



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108883173 A

(43)申请公布日 2018. 11. 23

(21)申请号 201680079786.8

(22)申请日 2016.12.02

(30)优先权数据

62/262,369 2015.12.02 US

62/419,911 2016.11.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/064642 2016.12.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/096179 EN 2017.06.08

(71)申请人 阿吉纳斯公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

路德维格癌症研究所有限公司

(72)发明人 尼古拉斯·S·威尔逊

杰里米·D·韦特 格尔德·里特

大卫·舍尔

丹尼尔·赫希霍恩-西默尔曼

塔哈·梅尔杰奥贝

叶卡特琳娜·V·布雷欧斯-尼斯特伦

沃尔克·赛贝特 辻竹政

奥利维尔·莱格尔

丹尼斯·J·安德伍德

马克·万迪吉克

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 邱晓敏

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

G07K 16/28(2006.01)

G07K 16/30(2006.01)

权利要求书15页 说明书83页

序列表128页 附图26页

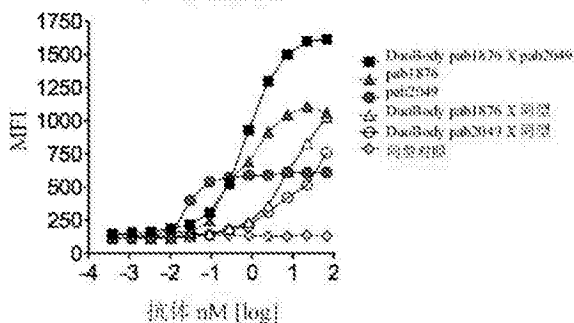
(54)发明名称

抗体和其使用方法

(57)摘要

本发明提供特异性地结合人类GITR和/或人类OX40的多特异性(例如双特异性)抗体和包含这类抗体的组合物。在一个特定方面中,所述多特异性抗体特异性地结合人类GITR和OX40且调节GITR和/或OX40活性,例如增强、活化或诱导GITR和/或OX40活性、或降低、去活化或抑制GITR和/或OX40活性。本发明亦提供用于治疗诸如癌症的病症的方法,通过授予多特异性抗体,所述多特异性抗体特异性地结合人类GITR和/或OX40且调节GITR和/或OX40活性,例如增强、活化或诱导GITR和/或OX40活性。本发明亦提供用于治疗自体免疫或发炎性疾病或病症的方法,通过授予多特异性抗体,所述多特异性抗体特异性地结合人类GITR和/或OX40且调节GITR和/或OX40活性,例如降低、去活化或抑制GITR和/或OX40活性。

与活化的 Hut102 细胞的结合 (GITR+OX40)



1. 一种特异性地结合人类OX40的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域,所述第一抗原结合域包含:
    - (i) 包含氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:47) 的重链可变域 (VH) 互补决定区 (CDR) 1;
    - (ii) 包含氨基酸序列RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:48) 的VH-CDR2;
    - (iii) 包含氨基酸序列GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49) 的VH-CDR3;
    - (iv) 包含氨基酸序列RSSQSLHNSNGYNYLD (SEQ ID NO:50) 的轻链可变域 (VL) -CDR1;
    - (v) 包含氨基酸序列LGSNRAS (SEQ ID NO:51) 的VL-CDR2;以及
    - (vi) 包含氨基酸序列MQGSKWPLT (SEQ ID NO:52) 或MQALQTPLT (SEQ ID NO:53) 的VL-CDR3;以及
  - (b) 第二抗原结合域。
2. 一种特异性地结合人类OX40的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 与抗体特异性地结合人类OX40的相同表位的第一抗原结合域,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或56;以及
  - (b) 第二抗原结合域。
3. 一种特异性地结合人类OX40的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 第一抗原结合域,所述第一抗原结合域特异性地结合人类OX40且相较于与SEQ ID NO:72的人类OX40序列的结合,表达与SEQ ID NO:72相同但存在氨基酸突变的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸突变选自自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A和其组合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:72;以及
  - (b) 第二抗原结合域。
4. 一种特异性地结合人类OX40的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 包含VH和VL的特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域,其中所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54;以及
  - (b) 第二抗原结合域。
5. 一种特异性地结合人类OX40的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 包含VH和VL的特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域,其中所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56;以及
  - (b) 第二抗原结合域。
6. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
  - (a) 第一抗原结合域;以及
  - (b) 特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域,所述第二抗原结合域包含:
    - (i) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub> (SEQ ID NO:87) 的VH-CDR1,其中X<sub>1</sub>是D、E或G;X<sub>2</sub>是A或V;且X<sub>3</sub>是Y或H;
    - (ii) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>SGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YNQKFX<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO:88) 的VH-CDR2,其中X<sub>1</sub>是V或L;X<sub>2</sub>是R、K或Q;X<sub>3</sub>是Y或F;X<sub>4</sub>是D、E或G;X<sub>5</sub>是V或L;X<sub>6</sub>是T或S;X<sub>7</sub>是K、R或Q;且X<sub>8</sub>是D、E或G;
    - (iii) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY (SEQ ID NO:3) 的VH-CDR3;
    - (iv) 包含氨基酸序列KSSQSLNLSX<sub>1</sub>NQKNYLX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:90) 的VL-CDR1,其中X<sub>1</sub>是G或S;且X<sub>2</sub>是T或S;

- (v) 包含氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:5) 的VL-CDR2;以及
- (vi) 包含氨基酸序列QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT (SEQ ID NO:92) 的VL-CDR3,其中X<sub>1</sub>是D或E;且X<sub>2</sub>是Y、F或S。
7. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 与抗体特异性地结合人类GITR的相同表位的第二抗原结合域,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。
8. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 第二抗原结合域,所述第二抗原结合域特异性地结合人类GITR的表位,所述表位包含SEQ ID NO:41的残基60至63中至少一个氨基酸。
9. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 第二抗原结合域,所述第二抗原结合域特异性地结合以下每一者:i) 包含SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR和ii) 石蟹猕猴GITR的变异体,所述变异体包含SEQ ID NO:46的残基26至234,其中所述抗体不特异性地结合包含SEQ ID NO:44的残基26至234的石蟹猕猴GITR。
10. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 第二抗原结合域,所述第二抗原结合域特异性地结合人类GITR且相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A或G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:41。
11. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 第二抗原结合域,所述第二抗原结合域特异性地结合人类GITR且包含VH和VL,其中所述VH包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24和25。
12. 一种特异性地结合人类GITR的分离的多特异性抗体,其中所述抗体包含:
- (a) 第一抗原结合域;以及
- (b) 第二抗原结合域,所述第二抗原结合域特异性地结合人类GITR且包含VH和VL,其中所述VL包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21、23和26。
13. 一种特异性地结合人类OX40的分离抗体,其中所述抗体包含:(a) 特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域;以及(b) 肿瘤坏死因子(TNF)超家族蛋白质。
14. 如权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述第二抗原结合域特异性地结合肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族蛋白质。
15. 如权利要求14所述的抗体,其中所述TNFR超家族蛋白质选自由以下组成的群组:GITR、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27和HVEM。
16. 一种特异性地结合人类GITR的分离抗体,其中所述抗体包含:(a) TNF超家族蛋白质;以及(b) 特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域。

17. 如权利要求6-12中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域特异性地结合TNFR超家族蛋白质。

18. 如权利要求17所述的分离抗体,其中所述TNFR超家族蛋白质选自由以下组成的群组:OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27和HVEM。

19. 如权利要求1-5、14或15中任一项所述的抗体,其中所述第二抗原结合域特异性地结合人类GITR。

20. 如权利要求16或19所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含:

(i) 包含氨基酸序列 $X_1YX_2MX_3$  (SEQ ID NO:87)的VH-CDR1,其中 $X_1$ 是D、E或G; $X_2$ 是A或V;且 $X_3$ 是Y或H;

(ii) 包含氨基酸序列 $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$  (SEQ ID NO:88)的VH-CDR2,其中 $X_1$ 是V或L; $X_2$ 是R、K或Q; $X_3$ 是Y或F; $X_4$ 是D、E或G; $X_5$ 是V或L; $X_6$ 是T或S; $X_7$ 是K、R或Q;且 $X_8$ 是D、E或G;

(iii) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY (SEQ ID NO:3)的VH-CDR3;

(iv) 包含氨基酸序列 $KSSQSLLNSX_1NQKNYLX_2$  (SEQ ID NO:90)的VL-CDR1,其中 $X_1$ 是G或S;且 $X_2$ 是T或S;

(v) 包含氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:5)的VL-CDR2;以及

(vi) 包含氨基酸序列 $QNX_1YSX_2PYT$  (SEQ ID NO:92)的VL-CDR3,其中 $X_1$ 是D或E;且 $X_2$ 是Y、F或S。

21. 如权利要求16、19或20所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域与抗体结合人类GITR的相同表位,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。

22. 如权利要求16或19-21中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域结合人类GITR的表位,所述表位包含SEQ ID NO:41的残基60至63中至少一个氨基酸。

23. 如权利要求16或19-22中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域结合以下每一者:i) 包含SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR以及ii) 石蟹猕猴GITR的变体,所述变体包含SEQ ID NO:46的残基26至234,其中所述第二抗原结合域不特异性地结合包含SEQ ID NO:44的残基26至234的石蟹猕猴GITR。

24. 如权利要求16或19-23中任一项所述的抗体,其中相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A或G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:41。

25. 如权利要求16或19-24中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,其中所述VH包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24和25。

26. 如权利要求16或19-25中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,其中所述VL包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21、23和26。

27. 如权利要求6-12、17或18中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域特异性地



结合人类OX40。

28. 如权利要求13或27所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含:

- (i) 包含氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:47) 的VH-CDR1;
- (ii) 包含氨基酸序列RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:48) 的VH-CDR2;
- (iii) 包含氨基酸序列GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49) 的VH-CDR3;
- (iv) 包含氨基酸序列RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:50) 的VL-CDR1;
- (v) 包含氨基酸序列LGSNRAS (SEQ ID NO:51) 的VL-CDR2;以及
- (vi) 包含氨基酸序列MQGSKWPLT (SEQ ID NO:52) 或MQALQTPLT (SEQ ID NO:53) 的VL-CDR3。

29. 如权利要求13、27或28所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域与抗体结合人类OX40的相同表位,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或56。

30. 如权利要求13或27-29中任一项所述的抗体,其中相较于与SEQ ID NO:72的人类OX40序列的结合,所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域表达与SEQ ID NO:72相同但存在氨基酸突变的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸突变选自以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A和其组合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:72。

31. 如权利要求13或27-30中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,其中所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。

32. 如权利要求13或27-31中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,其中所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56。

33. 如权利要求6-12、16或19-32中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含:

- (i) 包含氨基酸序列 $X_1YAMX_2$  (SEQ ID NO:1) 的VH-CDR1,其中 $X_1$ 是D、G或E;且 $X_2$ 是Y或H;
- (ii) 包含氨基酸序列 $X_1IRTYSGX_2VX_3YNQKFX_4X_5$  (SEQ ID NO:2) 的VH-CDR2,其中 $X_1$ 是V或L; $X_2$ 是D或G; $X_3$ 是T或S; $X_4$ 是K、R或Q;且 $X_5$ 是D、E或G;
- (iii) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY (SEQ ID NO:3) 的VH-CDR3;
- (iv) 包含氨基酸序列 $KSSQSLLSX_1NQKNYLT$  (SEQ ID NO:4) 的VL-CDR1,其中 $X_1$ 是G或S;
- (v) 包含氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:5) 的VL-CDR2;以及
- (vi) 包含氨基酸序列 $QNX_1YSX_2PYT$  (SEQ ID NO:6) 的VL-CDR3,其中 $X_1$ 是D或E;且 $X_2$ 是Y或F。

34. 如权利要求6-12、16或19-33中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH-CDR1,所述VH-CDR1包含选自SEQ ID NO:7至9组成的群组的氨基酸序列。

35. 如权利要求6-12、16或19-34中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH-CDR2,所述VH-CDR2包含选自SEQ ID NO:10至13组成的群组的氨基酸序列。

36. 如权利要求6-12、16或19-35中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类

GITR的第二抗原结合域包含VL-CDR1,所述VL-CDR1包含氨基酸序列SEQ ID NO:14或15。

37.如权利要求6-12、16或19-36中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL-CDR3,所述VL-CDR3包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或17。

38.如权利要求6-12、16或19-37中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含:

VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3序列,其分别在SEQ ID NO:7、10和3;SEQ ID NO:8、11和3;SEQ ID NO:9、12和3;或SEQ ID NO:9、13和3中示出;和/或

VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列,其分别在SEQ ID NO:14、5和16;或SEQ ID NO:15、5和17中示出。

39.如权利要求6-12、16或19-38中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含分别在SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16中示出的VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列。

40.如权利要求6-12、16或19-39中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,所述VH包含在SEQ ID NO:25中示出的氨基酸序列。

41.如权利要求6-12、16或19-40中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,所述VH包含与选自由以下组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22和24。

42.如权利要求41所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,所述VH包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22和24。

43.如权利要求42所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18。

44.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含选自由SEQ ID NO:29至36组成的群组的氨基酸序列。

45.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含选自由SEQ ID NO:74至81组成的群组的氨基酸序列。

46.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:31。

47.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:76。

48.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:32。

49.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:77。

50.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:34。

51.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。

52.如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:35。

53. 如权利要求43所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

54. 如权利要求6-10、12、16-24或26-37中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,所述VH包含源自于人类IGHV1-2种系序列的氨基酸序列。

55. 如权利要求6-12或16-54中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:26。

56. 如权利要求6-12或16-55中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,所述VL包含与选自由以下组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21和23。

57. 如权利要求56所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,所述VL包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21和23。

58. 如权利要求56所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。

59. 如权利要求58所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

60. 如权利要求58所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:38。

61. 如权利要求6-11、14-25或27-54中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,所述VL包含源自于人类IGKV4-1种系序列的氨基酸序列。

62. 如权利要求6-12、16-53或55-60中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL序列,其分别在SEQ ID NO:18和19、SEQ ID NO:20和21、SEQ ID NO:22和23、或SEQ ID NO:24和23中示出。

63. 如权利要求62所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,所述VH包含在SEQ ID NO:18中示出的序列且所述VL包含在SEQ ID NO:19中示出的序列。

64. 如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:31且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

65. 如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:76且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

66. 如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:32且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

67. 如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:77且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

68. 如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包

含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:34且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

69.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:79且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

70.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:35且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

71.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:80且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

72.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:29且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

73.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:74且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

74.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:30且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

75.如权利要求63所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:75且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

76.如权利要求54或61所述的抗体,其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有源自于人类IGHV1-2种系序列的氨基酸序列且所述轻链可变区具有源自于人类IGKV4-1种系序列的氨基酸序列。

77.如权利要求1-5、13-15或19-76中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,所述VH包含与氨基酸序列SEQ ID NO:54至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。

78.如权利要求77所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。

79.如权利要求78所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含选自由SEQ ID NO:59至66组成的群组的氨基酸序列。

80.如权利要求78所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含选自由SEQ ID NO:118至125组成的群组的氨基酸序列。

81.如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:61。

82.如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:120。

83. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:62。

84. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:121。

85. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:64。

86. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:123。

87. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:65。

88. 如权利要求79或80所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:124。

89. 如权利要求1-3、5、13-15、19-30或32-76中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,所述VH包含源自于人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列。

90. 如权利要求1-5、13-15或19-89中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,所述VL包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。

91. 如权利要求1-5、13-15或19-90中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL-CDR3,所述VL-CDR3包含氨基酸序列SEQ ID NO:52。

92. 如权利要求1-5、13-15或19-91中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55。

93. 如权利要求92所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67。

94. 如权利要求92所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:68。

95. 如权利要求1-5、13-15或19-90中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL-CDR3,所述VL-CDR3包含氨基酸序列SEQ ID NO:53。

96. 如权利要求1-5、13-15、19-90或95中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:56。

97. 如权利要求96所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:69。

98. 如权利要求96所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:70。

99. 如权利要求1-4、13-15、19-31或33-89中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,所述VL包含源自于人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

100. 如权利要求1-5、13-15、19-88或90-98中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH序列和VL序列,其分别在SEQ ID NO:54和55或SEQ ID

NO:54和56中示出。

101. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:59且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

102. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:118且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

103. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:64且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

104. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:123且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

105. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:65且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

106. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:124且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

107. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:61且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

108. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:120且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

109. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:62且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

110. 如权利要求100所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,所述重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:121且所述轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

111. 如权利要求89或99所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,所述VH包含源自于人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列且所述VL包含源自于人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

112. 如权利要求100-110中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:54中示出的VH序列和在SEQ ID NO:55或56中示出的VL序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:18中示出的VH序列和在SEQ ID NO:19中示出的VL序列。

113. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域

包含在SEQ ID NO:59中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:29中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

114. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:118中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:74中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

115. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:61中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:31中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

116. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:120中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:76中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

117. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:62中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:32中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

118. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:121中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:77中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

119. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:64中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:34中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

120. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:123中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:79中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

121. 如权利要求112项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:65中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:35中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

122. 如权利要求112所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:124中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:80中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。

123. 如权利要求112-122中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:67中示出的轻链序列。

124. 如权利要求112-122中任一项所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:69中示出的轻链序列。

125. 如权利要求111所述的抗体,其中所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含源自于人类IGHV3-73种系序列的VH和源自于人类IGKV2-28种系序列的VL,且其中所述特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含源自于人类IGHV1-2种系序列的VH和源自于人类IGKV4-1种系序列的VL。

126. 如权利要求1-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112或125中任一项所述的抗体,其中所述抗体为 $\kappa$ - $\lambda$ 体、双亲和重靶向分子(DART)、杵入臼型抗体、股交换工程改造结构域体(SEED体)或双特异性抗体(DuoBody)。

127. 如权利要求1-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112、125或126中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域包含选自由以下组成的群组的重链恒定区:人类IgG<sub>1</sub>、人类IgG<sub>2</sub>、人类IgG<sub>3</sub>、人类IgG<sub>4</sub>、人类IgA<sub>1</sub>和人类IgA<sub>2</sub>,且其中所述第二抗原结合域包含选自由以下组成的群组的重链恒定区:人类IgG<sub>1</sub>、人类IgG<sub>2</sub>、人类IgG<sub>3</sub>、人类IgG<sub>4</sub>、人类IgA<sub>1</sub>和人类IgA<sub>2</sub>。

128. 如权利要求127所述的抗体,其中所述第一抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>,且其中所述第二抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>。

129. 如权利要求1-12、14、15、17-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112、125或126中任一项所述的抗体,其中

(a) 所述第一抗原结合域包含第一重链恒定区,所述第一重链恒定区包含F405L氨基酸突变,所述氨基酸编号是根据EU编号系统;且

(b) 所述第二抗原结合域包含第二重链恒定区,所述第二重链恒定区包含K409R氨基酸突变,所述氨基酸编号是根据EU编号系统。

130. 如权利要求1-12、14、15、17-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112、125或126中任一项所述的抗体,其中

(a) 所述第一抗原结合域包含第一重链恒定区,所述第一重链恒定区包含K409R氨基酸突变,所述氨基酸编号是根据EU编号系统;且

(b) 所述第二抗原结合域包含第二重链恒定区,所述第二重链恒定区包含F405L氨基酸突变,所述氨基酸编号是根据EU编号系统。

131. 如权利要求128-130中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>。

132. 如权利要求128-130中任一项所述的抗体,其中所述第二抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>。

133. 如权利要求1-12、14、15、17-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112或125-132中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域包含选自由人类IgG <sub>$\kappa$</sub> 和IgG <sub>$\lambda$</sub> 组成的群组的轻链恒定区,且其中所述第二抗原结合域包含选自由人类IgG <sub>$\kappa$</sub> 和IgG <sub>$\lambda$</sub> 组成的群组的轻链恒定区。

134. 如权利要求10或24-133中任一项所述的抗体,其中相较于与SEQ ID NO:41的残基



26至241的人类GITR序列的结合,所述第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:41。

135. 如权利要求10或24-133中任一项所述的抗体,其中相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,所述第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:41。

136. 如权利要求8或22-135中任一项所述的抗体,其中所述结合人类GITR的第二抗原结合域结合选自由SEQ ID NO:41的残基60、62和63组成的群组的至少一个残基。

137. 如权利要求8或22-135中任一项所述的抗体,其中所述结合人类GITR的第二抗原结合域结合选自由SEQ ID NO:41的残基62和63组成的群组的至少一个残基。

138. 如权利要求8或22-135中任一项所述的抗体,其中所述结合人类GITR的第二抗原结合域结合选自由SEQ ID NO:41的残基60和63组成的群组的至少一个残基。

139. 如权利要求8或22-135中任一项所述的抗体,其中所述结合人类GITR的第二抗原结合域结合包含SEQ ID NO:41的残基60至63的表位。

140. 如权利要求19-139中任一项所述的抗体,其中所述抗体 (i) 相较于结合人类GITR且与所述结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与表达人类GITR和人类OX40的细胞增加的结合;和/或 (ii) 相较于结合人类OX40且与所述结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与表达人类GITR和人类OX40的细胞增加的结合。

141. 如权利要求19-140中任一项所述的抗体,其中所述抗体 (i) 相较于结合人类GITR且与所述结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与GITR阳性、OX40阴性细胞减少的结合;和/或 (ii) 相较于结合人类OX40且与所述结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与GITR阴性、OX40阳性细胞减少的结合。

142. 如权利要求19-141中任一项所述的抗体,其中所述抗体 (i) 相较于结合人类GITR且与所述结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,诱导对调节性T细胞更强的自然杀手细胞介导的细胞毒性;和/或 (ii) 相较于结合人类OX40且与所述结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,诱导对调节性T细胞更强的自然杀手细胞介导的细胞毒性。

143. 如权利要求6-12或16-142中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制人类GITR配体与人类GITR结合。

144. 如权利要求1-5、13-15或19-143项中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制人类OX40配体与人类OX40结合。

145. 如权利要求1-144中任一项所述的抗体,其中所述抗体当结合经活化的调节性T细胞时与选自由CD16、CD32A和CD64组成的群组的活化性Fc $\gamma$ 受体的结合程度大于所述抗体当结合经活化的效应T细胞时与选自由CD16、CD32A和CD64组成的群组的活化性Fc $\gamma$ 受体的结合程度。

