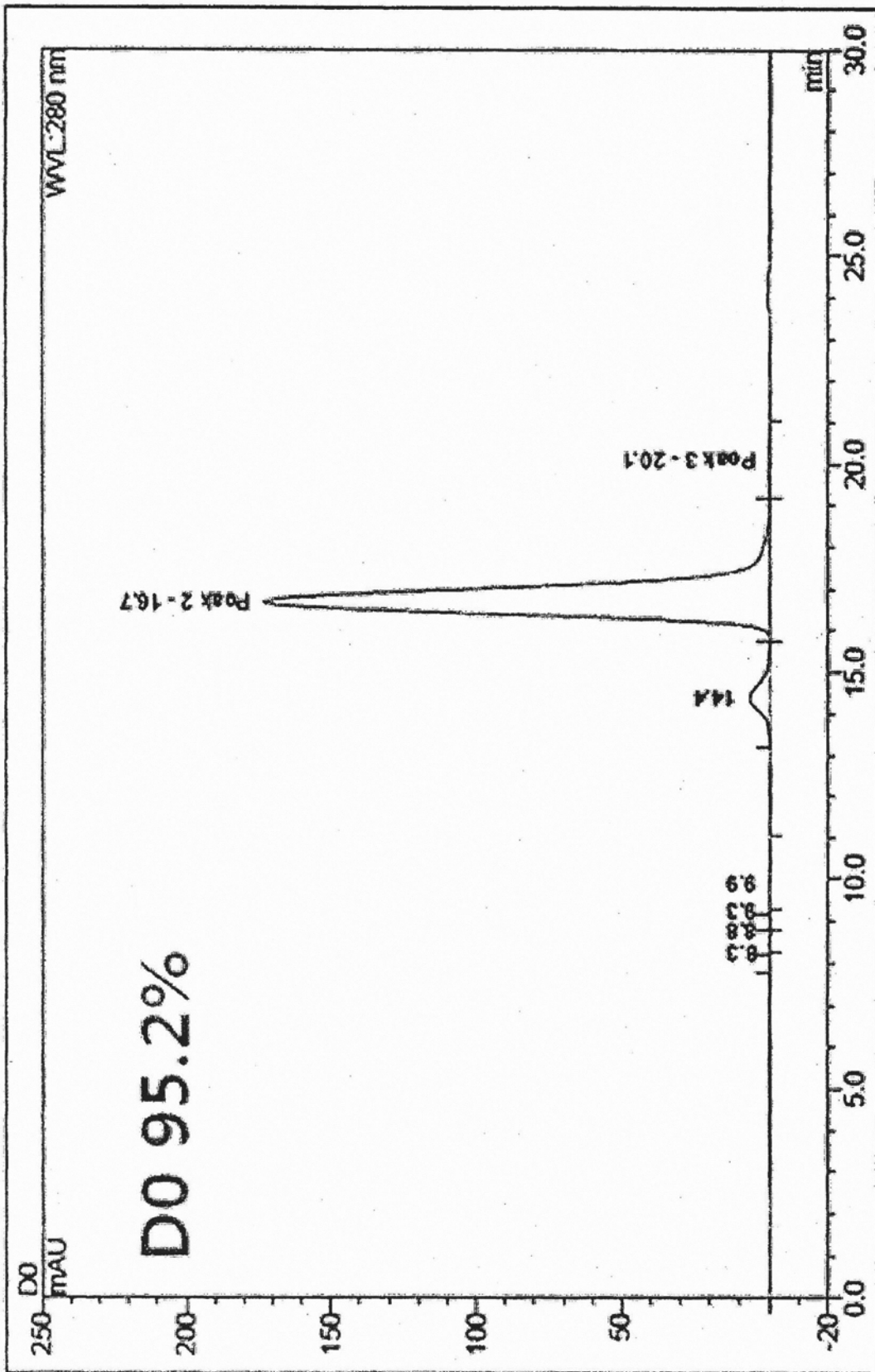


图4b

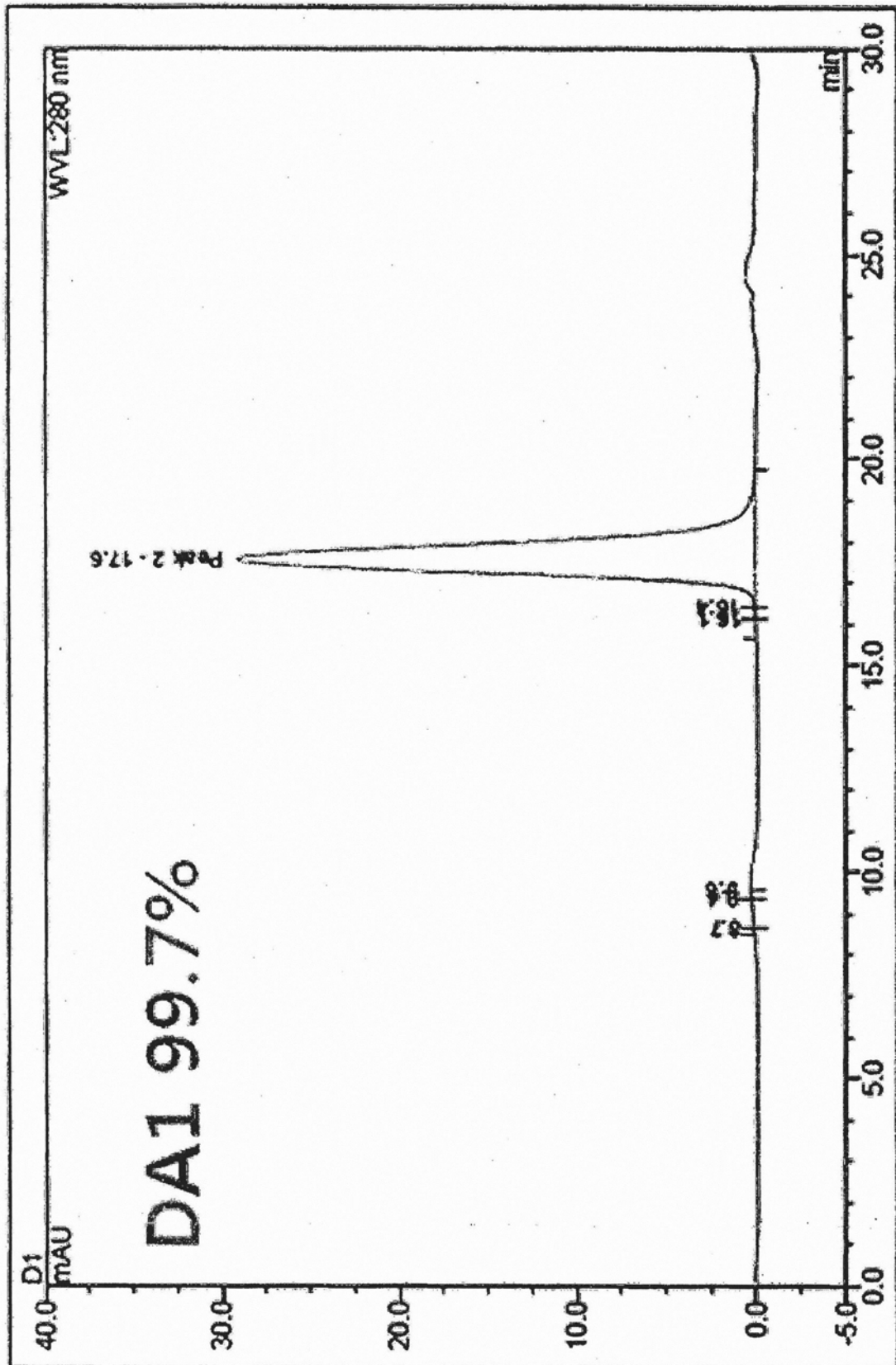


图4c

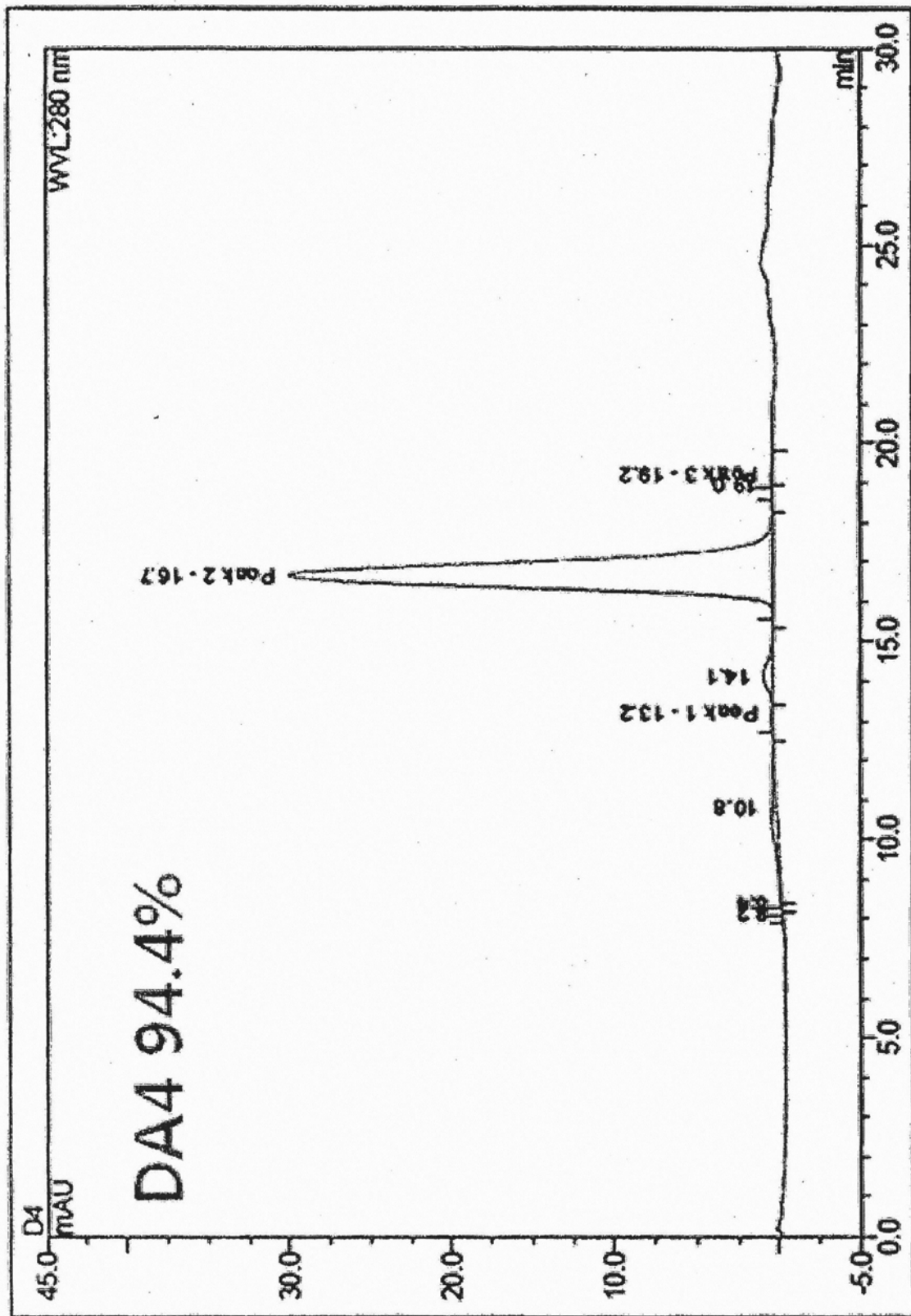


图4d

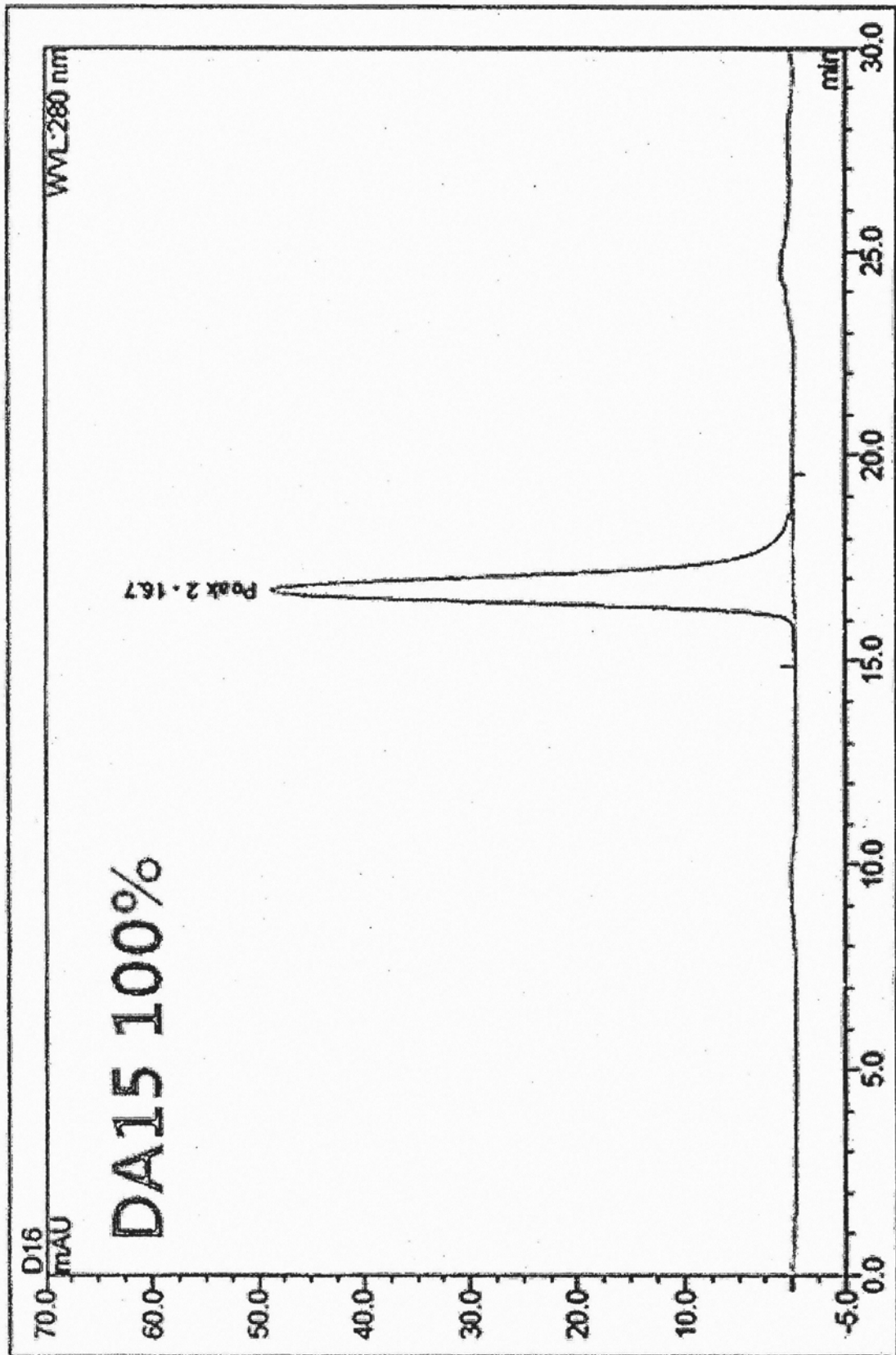


图4e

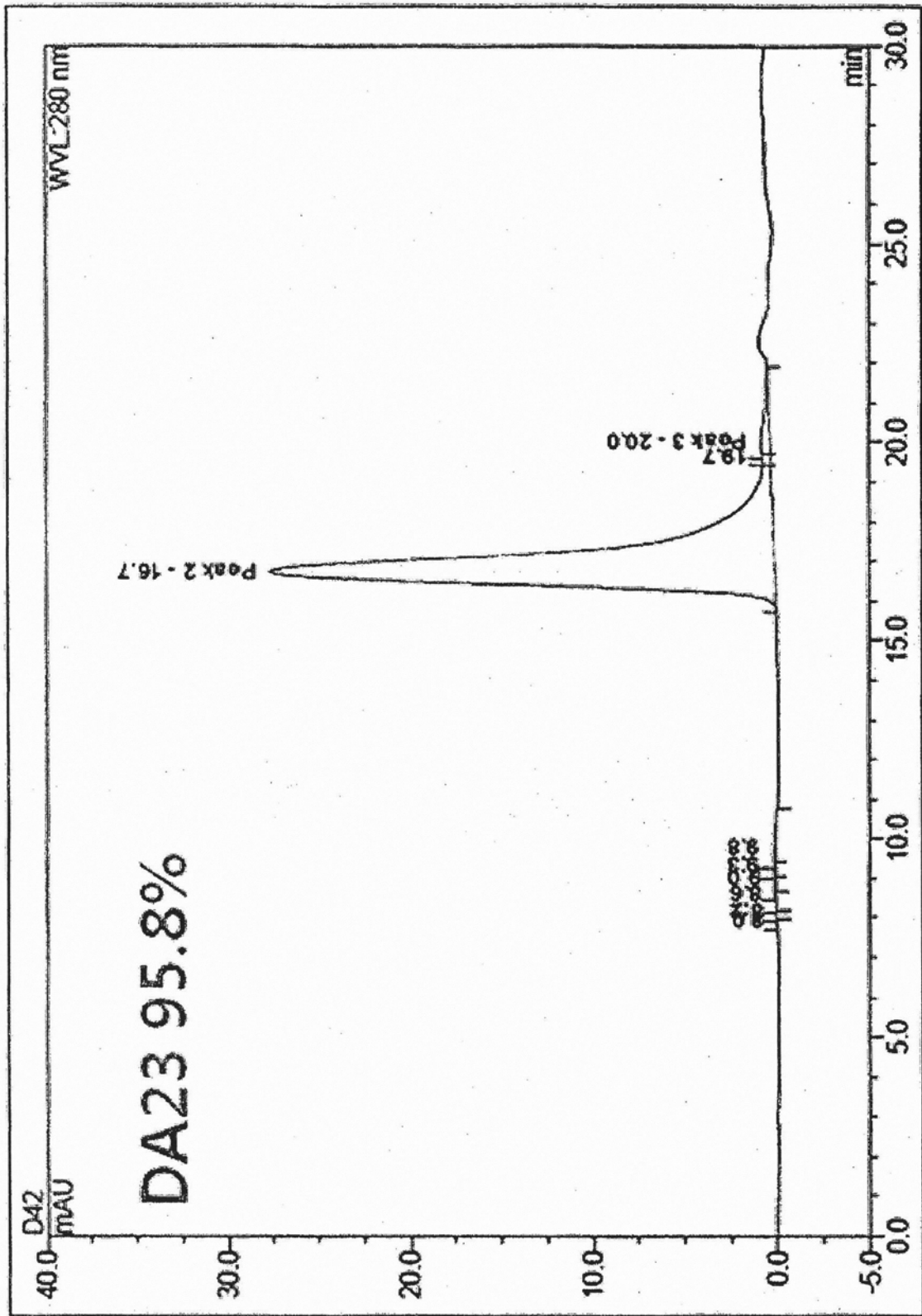