146. 如权利要求145所述的抗体,其中所述活化性Fc $\gamma$ 受体表达于选自由骨髓衍生的

效应细胞和淋巴球衍生的效应细胞组成的群组的细胞上。

147. 如权利要求1-47、50、51、54-65、68、69、72、73、76-81、89-104、107、108、111-116、119、120或123-146中任一项所述的抗体,其中所述抗体对人类GITR和/或人类OX40具有促效性。

148. 如权利要求147所述的抗体,其中所述抗体诱导、活化或增强人类GITR的活性。

149. 如权利要求147或148所述的抗体,其中所述抗体诱导、活化或增强人类OX40的活性。

150. 如权利要求1-12、14-43、54-58、61-63、76-78、89-92、95、96、99、100、111、112或125-146项中任一项所述的抗体,其中所述第一抗原结合域包含人类IgG<sub>1</sub>重链恒定区且所述第二抗原结合域包含人类IgG<sub>1</sub>重链恒定区,且其中所述重链恒定区包含选自以下组成的群组的相同的突变:N297A、N297Q、D265A、L234F/L235E/D265A和其组合,所述氨基酸编号是根据EU编号系统。

151. 如权利要求1-45、48、49、52-63、66、67、70、71、74-80、83、84、87-100、105、106、109-112、117、118或121-146中任一项所述的抗体,其中所述抗体对人类GITR和/或人类OX40具有拮抗性。

152. 如权利要求151所述的抗体,其中所述抗体去活化、降低或抑制人类GITR的活性。

153. 如权利要求151或152所述的抗体,其中所述抗体去活化、降低或抑制人类OX40的活性。

154. 如权利要求151-153中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制或减少人类GITR信号传导。

155. 如权利要求151-154中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制或减少人类OX40信号传导。

156. 如权利要求151-155中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制或减少由人类GITR配体诱导的人类GITR信号传导。

157. 如权利要求151-156中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制或减少由人类OX40配体诱导的人类OX40信号传导。

158. 如权利要求151-157中任一项所述的抗体,其中所述抗体减少由来自类风湿性关节炎患者的滑液诱导的CD4<sup>+</sup>T细胞增殖。

159. 如权利要求151-158中任一项所述的抗体,其中所述抗体增加接受人类PBMC移植的NOG小鼠的存活率。

160. 如权利要求151-159中任一项所述的抗体,其中所述抗体增加GVHD模型中调节性T细胞的增殖。

161. 如权利要求1-160中任一项所述的抗体,所述抗体进一步包含可检测的标记。

162. 一种组合物,所述组合物包含(i)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(ii)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(iii)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第二抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;以及(iv)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第二抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子。

163. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含(i)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(ii)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第一抗原结合片段的轻链的重链可变区或重链的核酸分子;(iii)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第二抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;以及(iv)编码如权利要求1-160中任一项所述的抗体的第二抗原结合片段的轻链的重链可变区或重链的核酸分子。

164. 如权利要求163所述的宿主细胞,所述宿主细胞是选自由以下组成的群组:大肠杆菌、假单胞菌(Pseudomonas)、芽孢杆菌(Bacillus)、链霉菌(Streptomyces)、酵母菌、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10细胞、植物细胞、昆虫细胞和组织培养的人类细胞。

165. 一种产生特异性地结合人类GITR和人类OX40的抗体的方法,所述方法包含培养如权利要求163或164所述的宿主细胞以使所述核酸分子表达且产生所述抗体。

166. 一种用于检测样品中表达GITR和OX40的细胞的方法,所述方法包含使所述样品与如权利要求1-161中任一项所述的抗体接触。

167. 一种医药组合物,所述医药组合物包含如权利要求1-161中任一项所述的抗体和医药学上可接受的赋形剂。

168. 一种试剂盒,所述试剂盒包含如权利要求1-161中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物和a)检测试剂、b)GITR和/或OX40抗原、c)反映批准用于人类投药的使用或销售的登记或d)其组合。

169. 一种调节个体的免疫反应的方法,所述方法包含对所述个体投予有效量的如权利要求1-160中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

170. 一种用于增强或诱导个体的免疫反应的方法,所述方法包含对所述个体投予有效量的如权利要求1-47、50、51、54-65、68、69、72、73、76-82、85、86、89-104、107、108、111-116、119、120或123-149中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

171. 一种治疗个体的癌症的方法,所述方法包含对所述个体投予有效量的如权利要求1-47、50、51、54-65、68、69、72、73、76-82、85、86、89-104、107、108、111-116、119、120或123-149中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

172. 如权利要求171所述的方法,其中所述癌症选自由黑素瘤、肾癌、前列腺癌、结肠癌和肺癌组成的群组。

173. 如权利要求171或172所述的方法,其进一步包含对所述个体投予吡啶胺-2,3-二氧化酶(IDO)的抑制剂。

174. 如权利要求173所述的方法,其中所述抑制剂为埃帕多塔(epacadostat)。

175. 如权利要求173所述的方法,其中所述抑制剂为F001287。

176. 如权利要求173所述的方法,其中所述抑制剂为吡啶西莫(indoximod)。

177. 如权利要求173所述的方法,其中所述抑制剂为NLG919。

178. 如权利要求171或172所述的方法,其进一步包含对所述个体投予疫苗。

179. 如权利要求178所述的方法,其中所述疫苗包含热休克蛋白肽复合物(HSPPC),所述HSPPC包含与抗原肽复合的热休克蛋白。

180. 如权利要求179所述的方法,其中所述热休克蛋白为hsp70或hsc70且与肿瘤相关

抗原肽复合。

181. 如权利要求180所述的方法,其中所述热休克蛋白为gp96且与肿瘤相关抗原肽复合,其中所述HSPPC源自于自所述个体获得的肿瘤。

182. 如权利要求171或172所述的方法,其进一步包含对所述个体授予检查点靶向剂。

183. 如权利要求182所述的方法,其中所述检查点靶向剂是选自由以下组成的群组:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、促效剂抗GITR抗体和促效剂抗OX40抗体。

184. 一种治疗个体的感染性疾病的方法,所述方法包含对所述个体授予有效量的如权利要求1-160中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

185. 一种用于减少或抑制个体的免疫反应的方法,所述方法包含对所述个体授予有效量的如权利要求1-160中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

186. 一种用于治疗个体的自体免疫性或发炎性疾病或病症的方法,所述方法包含对所述个体授予有效量的如权利要求1-160中任一项所述的抗体或如权利要求167所述的医药组合物。

187. 如权利要求186项的方法,其中所述自体免疫性或发炎性疾病或病症是选自由以下组成的群组:移植排斥反应、移植物抗宿主病、血管炎、气喘、类风湿性关节炎、皮炎、发炎性肠病、葡萄膜炎、狼疮、结肠炎、糖尿病、多发性硬化和气管发炎。

188. 如权利要求169-187中任一项所述的方法,其中所述个体为人类。

## 抗体和其使用方法

### [0001] 相关申请

[0002] 本申请主张2015年12月2日提出申请的美国临时申请第62/262,369号和2016年11月9日提出申请的美国临时申请第62/419,911号的优先权,其揭示内容以全文引用的方式并入本文中。

### [0003] 序列列表

[0004] 本申请含有序列表,其已以ASCII格式以电子文件方式提交且在此以全文引用的方式并入本文(2016年12月1日建立的ASCII复本命名为3617\_016PC02\_SeqListing.txt且大小具有274,675字节)。

### 技术领域

[0005] 本发明关于特异性地结合人类糖皮质激素诱导TNFR家族相关受体(GITR)和/或人类OX40受体("OX40")的多特异性抗体,例如双特异性抗体;包含这类抗体的组合物;以及产生和使用那些抗体的方法。

### 背景技术

[0006] 先天性免疫反应及适应性免疫反应在控制人体肿瘤生长的作用已经良好表征(Vesely MD等人,(2011)Annu Rev Immunol 29:235-271)。因此,基于抗体的策略已出现,旨在增强用于癌症治疗目的的T细胞反应,诸如使用促效剂抗体靶向T细胞表达的刺激性受体、或使用功能性拮抗剂靶向T细胞表达的抑制性受体(Mellman I等人,(2011)Nature 480:480-489)。抗体介导的促效剂和拮抗剂方法已显示临床前活性和近期的临床活性。

[0007] 免疫反应的两种重要的刺激因子为糖皮质激素诱导TNFR相关蛋白(GITR)和OX40受体("OX40")。GITR和OX40皆为肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员。

[0008] GITR(亦称为活化诱导型TNFR家族受体(AITR)、GITR-D、CD357和肿瘤坏死因子受体超家族成员18(TNFRSF18))表达于先天性免疫系统和适应性免疫系统的许多组分且刺激后天免疫和先天免疫两者(Nocentini G等人,(1994)PNAS 94:6216-6221;Hanabuchi S等人,(2006)Blood 107:3617-3623;Nocentini G和Riccardi C(2005)Eur J Immunol 35:1016-1022;Nocentini G等人,(2007)Eur J Immunol 37:1165-1169)。GITR表达于若干细胞和组织,包括T细胞、B细胞、树突细胞(DC)和自然杀手细胞(NK),且由其配体GITRL活化,配体GITRL主要表达于抗原呈现细胞(APC)、内皮细胞和肿瘤细胞。GITR/GITRL统参与自体免疫/发炎反应的发展且加强对感染和肿瘤的反应。举例而言,使用GITR-Fc融合蛋白治疗动物改善自体免疫/发炎性疾病,而GITR触发可有效治疗病毒感染、细菌感染和寄生物感染且增强对抗肿瘤的免疫反应(Nocentini G等人,(2012)Br J Pharmacol 165:2089-99)。这些作用归因于若干个并行机制,包括:效应T细胞的共活化、对调节性T(Treg)细胞的抑制、NK细胞共活化、巨噬细胞的活化、树突细胞功能的调节和外渗过程的调节。在T细胞活化之后,GITR的膜表达增加(Hanabuchi S等人,(2006)(同上);Nocentini G和Riccardi C(同上))。GITR触发会共活化效应T淋巴球(McHugh R S等人,(2002)Immunity 16:311-323;

Shimizu J等人, (2002) *Nat Immunol* 3:135-142; Ronchetti S等人, (2004) *Eur J Immunol* 34:613-622; Tone M等人, (2003) *PNAS* 100:15059-15064)。GITR活化增加对肿瘤和病毒感染的抵抗力, 涉及自体免疫/发炎过程且调节白血球外渗 (Nocentini G和Riccardi C (2005) (同上); Cuzzocrea S等人, (2004) *J Leukoc Biol* 76:933-940; Shevach E M和Stephens G L (2006) *Nat Rev Immunol* 6:613-618; Cuzzocrea S等人, (2006) *J Immunol* 177:631-641; Cuzzocrea S等人, (2007) *FASEB J* 21:117-129)。

[0009] 人类GITR以极低的量表达于周边(未活化)T细胞。在T细胞活化之后, 在CD4<sup>+</sup>细胞和CD8<sup>+</sup>细胞两者中, GITR经强烈上调达数日 (Kwon B等人, (1999) *J Biol Chem* 274:6056-6061; Gurney AL等人, (1999) *Curr Biol* 9:215-218; Ronchetti S等人, (2004) (同上); Shimizu J等人, (2002) (同上); Ji H B等人, (2004) (同上); Ronchetti S等人, (2002) *Blood* 100:350-352; Li Z等人, (2003) *J Autoimmun* 21:83-92), CD4<sup>+</sup>细胞比CD8<sup>+</sup>细胞具有更高的GITR表达 (Kober J等人, (2008) *Eur J Immunol* 38(10):2678-88; Bianchini R等人, (2011) *Eur J Immunol* 41(8):2269-78)。

[0010] OX40 (亦称为CD134、肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (TNFRSF4)、TXGP1L、ACT35和ACT-4) 调节T细胞、自然杀手T (NKT) 细胞和NK细胞功能 (Sugamura K等人, (2004) *Nat Rev Immunol* 4:420-431)。OX40可由抗原特异性T细胞在显示负载同源肽的MHC I类或II类分子的专职抗原呈现细胞 (APC) 刺激T细胞受体 (TCR) 之后上调 (Sugamura K等人, (2004) *Nat Rev Immunol* 4:420-431)。在成熟时, 诸如树突细胞 (DC) 的APC上调刺激性B7家族成员 (例如CD80和CD86) 和包括OX40配体 (OX40L) 的辅助共刺激分子, 其上调有助于塑造T细胞免疫反应的动力学和量级以及有效的记忆细胞分化。值得注意的是, 其他细胞类型亦可表达组成性和/或诱导性OX40L的含量, 诸如B细胞、血管内皮细胞、肥大细胞和在一些情况下经活化的T细胞 (Soroosh P等人, (2006) *J Immunol* 176:5975-5987)。咸信OX40:OX40L共接合驱动受体三聚体的更高层级的簇集和后续的信号转导 (Compaan DM等人, (2006) *Structure* 14:1321-1330)。

[0011] 已在鼠类和人类肿瘤组织中观测到在肿瘤微环境内T细胞表达OX40 (Bulliard Y等人, (2014) *Immunol Cell Biol* 92:475-480; 和Piconese S等人, (2014) *Hepatology* 60:1494-1507)。相对于熟知的T细胞群组体, 调节性T细胞 (Treg) 的肿瘤内群组体高度表达OX40, 此为归因于肿瘤内Treg群组体的增殖状态特征 (Waight J D等人, (2015) *J Immunol* 194:878-882; 和Bulliard Y等人, (2014) *Immunol Cell Biol* 92:475-480)。早期研究证实OX40促效剂抗体能够在小鼠模型中引出肿瘤排斥反应 (Weinberg A D等人, (2000) *J Immunol* 164:2160-2169; 和Piconese S等人, (2008) *J Exp Med* 205:825-839)。促效人类OX40信号传导的小鼠抗体亦已显示可增强癌症患者的免疫功能 (Curti B D等人, (2013) *Cancer Res* 73:7189-7198)。

[0012] OX40与OX40L的相互作用亦已与发炎性和自体免疫性疾病和病症的免疫反应相关, 气喘/特异反应、脑脊髓炎、类风湿性关节炎、结肠炎/发炎性肠病、移植物抗宿主病 (例如移植排斥反应)、非肥胖糖尿病小鼠的糖尿病和动脉粥样硬化的小鼠模型 (Croft M等人, (2009) *Immunol Rev* 229(1):173-191和其中引用的参考文献)。已经报道在OX40和OX40L缺陷型小鼠、接受负载细胞抑制药物的抗OX40脂质粒的小鼠和使用抗OX40阻断抗体或与人类免疫球蛋白的Fc部分融合的重组OX40阻断OX40与OX40L的相互作用的小鼠中与所述疾病

和病症相关的症状减少 (Croft M等人; Boot EPJ等人, (2005) *Arthritis Res Ther* 7: R604-615; Weinberg A D等人, (1999) *J Immunol* 162:1818-1826)。亦显示使用阻断性抗OX40L抗体的治疗可抑制恒河猴气喘模型的Th2发炎 (Croft M等人; Seshasayee D等人, (2007) *J Clin Invest* 117:3868-3878)。此外, OX40L的多态性已与狼疮相关 (Croft M等人)。

[0013] 鉴于人类GITR和OX40在调节免疫反应的角色, 本发明提供特异性地结合GITR和/或OX40的抗体和这些抗体调节GITR和/或OX40活性的用途。

## 发明内容

[0014] 在一个方面中, 本发明提供结合GITR和/或OX40的多特异性 (例如双特异性) 抗体。在一种情况下, 分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的第一抗原结合域和特异性地结合GITR (例如人类GITR) 的第二抗原结合域。

[0015] 在一种情况下, 抗体包含特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域和TNF超家族蛋白质。在一种情况下, 抗体包含TNF超家族蛋白质和特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域。TNF超家族蛋白质可置换本发明提供的任何多特异性 (例如双特异性) 抗体的第一抗原结合域或第二抗原结合域。

[0016] 在一种情况下, 特异性地结合人类OX40的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含: (a) 特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域, 包含: (i) 包含氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:47) 的重链可变域 (VH) 互补决定区 (CDR) 1; (ii) 包含氨基酸序列RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:48) 的VH-CDR2; (iii) 包含氨基酸序列GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49) 的VH-CDR3; (iv) 包含氨基酸序列RSSQSLHNSGYNLYD (SEQ ID NO:50) 的轻链可变域 (VL) -CDR1; (v) 包含氨基酸序列LGSNRAS (SEQ ID NO:51) 的VL-CDR2; 以及 (vi) 包含氨基酸序列MQGSKWPLT (SEQ ID NO:52) 或MQALQTPLT (SEQ ID NO:53) 的VL-CDR3; 以及 (b) 第二抗原结合域。

[0017] 在一种情况下, 特异性地结合人类OX40的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含: (a) 与抗体特异性地结合人类OX40的相同表位的第一抗原结合域, 所述抗体包含VH和VL, 所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或56; 以及 (b) 第二抗原结合域。

[0018] 在一种情况下, 特异性地结合人类OX40的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含: (a) 第一抗原结合域, 其特异性地结合人类OX40且相较于与SEQ ID NO:72的人类OX40序列的结合, 表达与SEQ ID NO:72相同但存在氨基酸突变的蛋白质的减少或缺少的结合, 所述氨基酸突变选自以下组成的群组: N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A和它们的组合, 其编号是根据SEQ ID NO:72; 以及 (b) 第二抗原结合域。

[0019] 在一种情况下, 特异性地结合人类OX40的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含: (a) 包含VH和VL的特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域, 其中所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54; 以及 (b) 第二抗原结合域。

[0020] 在一种情况下, 特异性地结合人类OX40的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包含: (a) 包含VH和VL的特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域, 其中所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56; 以及 (b) 第二抗原结合域。

[0021] 在一种情况下, 特异性地结合人类GITR的分离的多特异性 (例如双特异性) 抗体包

含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域，包含：(i) 包含氨基酸序列 $X_1YX_2MX_3$  (SEQ ID NO:87) 的VH-CDR1，其中 $X_1$ 为D、E或G； $X_2$ 为A或V；且 $X_3$ 为Y或H；(ii) 包含氨基酸序列 $X_1IX_2TX_3SGX_4X_5X_6YNQKFX_7X_8$  (SEQ ID NO:88) 的VH-CDR2，其中 $X_1$ 为V或L； $X_2$ 为R、K或Q； $X_3$ 为Y或F； $X_4$ 为D、E或G； $X_5$ 为V或L； $X_6$ 为T或S； $X_7$ 为K、R或Q；且 $X_8$ 为D、E或G；(iii) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY (SEQ ID NO:3) 的VH-CDR3；(iv) 包含氨基酸序列KSSQSLN $SX_1NQKNYLX_2$  (SEQ ID NO:90) 的VL-CDR1，其中 $X_1$ 为G或S；且 $X_2$ 为T或S；(v) 包含氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:5) 的VL-CDR2；以及 (vi) 包含氨基酸序列QNX $_1YSX_2PYT$  (SEQ ID NO:92) 的VL-CDR3，其中 $X_1$ 为D或E；且 $X_2$ 为Y、F或S。

[0022] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 与抗体特异性地结合人类GITR的相同表位的第二抗原结合域，所述抗体包含VH和VL，所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。

[0023] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 第二抗原结合域，其特异性地结合人类GITR的表位，所述表位包含SEQ ID NO:41的残基60至63中至少一个氨基酸。

[0024] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 第二抗原结合域，其特异性地结合以下每一者：i) 包含SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR以及 ii) 石蟹猕猴GITR的变体，其包含SEQ ID NO:46的残基26至234，其中所述抗体不特异性地结合包含SEQ ID NO:44的残基26至234的石蟹猕猴GITR。

[0025] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 第二抗原结合域，其特异性地结合人类GITR且相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合，表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A或G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合，其编号是根据SEQ ID NO:41。

[0026] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 第二抗原结合域，其特异性地结合人类GITR且包含VH和VL，其中所述VH包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24和25。

[0027] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含：(a) 第一抗原结合域；以及 (b) 第二抗原结合域，其特异性地结合人类GITR且包含VH和VL，其中所述VL包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列：SEQ ID NO:19、21、23和26。

[0028] 在一种情况下，特异性地结合人类OX40的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含第二抗原结合域。在一种情况下，所述第二抗原结合域特异性地结合TNFR超家族蛋白质。在一种情况下，所述TNFR超家族蛋白质选自由以下组成的群组：GITR、OX40（例如其中第二抗原结合域与第一抗原结合域结合不同的OX40表位）、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27和HVEM。

[0029] 在一种情况下，特异性地结合人类GITR的分离的多特异性（例如双特异性）抗体包含第一抗原结合域。在一种情况下，第一抗原结合域特异性地结合TNFR超家族蛋白质。在一种情况下，TNFR超家族蛋白质选自由以下组成的群组：GITR（例如其中第一抗原结合域与第



二抗原结合域结合不同的GITR表位)、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27和HVEM。

[0030] 在一种情况下,第二抗原结合域特异性地结合TNFR超家族蛋白质人类GITR。在一种情况下,结合人类GITR的第二抗原结合域包含:(i)包含氨基酸序列X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub>(SEQ ID NO:87)的VH-CDR1,其中X<sub>1</sub>为D、E或G;X<sub>2</sub>为A或V;且X<sub>3</sub>为Y或H;(ii)包含氨基酸序列X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>SGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YNQKFX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>(SEQ ID NO:88)的VH-CDR2,其中X<sub>1</sub>为V或L;X<sub>2</sub>为R、K或Q;X<sub>3</sub>为Y或F;X<sub>4</sub>为D、E或G;X<sub>5</sub>为V或L;X<sub>6</sub>为T或S;X<sub>7</sub>为K、R或Q;且X<sub>8</sub>为D、E或G;(iii)包含氨基酸序列SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)的VH-CDR3;(iv)包含氨基酸序列KSSQSLNLSX<sub>1</sub>NQKNYLX<sub>2</sub>(SEQ ID NO:90)的VL-CDR1,其中X<sub>1</sub>为G或S;且X<sub>2</sub>为T或S;(v)包含氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:5)的VL-CDR2;以及(vi)包含氨基酸序列QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT(SEQ ID NO:92)的VL-CDR3,其中X<sub>1</sub>为D或E;且X<sub>2</sub>为Y、F或S。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域与抗体结合人类GITR的相同表位,所述抗体包含VH和VL,所述VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18且所述VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域结合人类GITR的表位,其包含SEQ ID NO:41的残基60至63中至少一个氨基酸。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域结合以下每一者:i)包含SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR以及ii)石蟹猕猴GITR的变异体,其包含SEQ ID NO:46的残基26至234,其中所述第二抗原结合域不特异性地结合包含SEQ ID NO:44的残基26至234的石蟹猕猴GITR。在一种情况下,相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A或G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,其编号是根据SEQ ID NO:41。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,其中VH包含选自以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24和25。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,其中VL包含选自以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21、23和26。

[0031] 在一种情况下,第一抗原结合域特异性地结合TNFR超家族蛋白质人类OX40。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含:(i)包含氨基酸序列GSAMH(SEQ ID NO:47)的VH-CDR1;(ii)包含氨基酸序列RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:48)的VH-CDR2;(iii)包含氨基酸序列GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:49)的VH-CDR3;(iv)包含氨基酸序列RSSQSLLSHNGYNYLD(SEQ ID NO:50)的VL-CDR1;(v)包含氨基酸序列LGSNRAS(SEQ ID NO:51)的VL-CDR2;以及(vi)包含氨基酸序列MQGSKWPLT(SEQ ID NO:52)或MQALQTPLT(SEQ ID NO:53)的VL-CDR3。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域与抗体结合人类OX40的相同表位,所述抗体包含VH和VL,VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54且VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或56。在一种情况下,相较于与SEQ ID NO:72的人类OX40序列的结合,所述特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域表达与SEQ ID NO:72相同但存在氨基酸突变的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸突变选自以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A的和其组合,其编号是根据SEQ ID NO:72。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,且VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,且VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56。

[0032] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含:(i)包含氨基酸序

列 $X_1YAMX_2$  (SEQ ID NO:1)的VH-CDR1,其中 $X_1$ 为D、G或E;且 $X_2$ 为Y或H;(ii)包含氨基酸序列 $X_1IRTYSGX_2VX_3YNQKFX_4X_5$  (SEQ ID NO:2)的VH-CDR2,其中 $X_1$ 为V或L; $X_2$ 为D或G; $X_3$ 为T或S; $X_4$ 为K、R或Q;且 $X_5$ 为D、E或G;(iii)包含氨基酸序列SGTVRGFAY (SEQ ID NO:3)的VH-CDR3;(iv)包含氨基酸序列KSSQSLLNSX<sub>1</sub>NQKNYLT (SEQ ID NO:4)的VL-CDR1,其中 $X_1$ 为G或S;(v)包含氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:5)的VL-CDR2;以及(vi)包含氨基酸序列QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT (SEQ ID NO:6)的VL-CDR3,其中 $X_1$ 为D或E;且 $X_2$ 为Y或F。

[0033] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH-CDR1,选自自由SEQ ID NO:7至9组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH-CDR2,包含选自自由SEQ ID NO:10至13组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:14或15。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL-CDR3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或17。

[0034] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3序列,其分别在SEQ ID NO:7、10和3;SEQ ID NO:8、11和3;SEQ ID NO:9、12和3;或SEQ ID NO:9、13和3中示出;和/或VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列,其分别在SEQ ID NO:14、5和16或SEQ ID NO:15、5和17中示出。

[0035] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含分别在SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16中示出的VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列。

[0036] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,VH包含在SEQ ID NO:25中示出的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,VH包含与选自自由以下组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22和24。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,VH包含选自自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22和24。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:18。

[0037] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含选自自由SEQ ID NO:29至36组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含选自自由SEQ ID NO:74至81组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:31。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:76。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:32。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:77。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:77。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:34。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:35。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

[0038] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH,包含源自于人

类IGHV1-2种系序列的氨基酸序列。

[0039] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:26。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,VL包含与选自由以下组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21和23。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,VL包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、21和23。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。

[0040] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含轻链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:38。

[0041] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VL,其包含源自于人类IGKV4-1种系序列的氨基酸序列。

[0042] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL序列,其分别在SEQ ID NO:18和19、SEQ ID NO:20和21、SEQ ID NO:22和23或SEQ ID NO:24和23中示出。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含VH和VL,VH包含在SEQ ID NO:18中示出的序列且VL包含在SEQ ID NO:19中示出的序列。

[0043] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:31且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:76且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:32且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:77且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:34且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:79且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:35且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:80且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:29且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:74且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:30且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:75且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:37。

[0044] 在一种情况下,特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含重链可变区和轻链

可变区,重链可变区具有源自于人类IGHV1-2种系序列的氨基酸序列且轻链可变区具有源自于人类IGKV4-1种系序列的氨基酸序列。

[0045] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,VH包含与氨基酸序列SEQ ID NO:54至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,VH包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。

[0046] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含选自自由SEQ ID NO:59至66组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含选自自由SEQ ID NO:118至125组成的群组的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:61。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:120。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:62。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:121。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:64。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:123。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:65。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:124。

[0047] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH,VH包含源自于人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列。

[0048] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,VL包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL-CDR3,VL-CDR3包含氨基酸序列SEQ ID NO:52。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:55。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0049] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL-CDR3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:53。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,包含氨基酸序列SEQ ID NO:56。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含轻链,轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:70。

[0050] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VL,包含源自于人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

[0051] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含分别在SEQ ID NO:54和55或SEQ ID NO:54和56中示出的VH和VL序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:59且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:118且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:64且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:123且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:65且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:124且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:61且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:120且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:62且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含重链和轻链,重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:121且轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69。

[0052] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含VH和VL,VH包含源自于人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列且VL包含源自于人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

[0053] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:54中示出的VH序列和在SEQ ID NO:55或56中示出的VL序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:18中示出的VH序列和在SEQ ID NO:19中示出的VL序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:59中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:29中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:118中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:74中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:61中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:31中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:120中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:76中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:62中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:32中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:121中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:77中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:64中示出的重链序列和在SEQ ID

NO:67或69中示出的轻链序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:34中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:123中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:79中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:65中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:35中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:124中示出的重链序列和在SEQ ID NO:67或69中示出的轻链序列,且其中特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含在SEQ ID NO:80中示出的重链序列和在SEQ ID NO:37中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:67中示出的轻链序列。在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含在SEQ ID NO:69中示出的轻链序列。

[0054] 在一种情况下,特异性地结合人类OX40的第一抗原结合域包含源自于人类IGHV3-73种系序列的VH和源自于人类IGKV2-28种系序列的VL,且特异性地结合人类GITR的第二抗原结合域包含源自于人类IGHV1-2种系序列的VH和源自于人类IGKV4-1种系序列的VL。

[0055] 在一种情况下,抗体为 $\kappa$ - $\lambda$ 体、双亲和重靶向分子(DART)、杵入白型抗体、股交换工程改造结构域体(SEED体)或双特异性抗体DuoBody<sup>®</sup>抗体(Genmab A/S)。

[0056] 在一种情况下,第一抗原结合域包含选自由以下组成的群组的重链恒定区:人类IgG<sub>1</sub>、人类IgG<sub>2</sub>、人类IgG<sub>3</sub>、人类IgG<sub>4</sub>、人类IgA<sub>1</sub>和人类IgA<sub>2</sub>,且第二抗原结合域包含选自由以下组成的群组的重链恒定区:人类IgG<sub>1</sub>、人类IgG<sub>2</sub>、人类IgG<sub>3</sub>、人类IgG<sub>4</sub>、人类IgA<sub>1</sub>和人类IgA<sub>2</sub>。在一种情况下,第一抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>,且第二抗原结合域的重链恒定区为人类IgG<sub>1</sub>。

[0057] 在一种情况下,(a)第一抗原结合域包含第一重链恒定区,第一重链恒定区包含F405L氨基酸突变;且(b)第二抗原结合域包含第二重链恒定区,第二重链恒定区包含K409R氨基酸突变,其编号是根据EU编号系统。在一种情况下,(a)第一抗原结合域包含第一重链恒定区,第一重链恒定区包含K409R氨基酸突变;且(b)第二抗原结合域包含第二重链恒定区,第二重链恒定区包含F405L氨基酸突变,其编号是根据EU编号系统。在一种情况下,第一抗原结合域的重链恒定区为IgG<sub>1</sub>。在一种情况下,第二抗原结合域的重链恒定区为IgG<sub>1</sub>。

[0058] 在一种情况下,第一抗原结合域包含选自由人类IgG <sub>$\kappa$</sub> 和IgG <sub>$\lambda$</sub> 组成的群组的轻链恒定区,且第二抗原结合域包含选自由人类IgG <sub>$\kappa$</sub> 和IgG <sub>$\lambda$</sub> 组成的群组的轻链恒定区。

[0059] 在一种情况下,相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,其编号是根据SEQ ID NO:41。在一种情况下,相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,第二抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在G63A氨基酸取代的蛋白质的减少或缺少的结合,其编号是根据SEQ ID NO:41。在一种情况下,结合人类GITR的第二抗原结合域结合选自由SEQ ID NO:41的残基60、62和63组成的群组的至少一个残基。在一种情况下,结合人类GITR的第二抗原结合域结合选自由SEQ ID NO:41的残基62和63组成的群组的至少一个残基。在一种情况下,结合人类GITR

的第二抗原结合域结合选自SEQ ID NO:41的残基60和63组成的群组的至少一个残基。在一种情况下,结合人类GITR的第二抗原结合域结合包含SEQ ID NO:41的残基60至63的表位。

[0060] 在一种情况下,抗体(i)相较于结合人类GITR且与结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与表达人类GITR和人类OX40的细胞增加的结合;和/或(ii)相较于结合人类OX40且与结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与表达人类GITR和人类OX40的细胞增加的结合。

[0061] 在一种情况下,抗体(i)相较于结合人类GITR且与结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与GITR阳性、OX40阴性细胞减少的结合;和/或(ii)相较于结合人类OX40且与结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,显示与GITR阴性、OX40阳性细胞减少的结合。

[0062] 在一种情况下,抗体(i)相较于结合人类GITR且与结合人类GITR的第二抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,诱导对调节性T细胞更强的自然杀手细胞介导的细胞毒性;和/或(ii)相较于结合人类OX40且与结合人类OX40的第一抗原结合域含有相同的VH和VL的单特异性二价抗体,诱导对调节性T细胞更强的自然杀手细胞介导的细胞毒性。

[0063] 在一种情况下,抗体抑制人类GITR配体与人类GITR结合。在一种情况下,抗体抑制人类OX40配体与人类OX40结合。

[0064] 在一种情况下,抗体当结合经活化的调节性T细胞时与选自CD16、CD32A和CD64组成的群组的活化性Fc $\gamma$ 受体的结合程度大于抗体当结合经活化的效应T细胞时与选自CD16、CD32A和CD64组成的群组的活化性Fc $\gamma$ 受体的结合程度。在一种情况下,活化性Fc $\gamma$ 受体表达于选自骨髓衍生的效应细胞和淋巴球衍生的效应细胞组成的群组的细胞上。

[0065] 在一种情况下,抗体对人类GITR和/或人类OX40具有促效性。在一种情况下,抗体诱导、活化或增强人类GITR的活性。在一种情况下,抗体诱导、活化或增强人类OX40的活性。

[0066] 在一种情况下,第一抗原结合域包含人类IgG<sub>1</sub>重链恒定区,人类IgG<sub>1</sub>重链恒定区包含N297A突变或N297Q突变和/或第二抗原结合域包含人类IgG<sub>1</sub>重链恒定区,包含N297A突变或N297Q突变,其编号是根据EU编号系统。

[0067] 在一种情况下,抗体对人类GITR和/或人类OX40具有拮抗性。在一种情况下,抗体去活化、降低或抑制人类GITR的活性。在一种情况下,抗体去活化、降低或抑制人类OX40的活性。在一种情况下,抗体抑制或减少人类GITR信号传导。在一种情况下,抗体抑制或减少人类OX40信号传导。在一种情况下,抗体抑制或减少由人类GITR配体诱导的人类GITR信号传导。在一种情况下,抗体抑制或减少由人类OX40配体诱导的人类OX40信号传导。

[0068] 在一种情况下,抗体减少由来自类风湿性关节炎患者的滑液诱导的CD4<sup>+</sup>T细胞增殖。在一种情况下,抗体增加接受人类PBMC移植的NOG小鼠的存活率。在一种情况下,抗体增加GVHD模型中调节性T细胞的增殖。

[0069] 在一种情况下,抗体进一步包含可检测的标记。

[0070] 本发明亦提供组合物。在一种情况下,组合物包含(i)编码本发明提供的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(ii)编码本发明提供的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(iii)编码本发明提供的抗体的第二抗原结合

片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;以及(iv)编码本发明提供的抗体的第二抗原结合片段的重链可变区或重链的核酸分子。

[0071] 本发明亦提供宿主细胞。在一种情况下,宿主细胞包含(i)编码本发明提供的抗体的第一抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;(ii)编码本发明提供的抗体的第一抗原结合片段的重链可变区或重链的核酸分子;(iii)编码本发明提供的抗体的第二抗原结合片段的轻链可变区或轻链的核酸分子;以及(iv)编码本发明提供的抗体的第二抗原结合片段的重链可变区或重链的核酸分子。在一种情况下,宿主细胞是选自由以下组成的群组:大肠杆菌、假单孢菌(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、酵母菌、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10细胞、植物细胞、昆虫细胞和组织培养的人类细胞。本发明亦提供制备结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体的方法。在一种情况下,方法包括培养本发明提供的宿主细胞以使核酸分子表达且产生抗体。

[0072] 本发明亦提供使用与GITR和/或OX40结合的多特异性(例如双特异性)抗体的方法。在一种情况下,在样品中检测表达GITR和OX40的细胞的方法包括使样品与本发明提供的抗体接触。

[0073] 本发明亦提供医药组合物。在一种情况下,医药组合物包含本发明提供的抗体和医药学上可接受的赋形剂。

[0074] 本发明亦提供试剂盒。在一种情况下,试剂盒包含本发明提供的抗体或医药组合物以及a)检测试剂、b)GITR和/或OX40抗原、c)反映批准用于人类投药的使用或销售的注册或d)其组合。

[0075] 本发明亦提供使用本发明提供的抗体和医药组合物的方法。在一种情况下,调节个体的免疫反应的方法包含对个体投予有效量的本发明提供的抗体或医药组合物。在一种情况下,用于增强或诱导个体的免疫反应的方法包含对个体投予有效量的本发明提供的抗体或医药组合物。

[0076] 在一种情况下,治疗个体的癌症的方法包含对个体投予有效量的本发明提供的抗体或医药组合物。在一种情况下,癌症选自由黑素瘤、肾癌、前列腺癌、结肠癌和肺癌组成的群组。在一种情况下,方法进一步包含对个体投予吡哆胺-2,3-二氧化酶(IDO)的抑制剂。在一种情况下,抑制剂为埃帕多塔(epacadostat)。在一种情况下,抑制剂为F001287。在一种情况下,抑制剂为吡哆西莫(indoximod)。在一种情况下,抑制剂为NLG919。在一种情况下,方法进一步包含对个体投予疫苗。在一种情况下,疫苗包含热休克蛋白肽复合物(HSPPC),HSPPC包含与抗原肽复合的热休克蛋白。在一种情况下,热休克蛋白为hsp70或hsc70且与肿瘤相关抗原肽复合。在一种情况下,热休克蛋白为gp96蛋白且与肿瘤相关抗原肽复合,其中HSPPC源自于自个体获得的肿瘤。在一种情况下,方法进一步包含对个体投予检查点靶向剂。在一种情况下,检查点靶向剂选自由以下组成的群组:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、促效剂抗GITR抗体和促效剂抗OX40抗体。

[0077] 在一种情况下,治疗感染性疾病的方法包含对个体投予有效量的本发明提供的抗体或医药组合物。

[0078] 在一种情况下,减少或抑制个体的免疫反应的方法包含对个体投予有效量的本发



明提供的抗体或医药组合物。

[0079] 在一种情况下,治疗个体的自体免疫性或发炎性疾病或病症的方法包含对个体投予有效量的本发明提供的抗体或医药组合物。在一种情况下,自体免疫性或发炎性疾病或病症是选自由以下组成的群组:移植排斥反应、移植物抗宿主病、血管炎、气喘、类风湿性关节炎、皮炎、发炎性肠病、葡萄膜炎、狼疮、结肠炎、糖尿病、多发性硬化和气管发炎。

[0080] 在一种情况下,个体为人类。

## 附图说明

[0081] 图1A和1B:图1A为一组直方图,其显示在来自子宫内膜癌肿瘤组织、肾细胞癌(RCC)肿瘤组织和非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤组织的肿瘤内效应T细胞(Teff:CD4+CD127+CD25+/-FOXP3-)和调节性T细胞(Treg:CD4+CD127-CD25+FOXP3+)上GITR和OX40的表达。图1B为一组条形图,其显示在来自卵巢癌肿瘤组织、结肠直肠癌(CRC)肿瘤组织、子宫内膜癌肿瘤组织、RCC肿瘤组织和NSCLC肿瘤组织的Treg和Teff细胞的表面上GITR受体和OX40受体的预测数目。

[0082] 图2A、2B和2C为显示测试抗体与共表达GITR和OX40的活化的Hut102细胞(图2A)、表达GITR的Jurkat细胞(图2B)和表达OX40的Jurkat细胞(图2C)的结合的图表。绘制平均荧光强度(MFI)对抗体浓度范围的曲线。所使用的测试抗体为DuoBody pab1876×pab2049(图2A至2C)、二价单特异性抗体pab1876(图2A和2B)、二价单特异性抗体pab2049(图2A和2C)、DuoBody pab1876×同型(图2A)、DuoBody pab2049×同型(图2A)和同型对照抗体(图2A至2C)。

[0083] 图3A为一组直方图,其显示在活化的自然调节性T(nTreg)细胞上GITR和OX40的表达。图3B为报导基因试验的结果,其中检验测试抗体在当抗体结合活化的nTreg时活化表达FcγRIIIA<sup>V158</sup>的报告细胞系的能力。所使用的测试抗体为DuoBody pab1876×pab2049、二价单特异性抗体pab1876、二价单特异性抗体pab2049和同型对照抗体。将相对光单位(RLU)相对于经所测试的最高浓度的同型对照抗体处理的样品的RLU值归一化且绘制对抗体浓度的剂量滴定曲线。图3C和3D为类似的报导基因试验的结果,其中检验测试抗体在当抗体结合表达GITR的Jurkat细胞(图3C)或表达OX40的Jurkat细胞(图3D)时活化表达FcγRIIIA<sup>V158</sup>的报告细胞的能力。所使用的测试抗体为DuoBody pab1876×pab2049、二价单特异性抗体pab1876(F405L/F405L)、二价单特异性抗体pab2049(K409R/K409R)和同型对照抗体。绘制RLU对抗体浓度范围的曲线。图3E、3F、和3G为量测在同型对照抗体、pab1876、pab2049、DuoBody pab1876×pab2049、或pab1876与pab2049的组合存在下活化的效应T细胞或活化的Treg的NK细胞介导的裂解的分析结果。图3E为一对直方图,其显示通过流式细胞术所量测的活化的效应T细胞或Treg上GITR(左侧)或OX40(右侧)的表达。在图3F和3G中,绘制细胞毒性%对抗体浓度的滴定曲线。

[0084] 图4A和4B为描绘在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后DuoBody pab1876×pab2049对来自两个供者的原生人类T细胞的功能活性的图表。绘制在DuoBody pab1876×pab2049、DuoBody pab2049×同型和同型对照抗体的剂量滴定下IL-2的浓度曲线。

[0085] 图5A和5B:图5A为报导基因试验的结果,其中测试DuoBody pab1876×pab2049、三聚体GITRL和同型对照抗体活化Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶报告细胞的能力。绘制相

对光单位 (RLU) 对抗体或GITRL浓度范围的曲线。图5B为报导基因试验的结果, 其中检验 DuoBody pab1876×pab2049和同型对照抗体阻断GITRL诱导的NF-κB信号传导的能力。在报导基因试验中, 将Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶报告细胞与DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体一起预培育, 之后由三聚体GITRL活化。显示在抗体浓度的剂量滴定存在下的GITRL活性%。

[0086] 图6A和6B: 图6A描绘由多聚体OX40L、DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体触发的Jurkat-huOX40-NF-κB-荧光素酶报告细胞的NF-κB-荧光素酶信号。绘制RLU对OX40L或抗体浓度的剂量滴定曲线。图6B为报导基因试验的结果, 其中将Jurkat-huOX40-NF-κB-荧光素酶报告细胞与DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体一起预培育, 之后由多聚体OX40L活化。绘制OX40L活性%对抗体浓度范围的曲线。

[0087] 图7为直方图, 其显示当将生物素化的GITR (GITR-bio) 与嵌合亲本231-32-15、pab1875或pab1876抗体一起预培育时, 表达嵌合亲本231-32-15抗体的1624-5前B细胞与GITR-bio的结合损失。图7右侧曲线描绘表达嵌合亲本231-32-15抗体的1624-5前B细胞与GITR-bio的结合。然而, 在左侧曲线中, 在将GITR-bio与嵌合亲本231-32-15、pab1875或pab1876抗体一起预培育后, 表达嵌合亲本231-32-15抗体的1624-5细胞与GITR-bio的结合损失。

[0088] 图8显示通过表面等离子体共振(BIAcore<sup>®</sup> T100/200) 所量测的表位竞争分析的结果。将GITR抗原固定在CM5传感器芯片上且以300nM的浓度施加抗GITR抗体。首先施加嵌合亲本231-32-15抗体, 继而施加鼠类抗体6C8。

[0089] 图9A和9B为使用表达由易错PCR产生的GITR变异体的细胞文库的表位定位实验的结果。图9A和9B显示结合多克隆抗GITR抗体但不结合抗GITR嵌合亲本231-32-15抗体的GITR变异体的序列比对。