图4f

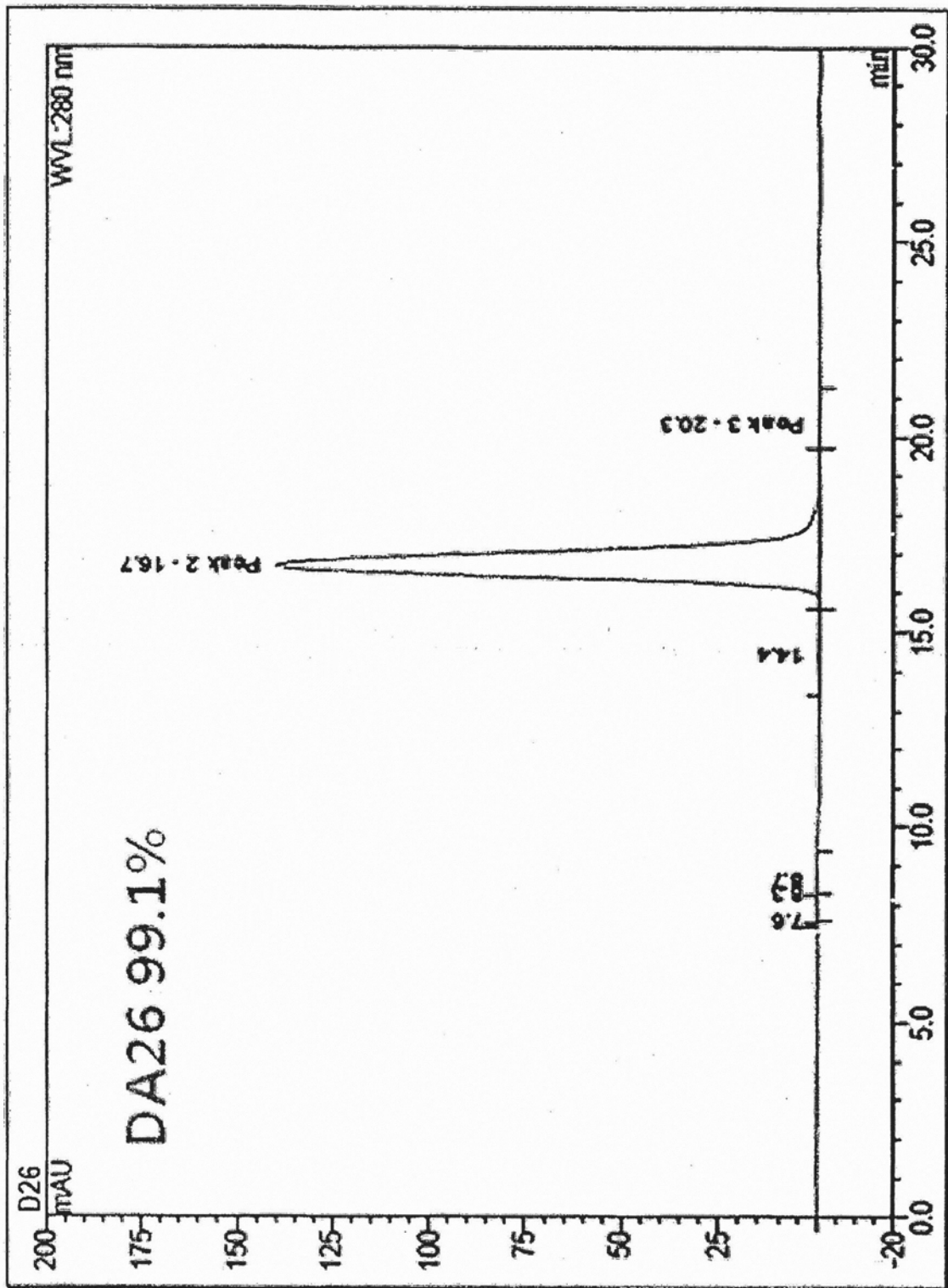


图4g

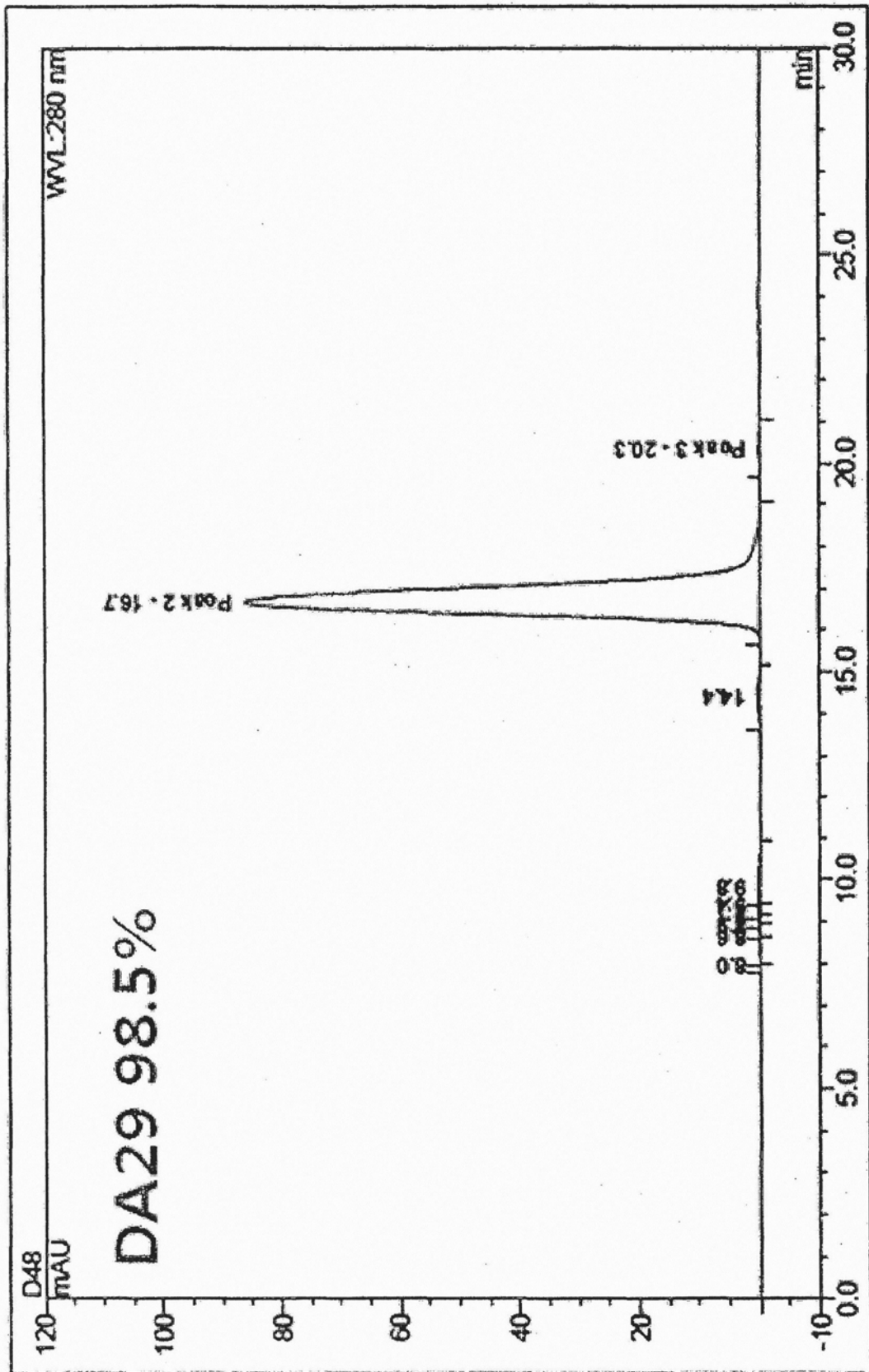


图4h

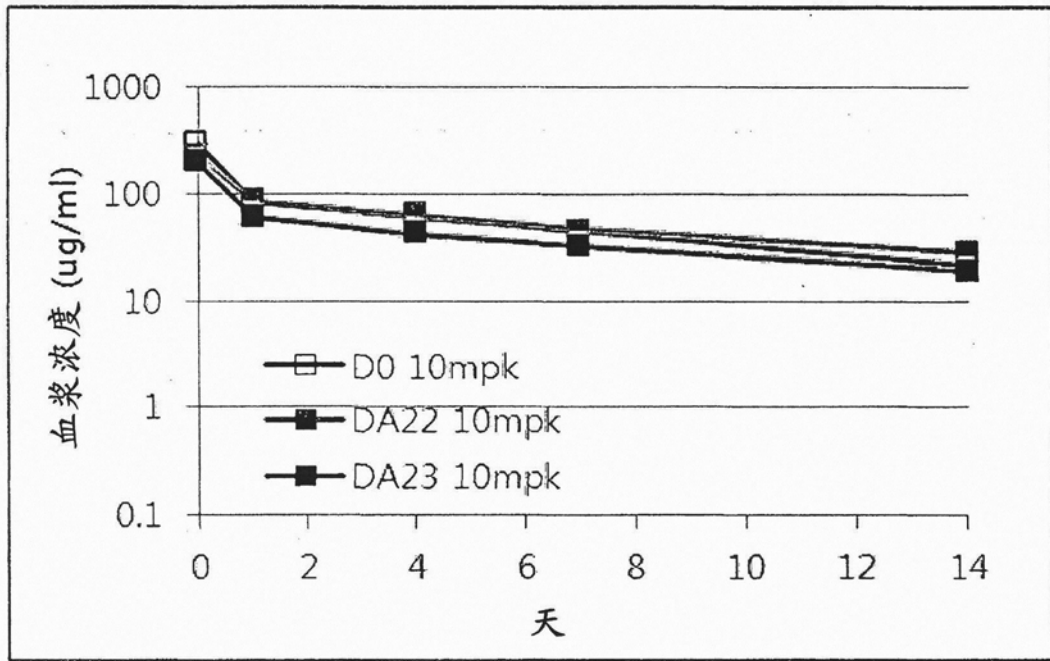


图5

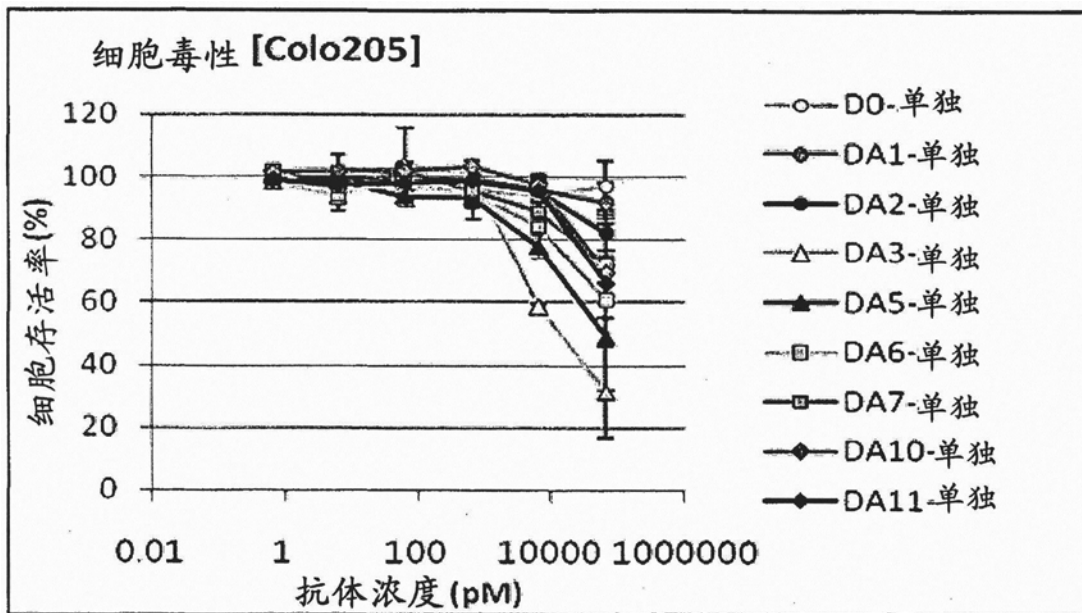


图6a