[0090] 图10A和10B为使用丙氨酸扫描的表位定位实验的结果。分别使人类GITR的下列位置(根据SEQ ID NO: 41编号) 突变成丙氨酸: P28A、T29A、G30A、G31A、P32A、T54A、T55A、R56A、C57A、C58A、R59A、D60A、Y61A、P62A、G63A、E64A、E65A、C66A、C67A、S68A、E69A、W70A、D71A、C72A、M73A、C74A、V75A和Q76A。图10A所示的实验所测试的抗体包括: 单克隆抗GITR抗体 pab1876、pab1967、pab1975、pab1979和m6C8以及多克隆抗GITR抗体 (AF689, R&D systems公司)。图10A为汇总pab1876、pab1967、pab1975、pab1979和参考抗体m6C8与表达人类GITR丙氨酸突变体的1624-5细胞结合的表。图10B为一组流式细胞术图, 其显示使用单克隆抗体 231-32-15、pab1876或m6C8或多克隆抗体对表达野生型人类GITR、D60A突变体或G63A突变体的1624-5细胞的染色。在各图中表示GITR阳性细胞的百分比。

[0091] 图11A为突显位置62和63的人类GITR、V1M石蟹猕猴GITR和V1M/Q62P/S63G石蟹猕猴GITR的序列比对, 在所述位置处来自石蟹猕猴GITR的两个氨基酸 (GlnSer) 经人类GITR的对应残基 (ProGly) 置换。图11B为一组流式细胞术图, 显示使用单克隆抗体231-32-15、pab1876或m6C8或多克隆抗GITR抗体对表达人类GITR、V1M石蟹猕猴GITR或V1M/Q62P/S63G石蟹猕猴GITR的1624-5细胞的染色。

[0092] 图12为汇总单克隆抗OX40抗体pab1949w、pab2049和pab1928与表达人类OX40丙氨酸突变体的1624-5细胞结合的表。

## 具体实施方式

[0093] 本发明提供特异性地结合GITR (例如人类GITR) 和/或OX40 (例如人类OX40) 的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)。

[0094] 举例而言,本发明提供的多特异性 (例如双特异性) 抗体可含有结合OX40的第一抗原结合域、和第二抗原结合域。第二抗原结合域可不同于第一抗原结合域。第二抗原结合域可与第一抗原结合域结合不同的抗原 (即不为OX40的抗原)。第二抗原结合域可与第一抗原结合域结合不同的表位。在一种情况下,本发明提供的抗体含有特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的第一抗原结合域和特异性地结合TNFR超家族蛋白质的第二抗原结合域。TNFR超家族蛋白质可为例如GITR、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27或HVEM。在一种情况下,本发明提供的抗体含有特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的第一抗原结合域和特异性地结合GITR (例如人类GITR) 的第二抗原结合域。

[0095] 在另一个实施例中,本发明提供的抗体可含有第一抗原结合域和结合GITR的第二抗原结合域。第一抗原结合域可不同于第二抗原结合域。第一抗原结合域可与第一抗原结合域结合不同的抗原 (即不为GITR的抗原)。第二抗原结合域可与第一抗原结合域结合不同的表位。在一种情况下,本发明提供的抗体含有特异性地结合TNFR超家族蛋白质的第一抗原结合域和特异性地结合GITR (例如人类GITR) 的第二抗原结合域。TNFR超家族蛋白质可为例如GITR、OX40、CD137、DR3、CD40、BAFFR、CD27或HVEM。在另一个实施例中,本发明提供的抗体含有结合OX40的第一抗原结合域和结合GITR的第二抗原结合域。在一种情况下,本发明提供的抗体含有特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的第一抗原结合域和特异性地结合GITR (例如人类GITR) 的第二抗原结合域。

[0096] 本发明亦提供包含特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域和TNF超家族蛋白质的抗体。这类抗体可结合表达OX40 (例如人类OX40) 和TNF超家族蛋白质受体的细胞。本发明亦提供包含TNF超家族蛋白质和特异性地结合GITR (例如人类GITR) 的抗原结合域的抗体。这类抗体可结合表达TNF超家族蛋白质受体和GITR (例如人类GITR) 的细胞。TNF超家族蛋白质可为例如GITR配体、OX40配体、CD137配体、DR3配体、CD40配体、BAFFR配体、CD27配体或HVEM配体。TNF超家族蛋白质可置换本发明提供的任何多特异性 (例如双特异性) 抗体的第一抗原结合域或第二抗原结合域。

[0097] 在一个方面中,本发明提供一种特异性地结合GITR和OX40且增强、诱导或增加一或多种GITR和/或OX40活性的多特异性 (例如双特异性) 抗体。在另一个方面中,本发明提供一种特异性地结合GITR和OX40且降低、抑制或减少一或多种GITR或OX40活性的多特异性 (例如双特异性) 抗体。在一个特定实施方案中,抗体经分离。

[0098] 亦提供编码这类抗体的分离的核酸 (聚核苷酸), 诸如互补DNA (cDNA)。进一步提供载体 (例如表达载体) 和细胞 (例如宿主细胞), 其包含编码这类抗体的核酸 (聚核苷酸)。亦提供制备这类抗体的方法。在其他方面中,本发明提供诱导、增加或增强GITR和/或OX40活性和治疗某些病况 (诸如癌症) 的方法和用途。进一步提供抑制、减少或降低GITR和/或OX40活性和治疗某些病况 (诸如发炎性或自体免疫性疾病和病症) 的方法和用途。亦提供相关组合物 (例如医药组合物)、试剂盒和检测方法。

[0099] 7.1 术语

[0100] 如本文所用的术语“约”和“大约”在用于修饰数值或数值范围时,表明比所述值或范围高5%至10%和低5%至10%的偏差仍在所述值或范围的预期含义内。

[0101] 如本文所用,若例如在既定实验中,或使用来自多次实验的平均值,B实质上随A在指定范围内增加而增加,则B为在A值的指定范围内A的“实质上递增函数”。此定义允许对应于A的指定值的B的值相对于对应于A的任何下限值的B的值低至多1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%或20%。

[0102] 如本文所用,若例如在既定实验中,或使用来自多次实验的平均值,B实质上随A在指定范围内增加而减少,则B为在A值的指定范围内A的“实质上递减函数”。此定义允许对应于A的指定值的B的值相对于对应于A的任何下限值的B的值高至多1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%或20%。

[0103] 如本文所用的术语“抗体 (antibody)”和“抗体 (antibodies)”为本领域的术语且在本文可互换使用且是指具有特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子。

[0104] 抗体可包括例如单克隆抗体、重组产生的抗体、人类抗体、人类化抗体、表面重整抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、内抗体、异源结合抗体、单域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv (scFv)、骆驼化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、二硫键连接的Fv (sdFv)、抗遗传型(抗Id)抗体(包括例如抗抗Id抗体)、双特异性抗体和多特异性抗体。在某些实施方案中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群组体。抗体可为任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>或IgA<sub>2</sub>)或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>或IgG<sub>2b</sub>)的免疫球蛋白分子。在某些实施方案中,本文所述的抗体为IgG抗体或其类别(例如人类IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>或IgG<sub>4</sub>)或子类。在一个特定实施方案中,抗体为人类化单克隆抗体。在另一个特定实施方案中,抗体为人类单克隆抗体,例如其为免疫球蛋白。在某些实施方案中,本文所述的抗体为IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>或IgG<sub>4</sub>抗体。

[0105] “多特异性”抗体为具有至少两个不同的抗原结合位点的抗体。多特异性抗体包括含有两个不同抗原结合位点(不包括Fc区)的双特异性抗体。多特异性抗体可包括例如重组产生的抗体、人类抗体、人类化抗体、表面重整抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、异源结合抗体、连接的单链抗体或连接的单链Fv (scFv)、骆驼化抗体、亲和体、连接的Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、化学连接的Fv和二硫键连接的Fv (sdFv)。多特异性抗体可为任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>或IgA<sub>2</sub>)或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>或IgG<sub>2b</sub>)的免疫球蛋白分子。在某些实施方案中,本文所述的多特异性抗体为IgG抗体或其类别(例如人类IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>或IgG<sub>4</sub>)或子类。

[0106] 如本文所用的术语“抗原结合域”、“抗原结合区”、“抗原结合位点”和类似术语是指抗体分子所包含赋予抗体分子以对抗原的特异性的氨基酸残基(例如互补决定区(CDR))的部分。抗原结合区可源自于任何动物物种,诸如啮齿类动物(例如小鼠、大鼠或仓鼠)和人类。

[0107] 如本文所用的术语“抗GITR/OX40”抗体是指含有结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域和结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域的多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0108] 如本文所用的术语“可变区”或“可变域”可互换使用且为本领域中常见的。可变区

通常是指抗体的一部分,一般为轻链或重链的一部分,其通常为成熟重链的约氨基末端110至125个氨基酸和成熟轻链的约90至115个氨基酸,其在序列上在抗体之间广泛不同且用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列变异性集中在称作互补决定区(CDR)的区域中,而可变域中较高度保守的区域称作框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论所束缚,咸信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施方案中,可变区为人类可变区。在某些实施方案中,可变区包含啮齿类动物或鼠类CDR和人类框架区(FR)。在特定实施方案中,可变区为灵长类动物(例如非人类灵长类动物)可变区。在某些实施方案中,可变区包含啮齿类动物或鼠类CDR和灵长类动物(例如非人类灵长类动物)框架区(FR)。

[0109] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用以指抗体的轻链可变区。

[0110] 术语“VH”和“VH结构域”可互换使用以指抗体的重链可变区。

[0111] 术语“Kabat编号”和类似术语为本领域中公认且是指对抗体的重链和轻链可变区或其抗原结合部分的氨基酸残基进行编号的系统。在某些方面中,抗体的CDR可根据Kabat编号系统确定(参见例如Kabat EA和Wu TT(1971)Ann NY Acad Sci 190:382-391;和Kabat EA等人,(1991)《免疫学相关蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第五版,美国卫生和人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH出版号:91-3242)。使用Kabat编号系统,抗体重链分子的CDR通常存在于氨基酸位置31至35处,其视情况可在35后包括一或两个额外的氨基酸(在Kabat编号方案中称作35A和35B)(CDR1);氨基酸位置50至65处(CDR2);和氨基酸位置95至102处(CDR3)。使用Kabat编号系统,抗体轻链分子的CDR通常存在于氨基酸位置24至34处(CDR1);氨基酸位置50至56处(CDR2);和氨基酸位置89至97处(CDR3)。在一个特定实施方案中,本文所述的抗体的CDR已根据Kabat编号方案。

[0112] 如本文所用的术语“恒定区”或“恒定域”为可互换的且具有本领域中常见的含义。恒定区为抗体部分,例如轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合但可表现出各种效应功能,诸如与Fc受体相互作用。相对于免疫球蛋白可变域,免疫球蛋白分子的恒定区一般具有较保守的氨基酸序列。

[0113] 如本文所用的术语“重链”在用于提和抗体时可指基于恒定域的氨基酸序列的任何不同类型,例如 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ ,其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别的抗体,包括IgG的子类,例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>和IgG<sub>4</sub>。

[0114] 如本文所用的术语“轻链”在用于提及抗体时可指基于恒定域的氨基酸序列的任何不同类型,例如 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。轻链氨基酸序列为本领域中所熟知。在特定实施方案中,轻链为人类轻链。

[0115] 如本文所用的术语“EU编号系统”是指用于抗体的恒定区的EU编号惯例,如Edelman,G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969);和Kabat等人,《免疫学相关蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国卫生和人类服务部,第5版,1991中所述,所述文献各自以全文引用的方式并入本文中。

[0116] “结合亲和力”一般指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合伴(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用的“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其伴Y

的亲和力可一般由解离常数 ( $K_D$ ) 表示。亲和力可以本领域中熟知的许多方式量测和/或表示,包括(但不限于)平衡解离常数 ( $K_D$ ) 和平衡缔合常数 ( $K_A$ )。 $K_D$ 是由 $k_{\text{解离}}/k_{\text{缔合}}$  ( $K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$ ) 的商数计算,而 $K_A$ 是由 $k_{\text{缔合}}/k_{\text{解离}}$ 的商数计算。 $k_{\text{缔合}}$ 是指例如抗体与抗原的缔合速率常数,且 $k_{\text{解离}}$ 是指例如抗体与抗原的解离。 $k_{\text{缔合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$ 可通过一般技术者已知的技术(诸如BIAcore<sup>®</sup>或KinExA)测定。

[0117] 如本文所用的“保守氨基酸取代”为其中氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基所置换的氨基酸取代。具有侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。此等家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 $\beta$ -分支链侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在某些实施方案中,抗体的CDR内或框架区内的一或多个氨基酸残基可经具有类似侧链的氨基酸残基置换。

[0118] 如本文所用的“表位”为本领域中的术语且是指抗原的可由抗体特异性地结合的局部区域。表位可为例如多肽的连续氨基酸(线性或连续表位)或表位可例如自一个多肽或多个多肽的两个或多于两个非连续区域会合在一起(构形、非线性、不连续或非连续表位)。在某些实施方案中,与抗体结合的表位可通过例如NMR光谱学、X射线衍射结晶学研究、ELISA分析、氢/氘交换联同质谱分析(例如液相层析电喷雾质谱分析)、基于数组的寡肽扫描分析和/或突变诱发定位(例如定点突变诱发定位)确定。对于X射线结晶学,结晶可使用本领域已知方法中任一者来实现(例如Giegér等人,(1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4):339-350;McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE (1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可使用熟知的X射线衍射技术来研究且可使用计算机软件来精修,所述计算机软件诸如X-PLOR(耶鲁大学(Yale University),1992,由Molecular Simulations公司经销;参见例如Meth Enzymol (1985) 第114卷和第115卷,Wyckoff HW等人编;U.S. 2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60;Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423,Carter CW编;Roversi P等人 (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323)。突变诱发定位研究可使用本领域技术人员已知的任何方法来实现。参见例如Champe M等人,(1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394;以及Cunningham BC和Wells JA (1989) *Science* 244:1081-1085中对包括丙氨酸扫描突变诱发技术的突变诱发技术的描述。在一个特定实施方案中,抗体的表位是使用丙氨酸扫描突变诱发研究来确定。

[0119] 如本文所用的术语“免疫特异性地结合”、“免疫特异性识别”、“特异性地结合”和“特异性识别”在抗体的背景下为类似术语且是指结合抗原(例如表位或免疫复合物)的分子,因为其结合可由本领域技术人员所理解。举例而言,特异性地结合抗原的分子可一般以较低的亲和力结合其他肽或多肽,如通过例如免疫分析、BIAcore<sup>®</sup>、KinExA 3000仪器(爱达荷州波夕的Sapidyne Instruments公司)或本领域已知的其他分析所测定。在一个特定实施方案中,免疫特异性地结合抗原的分子结合抗原的 $K_A$ 比当分子非特异性地结合另一抗

原时的 $K_A$ 大至少2倍log、2.5倍log、3倍log、4倍log或大于4倍log。在多特异性(例如双特异性)抗体的背景下,术语“免疫特异性地结合”、“免疫特异性识别”、“特异性地结合”和“特异性识别”是指对多于一个抗原或对单个抗原上的多于一个表位具有不同特异性的抗体。举例而言,双特异性抗体可例如以不同的抗原结合域特异性地结合例如人类OX40和人类GITR中每一者。

[0120] 在另一个特定实施方案中,免疫特异性地结合抗原的抗原结合域在相似的结合条件下不与其他蛋白质交叉反应。在另一个特定实施方案中,免疫特异性地结合GITR抗原的抗原结合域不与其他非GITR蛋白质交叉反应。在另一个特定实施方案中,免疫特异性地结合OX40抗原的抗原结合域不与其他非OX40蛋白质交叉反应。在一个特定实施方案中,本发明提供一种含有抗原结合域的抗体,相较于对另一无关抗原的亲和力,所述抗原结合域以较高的亲和力结合GITR或OX40。在某些实施方案中,本发明提供一种含有抗原结合域的抗体,所述抗原结合域结合GITR或OX40(例如人类GITR或人类OX40)的亲和力比对另一无关抗原的亲和力高20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或高于95%,如通过例如放射免疫分析、表面等离子体共振或动力学排除分析所量测。在一个特定实施方案中,本文所述的抗GITR抗原结合域与无关非GITR蛋白质的结合程度小于抗原结合域与GITR蛋白质的结合的10%、15%或20%,如通过例如放射免疫分析所量测。在一个特定实施方案中,本文所述的抗OX40抗原结合域与无关非OX40蛋白质的结合程度小于抗原结合域与OX40蛋白质的结合的10%、15%或20%,如通过例如放射免疫分析所量测。

[0121] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种抗体,其含有结合人类GITR的亲和力高于对另一种GITR的亲合力的抗原结合域和/或结合人类OX40的亲和力高于对另一种OX40的亲合力的抗原结合域。在某些实施方案中,本发明提供含有抗原结合域的抗体,其抗原结合域结合人类GITR的亲和力比对另一种GITR的亲和力高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高于70%,如通过例如放射免疫分析、表面等离子体共振或动力学排除分析所量测;和/或结合人类OX40的亲和力比对另一种OX40的亲和力高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高于70%,如通过例如放射免疫分析、表面等离子体共振或动力学排除分析所量测。在一个特定实施方案中,本文所述的结合人类GITR和人类OX40的抗体与另一种GITR和/或OX40蛋白质的结合将小于所述抗体与人类GITR和/或OX40蛋白质的结合的10%、15%或20%,如通过例如放射免疫分析、表面等离子体共振或动力学排除分析所量测。

[0122] 如本文所用的术语“糖皮质激素诱导TNFR家族相关受体”或“GITR”或“GITR多肽”是指GITR,其包括(但不限于)天然GITR、GITR的同功型或GITR的种间GITR同源物。GITR亦称为活化诱导型TNFR家族受体(AITR)、GITR-D、CD357和肿瘤坏死因子受体超家族成员18(TNFRSF18)。GenBank™登录号BC152381和BC152386提供人类GITR核酸序列。Swiss-Prot登录号Q9Y5U5-1(TNR18\_HUMAN;SEQ ID NO:41)和GenBank™登录号NP\_004186提供同功型1的例示性人类GITR氨基酸序列。此氨基酸序列具有241个氨基酸的长度,前25个氨基酸残基编码信号序列。同功型1为I型膜蛋白。人类GITR的例示性成熟氨基酸序列以SEQ ID NO:40提供。相反地,同功型2为人类GITR的分泌形式且具有约255个氨基酸的长度。Swiss-Prot登录号Q9Y5U5-2和GenBank™登录号NP\_683699提供同功型2的例示性人类GITR氨基酸序列。人类

GITR的同功型3具有约234个氨基酸的长度。Swiss-Prot登录号Q9Y5U5-3和GenBank™登录号NP\_683700 (同功型3前驱体) 提供同功型3的例示性人类GITR氨基酸序列。在一个特定实施方案中,GITR为人类GITR。在另一个特定实施方案中,GITR为人类GITR同功型1 (SEQ ID NO: 41)。在某些实施方案中,GITR为人类同功型2 (SEQ ID NO:42) 或同功型3 (SEQ ID NO:43)。人类GITR是由Entrez Gene指定为GeneID:8784。SEQ ID NO:44提供石蟹猕猴GITR氨基酸序列,且SEQ ID NO:44的氨基酸26-234表示石蟹猕猴GITR的成熟形式。如本文所用的术语“人类GITR”是指包含多肽序列SEQ ID NO:40的GITR。

[0123] 如本文所用的术语“GITR配体”和“GITRL”是指糖皮质激素诱导TNFR相关蛋白配体。GITRL另外称为活化诱导TNF相关配体 (AITRL) 和肿瘤坏死因子配体超家族成员18 (TNFSF18)。GenBank™登录号AF125303提供例示性人类GITRL核酸序列。GenBank™登录号NP\_005083和Swiss-Prot登录号Q9UNG2提供例示性人类GITRL氨基酸序列。

[0124] 如本文所用的术语“OX40受体”或“OX40”或“OX40多肽”是指OX40,其包括(但不限于)天然OX40、OX40的同功型或OX40的种间OX40同源物。OX40亦称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (TNFRSF4)、ACT35、CD134、IMD16和TXGP1L。GenBank™登录号BC105070和BC105072提供人类OX40核酸序列。Refseq号NP\_003318.1提供人类OX40的氨基酸序列。人类OX40的未成熟氨基酸序列以SEQ ID NO:73提供。人类OX40的成熟氨基酸序列以SEQ ID NO:72提供。人类OX40由Entrez Gene指定为GeneID:7293。RefSeq号XM\_005545122.1和XP\_005545179.1分别提供预测的石蟹猕猴OX40核酸序列和氨基酸序列。亦已经报道人类OX40的可溶性同功型 (Taylor L等人,(2001) J Immunol Methods 255:67-72)。如本文所用的术语“人类OX40”是指包含多肽序列SEQ ID NO:72的OX40。

[0125] 如本文所用的术语“OX40配体”和“OX40L”是指肿瘤坏死因子配体超家族成员4 (TNFSF4)。OX40L另外称为CD252、GP34、TXGP1和CD134L。GenBank™登录号D90224.1和AK297932.1提供例示性人类OX40L核酸序列。RefSeq号NP\_003317.1和Swiss-Prot登录号P23510-1提供同功型1的例示性人类OX40L氨基酸序列。RefSeq号NP\_001284491.1和Swiss-Prot登录号P23510-2提供同功型2的例示性人类OX40L氨基酸序列。人类OX40L由Entrez Gene指定为GeneID:7292。

[0126] 如本文所用的术语“宿主细胞”可为任何类型的细胞,例如原生细胞、培养物中的细胞或来自细胞系的细胞。在特定实施方案中,术语“宿主细胞”是指经核酸分子转染的细胞和这样的细胞的子代或潜在子代。这样的细胞的子代未必与经核酸分子转染的母细胞相同,例如归因于可能在子代或核酸分子向宿主细胞基因组中的整合中出现的突变或环境影响。

[0127] 如本文所用的术语“有效量”在对个体授予治疗的背景下是指达成所需的预防或治疗作用的治疗量。

[0128] 如本文所用的术语“个体”和“患者”可互换使用。个体可为动物。在一些实施方案中,个体为哺乳动物,诸如非灵长类动物(例如牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如猴或人类),最佳为人类。在一些实施方案中,个体为石蟹猕猴。在某些实施方案中,这类术语是指非人类动物(例如非人类动物,诸如猪、马、牛、猫或狗)。在一些实施方案中,这类术语是指宠物或农畜。在特定实施方案中,这类术语是指人类。

[0129] 如本文所用,若测试抗体与第一抗原之间的结合相对于测试抗体与第二抗原之间



的结合减少至少30%、40%、50%、60%、70%或80%，则相对于测试抗体与第二抗原之间的结合，测试抗体与第一抗原之间的结合“实质上减弱”，如在例如流式细胞术分析中、或在既定实验中、或使用来自多次实验的平均值所量测，如通过例如包括下列步骤的分析所评定：(a) 使第一抗原或第二抗原在细胞（例如1624-5细胞）的表面上表达；(b) 在流式细胞术分析中使用例如2 $\mu$ g/ml的测试抗体或多克隆抗体对表达第一抗原或第二抗原的细胞进行染色且记录例如作为来自多于一次量测的平均值的平均荧光强度(MFI)值，其中多克隆抗体识别第一抗原和第二抗原两者；(c) 将测试抗体对表达第二抗原的细胞的MFI值除以多克隆抗体对表达第二抗原的细胞的MFI值(MFI比率<sub>2</sub>)；(d) 将测试抗体对表达第一抗原的细胞的MFI值除以多克隆抗体对表达第一抗原的细胞的MFI值(MFI比率<sub>1</sub>)；以及(e) 通过计算100% $\times$ (1-(MFI比率<sub>1</sub>/MFI比率<sub>2</sub>))来确定结合的减少百分比。

[0130] 亦可使用数学算法来确定两个序列（例如氨基酸序列或核酸序列）之间的“一致性百分比”。用于比较两个序列的数学算法的特定非限制性实例为Karlin S和Altschul SF (1990) PNAS 87:2264-2268的算法，其如在Karlin S和Altschul SF (1993) PNAS 90:5873-5877中所修改。所述算法并入Altschul SF等人，(1990) J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中。可进行BLAST核苷酸搜寻，其中NBLAST核苷酸程序参数设定为例如得分=100、字长=12以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可进行BLAST蛋白质搜寻，其中XBLAST程序参数设定为例如得分=50、字长=3以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的空位比对，可利用空位BLAST，如Altschul SF等人，(1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402中所述。或者，可使用PSI BLAST来进行重复搜寻，所述搜寻检测分子之间的远源关系（同上）。当利用BLAST、空位BLAST和PSI Blast程序时，可使用对应程序（例如XBLAST和NBLAST）的预设参数（参见例如全球信息网上的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI), ncbi.nlm.nih.gov)。用于比较序列的数学算法的另一特定非限制性实例为Myers和Miller, 1988, CABIOS 4:11-17的算法。所述算法并入作为GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(第2.0版)中。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时，可使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。

[0131] 两个序列之间的一致性百分比可使用类似于上文所述的技术，在允许或不允许空位的情况下确定。在计算一致性百分比时，通常仅对精确匹配进行计数。

#### [0132] 7.2结合GITR和/或OX40的多特异性抗体

[0133] 在一个特定方面中，本发明提供特异性地结合GITR和/或OX40（例如人类GITR和人类OX40）的多特异性抗体（例如双特异性抗体）。举例而言，本发明提供的多特异性（例如双特异性）抗体可包含结合OX40的第一抗原结合域、和第二抗原结合域。本发明提供的多特异性（例如双特异性）抗体亦可包含第一抗原结合域和结合GITR的第二抗原结合域。这些多特异性（例如双特异性）抗体亦可结合其他肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族蛋白质，例如与GITR和/或OX40共调节的蛋白质。与仅结合一种TNFR超家族蛋白质的单特异性二价抗体相比，此等多特异性抗体有利地对含有靶蛋白组合的某些免疫细胞子集显示出较大的特异性。

[0134] 举例而言，本发明提供抗体，其包含结合OX40的第一抗原结合域和结合肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族蛋白质（诸如GITR、OX40、CD137或DR3）的第二抗原结合域。在另一个

实施例中,本发明提供抗体,其包含结合TNFR超家族蛋白质(诸如GITR、OX40、CD137或DR3)的第一抗原结合域和结合GITR的第二抗原结合域。

[0135] 本发明亦提供多特异性(例如双特异性)抗体,其包含结合OX40的第一抗原结合域和结合GITR的第二抗原结合域。

[0136] 与例如结合GITR且含有相同的GITR抗原结合域的单特异性二价抗体相比和/或与结合OX40且含有相同的OX40抗原结合域的单特异性二价抗体相比,本发明提供的含有OX40抗原结合域和GITR抗原结合域的抗体可显示与表达GITR和OX40的细胞(例如T调节性细胞)增加的结合。

[0137] 相较于结合GITR且含有相同的GITR抗原结合域的单特异性二价抗体,本发明提供的含有OX40抗原结合域和GITR抗原结合域的抗体亦可显示与GITR阳性、OX40阴性细胞减少的结合(例如在低浓度下)。

[0138] 相较于结合OX40且含有相同的OX40抗原结合域的单特异性二价抗体,本发明提供的含有OX40抗原结合域和GITR抗原结合域的抗体亦可显示与GITR阴性、OX40阳性细胞减少的结合(例如在低浓度下)。

[0139] 在某些实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR和OX40的多特异性(例如双特异性)抗体可结合人类CD4+T细胞和人类CD8+T细胞。在某些实施方案中,本文所述的抗体结合人类CD4+细胞和石蟹猕猴CD4+T细胞。相较于与效应T细胞的结合,本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的抗体可显示与调节性T细胞增强的结合。在一些情况下,相较于与肿瘤内效应T细胞的结合,本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的抗体显示与肿瘤内调节性T细胞增强的结合。

[0140] 本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的多特异性(例如双特异性)抗体可抑制人类GITR配体与人类GITR结合和/或抑制人类OX40配体与人类OX40结合。

[0141] 在一种情况下,本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的抗体含有下表1的单列中所示的CDR组合。

[0142] 表1: 例示性抗GITR/OX40抗体的CDR序列\*

[0143]

GITR-结合序列 SEQ ID NO.						OX40-结合序列 SEQ ID NO.					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
7	10	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
8	11	3	15	5	17	47	48	49	50	51	52

[0144]

GITR-结合序列 SEQ ID NO.						OX40-结合序列 SEQ ID NO.					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
9	12	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
9	13	3	14	5	16	47	48	49	50	51	52
1	2	3	4	5	6	47	48	49	50	51	52
87	88	3	90	5	92	47	48	49	50	51	52
7	10	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
8	11	3	15	5	17	47	48	49	50	51	53
9	12	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
9	13	3	14	5	16	47	48	49	50	51	53
1	2	3	4	5	6	47	48	49	50	51	53
87	88	3	90	5	92	47	48	49	50	51	53

[0145] \*表1中的CDR是根据Kabat确定。

[0146] 在一种情况下,本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的抗体含有下表2的单列中所示的两个重链可变域和两个轻链可变域的组合。

[0147] 表2: 例示性抗GITR/OX40抗体的重链可变域 (VH) 及轻链可变域 (VL) 序列

GITR VH (SEQ ID NO:)	GITR VL (SEQ ID NO:)	OX40 VH (SEQ ID NO:)	OX40 VL (SEQ ID NO:)
18	19	54	55
20	21	54	55
22	23	54	55
24	23	54	55
25	26	54	55
18	19	54	56
20	21	54	56
22	23	54	56
24	23	54	56
25	26	54	56

[0148]

[0149] 在一种情况下,本发明提供的特异性地结合GITR和OX40的抗体含有下表3的单列中所示的两个重链和两个轻链的组合。

[0150] 表3: 例示性抗GITR/OX40DuoBody抗体的重链 (HC) 及轻链 (LC) 序列

[0151]

抗体	G1TR HC (SEQ ID NO:)	G1TR LC (SEQ ID NO:)	OX40 HC (SEQ ID NO:)	OX40 LC (SEQ ID NO:)
pab1876w (F405L) X pab2049w (K409R)	31	37	61	67

[0152]

抗体	GITR HC (SEQ ID NO:)	GITR LC (SEQ ID NO:)	OX40 HC (SEQ ID NO:)	OX40 LC (SEQ ID NO:)
pab1876w (F405L/N297A) X pab2049w (K409R/N297A)	32	37	62	67
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (K409R/L234F/L235E/D265A)	33	37	63	67
pab1876w (F405L) X pab1949w (K409R)	31	37	61	69
pab1876w (F405L/N297A) X pab1949w (K409R/N297A)	32	37	62	69
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (K409R/L234F/L235E/D265A)	33	37	63	69
pab1876w (K409R) X pab2049w (F405L)	34	37	64	67
pab1876w (K409R/N297A) X pab2049w (F405L/N297A)	35	37	65	67
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (F405L/L234F/L235E/D265A)	39	37	71	67
pab1876w (K409R) X pab1949w (F405L)	34	37	64	69
pab1876w (K409R/N297A) X pab1949w (F405L/N297A)	35	37	65	69
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (F405L/L234F/L235E/D265A)	39	37	71	69
pab1876w (F405L) X pab2049w (K409R) (不含重链末端赖氨酸)	76	37	120	67
pab1876w (F405L/N297A) X pab2049w (K409R/N297A) (不含重链 末端赖氨酸)	77	37	121	67
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (K409R/L234F/L235E/D265A) (不含 重链末端赖氨酸)	78	37	122	67
pab1876w (F405L) X pab1949w (K409R) (不含重链末端赖氨酸)	76	37	120	69
pab1876w (F405L/N297A) X pab1949w (K409R/N297A) (不含重链 末端赖氨酸)	77	37	121	69

[0153]

抗体	GITR HC (SEQ ID NO:)	GITR LC (SEQ ID NO:)	OX40 HC (SEQ ID NO:)	OX40 LC (SEQ ID NO:)
pab1876w (F405L/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (K409R/L234F/L235E/D265A) (不含 重链末端赖氨酸)	78	37	122	69
pab1876w (K409R) X pab2049w (F405L) (不含重链末端赖氨酸)	79	37	123	67
pab1876w (K409R/N297A) X pab2049w (F405L/N297A) (不含重链 末端赖氨酸)	80	37	124	67
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab2049w (F405L/L234F/L235E/D265A) (不含 重链末端赖氨酸)	82	37	83	67
pab1876w (K409R) X pab1949w (F405L) (不含重链末端赖氨酸)	79	37	123	69
pab1876w (K409R/N297A) X pab1949w (F405L/N297A) (不含重链 末端赖氨酸)	80	37	124	69
pab1876w (K409R/L234F/L235E/D265A) X pab1949w (F405L/L234F/L235E/D265A) (不含 重链末端赖氨酸)	82	37	83	69

[0154] 如本发明所提供的结合GITR和/或OX40的多特异性抗体,例如双特异性抗体,可通过以化学方式连接两种不同的单克隆抗体或通过使两种杂交瘤细胞系融合以产生杂交杂交瘤来制备。可使用的其他多价形式包括例如K $\lambda$ 体、dAb、双功能抗体、TandAb、纳米抗体、SMIP、DNL、股交换工程改造结构域体(SEED体)、亲和体、Fynomer、Kunitz结构域、Albu-dab、DART、DVD-Ig、Covx体、肽体、scFv-Ig、SVD-Ig、dAb-Ig、杆入白型抗体、DuoBody抗体和三功能抗体(triomAb)。例示性双特异性形式论述于Garber等人,Nature Reviews Drug Discovery 13:799-801(2014)中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0155] 本发明的例示性双特异性抗体分子包括(i)具有包含不同的抗原结合区的两个臂的单一抗体,其中一个臂对第一抗原(诸如OX40)具有特异性且一个臂对第二抗原(诸如GITR)具有特异性;(ii)具有对第一抗原(诸如OX40)具有特异性的一个抗原结合区或臂和对第二抗原(诸如GITR)具有特异性的第二抗原结合区或臂的单一抗体;(iii)具有对第一抗原(诸如OX40)的第一特异性和对第二抗原(诸如GITR)的第二特异性的单链抗体,例如经由通过额外的肽连接符串联连接的两个scFv;(iv)双可变域抗体(DVD-Ig),其中各轻链和重链含有经由短肽键串联的两个可变域(Wu等人,《双可变域免疫球蛋白(DVD-Ig.TM.)分子的产生和表征(Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig.TM.)Molecule)》,《抗体工程改造(Antibody Engineering)》,

Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) 化学连接的双特异性 (Fab')<sub>2</sub> 片段; (vi) Tandab, 其为两个单链双功能抗体的融合体, 从而产生对于靶抗原中的每一者具有两个结合位点的四价双特异性抗体; (vii) 可挠性体 (flexibody), 其为 scFv 与双功能抗体的组合, 从而产生多价分子; (viii) 基于蛋白激酶 A 中的“二聚化对接结构域 (docking domain)”的所谓的“对接和锁定 (dock and lock)”分子, 其在应用于 Fab 时可产生由连接至不同 Fab 片段的两个相同的 Fab 片段组成的三价双特异性地结合蛋白; (ix) 所谓的 Scorpion 分子, 其包含例如与人类 Fab 臂的两个末端融合的两个 scFv; 以及 (x) 双功能抗体。

[0156] 不同类别的双特异性抗体的实例包括 (但不限于) IgG 样分子, 其具有互补的 CH3 结构域以迫使异二聚化; 重组 IgG 样双重靶向分子, 其中分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的 Fab 片段或 Fab 片段的一部分; IgG 融合分子, 其中全长 IgG 抗体与额外的 Fab 片段或 Fab 片段的部分融合; Fc 融合分子, 其中单链 Fv 分子或稳定化的双功能抗体与重链恒定域、Fc 区或其部分融合; Fab 融合分子, 其中不同 Fab 片段融合于一起; 基于 ScFv 的抗体和基于双功能抗体的抗体以及重链抗体 (例如结构域抗体、纳米抗体), 其中不同的单链 Fv 分子或不同的双功能抗体或不同的重链抗体 (例如结构域抗体、纳米抗体) 彼此融合或与另一蛋白质或载体分子融合。

[0157] Fab 融合双特异性抗体的实例包括 (但不限于) F(ab)<sub>2</sub> (Medarex 公司/AMGEN 公司)、Dual-Action 或 Bis-Fab (Genentech 公司)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics 公司)、Bivalent Bispecific (Biotecol 公司) 以及 Fab-Fv (UCB-Celltech 公司)。基于 ScFv 的抗体、基于双功能抗体的抗体以及结构域抗体的实例包括 (但不限于) 双特异性 T 细胞接合剂 (Bispecific T Cell Engager) (BITE) (Micromet 公司)、串联双功能抗体 (Tandab) (Affimed 公司)、双亲和重靶向技术 (DART) (MacroGenics 公司)、单链双功能抗体 (Academic 公司)、TCR 样抗体 (AIT, ReceptorLogics 公司)、人血清白蛋白 ScFv 融合体 (Merrimack 公司) 以及 COMBODY (Epigen Biotech 公司)、双重靶向纳米抗体 (Ablynx 公司) 和双重靶向仅重链结构域抗体。

[0158] 在特定实施方案中, 多特异性 (例如双特异性) 抗体可为嵌合抗体或人类化抗体。在某些实施方案中, 多特异性 (例如双特异性) 抗体可为 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

[0159] 在某些实施方案中, 结合 GITR 和/或 OX40 的多特异性 (例如双特异性) 抗体为 DuoBody 抗体。

[0160] 在某些实施方案中, 如本文所述的结合 OX40 的第一抗原结合域包含人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区, 人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区包含 F405L 突变, 且如本文所述的结合 GITR 的第二抗原结合域包含人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区, 人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区包含 K409R 突变, 其是根据 EU 编号系统编号。

[0161] 在某些实施方案中, 如本文所述的结合 OX40 的第一抗原结合域包含人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区, 人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区包含 K409R 突变, 且如本文所述的结合 GITR 的第二抗原结合域包含人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区, 人类 IgG<sub>1</sub> 重链恒定区包含 F405L 突变, 其是根据 EU 编号系统编号。

[0162] 如本发明所提供者, 结合 GITR 和/或 OX40 的多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 可促效或拮抗 GITR 和/或 OX40 活性。促效 GITR 和/或 OX40 功能的抗体包括使 GITR 和/或 OX40 簇集的抗体。簇集可例如由于 Fc-Fc 受体 (FcR) 相互作用而产生。因此, 促效 GITR 和/或 OX40 的抗体包括具有增加的 Fc 受体结合的抗体。增加 Fc 受体结合的突变为本领域中所熟知且包括例如具有无海藻糖基化的 Fc 的抗体以及具有诸如 S267E/L328F (SELF 突变体) 和 S239D/

A330L/I332E的突变的抗体,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)促效剂抗体包含IgG2恒定区,IgG2恒定区含有C127S,其是根据Kabat编号。拮抗GITR和/或OX40功能的抗体包括具有减少的Fc受体结合的抗体。减少Fc受体结合的突变为本领域中所熟知且包括例如N297A;N297Q;D265A;L234F/L235E;L234F/L235E/N297Q;L234F/L235E/P331S;D265A/N297Q;和L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)拮抗剂抗体包含IgG1恒定区,IgG1恒定区含有N297A,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)拮抗剂抗体包含IgG1恒定区,IgG1恒定区含有N297Q,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)拮抗剂抗体包含IgG1恒定区,IgG1恒定区含有D265A,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)拮抗剂抗体包含IgG1恒定区,IgG1恒定区含有L234F/L235E/D265A,其是根据EU编号系统编号。在一些实施方案中,结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)拮抗剂抗体包含IgG1恒定区,IgG1恒定区含有选自由D265A、P329A和其组合组成的群组的突变,其是根据EU编号系统编号。

[0163] 在一些实施方案中,将一个、两个或多于两个突变(例如氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如CH2结构域(人类IgG<sub>1</sub>的残基231至340)和/或CH3结构域(人类IgG<sub>1</sub>的残基341至447)和/或铰链区)中(其是根据EU编号系统编号)以例如增加或减少抗体对效应细胞的表面上的Fc受体(例如活化的Fc受体)的亲合力。抗体的Fc区中减少或增加抗体对Fc受体的亲和力的突变和将此等突变引入至Fc受体或其片段中的技术为本领域技术人员所熟知。抗体的Fc受体可进行改变抗体对Fc受体的亲和力的突变的实例描述于例如Smith P等人,(2012)PNAS 109:6181-6186;美国专利第6,737,056号;和国际公布第WO 02/060919号;第WO 98/23289号;和第WO 97/34631号中,其以引用的方式并入本文中。

[0164] 在一个特定实施方案中,将一个、两个或多于两个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)引入IgG恒定域或其FcRn结合片段(较佳Fc或铰链-Fc结构域片段)以改变(例如缩短或延长)抗体在活体内的半衰期。参见例如国际公布第WO 02/060919号;第WO 98/23289号;和第WO 97/34631号;以及美国专利第5,869,046号、第6,121,022号、第6,277,375号和第6,165,745号中例如将改变(例如缩短或延长)抗体在活体内的半衰期的突变。在一些实施方案中,将一个、两个或多于两个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)引入IgG恒定域或其FcRn结合片段(较佳Fc或铰链-Fc结构域片段)以缩短抗体在活体内的半衰期。在其他实施方案中,将一个、两个或多于两个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)引入IgG恒定域或其FcRn结合片段(较佳Fc或铰链-Fc结构域片段)以延长抗体在活体内的半衰期。在一个特定实施方案中,抗体可在第二恒定(CH2)域(人类IgG<sub>1</sub>的残基231至340)和/或第三恒定(CH3)域(人类IgG<sub>1</sub>的残基341至447)中具有一或多个氨基酸突变(例如取代),其是根据EU编号系统编号。在一个特定实施方案中,本文所述的抗体的IgG<sub>1</sub>的恒定区包含位置252处甲硫氨酸(M)经酪氨酸(Y)的取代、位置254处丝氨酸(S)经苏氨酸(T)的取代和位置256处苏氨酸(T)经谷氨酸(E)的取代,其是根据EU编号系统编号。参见美国专利第7,658,921号,其以引用的方式并入本文中。已显示称为“YTE突变体”的此类型的突变型IgG显示出半衰期延长至相同抗体的野生型型的四倍(参见Dall'Acqua WF等人,(2006)J Biol Chem 281:23514-24)。在某些实



实施方案中,抗体包含IgG恒定域,IgG恒定域包含位置251至257、285至290、308至314、385至389和428至436处氨基酸残基的一个、两个、三个或多于三个氨基酸取代,其是根据EU编号系统编号。

[0165] 在另一个实施方案中,将一个、两个或多于两个氨基酸取代引入IgG恒定域Fc区中以改变抗体的效应功能。举例而言,选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的一或多个氨基酸(其是根据EU编号系统编号)可经不同氨基酸残基置换以使得抗体具有改变的对效应配体的亲和力但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应配体可为例如Fc受体或补体的C1组分。此方法进一步详细描述于美国专利第5,624,821号和第5,648,260号中。在一些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(经由点突变或其他方式)可减少循环抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。参见例如美国专利第5,585,097号和第8,591,886号中对使恒定域缺失或失活且从而增加肿瘤定位的突变的描述。在某些实施方案中,可将一或多个氨基酸取代引入本文所述的抗体的Fc区中以移除Fc区上潜在的糖基化位点,此可减少Fc受体结合(参见例如Shields RL等人,(2001) J Biol Chem 276:6591-604)。在各种实施方案中,可进行本文所述的抗体的恒定区中下列突变中的一或多个者:N297A取代;N297Q取代;L235A取代和L237A取代;L234A取代和L235A取代;E233P取代;L234V取代;L235A取代;C236缺失;P238A取代;D265A取代;A327Q取代;或P329A取代,其是根据EU编号系统编号。

[0166] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗体包含具有N297Q或N297A氨基酸取代的IgG<sub>1</sub>恒定域,其是根据EU编号系统编号。

[0167] 在某些实施方案中,本文所述的抗体的恒定区中选自氨基酸残基329、331和322的一或多个氨基酸(其是根据EU编号系统编号)可经不同氨基酸残基置换以使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法进一步详细描述于美国专利第6,194,551号(Idsogie等人)中。在一些实施方案中,使本文所述的抗体的CH2结构域的N末端区域中氨基酸位置231至238内的一或多个氨基酸残基改变,从而改变抗体固定补体的能力。此方法进一步描述于国际公布第W0 94/29351号中。在某些实施方案中,通过使下列位置处的一或多个氨基酸突变(例如引入氨基酸取代)来修饰本文所述的抗体的Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc $\gamma$ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,其是根据EU编号系统编号。此方法进一步描述于国际公布第W0 00/42072号中。