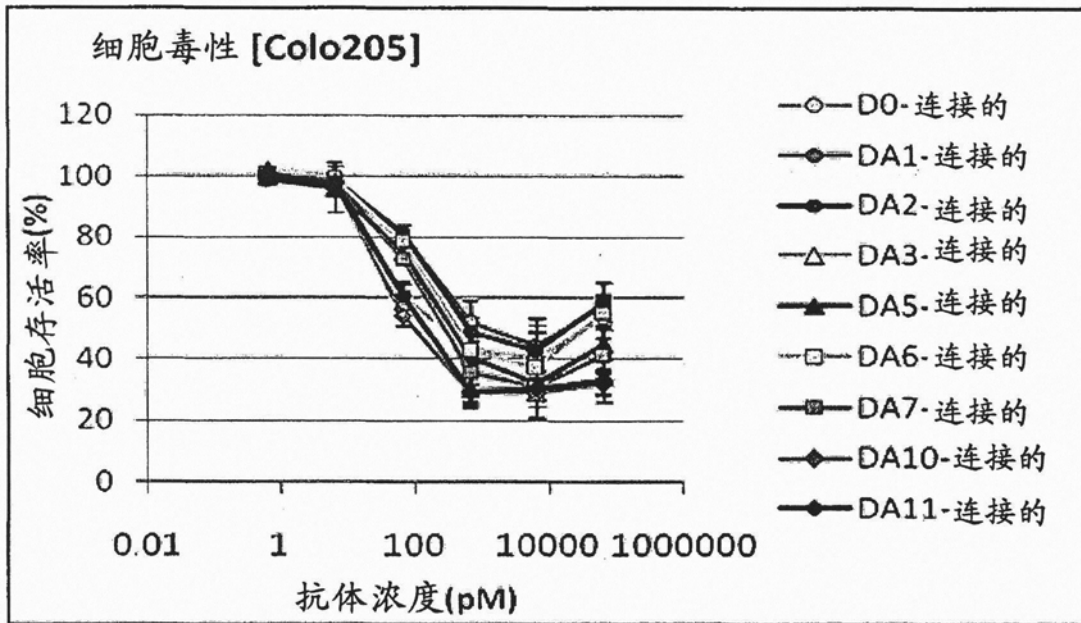


图6b

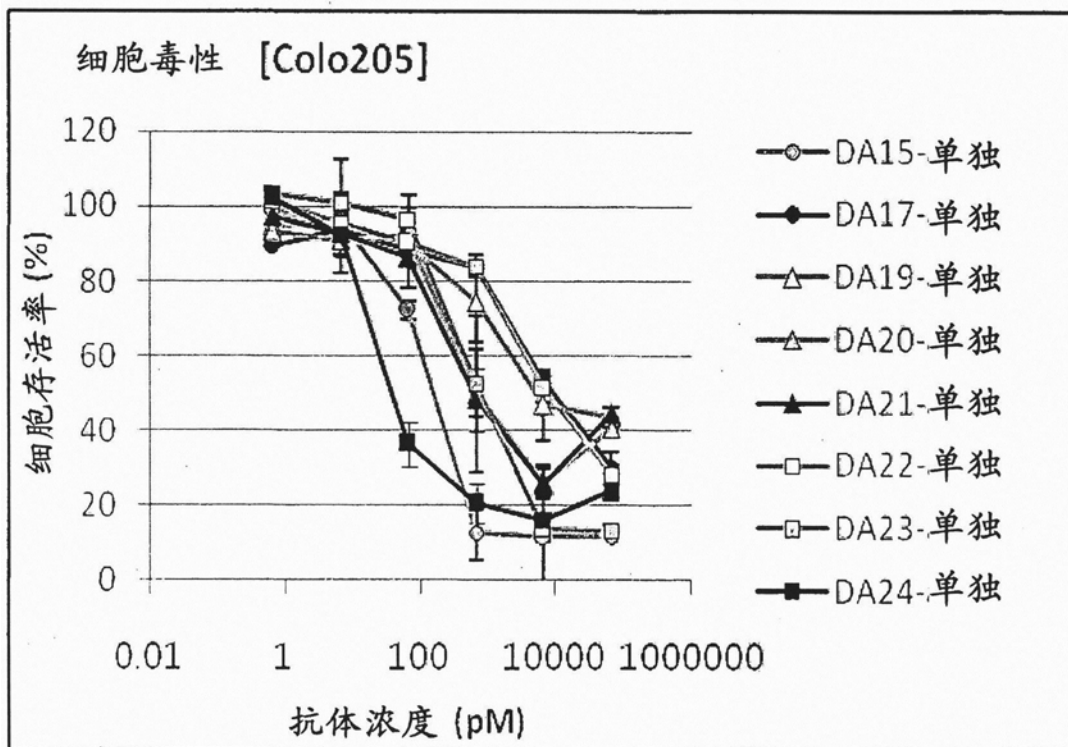


图6c

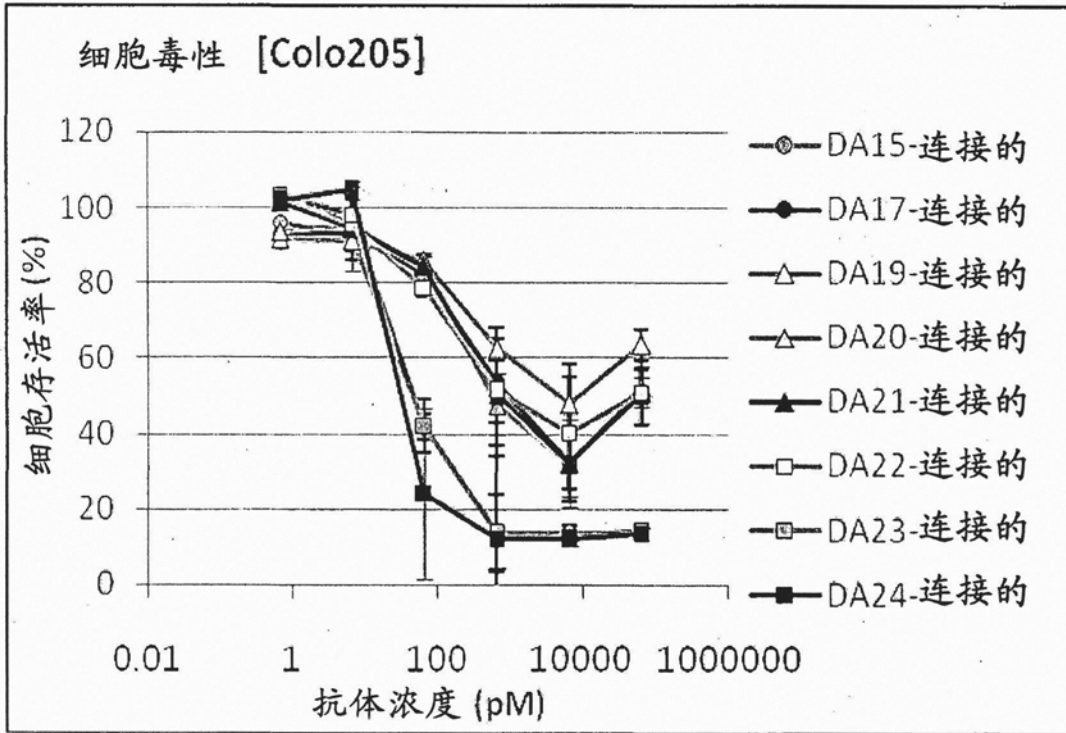


图6d

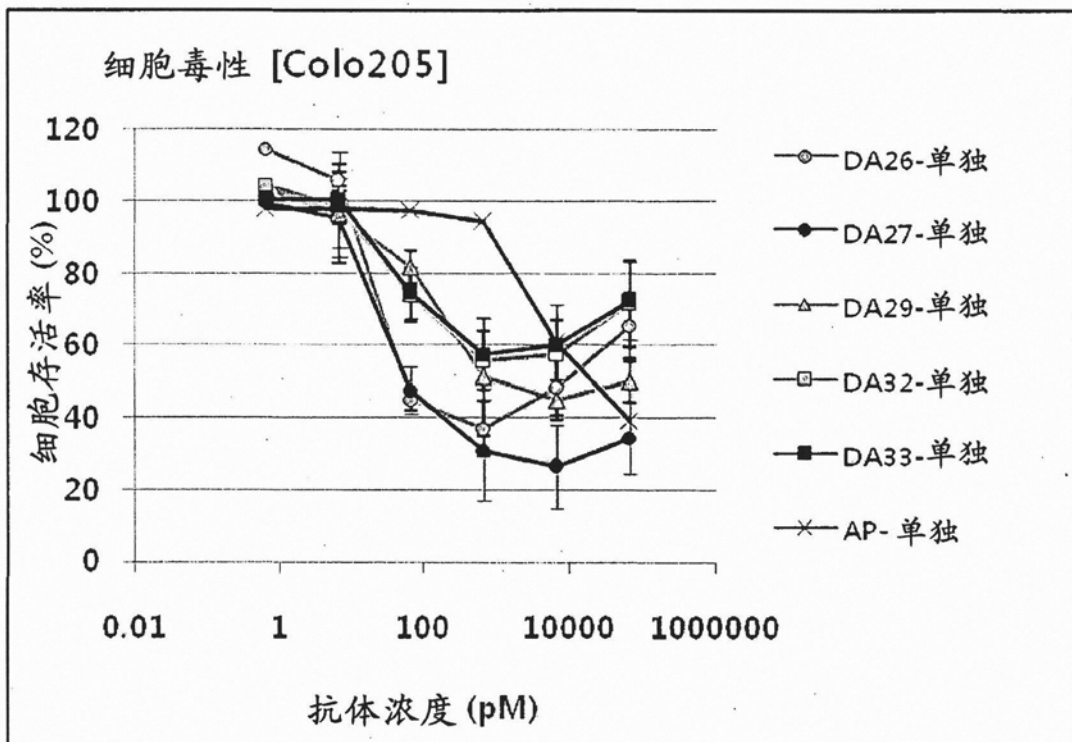


图6e

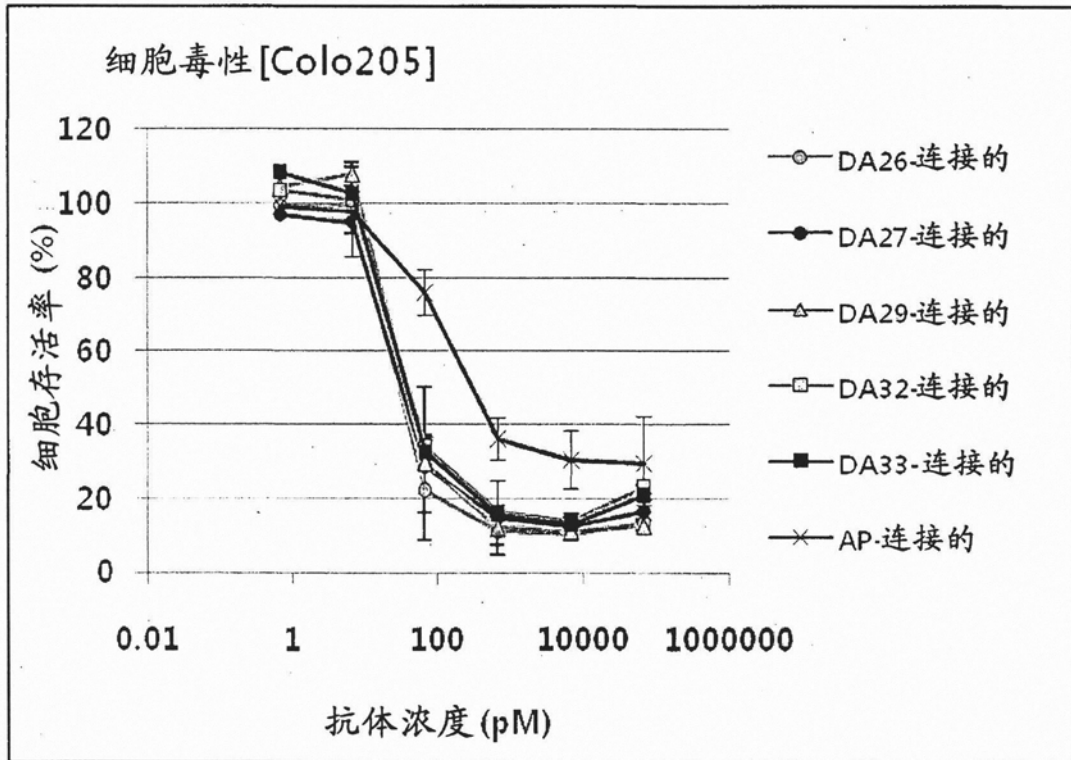


图6f

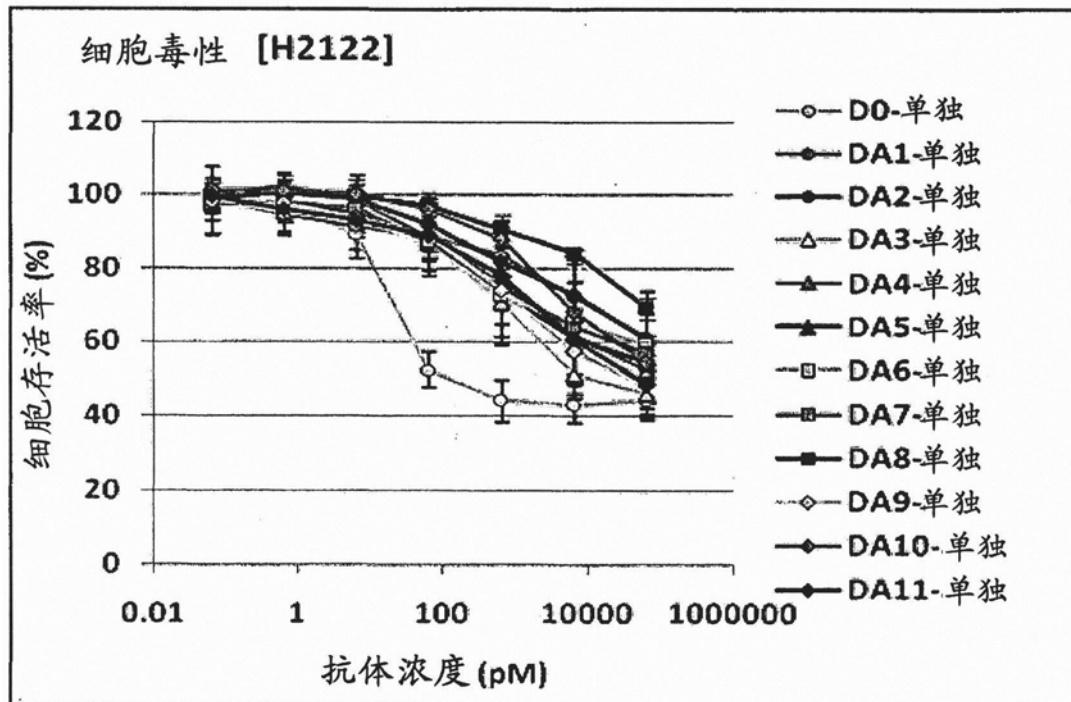


图6g

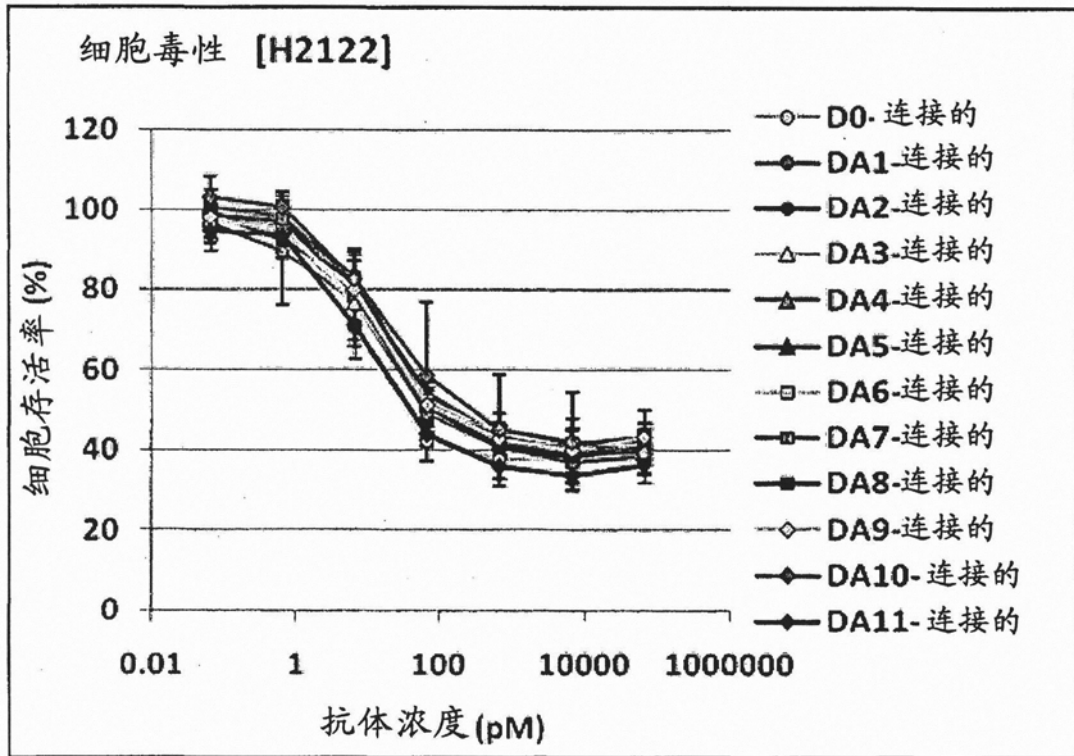


图6h

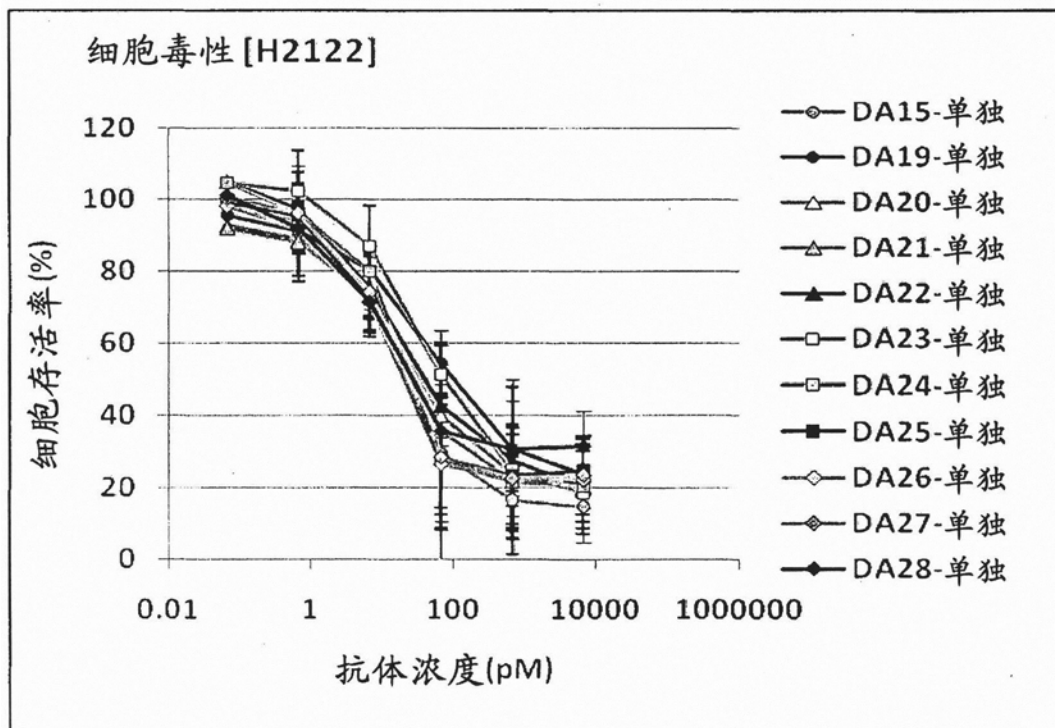


图6i

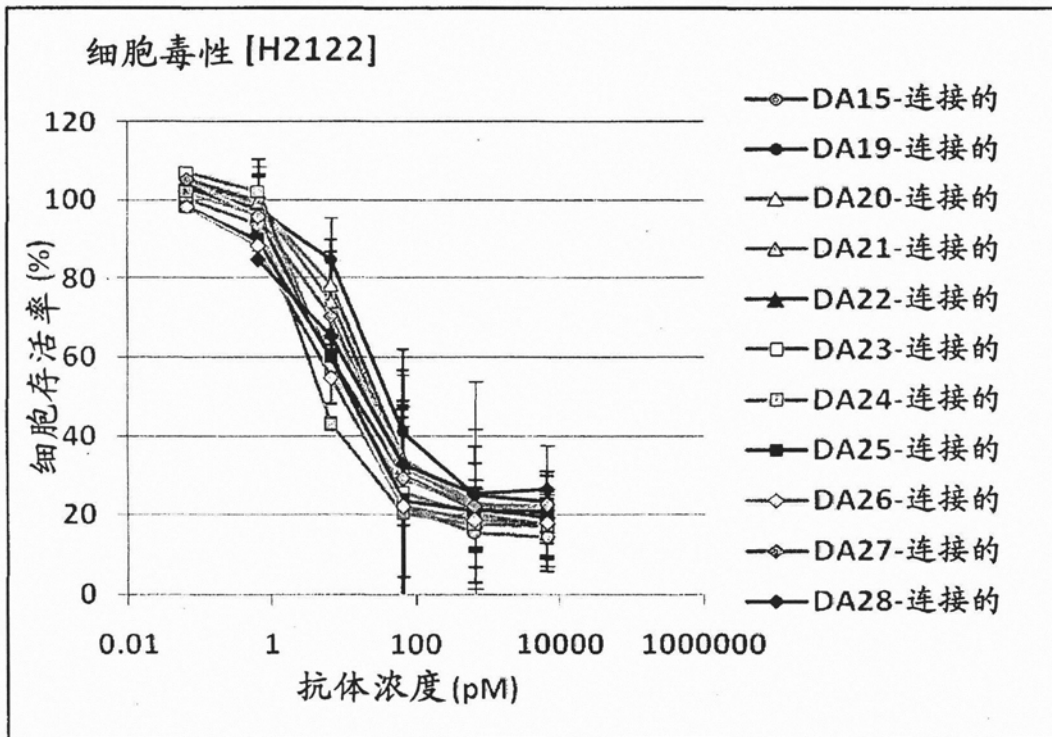


图6j

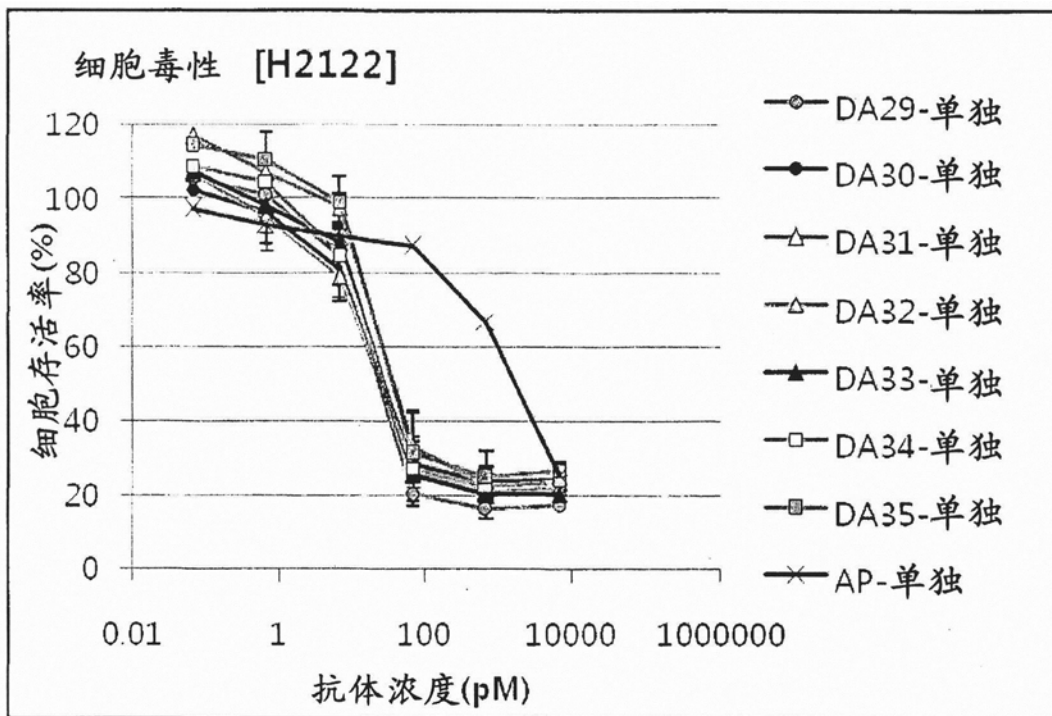