[0168] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含在位置267、328或其组合处具有突变(例如取代)的IgG<sub>1</sub>恒定域,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,本文所述的抗体包含具有选自由S267E、L328F和其组合组成的群组的突变(例如取代)的IgG<sub>1</sub>恒定域,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,本文所述的抗体包含具有S267E/L328F突变(例如取代)的IgG<sub>1</sub>恒定域,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,本文所述的包含具有S267E/L328F突变(例如取代)的IgG<sub>1</sub>恒定域的抗体具有增加的对Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB或Fc $\gamma$ RIIA和Fc $\gamma$ RIIB的结合亲和力,其是根据EU编号系统编号。

[0169] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含IgG<sub>4</sub>抗体的恒定区,且重链的氨基酸残基228处的丝氨酸(其是根据EU编号系统编号)经脯氨酸取代。

[0170] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含IgG<sub>2</sub>抗体的恒定区且重链的氨基酸残基127处的半胱氨酸(其是根据Kabat编号)经丝氨酸取代。

[0171] 已经报道具有降低的海藻糖含量的抗体具有增加的对Fc受体(诸如Fc $\gamma$ RIIIa)的亲和力。因此,在某些实施方案中,本文所述的抗体具有降低的海藻糖含量或无海藻糖含量。这类抗体可使用本领域技术人员熟知的技术产生。举例而言,可使抗体在海藻糖基化的能力有缺陷或缺乏海藻糖基化的能力的细胞中表达。在一个特定实施例中,可使用具有 $\alpha$ 1,6-海藻糖基转移酶的两个等位基因的基因剔除的细胞系产生具有降低的海藻糖含量的抗体。Potelligent<sup>®</sup>系统(Lonza公司)为此种可用于产生具有降低的海藻糖含量的抗体的系统的实例。或者,具有降低的海藻糖含量或无海藻糖含量的抗体可通过例如以下来产生:(i)在防止或减少海藻糖基化的条件下培养细胞;(ii)翻译后移除海藻糖(例如用海藻糖苷酶);(iii)例如在重组表达非糖基化糖蛋白之后,翻译后添加所需的碳水化合物;或(iv)纯化糖蛋白以选择其未海藻糖基化的抗体。参见例如Longmore GD和Schachter H(1982) Carbohydr Res 100:365-92;和Imai-Nishiya H等人,(2007) BMC Biotechnol.7:84中用于产生其无海藻糖含量或具有降低的海藻糖含量的抗体的方法。

[0172] 工程改造的糖型(glycoform)可用于多种目的,其包括(但不限于)增强或降低效应功能。用于产生本文所述的抗体的工程改造的糖型的方法包括(但不限于)例如以下文献中所揭示的方法:Umaña P等人,(1999) Nat Biotechnol 17:176-180;Davies J等人,(2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields RL等人,(2002) J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa T等人,(2003) J Biol Chem 278:3466-3473;Niwa R等人,(2004) Clin Cancer Res 1:6248-6255;Presta LG等人,(2002) Biochem Soc Trans 30:487-490;Kanda Y等人,(2007) Glycobiology 17:104-118;美国专利第6,602,684号;第6,946,292号;和第7,214,775号;美国专利公布第US 2007/0248600号;第2007/0178551号;第2008/0060092号;和第2006/0253928号;国际公布第W0 00/61739号;第W0 01/292246号;第W0 02/311140号;和第W0 02/30954号;Potillegent<sup>™</sup>技术(新泽西州普林斯顿的Biowa公司);和GlycoMAb<sup>®</sup>糖基化工程改造技术(瑞士苏黎世的Glycart biotechnology AG公司)。亦参见例如Ferrara C等人,(2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861;国际公布第W0 07/039818号;第W0 12/130831号;第W0 99/054342号;第W0 03/011878号;和第W0 04/065540号。

[0173] 在某些实施方案中,用于工程改造本文所述的抗体的Fc结构域的技术为Xencor公司(加利福尼亚州的蒙罗维亚(Monrovia,CA))的Xmab<sup>®</sup>技术。参见例如美国专利第8,367,805号;第8,039,592号;第8,124,731号;第8,188,231号;美国专利公布第2006/0235208号;国际公布第W0 05/077981号;第W0 11/097527号;和Richards JO等人,(2008) Mol Cancer Ther 7:2517-2527。

[0174] 在某些实施方案中,本文所述的抗体的恒定区中对应于人类IgG1重链中的位置L234、L235和D265的位置处的氨基酸残基(其是根据EU编号系统编号)分别不为L、L和D。此方法详细描述于国际公布第W0 14/108483号中。在一个特定实施方案中,对应于人类IgG1重链中的位置L234、L235和D265的氨基酸分别为F、E和A;或A、A和A,其是根据EU编号系统编

号。

[0175] 在某些实施方案中,将一个、两个或多于两个突变(例如氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如CH2结构域(人类IgG1的残基231至340)和/或CH3结构域(人类IgG1的残基341至447)和/或铰链区)中(其是根据EU编号系统编号)以例如改变抗体的一或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0176] 在某些实施方案中,将一个、两个或多于两个突变(例如氨基酸取代)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中以使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变(例如增加或减少),如例如美国专利第5,677,425号中所述。可以改变CH1结构域的铰链区中半胱氨酸残基的数目以例如促成轻链和重链的组装或改变(例如增加或降低)抗体的稳定性。

[0177] 在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR或OX40的抗体)的情况下的GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性,免疫特异性地结合GITR和OX40(例如人类GITR和OX40)的多特异性(例如双特异性)抗体使GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性增加至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。举例而言,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR或OX40的抗体)的情况下的GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性,结合GITR和OX40的抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的抗体可使GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性的非限制性实例可包括GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)信号传导、细胞增殖、细胞存活和细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13)。

[0178] 如本发明所提供者,结合GITR和/或OX40的多特异性抗体(例如双特异性抗体)可促效GITR和/或OX40功能,例如通过在SEA分析中刺激IL-2释放,例如如下文实施例所例示者。举例而言,在例如37°C、5%CO<sub>2</sub>和97%湿度下刺激例如5天时,结合GITR和OX40的抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如100ng/ml)组合诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电致化学发光所量测。在一些实施方案中,IL-2产生为在以下范围内抗体浓度的实质上递增函数:例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml。在某些实施方案中,结合GITR和OX40的抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)组合诱

导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2产生为在以下范围内抗体浓度的实质上递增函数:例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml,如例如在包括下列步骤的分析中所评定:(a)在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>和97%湿度下,在不存在或存在不同浓度(例如20 $\mu$ g/ml、46.7 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml和0.08 $\mu$ g/ml)的抗体和例如100ng/ml的SEA的情况下将PBMC(例如每孔中10<sup>5</sup>个细胞)培养例如5天;以及(b)收集澄清的上清液且通过例如电致化学发光量测IL-2的效价。

[0179] 在某些实施方案中,在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>及97%湿度下刺激例如5天时,结合GITR及OX40的抗体,例如结合GITR及OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH及/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH及/或VL序列、或本文所指定的重链及/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如100ng/ml)组合诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电致化学发光所量测。在一些实施方案中,当抗体为例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml时,IL-2产生显示S形剂量反应曲线。在某些实施方案中,结合GITR及OX40的抗体,例如结合GITR及OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH及/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH及/或VL序列、或本文所指定的重链及/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)组合诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中当抗体为例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml时,IL-2产生显示S形剂量反应曲线,如例如在包括下列步骤的分析中所评定:(a)在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>及97%湿度下,在不存在或存在不同浓度(例如20 $\mu$ g/ml、6.7 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml及0.08 $\mu$ g/ml)的抗体及例如100ng/ml的SEA的情况下将PBMC(例如每孔中10<sup>5</sup>个细胞)培养例如5天;以及(b)收集澄清的上清液且通过例如电致化学发光量测IL-2的效价。在某些实施方案中,在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>和97%湿度下刺激例如5天时,结合GITR和OX40的抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如100ng/ml)组合诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电致化学发光所量测,其中IL-2产生为在以下范围内抗体浓度的实质上递增函数:例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml。在某些实施方案中,结合GITR和OX40的抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的抗体可与葡萄球菌肠毒素A(SEA)组合诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2产生为在以下范围内抗体浓度的实质上递增函数:例如0.08 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml或6.7 $\mu$ g/ml至20 $\mu$ g/ml,如例如在包括下列步骤的分析中所评定:(a)在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>和97%湿度下,在不存在或存在不同浓度(例如20 $\mu$ g/ml、6.7 $\mu$ g/ml、2.2 $\mu$ g/ml、0.74 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml和0.08 $\mu$ g/ml)的抗体和例如100ng/ml的SEA的情况下将PBMC(例如每孔中10<sup>5</sup>个细胞)培养例如5天;以

及(b)收集澄清的上清液且通过例如电致化学发光量测IL-2的效价。

[0180] 在一个特定方面中,本发明提供免疫特异性地结合GITR和OX40(例如人类GITR和OX40)的多特异性(例如双特异性)拮抗性抗体。

[0181] 在一个特定方面中,如本文所述的免疫特异性地结合GITR和OX40(例如人类GITR和OX40)的多特异性(例如双特异性)抗体包含人类免疫球蛋白IgG<sub>1</sub>重链恒定区,其中IgG<sub>1</sub>重链恒定区的氨基酸序列包含选自由以下组成的群组的突变:N297A、D265A、L234F、L235E、N297Q和P331S,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为N297A或D265A,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为L234F和L235E,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为L234F、L234E和D265A,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为L234F、L234E和N297Q,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为L234F、L235E和P331S,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为D265A和N297Q,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,突变为L234F、L235E、D265A、N297Q和P331S,其是根据EU编号系统编号。在一个特定方面中,如本文所述的免疫特异性地结合GITR和OX40(例如人类GITR和OX40)的多特异性(例如双特异性)抗体包含人类免疫球蛋白IgG<sub>1</sub>重链恒定区,其中IgG<sub>1</sub>重链恒定区的氨基酸序列包含选自由D265A、P329A和其组合组成的群组的突变,其是根据EU编号系统编号。在某些实施方案中,所述抗体具有拮抗性。

[0182] 在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR或OX40的抗体)的情况下的GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性,本文所述的免疫特异性地结合GITR和OX40(例如人类GITR和OX40)的拮抗剂多特异性(例如双特异性)抗体使GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性降低至少约1.2、1.3、1.4、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR或OX40的抗体)的情况下的GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性,本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的拮抗剂多特异性(例如双特异性)抗体使GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)活性的非限制性实例可包括GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)信号传导、细胞增殖、细胞存活和细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13)。在特定实施方案中,如下文实施例中所述来评定GITR和/或OX40活性。

[0183] 如本发明所提供者,结合GITR和/或OX40的拮抗剂多特异性抗体(例如双特异性抗体)可拮抗GITR和/或OX40功能,例如通过中和GITRL诱导的信号传导,例如如下文实施例中所示者。举例而言,结合GITR和OX40的拮抗剂抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的拮抗剂抗体可中和GITRL诱导的信号传导,如通过例如荧光素酶分析所量测。在某些实施方案中,结合GITR和OX40的拮抗剂抗体,例如结合GITR和OX40且包含本文所指定的CDR序列的组合、与本文所指定的VH和/或VL序列具有至少70%、

至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的VH和/或VL序列、或本文所指定的重链和/或轻链的拮抗剂抗体可中和GITRL诱导的信号传导,如例如在包括下列步骤的荧光素酶分析中所评定:(a)在37°C和5%CO<sub>2</sub>下在补充10%热灭活FBS的RPMI培养基中,在不存在或存在不同浓度的抗体(例如12点剂量滴定,0.05ng/ml至10,000ng/ml)和三聚体GITRL的情况下,将Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶细胞培养2小时;以及(b)检测荧光素酶活性。

[0184] 在某些实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗剂多特异性抗体(例如双特异性抗体)阻断GITR和/或OX40与GITRL和/或OX40L的相互作用(例如阻断GITRL与GITR和/或OX40L与OX40彼此结合)。在某些实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗剂多特异性抗体(例如双特异性抗体)降低由GITRL和/或OX40L诱导的GITR和/或OX40活性(例如GITR和/或OX40信号传导)。在某些实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗剂多特异性抗体(例如双特异性抗体)抑制T细胞增殖。在某些实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗剂多特异性抗体(例如双特异性抗体)抑制细胞激素(例如IL-2、TNFα、IFNγ、IL-4、IL-10、IL-13或其组合)的产生。

[0185] 本发明提供的结合GITR和/或OX40的抗体可融合或结合(例如共价或非共价连接)可检测标记或物质。所述可检测标记或物质的实例包括酶标记,诸如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(<sup>125</sup>I、<sup>121</sup>I)、碳(<sup>14</sup>C)、硫(<sup>35</sup>S)、氚(<sup>3</sup>H)、铟(<sup>121</sup>In)和锝(<sup>99</sup>Tc);发光标记,诸如鲁米诺(lumino1);和荧光标记,诸如荧光素和若丹明(rhodamine);以及生物素。此等标记的抗体可用于检测OX40(例如人类OX40)蛋白质。参见例如下文的章节7.5.2。

[0186] 7.2.1OX40抗原结合域

[0187] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的OX40抗原结合域包含轻链可变区(VL),轻链可变区包含如表4中所示:

[0188] (a) VL CDR1,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列RSSQSLLHNSNGYNYLD (SEQ ID NO:50);

[0189] (b) VL CDR2,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列LGSNRAS (SEQ ID NO:51);以及

[0190] (c) VL CDR3,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列MQALQTPLT (SEQ ID NO:52)或MQALQTPLT (SEQ ID NO:53)。

[0191] 在一些实施方案中,OX40抗原结合域包含本文所述的VL框架区。

[0192] 在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链可变区(VH),重链可变区包含如表4中所示:

[0193] (a) VH CDR1,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:47);

[0194] (b) VH CDR2,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:48);以及

[0195] (c) VH CDR3,其包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49)。

[0196] 在一些实施方案中,OX40抗原结合域包含本文所述的VH框架。在特定实施方案中,OX40抗原结合域包含本文所述的抗体的VH框架区。

[0197] 表4. 抗OX40抗体的VL CDR氨基酸序列\*

[0198]

抗体	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
pab1949w	RSSQSLLHSNGYNYLD (50)	LGSNRAS (51)	MQALQTPLT (53)
pab2049w	RSSQSLLHSNGYNYLD (50)	LGSNRAS (51)	MQGSKWPLT (52)

[0199] \*表4中的VL CDR是根据Kabat确定。

[0200] 表5. 抗OX40抗体的VH CDR氨基酸序列\*

[0201]

抗体	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
pab1949w	GSAMH (47)	RIRSKANSYATAYAASVKG (48)	GIYDSSGYDY (49)
pab2049w	GSAMH (47)	RIRSKANSYATAYAASVKG (48)	GIYDSSGYDY (49)

[0202] \*表5中的VH CDR是根据Kabat确定。

[0203] 在某些实施方案中,本发明提供一种抗原结合域,其特异性地结合OX40(例如人类OX40)且包含pab1949w或pab2049w的轻链可变区(VL)CDR和重链可变区(VH)CDR,例如如表4和5中所示出(即SEQ ID NO:47至52或SEQ ID NO:47至51和53)。

[0204] 在某些实施方案中,OX40抗原结合域包含源自于人类IGKV2-28种系序列的轻链可变框架区(例如IGKV2-28\*01,其例如具有氨基酸序列SEQ ID NO:58)。

[0205] 在某些实施方案中,OX40抗原结合域包含源自于人类IGHV3-73种系序列的重链可变框架区(例如IGHV3-73\*01,其例如具有氨基酸序列SEQ ID NO:57)。

[0206] 在一个特定实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VL结构域,VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:55或56。在一个特定实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VL结构域,VL结构域由氨基酸序列SEQ ID NO:55或56组成或基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:55或56组成。

[0207] 在某些实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VH结构域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:54。在一些实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VH结构域,VH结构域由氨基酸序列SEQ ID NO:54组成或基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:54组成。

[0208] 在某些实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VH结构域和VL结构域,其中VH结构域和VL结构域分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55或56。在某些实施方案中,特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VH结构域和VL结构域,其中VH结构域和VL结构域分别由氨基酸序列SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55或56组成或基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55或56组成,例如如表6中所示。

[0209] 表6. 例示性抗OX40抗体的VH和VL序列

[0210]

抗体	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
pab2049w	54	55

pab1949w	54	56
----------	----	----

[0211] 在特定方面中,本发明提供一种抗原结合域,其包含轻链和重链,例如各别轻链和重链。对于轻链,在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为 $\kappa$ 轻链。在另一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为 $\lambda$ 轻链。在另一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为人类 $\kappa$ 轻链或人类 $\lambda$ 轻链。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40多肽(例如人类OX40)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:55或56中示出的序列,且其中轻链的恒定区包含人类 $\kappa$ 轻链恒定区的氨基酸序列。在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:55或56中示出的序列,且其中轻链的恒定区包含人类 $\lambda$ 轻链恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:55或56中示出的序列,且其中轻链的恒定区包含人类 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链恒定区的氨基酸序列。人类恒定区序列的非限制性实例在本领域中已被描述,例如参见美国专利第5,693,780号和Kabat EA等人(1991)(同上)。

[0212] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含轻链,其包含在SEQ ID NO:67或69中示出的氨基酸序列。

[0213] 对于重链,在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的重链可为 $\alpha$ 重链、 $\delta$ 重链、 $\epsilon$ 重链、 $\gamma$ 重链或 $\mu$ 重链。在另一个特定实施方案中,所述的抗原结合域的重链可包含人类 $\alpha$ 重链、 $\delta$ 重链、 $\epsilon$ 重链、 $\gamma$ 重链或 $\mu$ 重链。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其中VH结构域的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:54中示出的序列且其中重链的恒定区包含人类 $\gamma$ 重链恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其中VH结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:54中示出的序列,且其中重链的恒定区包含本文所述或本领域已熟知的人类重链的氨基酸。人类恒定区序列的非限制性实例在本领域中已被描述,例如参见美国专利第5,693,780号和Kabat EA等人(1991)(同上)。

[0214] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,重链包含在SEQ ID NO:61中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,重链包含在SEQ ID NO:62中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其包含在SEQ ID NO:63中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其包含在SEQ ID NO:64中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其包含在SEQ ID NO:65中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含重链,其包含在SEQ ID NO:71中示出的氨基酸序列。

[0215] 在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、或人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在另一个特定实施方案中,本文所



述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>) 或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>和IgG<sub>2b</sub>) 的免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,恒定区包含人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>) 或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>和IgG<sub>2b</sub>) 的免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。

[0216] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含人类IgG<sub>1</sub> (例如同种异型G1m3、G1m17,1或G1m17,1,2)、人类IgG<sub>2</sub>或人类IgG<sub>4</sub>的恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含人类IgG<sub>1</sub> (同种异型G1m3) 的恒定区的氨基酸序列。人类恒定区的非限制性实例在本领域中被描述,例如参见Kabat EA等人(1991) (同上)。

[0217] 在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含轻链和重链,轻链包含在SEQ ID NO:67中示出的氨基酸序列且重链包含在SEQ ID NO:61、62、63、64、65或71中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含轻链和重链,轻链包含在SEQ ID NO:69中示出的氨基酸序列且重链包含在SEQ ID NO:61、62、63、64、65或71中示出的氨基酸序列。

[0218] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含与pab1949w或pab2049w的VL结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:55或56) 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VL结构域,例如其中抗原结合域包含与pab1949w或pab2049w的VL CDR相同的VL CDR。

[0219] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含与pab1949w或pab2049w的VH结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:54) 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,例如其中抗原结合域包含与pab1949w或pab2049w的VH CDR相同的VH CDR。

[0220] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40 (例如人类OX40) 的抗原结合域包含:(i) 与pab1949w或pab2049w的VL结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:55或56) 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii) 与pab1949w或pab2049w的VH结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:54) 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,例如其中抗体包含与pab1949w或pab2049w的VL CDR和VH CDR相同的VL CDR和VH CDR。

[0221] 在特定方面中,本发明提供一种抗原结合域,其与包含具有在SEQ ID NO:55或56中示出的氨基酸序列的VL结构域和具有在SEQ ID NO:54中示出的氨基酸序列的VH结构域的抗原结合域竞争(例如以剂量依赖性方式) 特异性地结合OX40 (例如人类OX40)。

[0222] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域为被与OX40 (例如人类OX40) 的特异性地结合由包含具有在SEQ ID NO:55或56中示出的氨基酸序列的VL结构域和具有在SEQ

ID NO:54中示出的氨基酸序列的VH结构域的抗原结合域竞争性阻断(例如以剂量依赖性方式)的抗原结合域。

[0223] 可使用本领域技术人员已知或本文所述的分析(例如X射线结晶学、氢/氘交换联同质谱分析(例如液相层析电喷雾质谱分析)、丙氨酸扫描、ELISA分析等)以确定两种抗体是否结合相同的表位。

[0224] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域免疫特异性地结合与由pab1949w或pab2049w所结合的表位相同的表位或与所述表位重迭的表位。

[0225] 在一个特定方面中,相对于本文所述的抗原结合域与SEQ ID NO:72的人类OX40序列之间的结合,抗原结合域与变异型OX40之间的结合实质上减弱,其中除了氨基酸突变(例如取代)之外,变异型OX40包含SEQ ID NO:72的序列,氨基酸突变选自自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A和其组合,或选自自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A和P93A,其是根据SEQ ID NO:72编号。

[0226] 在一些实施方案中,变异型OX40包含SEQ ID NO:72的序列,除了选自自由以下组成的群组中的任一个突变之外:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A,或选自自由以下组成的群组中的任一个突变之外:N60A、R62A、R80A、L88A和P93A,其是根据SEQ ID NO:72编号。在一些实施方案中,变异型OX40包含SEQ ID NO:72的序列,除了选自自由以下组成的群组中的任两个、三个、四个、五个、六个或七个突变之外:W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A,或选自自由以下组成的群组中的任两个、三个、四个、五个、六个或七个突变之外:N60A、R62A、R80A、L88A和P93A,其是根据SEQ ID NO:72编号。在一些实施方案中,除了氨基酸突变W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A之外或除了氨基酸突变N60A、R62A、R80A、L88A和P93A之外,变异型OX40包含SEQ ID NO:72的序列,其编号是根据SEQ ID NO:72。