图6k

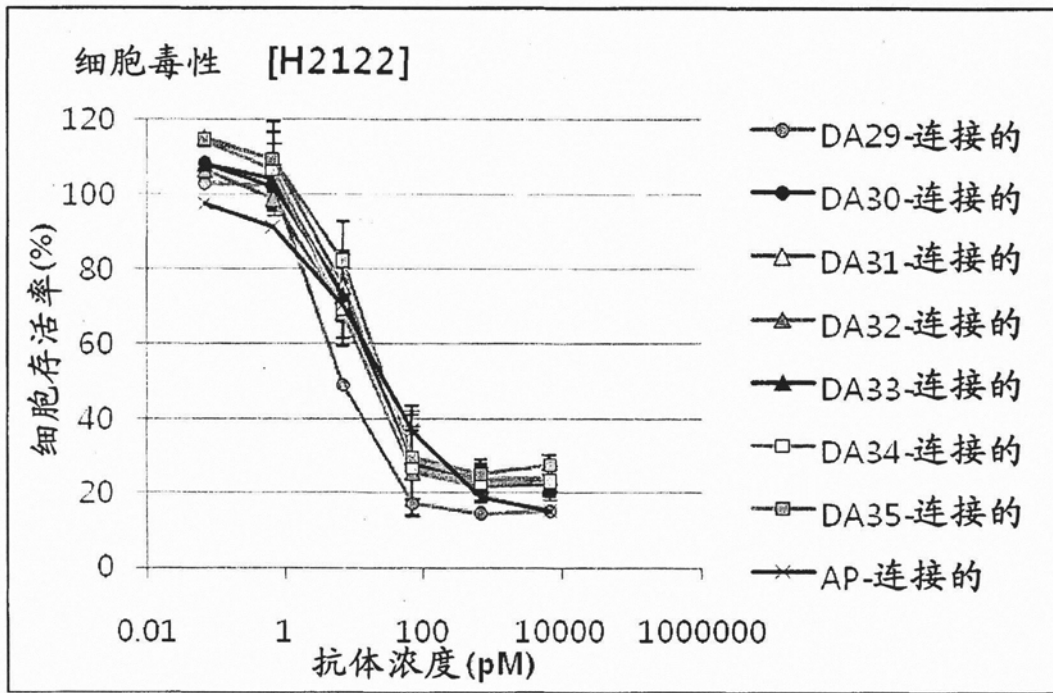


图61

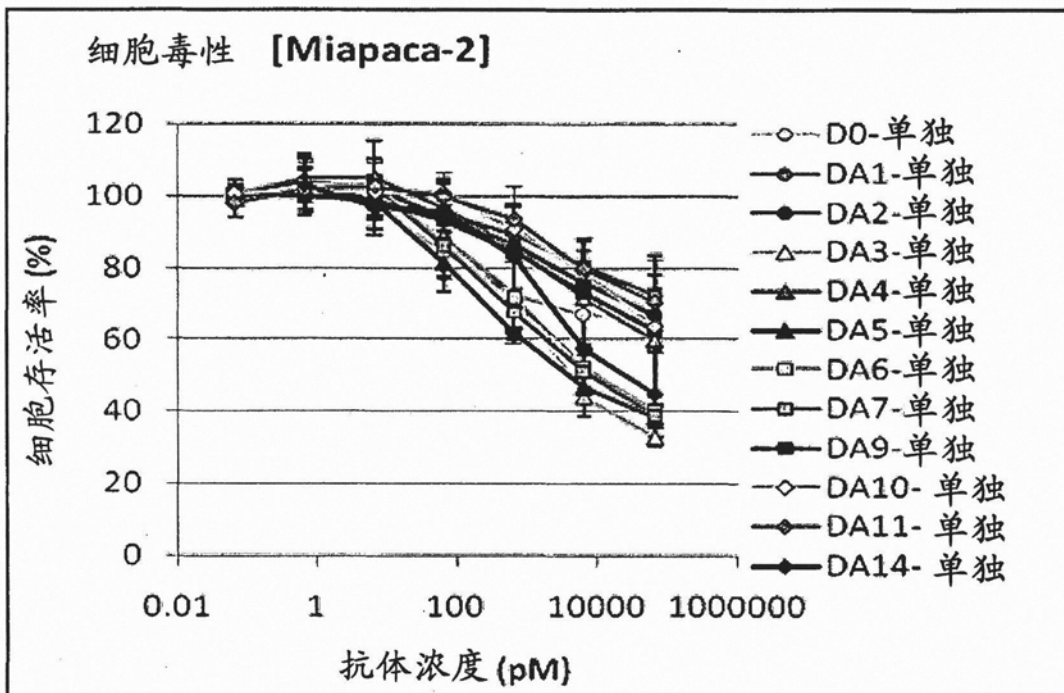


图6m

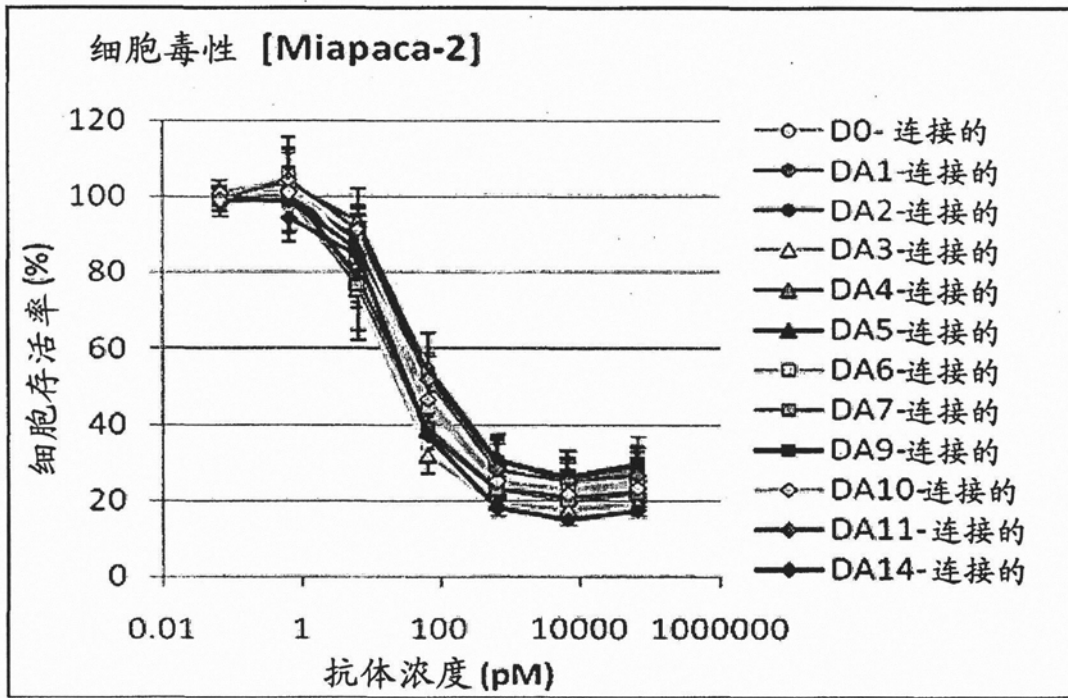


图6n

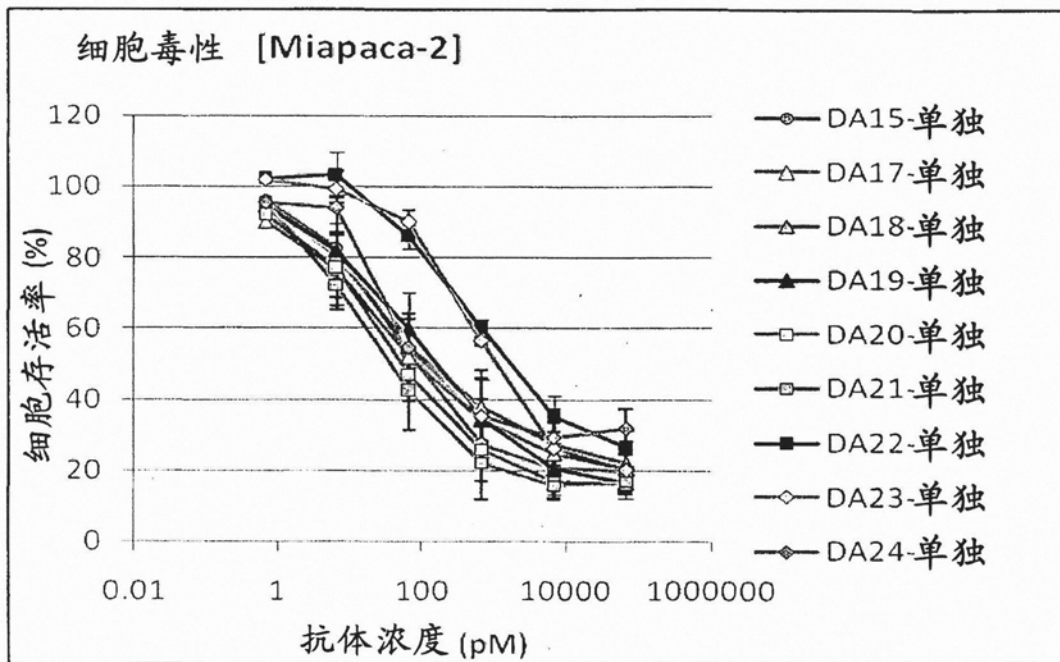


图6o

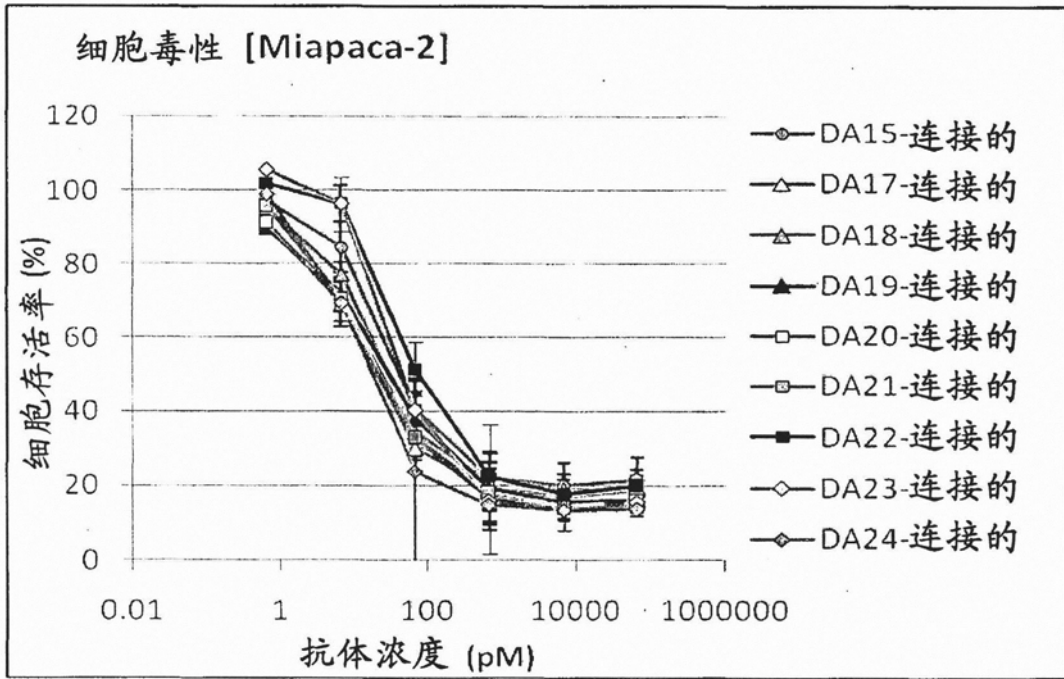


图6p

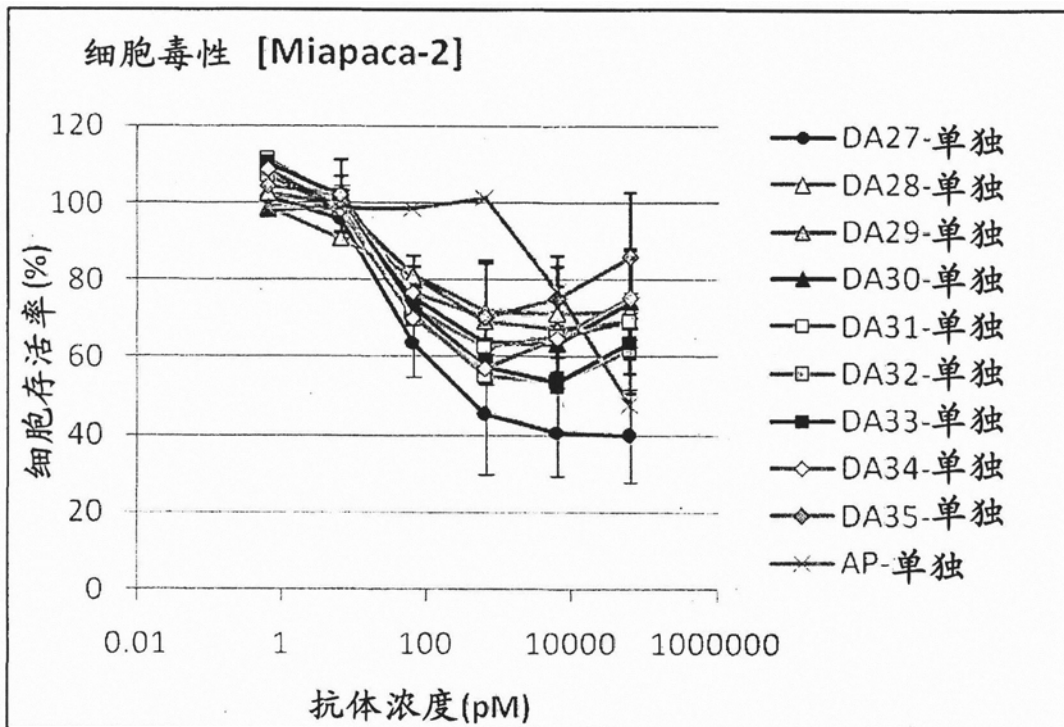


图6q

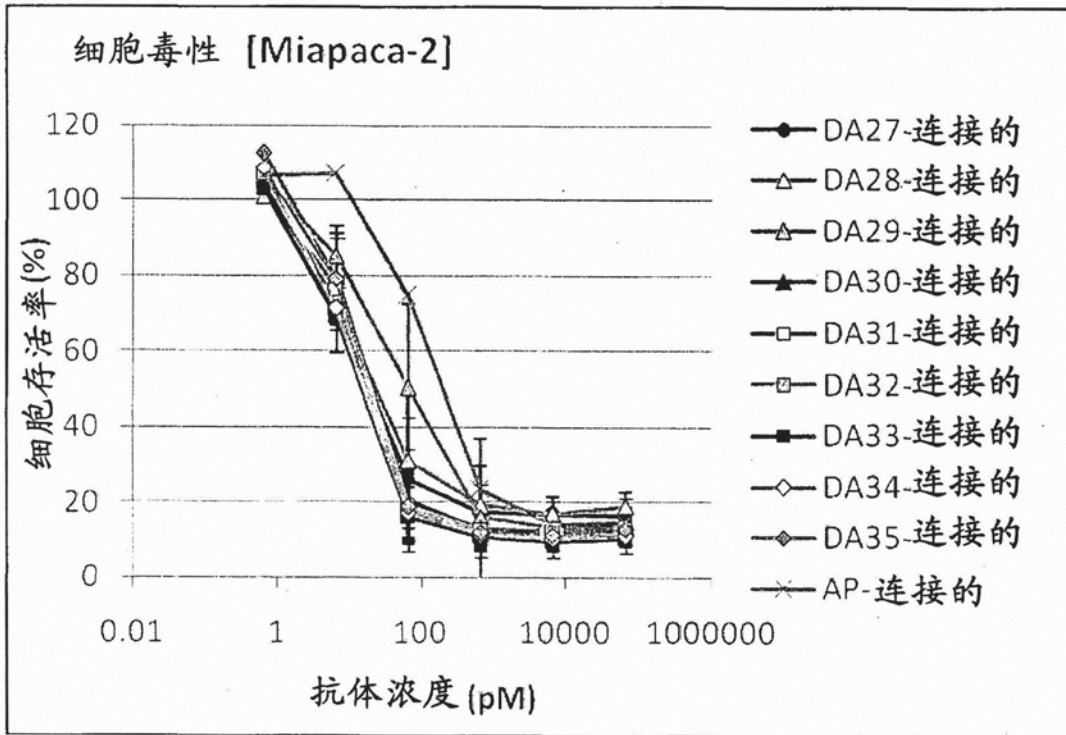


图6r

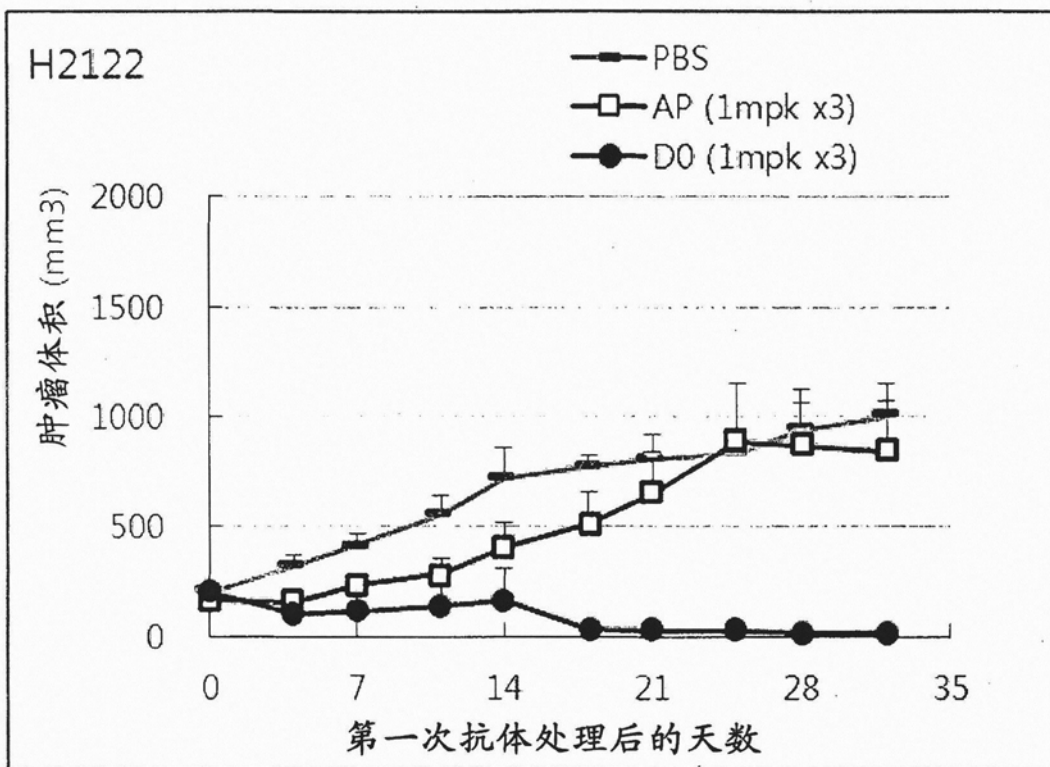


图7a

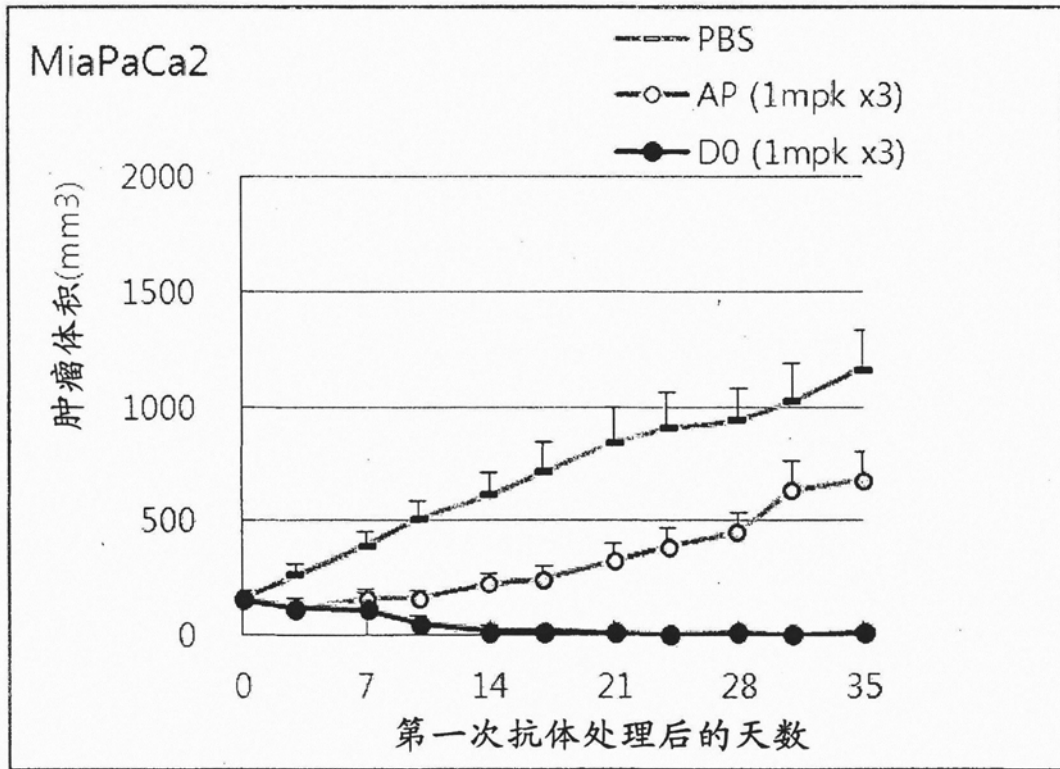