[0227] 在一个特定方面中,本文所述的抗原结合域结合人类OX40序列的表位,所述表位包含SEQ ID NO:72的残基、基本上由SEQ ID NO:72的残基组成或由SEQ ID NO:72的残基组成,所述残基选自自由以下组成的群组:58、60、62、80、88、93、99、115和其组合,或选自自由以下组成的群组:60、62、80、88、93和其组合。在一些实施方案中,所述表位包含任一个残基、或任何两个、三个、四个、五个、六个或七个残基;由任一个残基、或任何两个、三个、四个、五个、六个或七个残基组成;或基本上由任一个残基、或任何两个、三个、四个、五个、六个或七个残基组成,所述残基选自自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的58、60、62、80、88、93、99和115,或选自自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的60、62、80、88和93。在一些实施方案中,所述表位包含以下残基、基本上由以下残基组成或由以下残基组成:SEQ ID NO:72的残基58、60、62、80、88、93、99和115;或包含SEQ ID NO:72的残基60、62、80、88和93。

[0228] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域结合SEQ ID NO:72的表位,所述表位包含以下残基、基本上由以下残基组成或由以下残基组成,所述残基选自自由以下组成的群组:58、60、62、80、88、93、99、115和其组合;或SEQ ID NO:72的表位,所述表位包含以下残基、基本上由以下残基组成或由以下残基组成,所述残基选自自由以下组成的群组:60、62、80、88、93和其组合。在一些实施方案中,所述表位包含任一个残基、或任何两个、三个、四个、五个、六个或七个残基,所述残基选自自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的58、60、62、80、88、93、99和115,或选自自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的60、62、80、88和93。在一些

实施方案中,所述表位包含以下残基、由以下残基组成或基本上由以下残基组成:SEQ ID NO:72的残基58、60、62、80、88、93、99和115,或包含SEQ ID NO:72的残基60、62、80、88和93。

[0229] 在一个特定方面中,本文所述的抗原结合域结合SEQ ID NO:72的至少一个残基,所述残基选自由以下组成的群组:58、60、62、80、88、93、99、115和其组合,或选自由以下组成的群组:60、62、80、88、93和其组合。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合域结合任一个残基、或任何两个、三个、四个、五个、六个或七个残基,所述残基选自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的58、60、62、80、88、93、99和115,或选自由以下组成的群组:SEQ ID NO:72的60、62、80、88和93。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合域结合SEQ ID NO:72的残基58、60、62、80、88、93、99和115。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合域结合SEQ ID NO:72的残基60、62、80、88和93。

[0230] 在一个特定方面中,相较于与SEQ ID NO:72的人类OX40序列的结合,本文所述的抗原结合域表达与SEQ ID NO:72相同但存在氨基酸突变(例如取代)的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸突变选自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A和其组合,或选自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A和其组合,其是根据SEQ ID NO:72。在一些实施方案中,除存在氨基酸突变之外,所述蛋白质与SEQ ID NO:72相同,所述氨基酸突变包括任一个突变,所述突变选自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A,或选自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A和P93A,其是根据SEQ ID NO:72编号。在一些实施方案中,除存在任何两个、三个、四个、五个、六个或七个突变之外,所述蛋白质与SEQ ID NO:72相同,所述突变选自由以下组成的群组:W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A,或选自由以下组成的群组:N60A、R62A、R80A、L88A和P93A,其是根据SEQ ID NO:72编号。在一些实施方案中,除存在氨基酸取代W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A和P115A之外或除存在氨基酸取代N60A、R62A、R80A、L88A和P93A之外,所述蛋白质与SEQ ID NO:72相同,其编号是根据SEQ ID NO:72。

[0231] 在某些实施方案中,本文所述的抗原结合域的表位用作免疫原以产生抗体。参见例如下文章节7.3中用于产生抗体的方法。

[0232] 在特定方面中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时用作促效剂。

[0233] 在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如人类OX40)活性,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时使OX40(例如人类OX40)活性增加至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如人类OX40)活性,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时使OX40(例如人类OX40)活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述和/或本领域技术人员所熟知的方法评定。OX40(例如人类OX40)活性的非限制性实例可包括OX40(例如人类OX40)信号传导、细胞增殖、细胞存活和

细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13)。在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合OX40(例如人类OX40)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时诱导、增强或增加OX40(例如人类OX40)活性。在特定实施方案中,OX40活性的增加如下文实施例所述评定。

[0234] 在某些实施方案中,本发明提供的多特异性(例如双特异性)抗体包含如美国申请第62/161,198号所述的结合OX40的抗原结合域,其以全文引用的方式并入本文中。

[0235] 7.2.2GITR抗原结合域

[0236] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含如表7中所示:

[0237] (a) 包含氨基酸序列KSSQSLN<sub>1</sub>NSX<sub>1</sub>NQKNYLX<sub>2</sub>(SEQ ID NO:90)的VL-CDR1,其中X<sub>1</sub>为G或S;且X<sub>2</sub>为T或S;

[0238] (b) 包含氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:5)的VL-CDR2;以及

[0239] (c) 包含氨基酸序列QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT(SEQ ID NO:92)的VL-CDR3,其中X<sub>1</sub>为D或E;且X<sub>2</sub>为Y、F或S。

[0240] 在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的GITR抗原结合域包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含如表8中所示:

[0241] (a) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub>(SEQ ID NO:87)的VH-CDR1,其中X<sub>1</sub>为D、E或G;X<sub>2</sub>为A或V;且X<sub>3</sub>为Y或H;

[0242] (b) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>SGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>YNQKFX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>(SEQ ID NO:88)的VH-CDR2,其中X<sub>1</sub>为V或L;X<sub>2</sub>为R、K或Q;X<sub>3</sub>为Y或F;X<sub>4</sub>为D、E或G;X<sub>5</sub>为V或L;X<sub>6</sub>为T或S;X<sub>7</sub>为K、R或Q;且X<sub>8</sub>为D、E或G;

[0243] (c) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)的VH-CDR3。

[0244] 在另一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含如表7中所示:

[0245] (a) 包含氨基酸序列KSSQSLN<sub>1</sub>NSX<sub>1</sub>NQKNYLT(SEQ ID NO:4)的VL-CDR1,其中X<sub>1</sub>为G或S;

[0246] (b) 包含氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:5)的VL-CDR2;以及

[0247] (c) 包含氨基酸序列QNX<sub>1</sub>YSX<sub>2</sub>PYT(SEQ ID NO:6)的VL-CDR3,其中X<sub>1</sub>为D或E;且X<sub>2</sub>为Y或F。

[0248] 在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的GITR抗原结合域包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含如表8中所示:

[0249] (a) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>YAMX<sub>2</sub>(SEQ ID NO:1)的VH-CDR1,其中X<sub>1</sub>为D、G或E;且X<sub>2</sub>为Y或H;

[0250] (b) 包含氨基酸序列X<sub>1</sub>IRTYSGX<sub>2</sub>VX<sub>3</sub>YNQKFX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(SEQ ID NO:2)的VH-CDR2,其中X<sub>1</sub>为V或L;X<sub>2</sub>为D或G;X<sub>3</sub>为T或S;X<sub>4</sub>为K、R或Q;且X<sub>5</sub>为D、E或G;以及

[0251] (c) 包含氨基酸序列SGTVRGFAY(SEQ ID NO:3)的VH-CDR3。

[0252] 表7.GITR VL CDR氨基酸序列\*

[0253]

抗体	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
共有序列 1	KSSQSLLNSX <sub>1</sub> NQKNYLX <sub>2</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 是 G 或 S; 且 X <sub>2</sub> 是 T 或 S (90)	WASTRES (5)	QNX <sub>1</sub> YSX <sub>2</sub> PYT, 其中 X <sub>1</sub> 是 D 或 E; 且 X <sub>2</sub> 是 Y、F 或 S (92)
共有序列 2	KSSQSLLNSX <sub>1</sub> NQKNYLT X <sub>1</sub> 是 G 或 S (4)	WASTRES (5)	QNX <sub>1</sub> YSX <sub>2</sub> PYT X <sub>1</sub> 是 D 或 E; 且 X <sub>2</sub> 是 Y 或 F (6)
pab1876w	KSSQSLLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)
pab1967w	KSSQSLLNSSNQKNYLT (15)	WASTRES (5)	QNEYSFPYT (17)
pab1975w	KSSQSLLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)
pab1979w	KSSQSLLNSGNQKNYLT (14)	WASTRES (5)	QNDYSYPYT (16)

[0254] \*表7中的VL CDR是根据Kabat确定。

[0255] 表8.GITR VH CDR氨基酸序列\*

[0256]

抗体	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
共有序列 1	X <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> MX <sub>3</sub> 其中 X <sub>1</sub> 是 D、E 或 G; X <sub>2</sub> 是 A 或 V; 且 X <sub>3</sub> 是 Y 或 H (87)	X <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> SGX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> YNQKFX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 是 V 或 L; X <sub>2</sub> 是 R、K 或 Q; X <sub>3</sub> 是 Y 或 F; X <sub>4</sub> 是 D、E 或 G; X <sub>5</sub> 是 V 或 L; X <sub>6</sub> 是 T 或 S; X <sub>7</sub> 是 K、R 或 Q; 且 X <sub>8</sub> 是 D、E 或 G (88)	SGTVRGFAY (3)
共有序列 2	X <sub>1</sub> YAMX <sub>2</sub> X <sub>1</sub> 是 D、G 或 E; 且 X <sub>2</sub> 为 Y 或 H (1)	X <sub>1</sub> IRTYSGX <sub>2</sub> VX <sub>3</sub> YNQKFX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>1</sub> 是 V 或 L; X <sub>2</sub> 是 D 或 G; X <sub>3</sub> 是 T 或 S; X <sub>4</sub> 是 K、R 或 Q; 且 X <sub>5</sub> 是 D、E 或 G (2)	SGTVRGFAY (3)
pab1876w	DYAMY (7)	VIRTYSGDVTYNQKFKD (10)	SGTVRGFAY (3)
pab1967w	GYAMH (8)	LIRTYSGGVSYNQKFRE (11)	SGTVRGFAY (3)
pab1975w	EYAMH (9)	LIRTYSGGVSYNQKFG (12)	SGTVRGFAY (3)
pab1979w	EYAMH (9)	VIRTYSGGVSYNQKFQE (13)	SGTVRGFAY (3)

[0257] \*表8中的VH CDR是根据Kabat确定。

[0258] 在某些实施方案中,本发明提供一种抗原结合域,其特异性地结合GITR(例如人类GITR)且包含pab1876、pab1967、pab1975或pab1979的轻链可变区(VL)CDR和重链可变区(VH)CDR,例如如表1和2中所示(即SEQ ID NO:14、5、16、7、10和3;SEQ ID NO:15、5、17、8、11和3;SEQ ID NO:14、5、16、9、12和3;或SEQ ID NO:14、5、16、9、13和3)。

[0259] 在某些实施方案中,GITR抗原结合域包含源自于人类IGKV4-1种系序列的轻链可变框架区(例如IGKV4-1\*01,其例如具有氨基酸序列SEQ ID NO:28)。

[0260] 在某些实施方案中,GITR抗原结合域包含源自于人类IGHV1-2种系序列的重链可变框架区(例如IGHV1-2\*02,其例如具有氨基酸序列SEQ ID NO:27)。

[0261] 在一个特定实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域,所述VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:19、21、23或26。在一个特定实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域,所述VL结构域由氨基酸序列SEQ ID NO:19、21、23或26组成或基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:19、21、23或26组成。

[0262] 在某些实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VH结构域,所述VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18、20、22、24或25。在一些实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VH结构域,所述VH结构域由氨基酸序列SEQ ID NO:18、20、22、24或25组成或基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:18、20、22、24或25组成。

[0263] 在某些实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VH结构域和VL结构域,其中所述VH结构域和所述VL结构域分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;SEQ ID NO:24和23;或SEQ ID NO:25和26。在某些实施方案中,特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VH结构域和VL结构域,其中所述VH结构域和所述VL结构域分别由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:氨基酸序列SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;SEQ ID NO:24和23;或SEQ ID NO:25和26,例如如表9中所示。

[0264] 表9. 例示性抗GITR抗体的VH和VL序列

[0265]

抗体	VH(SEQ ID NO:)	VL(SEQ ID NO:)
pab1876w	18	19
pab1967w	20	21
pab1975w	22	23
pab1979w	24	23

[0266] 在特定方面中,本发明提供一种抗原结合域,其包含轻链和重链,例如各别轻链和重链。对于轻链,在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为 $\kappa$ 轻链。在另一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为 $\lambda$ 轻链。在另一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的轻链为人类 $\kappa$ 轻链或人类 $\lambda$ 轻链。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR多肽(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:19、21、23或26中示出的序列且其中轻链的恒定区包含人类 $\kappa$ 轻链恒定区的氨基酸序列。在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:19、21、23或26中示出的序列且其中轻链的恒定区包含人类 $\lambda$ 轻链恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:19、21、23或26中示出的序列且其中轻链的恒定区包含人类 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链恒定区的氨基酸序列。人类恒定区序列的非限制性实例在本领域中已被描述,例如参见美国专利第5,693,780号和Kabat EA等人(1991)(同上)。

[0267] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含轻链,所述轻链包含在SEQ ID NO:37或38中示出的氨基酸序列。

[0268] 对于重链,在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域的重链可为 $\alpha$ 重链、 $\delta$ 重

链、 $\epsilon$ 重链、 $\gamma$ 重链或 $\mu$ 重链。在另一个特定实施方案中,所述的抗原结合域的重链可包含人类 $\alpha$ 重链、 $\delta$ 重链、 $\epsilon$ 重链、 $\gamma$ 重链或 $\mu$ 重链。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,其中VH结构域的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:18、20、22、24或25中示出的序列且其中重链的恒定区包含人类 $\gamma$ 重链恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,其中VH结构域的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:18、20、22、24或25中示出的序列,且其中重链的恒定区包含本文所述或本领域中已知的人类重链的氨基酸。人类恒定区序列的非限制性实例在本领域中已被描述,例如参见美国专利第5,693,780号和Kabat EA等人(1991)(同上)。

[0269] 在一个特定实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:31中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:32中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:33中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:34中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:35中示出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含重链,所述重链包含在SEQ ID NO:39中示出的氨基酸序列。

[0270] 在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,所述VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、或人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,所述VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>)或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>和IgG<sub>2b</sub>)的免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,恒定区包含人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、任何类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>)或任何子类(例如IgG<sub>2a</sub>和IgG<sub>2b</sub>)的免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。

[0271] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,所述VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含人类IgG<sub>1</sub>(例如同种异型G1m3、G1m17,1或G1m17,1,2)、人类IgG<sub>2</sub>或人类IgG<sub>4</sub>的恒定区的氨基酸序列。在一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含VL结构域和VH结构域,所述VL结构域和VH结构域包含本文所述的任何氨基酸序列,其中恒定区包含人类IgG<sub>1</sub>(同种异型G1m3)的恒定区的氨基酸序列。人类恒定区的非限制性实例在本领域中被描述,例如参见Kabat EA等人(1991)(同上)。

[0272] 在另一个实施方案中,本文所述的特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合

域包含轻链和重链,所述轻链包含在SEQ ID NO:37中示出的氨基酸序列且所述重链包含在SEQ ID NO:31、32、33、34、35或39中示出的氨基酸序列。

[0273] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VL结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:19、21或23)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VL结构域,例如其中所述抗原结合域包含与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VL CDR相同的VL CDR。

[0274] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VH结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:18、20、22或24)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,例如其中所述抗原结合域包含与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VH CDR相同的VH CDR。

[0275] 在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域包含:(i)与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VL结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:19、21或23)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii)与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VH结构域的氨基酸序列(即SEQ ID NO:18、20、22或24)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的VH结构域,例如其中所述抗体包含与pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的VL CDR和VH CDR相同的VL CDR和VH CDR。

[0276] 在特定方面中,本发明提供一种抗原结合域,其与包含VH结构域和VL结构域的抗原结合域竞争(例如以剂量依赖性方式)特异性地结合GITR(例如人类GITR),所述VH结构域和所述VL结构域分别具有在SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;或SEQ ID NO:24和23中示出的氨基酸序列。

[0277] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域为被与GITR(例如人类GITR)的特异性地结合由包含VH结构域和VL结构域的抗原结合域竞争性阻断(例如以剂量依赖性方式)的抗原结合域,所述VH结构域和所述VL结构域分别具有在SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;或SEQ ID NO:24和23中示出的氨基酸序列。

[0278] 可使用本领域技术人员已知或本文所述的分析(例如X射线结晶学、氢/氘交换联同质谱分析(例如液相层析电喷雾质谱分析)、丙氨酸扫描、ELISA分析等)以确定两种抗体是否结合相同的表位。

[0279] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域免疫特异性地结合与由pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w所结合的表位相同的表位或与所述表位重迭的表位。

[0280] 在一个特定方面中,相对于本文所述的抗原结合域与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列之间的结合,所述抗原结合域与变异型GITR之间的结合实质上减弱,其中除了存在D60A或G63A突变之外,所述变异型GITR包含SEQ ID NO:41的残基26至241的序列,所述氨基酸编号是根据SEQ ID NO:41。在一些实施方案中,除了存在D60A和G63A突变之外,所述变异型GITR包含SEQ ID NO:41的残基26至241的序列,其编号是根据SEQ ID NO:



41。

[0281] 在一个特定方面中,本文所述的抗原结合域结合人类GITR序列的表位,所述表位包含SEQ ID NO:41的氨基酸60至63中的至少一个残基、基本上由SEQ ID NO:41的氨基酸60至63中的至少一个残基组成或由SEQ ID NO:41的氨基酸60至63中的至少一个残基组成。在一些实施方案中,所述表位包含SEQ ID NO:41的氨基酸60至63、基本上由SEQ ID NO:41的氨基酸60至63组成或由SEQ ID NO:41的氨基酸60至63组成。

[0282] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗原结合域结合人类GITR的表位,所述表位包含以下残基、基本上由以下残基组成或由以下残基组成,所述残基选自以下组成的群组:SEQ ID NO:41的残基60、62和63、和其组合。在一些实施方案中,所述表位包含任一个残基或任何两个或三个残基、基本上由任一个残基或任何两个或三个残基组成或由任一个残基或任何两个或三个残基组成,所述残基选自以下组成的群组:SEQ ID NO:41的残基60、62和63。

[0283] 在一个特定方面中,相较于与SEQ ID NO:41的残基26至241的人类GITR序列的结合,本文所述的抗原结合域表达与SEQ ID NO:41的残基26至241相同但存在D60A或G63A氨基酸突变(例如取代)的蛋白质的减少或缺少的结合,所述氨基酸突变选自以下组成的群组:D60A和G63A,其编号是根据SEQ ID NO:41。在一些实施方案中,所述取代为D60A,其是根据SEQ ID NO:41编号。在一些实施方案中,所述取代为G63A,其是根据SEQ ID NO:41编号。

[0284] 在某些实施方案中,本文所述的抗原结合域的表位用作免疫原以产生抗体。参见例如下文章节7.3中用于产生抗体的方法。

[0285] 在特定方面中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时用作促效剂。

[0286] 在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR的抗体)的情况下的GITR(例如人类GITR)活性,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时使GITR(例如人类GITR)活性增加至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述和/或本领域技术人员已知的方法评定。在某些实施方案中,相对于不存在任何抗体的情况下或存在无关抗体(例如非免疫特异性地结合GITR的抗体)的情况下的GITR(例如人类GITR)活性,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时使GITR(例如人类GITR)活性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述和/或本领域技术人员已知的方法评定。GITR(例如人类GITR)活性的非限制性实例可包括GITR(例如人类GITR)信号传导、细胞增殖、细胞存活和细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13)。在某些实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR(例如人类GITR)的抗原结合域在以单特异性二价形式存在时诱导、增强或增加GITR(例如人类GITR)活性。在特定实施方案中,GITR活性的增加如下文实施例中所述评定。

[0287] 在某些实施方案中,本发明提供的多特异性(例如双特异性)抗体包含如国际申请第PCT/US2015/032895号中所述的结合GITR的抗原结合域,其以全文引用的方式并入本文

中。

### [0288] 7.2.3 抗原结合域

[0289] 在某些方面中,本文所述的抗原结合域可单独由其VL结构域、或单独由其VH结构域、或单独由其3个VL CDR、或单独由其3个VH CDR来描述。参见例如Rader C等人(1998) PNAS 95:8910-8915,其以全文引用的方式并入本文中,其描述通过分别自人类轻链或重链文库识别互补轻链或重链以对小鼠抗 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 抗体进行人类化,从而产生具有与原始抗体的亲和力和同样高或比所述亲和力高的亲和力的人类化抗体变异体。亦参见Clackson T等人(1991) Nature 352:624-628,其以全文引用的方式并入本文中,其描述通过通过使用特定VL结构域(或VH结构域)且在文库中筛选互补可变域来产生结合特异性抗原的抗体的方法。所述筛选产生特定VH结构域的14个新伴(new partner)和特定VL结构域的13个新伴,其为强结合剂,如由ELISA所测定。亦参见Kim S J和Hong H J,(2007) J Microbiol 45:572-577,其以全文引用的方式并入本文中,其描述,通过通过使用特定VH结构域且在文库(例如人类VL文库)中筛选互补VL结构域来产生结合特定抗原的抗体的方法;进而可使用所选择的VL结构域以指导额外的互补(例如人类)VH结构域的选择。

[0290] 在某些方面中,抗原结合域的CDR可根据Chothia编号方案确定,其是指免疫球蛋白结构环的位置(参见例如Chothia C和Lesk AM,(1987), J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等人(1997) J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等人,(1992) J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等人,(1990) J Mol Biol 215(1):175-82;和美国专利第7,709,226号)。通常,当使用Kabat编号惯例时,Chothia CDR-H1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDR-H2环存在于重链氨基酸52至56处,且Chothia CDR-H3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDR-L1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDR-L2环存在于轻链氨基酸50至56处,且Chothia CDR-L3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变动,视环的长度而定(因为Kabat编号方案在H35A和H35B处置放插入物;若既不存在35A,亦不存在35B,则环终止于32;若仅存在35A,则环终止于33;若存在35A和35B两者,则环终止于34)。