图7b

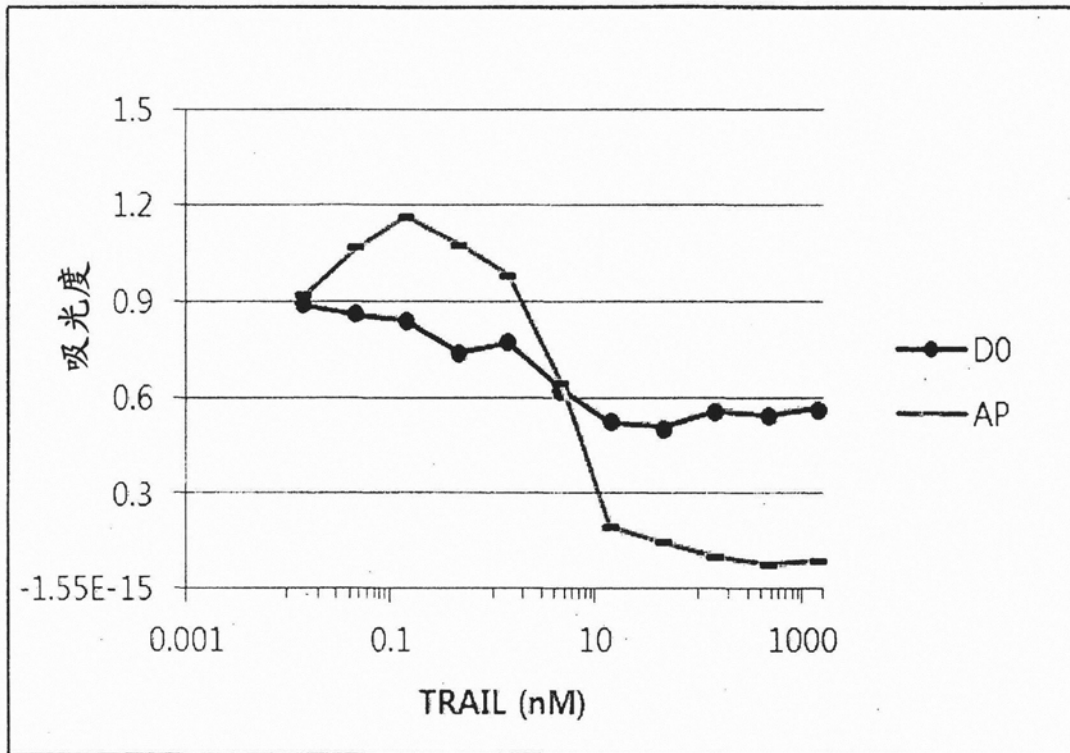


图8a

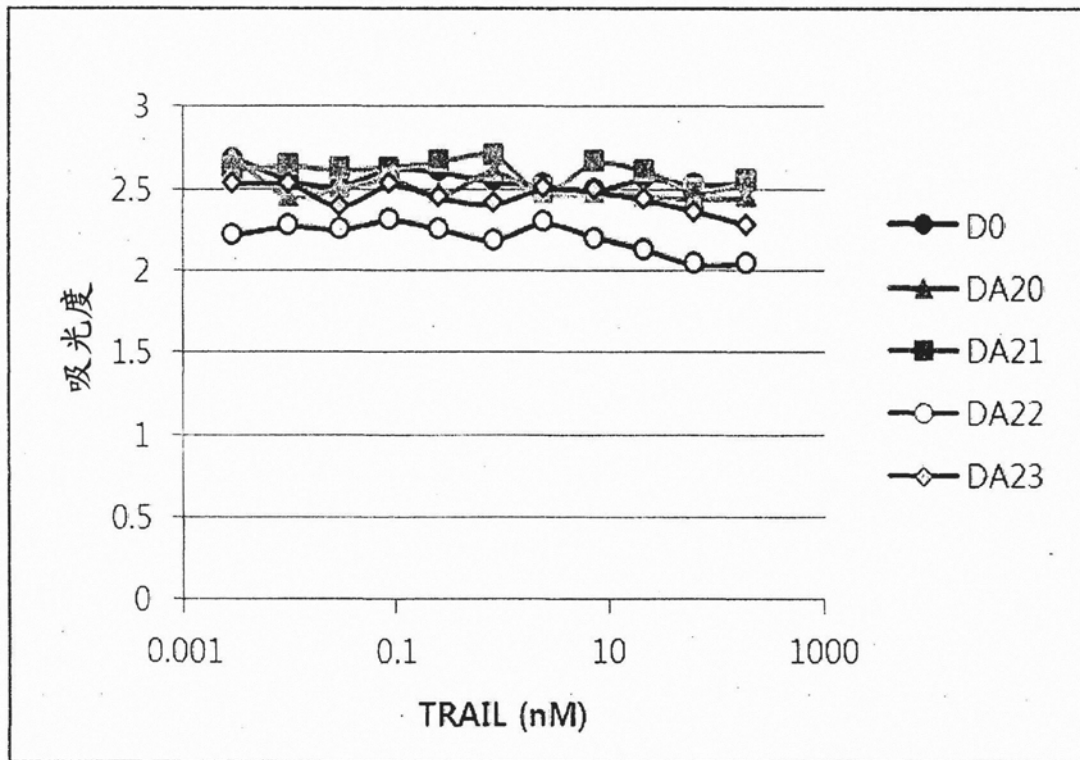


图8b

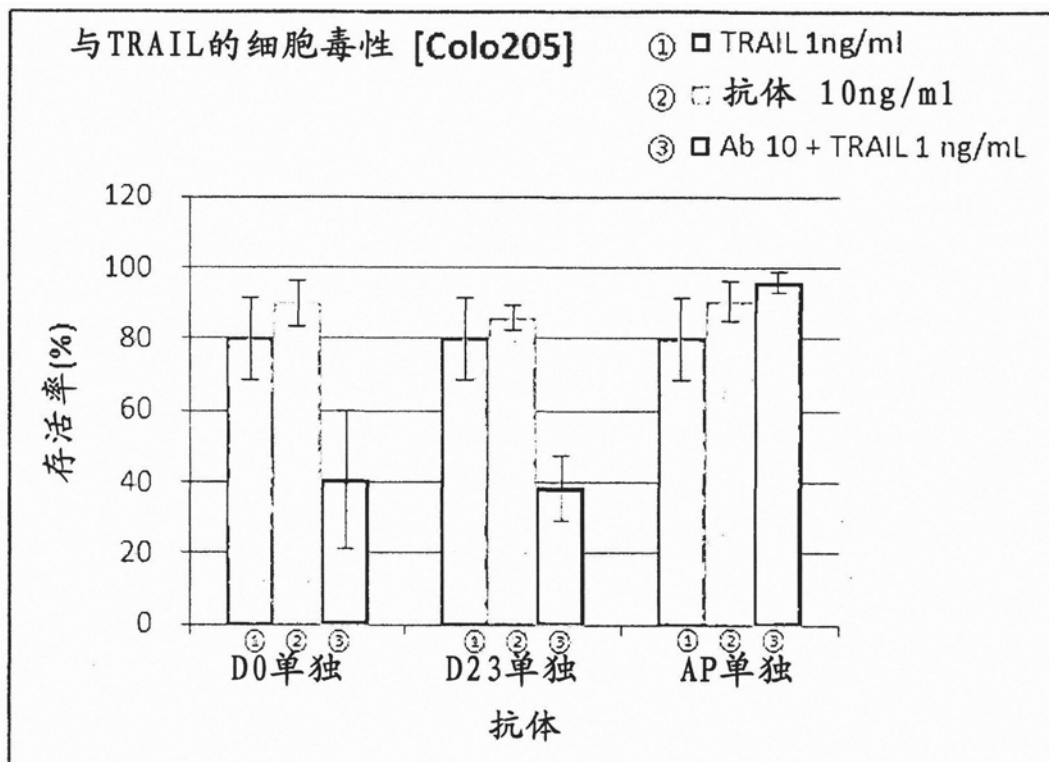


图9a

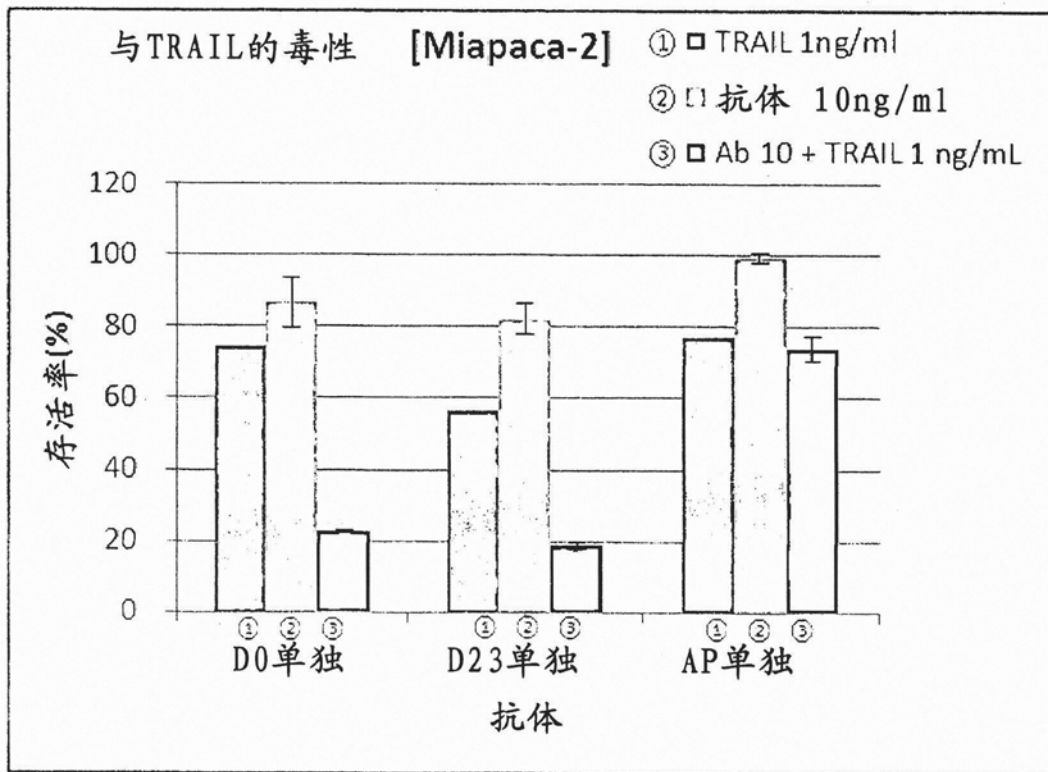


图9b

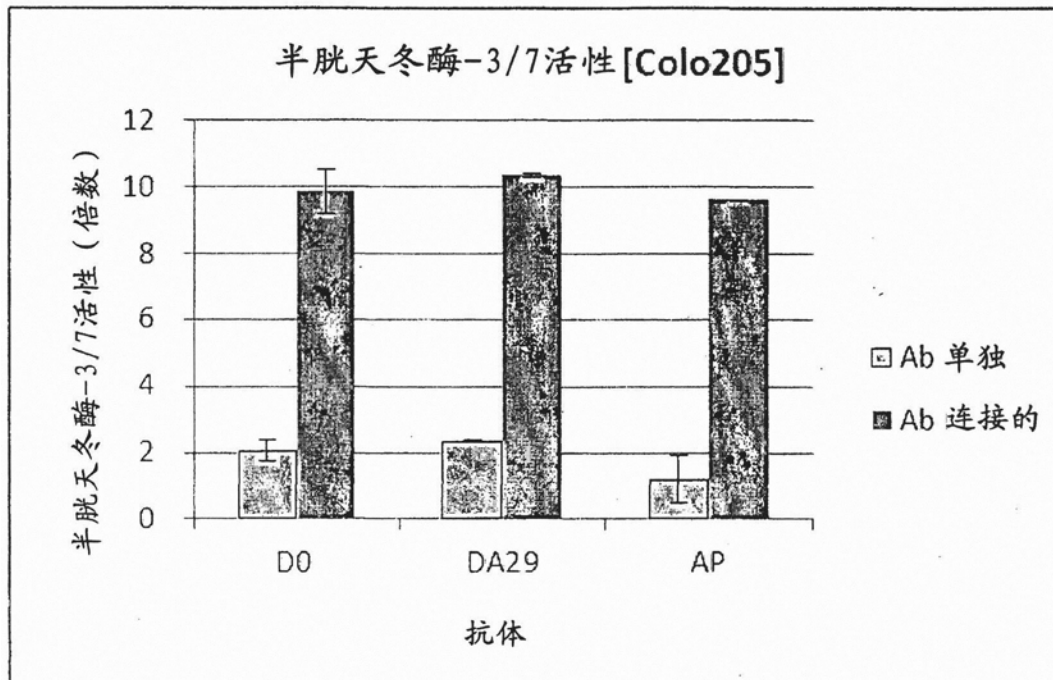


图10a

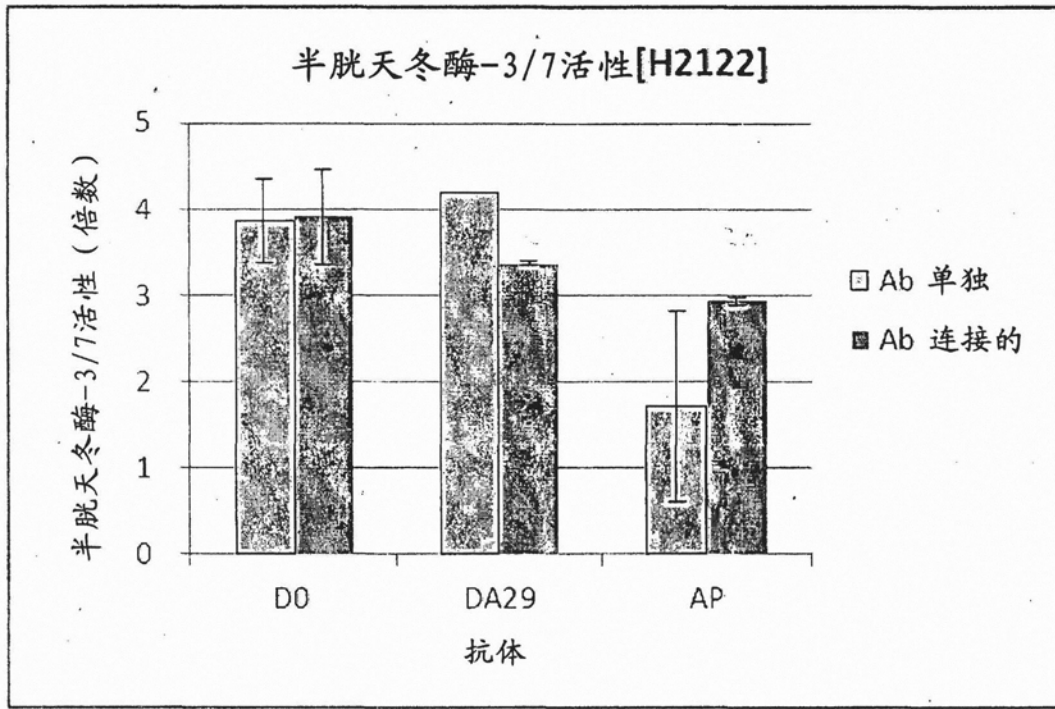


图10b

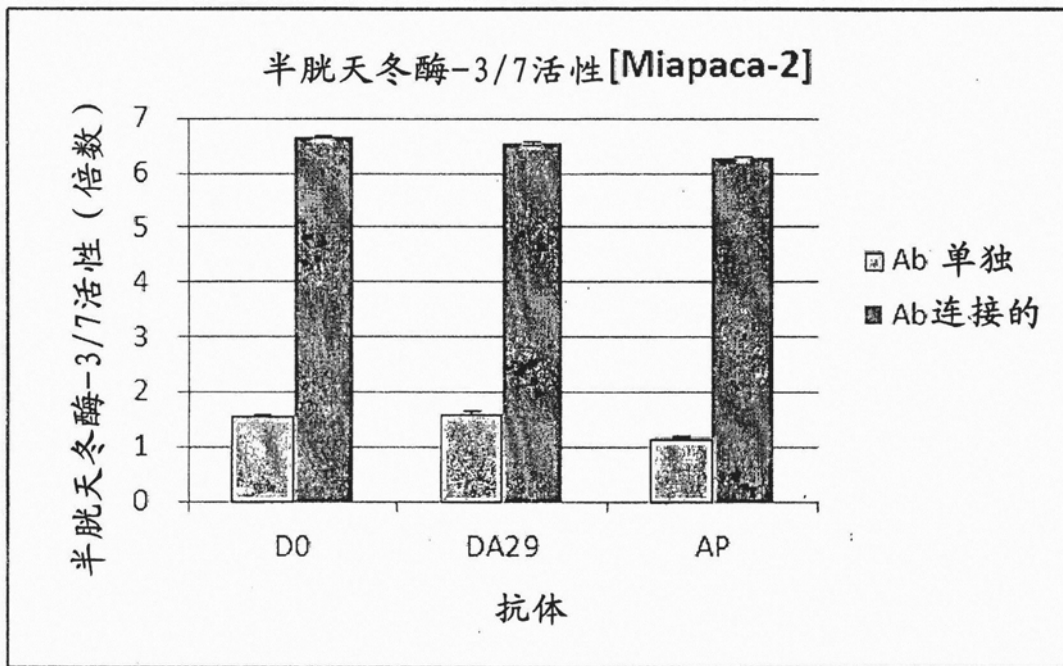


图10c

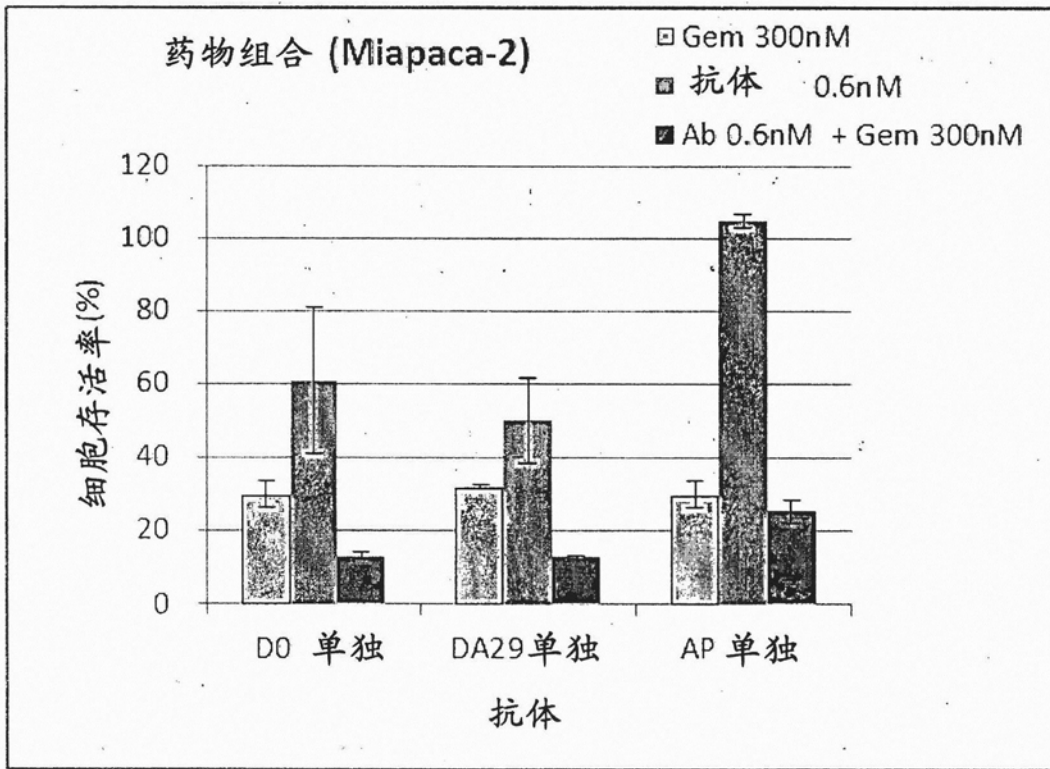


图11a

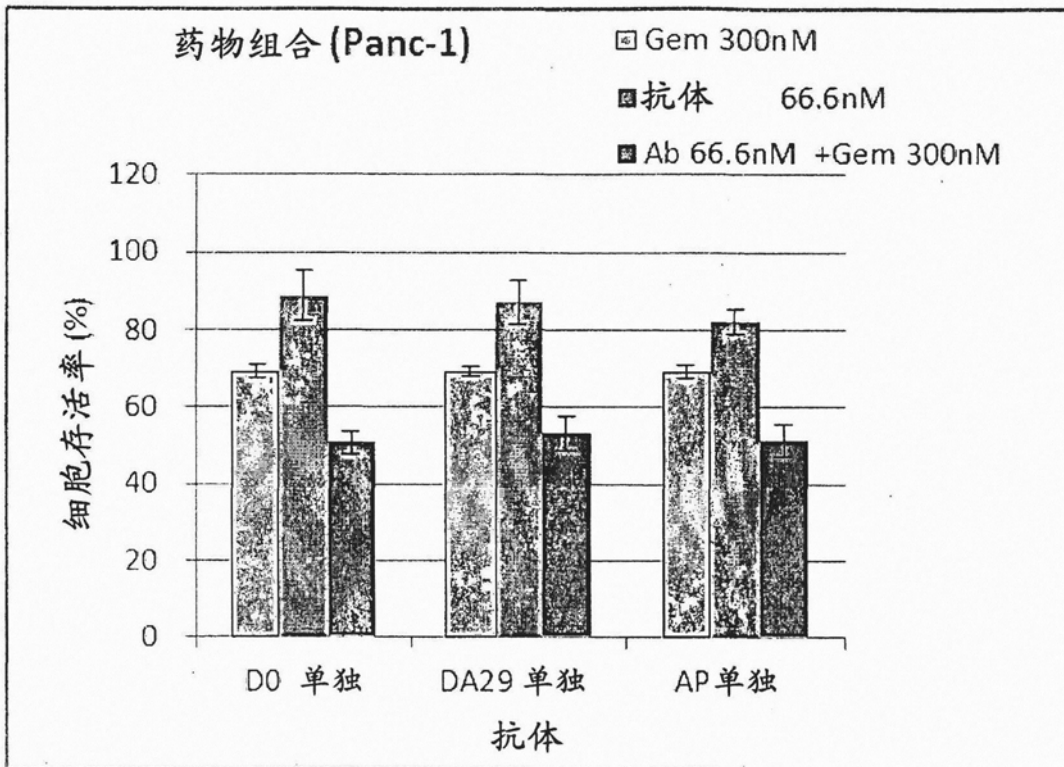


图11b