[0291] 在某些方面中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的VL的Chothia VL CDR。在某些方面中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876、pab1967、pab1975、pab1979、pab2049或pab1949的VH的Chothia VH CDR。在某些方面中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876、pab1967、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的VL的Chothia VL CDR,且包含pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的VH的Chothia VH CDR。在某些实施方案中,特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含一或多个CDR,其中Chothia CDR与Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含Kabat CDR与Chothia CDR的组合。

[0292] 在某些方面中,抗原结合域的CDR可根据IMGT编号系统确定,如以下文献中所述:Lefranc M-P,(1999) The Immunologist 7:132-136;和Lefranc M-P等人,(1999) Nucleic Acids Res 27:209-212。根据IMGT编号方案,VH-CDR1处于位置26至35处,VH-CDR2处于位置

51至57处,VH-CDR3处于位置93至102处,VL-CDR1处于位置27至32处,VL-CDR2处于位置50至52处,且VL-CDR3处于位置89至97处。在一个特定实施方案中,本文提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的如通过IMGT编号系统确定的CDR,例如如Lefranc M-P(1999)(同上)和Lefranc M-P等人(1999)(同上)中所述。

[0293] 在某些方面中,抗原结合域的CDR可根据MacCallum RM等人,(1996) J Mol Biol 262:732-745确定。亦参见例如Martin A.“抗体可变域的蛋白质序列和结构分析(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains)”,《抗体工程改造(Antibody Engineering)》,Kontermann和Dübel编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)。在一个特定实施方案中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的如由MacCallum RM等人的方法所确定的CDR。

[0294] 在某些方面中,抗体的CDR可根据AbM编号方案确定,其涉及AbM高变区,其代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,且由Oxford Molecular的AbM抗体模型化软件(Oxford Molecular Group公司)所使用。在一个特定实施方案中,本发明提供抗原结合域,其特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)且包含pab1876w、pab1967w、pab1975w、pab1979w、pab2049w或pab1949w的如由AbM编号方案确定的CDR。

[0295] 在一个特定实施方案中,沿本文所述的抗原结合域的VH区(例如CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL区(例如CDR1、CDR2或CDR3)的一或多个CDR的位置可变化一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸位置,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。举例而言,在一个实施方案中,界定本文所述的抗原结合域的CDR的位置可通过使CDR的N末端和/或C末端边界相对于本文所述的抗原结合域的CDR位置移动一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸而变化,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在另一个实施方案中,沿本文所述的抗原结合域的VH区(例如CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL区(例如CDR1、CDR2或CDR3)的一或多个CDR的长度可变化(例如更短或更长)一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。

[0296] 在一个实施方案中,本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3可比本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53)短一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在另一个实施方案中,本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3可比本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ

ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53)长一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在另一个实施方案中,相较于本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53),本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3的氨基末端可延长一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在另一个实施方案中,相较于本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6),本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3的羧基末端可延长一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在另一个实施方案中,相较于本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6),本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3的氨基末端可缩短一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。在一个实施方案中,相较于本文所述的一或多个CDR(例如SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53),本文所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3的羧基末端可缩短一个、两个、三个、四个、五个或多于五个氨基酸,只要维持(例如实质上维持例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合即可。可使用本领域中已知的任何方法以确定是否维持与GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的免疫特异性地结合,例如本文提供的“实施例”章节(章节8)中所述的结合分析和条件。

[0297] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,其中所述VH结构域和VL结构域的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含在SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含轻链恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含重链恒定域,其包含人类IgG<sub>1</sub>(视情况为IgG<sub>1</sub>(同种异型G1m3))重链的恒定域的氨基酸序列。

[0298] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域和VL结构域分别包含在SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;

SEQ ID NO:22和23;SEQ ID NO:24和23;SEQ ID NO:25和26;SEQ ID NO:54和55;或SEQ ID NO:54和56中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含恒定域,其包含人类IgG<sub>1</sub>(视情况为IgG<sub>1</sub>(同种异型G1m3))重链的恒定域的氨基酸序列。

[0299] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,其中所述VH结构域和VL结构域的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含在SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含轻链恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含重链恒定域,其包含人类IgG<sub>4</sub>重链的恒定域的氨基酸序列。

[0300] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域和VL结构域分别包含在SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;SEQ ID NO:24和23;SEQ ID NO:25和26;SEQ ID NO:54和55;或SEQ ID NO:54和56中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含恒定域,其包含人类IgG<sub>4</sub>重链的恒定域的氨基酸序列。

[0301] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,其中所述VH结构域和VL结构域的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含在SEQ ID NO:1至6;SEQ ID NO:87、88、3、90、5和92;SEQ ID NO:7、10、3、14、5和16;SEQ ID NO:8、11、3、15、5和17;SEQ ID NO:9、12、3、14、5和16;SEQ ID NO:9、13、3、14、5和16;SEQ ID NO:47至52;或SEQ ID NO:47至51和53中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含轻链恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含重链恒定域,其包含人类IgG<sub>2</sub>重链的恒定域的氨基酸序列。

[0302] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(i)所述重链和轻链分别包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域和VL结构域分别包含在SEQ ID NO:18和19;SEQ ID NO:20和21;SEQ ID NO:22和23;SEQ ID NO:24和23;SEQ ID NO:25和26;SEQ ID NO:54和55;或SEQ ID NO:54和56中示出的氨基酸序列;(ii)所述轻链进一步包含恒定域,其包含人类 $\kappa$ 轻链的恒定域的氨基酸序列;以及(iii)所述重链进一步包含恒定域,其包含人类IgG<sub>2</sub>重链的恒定域的氨基酸序列。

[0303] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含重链和轻链,其中(a)包含在氨基酸位置297处具有N经A或Q的氨基酸取代的氨基酸序列SEQ ID NO:59的重链;以及(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69的轻链。

[0304] 在另一个特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类

GITR或OX40)的抗原结合域包含(a)包含具有选自由以下组成的群组的氨基酸取代的氨基酸序列SEQ ID NO:59或29的重链:氨基酸位置267处S经E的取代、氨基酸位置328处L经F的取代、以及氨基酸位置267处S经E的取代和氨基酸位置328处L经F的取代两者;以及(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:67或69或SEQ ID NO:37的轻链。

[0305] 在特定实施方案中,本文所述的免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的抗原结合域包含框架区(例如VL结构域和/或VH结构域的框架区),其为人类框架区或源自于人类框架区。人类框架区的非限制性实例在本领域中被描述,例如参见Kabat EA等人(1991)(同上)。在某个实施方案中,本文所述的抗原结合域包含框架区(例如VL结构域和/或VH结构域的框架区),其为灵长类动物(例如非人类灵长类动物)框架区或源自于灵长类动物(例如非人类灵长类动物)框架区。

[0306] 举例而言,将来自抗原特异性非人类抗体(通常为啮齿类动物来源(例如小鼠或大鼠))的CDR移植至同源人类或非人类灵长类动物受体框架上。在一个实施方案中,非人类灵长类动物受体框架来自旧世界猿。在一个特定实施方案中,旧世界猿受体框架来自黑猩猩(*Pan troglodytes*)、侏儒黑猩猩(*Pan paniscus*)或大猩猩(*Gorilla gorilla*)。在一个特定实施方案中,非人类灵长类动物受体框架来自黑猩猩。在一个特定实施方案中,非人类灵长类动物受体框架为旧世界猴受体框架。在一个特定实施方案中,旧世界猴受体框架来自猕猴属(*Macaca*)。在某个实施方案中,非人类灵长类动物受体框架源自于石蟹猕猴(*Macaca cynomolgus*)。非人类灵长类动物框架序列描述于美国专利申请公布第US 2005/0208625号中。

[0307] 在另一个方面中,本发明提供含有抗原结合域的抗体,其与本文所述的抗体(例如pab1949w、pab2049w或pab1876w)结合GITR或OX40的相同或重迭表位(例如人类GITR或OX40的表位)。在某些实施方案中,抗体的表位可通过例如NMR光谱学、X射线衍射结晶学研究、ELISA分析、氢/氘交换联同质谱分析(例如液相层析电喷雾质谱分析)、基于数组的寡肽扫描分析和/或突变诱发定位(例如定点突变诱发定位)确定。对于X射线结晶学,结晶可使用本领域中已知方法中的任一者实现(例如Giegèr等人,(1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4):339-350;McPherson A(1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE(1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A(1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可使用熟知的X射线衍射技术来研究且可使用计算机软件来精修,所述计算机软件诸如X-PLOR(耶鲁大学,1992,由Molecular Simulations公司经销;参见例如Meth Enzymol(1985)第114卷和第115卷,Wyckoff HW等人编;美国专利申请第2004/0014194号)和BUSTER(Bricogne G(1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60;Bricogne G(1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423,Carter CW编;Roversi P等人,(2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323)。突变诱发定位研究可使用本领域技术人员已知的任何方法来实现。参见例如Champe M等人(1995)(同上);和Cunningham BC和Wells JA(1989)(同上)中对包括丙氨酸扫描突变诱发技术的突变诱发技术的描述。在一个特定实施方案中,抗原结合片段的表位是使用丙氨酸扫描突变诱发研究确定。此外,识别且结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的相同或重迭表位的抗原结合片段可使用诸如免疫分析的常规技术,例如通过显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力(即竞争结合分析)来识别。竞争结合分析亦可用于确定两种抗体是否对表

位具有相似的结合特异性。竞争结合可在其中所测试的免疫球蛋白抑制参考抗体与共同抗原(诸如GITR或OX40)的特异性地结合的分析确定。许多类型的竞争结合分析为已知,例如:固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见Stahli C等人,(1983) *Methods Enzymol* 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland TN等人,(1986) *J Immunol* 137:3614-9);固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见Harlow E和Lane D,(1988)《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel GA等人,(1988) *Mol Immunol* 25(1):7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung RC等人,(1990) *Virology* 176:546-52);和直接标记RIA(Moldenhauer G等人,(1990) *Scand J Immunol* 32:77-82)。通常,此种分析涉及使用结合至固体表面的纯化抗原(例如GITR或OX40,诸如人类GITR或OX40)或带有此等抗原中的任一者的细胞、未标记的测试免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白。竞争性抑制可通过测定在测试免疫球蛋白存在下结合至固体表面或细胞的标记的量来量测。通常,测试免疫球蛋白以过量存在。通常,当竞争性抗体以过量存在时,其将参考抗体与共同抗原的特异性地结合抑制至少50%至55%、55%至60%、60%至65%、65%至70%、70%至75%或大于75%。竞争结合分析可使用标记抗原或标记抗体配置成许多不同形式。在此分析的常见型式,将抗原固定在96孔板上。接着使用放射性标记或酶标记量测未标记的抗体阻断标记的抗体与抗原结合的能力。对于另外的细节,参见例如Wagener C等人,(1983) *J Immunol* 130:2308-2315;Wagener C等人,(1984) *J Immunol Methods* 68:269-274;Kuroki M等人,(1990) *Cancer Res* 50:4872-4879;Kuroki M等人,(1992) *Immunol Invest* 21:523-538;Kuroki M等人,(1992) *Hybridoma* 11:391-407;和《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,Harlow E和Lane D编(同上),第386-389页。

[0308] 在一个实施方案中,竞争分析是使用表面等离子体共振(BIAcore<sup>®</sup>),例如通过『串联方法』,诸如Abdiche YN等人,(2009) *Analytical Biochem* 386:172-180所述的方法来进行,藉此将GITR或OX40抗原固定于芯片表面(例如CM5传感器芯片)上,且接着使抗GITR或OX40抗体在芯片上通过。为确定抗体是否与本文所述的抗GITR或OX40抗原结合域竞争,首先使含有所述抗GITR或OX40抗原结合域的抗体在芯片表面上通过以达成饱和,且接着添加潜在的竞争性抗体。接着可测定竞争性抗体的结合且相对于非竞争性对照定量。

[0309] 在某些方面中,当两种抗体在诸如竞争ELISA分析的竞争结合分析中识别相同或空间上重叠的表位时,可使用竞争结合分析来确定其中一种抗体是否由其中作为参考抗体的另一种抗体(例如结合基本上相同的表位或重叠表位的抗体)例如以剂量依赖性方式竞争性阻断,其竞争结合分析可使用标记的抗原或标记的抗体配置成许多不同形式。在一个特定实施方案中,可在竞争结合分析中用本文所述的抗体(例如抗体pab1949w、pab2049w或pab1876w)、或其嵌合或Fab抗体、或包含本文所述的抗体(例如pab1949w、pab2049w或pab1876w)的VH CDR和VL CDR的抗体来测试抗体。

[0310] 在另一个方面中,本发明提供抗原结合域,其与本文所述的抗原结合域竞争(例如以剂量依赖性方式)结合GITR或OX40(例如人类OX40),如使用本领域技术人员已知或本文所述的分析(例如ELISA竞争分析或表面等离子体共振)确定。在另一个方面中,本发明提供抗原结合域,其竞争性抑制(例如以剂量依赖性方式)本文所述的抗原结合域(例如

pab1949w、pab2049w或pab1876w)结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40),如使用本领域技术人员已知或本文所述的分析(例如ELISA竞争分析、或悬浮数组或表面等离子体共振分析)确定。在特定方面中,本文提供抗原结合片段,其与包含本文所述的氨基酸序列(例如pab1949w、pab2049w或pab1876w的VL和/或VH氨基酸序列)的抗体竞争(例如以剂量依赖性方式)特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40),如使用本领域技术人员已知或本文所述的分析(例如ELISA竞争分析、或悬浮数组或表面等离子体共振分析)确定。

[0311] 在某些实施方案中,本发明提供抗原结合片段,其与本文所述的抗原结合片段竞争结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40),所述竞争程度与本文所述的抗原结合片段自我竞争结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的程度相同。在一些实施方案中,本发明提供第一抗原结合抗体片段,其与本文所述的抗原结合抗体片段竞争结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40),其中所述第一抗原结合抗体片段在包括下列步骤的分析中竞争结合:(a)将GITR和/或OX40转染的细胞与呈未标记形式的第一抗原结合抗体片段在容器中培育;和(b)在容器中添加呈标记形式的本文所述的抗原结合抗体片段且在容器中培育细胞;以及(c)检测呈标记形式的本文所述的抗原结合抗体片段与细胞的结合。在某些实施方案中,本发明提供第一抗原结合抗体片段,其与本文所述的抗原结合抗体片段竞争结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40),其中所述竞争表达为第一抗原结合抗体片段与GITR或OX40的结合减少超过80%(例如85%、90%、95%、或98%、或80%至85%、80%至90%、85%至90%或85%至95%)。

### [0312] 7.3抗体产生

[0313] 免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和人类OX40)的多特异性(例如双特异性)抗体可通过本领域中已知用于合成抗体的任何方法,例如通过化学合成或通过重组表达技术产生。除非另外指示,否则本文所述的方法使用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交和本领域内相关领域的熟知技术。此等技术描述于例如本文引用的参考文献中且在文献中充分解释。参见例如Maniatis T等人,(1982)《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(1989)《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(2001)《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, NY;Ausubel FM等人,《最新分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)》,John Wiley&Sons(1987年和每年更新);《最新免疫学方案(Current Protocols in Immunology)》,John Wiley&Sons(1987年和每年更新);Gait(编)(1984)《寡核苷酸合成:实用方法(Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach)》,IRL Press;Eckstein(编)(1991)《寡核苷酸和类似物:实用方法(Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach)》,IRL Press;Birren B等人(编)(1999)《基因组分析:实验室手册(Genome Analysis:A Laboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0314] 在一个特定实施方案中,本文所述的多特异性(例如双特异性)抗体为通过任何方式制备、表达、形成或分离的多特异性(例如双特异性)抗体(例如重组抗体),所述方式涉及例如经由DNA序列的合成、遗传工程改造形成。在某些实施方案中,此种多特异性(例如双特



异性)抗体包含在动物或哺乳动物(例如人类)的活体内抗体种系谱系内非天然存在的序列(例如DNA序列或氨基酸序列)。

[0315] 双特异性二价抗体和其制备方法描述于例如美国专利第5,731,168号、第5,807,706号、第5,821,333号和美国申请公布第2003/020734号和第2002/0155537号中,其各自以全文引用的方式并入本文中。双特异性四价抗体和其制备方法描述于例如国际申请公布第W002/096948号和第W000/44788号中,此两者的揭示内容以全文引用的方式并入本文中。一般参见国际申请公布第W093/17715号、第W092/08802号、第W091/00360号和第W092/05793号;Tutt等人,J.Immunol.147:60-69(1991);美国专利第4,474,893号;第4,714,681号;第4,925,648号;第5,573,920号;和第5,601,819号;和Kostelny等人,J.Immunol.148:1547-1553(1992),其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0316] 如本文所述的双特异性抗体可根据DuoBody技术平台(Genmab A/S公司)来产生,如例如国际公布第W0 2011/131746号、第W0 2011/147986号、第W0 2008/119353号和第W0 2013/060867号;以及Labrijn AF等人,(2013)PNAS 110(13):5145-5150中所述。DuoBody技术可用于将含有两个重链和两个轻链的第一单特异性抗体的一半与含有两个重链和两个轻链的第二单特异性抗体的一半组合。所得的异二聚体含有与来自第二抗体的一个重链和一个轻链配对的来自第一抗体的一个重链和一个轻链。当所述两种单特异性抗体识别不同抗原上的不同表位时,所得的异二聚体为双特异性抗体。

[0317] DuoBody技术要求单特异性抗体各自包括在CH3结构域中具有单点突变的重链恒定区。点突变允许所得的双特异性抗体中的CH3结构域之间的相互作用强于单特异性抗体中的任一者中的CH3结构域之间的相互作用。各单特异性抗体中的单点突变处于重链恒定区的CH3结构域中的残基366、368、370、399、405、407或409处,其编号是根据EU编号系统,如例如国际公布第W0 2011/131746号中所述。此外,在一种单特异性抗体中,相较于另一种单特异性抗体,所述单点突变位于不同的残基处。举例而言,一种单特异性抗体可包含突变F405L(即在残基405处苯丙氨酸突变成亮氨酸),而另一种单特异性抗体可包含突变K409R(即在残基409处赖氨酸突变成精氨酸),其编号是根据EU编号系统。单特异性抗体的重链恒定区可为IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>同型(例如人类IgG<sub>1</sub>同型),且通过DuoBody技术产生的双特异性抗体可保留Fc介导的效应功能。

[0318] 另一种产生双特异性抗体的方法已称作“杵入臼”策略(参见例如国际公布W02006/028936)。在本领域中通过使IgG中形成CH3结构域的界面的所选氨基酸突变来减少Ig重链的错配。在CH3结构域内两个重链直接相互作用的位置处,将具有小侧链的氨基酸(臼)引入一个重链的序列中,且将具有大侧链的氨基酸(杵)引入另一个重链上的对应相互作用残基位置中。在一些实施方案中,本发明的组合物具有免疫球蛋白链,其中已通过使在两个多肽之间的界面处相互作用的所选氨基酸突变以优先形成双特异性抗体来修饰CH3结构域。双特异性抗体可由同一子类(例如IgG<sub>1</sub>或IgG<sub>3</sub>)或不同子类(例如IgG<sub>1</sub>和IgG<sub>3</sub>、或IgG<sub>3</sub>和IgG<sub>4</sub>)的免疫球蛋白链构成。

[0319] 在一个实施方案中,结合GITR和/或OX40的双特异性抗体包含“杵链”中的T366W突变和“臼链”中的T366S、L368A、Y407V突变以及视情况存在的在CH3结构域之间额外的链间二硫桥,所述二硫桥是通过例如将Y349C突变引入至“杵链”中且将E356C突变或S354C突变引入至“臼链”中而形成;“杵链”中的R409D、K370E突变和“臼链”中的D399K、E357K突变;“杵

链”中的R409D、K370E突变和“白链”中的D399K、E357K突变；“杆链”中的T366W突变和“白链”中的T366S、L368A、Y407V突变；“杆链”中的R409D、K370E突变和“白链”中的D399K、E357K突变；一个链中的Y349C、T366W突变和对应链中的E356C、T366S、L368A、Y407V突变；一个链中的Y349C、T366W突变和对应链中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变；一个链中的Y349C、T366W突变和对应链中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变；以及一个链中的Y349C、T366W突变和对应链中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变（其编号是根据EU编号系统）。

[0320] 结合GITR和/或OX40的双特异性抗体在一些情况下可含有IgG4与IgG1、IgG4与IgG2、IgG4与IgG2、IgG4与IgG3、或IgG1与IgG3链异二聚体。此等异二聚体重链抗体可常规地通过例如修饰人类IgG4和IgG1或IgG3中形成CH3结构域的界面的所选氨基酸以有利于异二聚体重链形成经工程改造。

[0321] 在特定实施方案中，多特异性（例如双特异性）抗体可为嵌合抗体或人类化抗体。在某些实施方案中，多特异性（例如双特异性）抗体可为F(ab')<sub>2</sub>片段。F(ab')<sub>2</sub>片段含有四聚体抗体分子的由铰链区中的二硫键连接的两个抗原结合臂。

[0322] 本文所述的多特异性（例如双特异性）抗体可通过本领域技术人员已知的任何技术产生。举例而言，本文所述的F(ab')<sub>2</sub>片段可通过使用诸如胃蛋白酶的酶对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解产生。

[0323] 在某个方面中，本文提供一种制备免疫特异性地结合GITR和/或OX40（例如人类GITR和/或OX40）的抗体或抗原结合片段的方法，其包括培养本文所述的一种细胞或多种细胞。在某个方面中，本文提供一种制备免疫特异性地结合GITR和/或OX40（例如人类GITR和/或OX40）的抗体或抗原结合片段的方法，其包括使用本文所述的细胞或宿主细胞（例如包含编码本文所述的抗体的聚核苷酸的细胞或宿主细胞）使所述抗体或抗原结合片段表达（例如重组表达）。在一个特定实施方案中，所述细胞为分离的细胞。在一个特定实施方案中，已将外源性聚核苷酸引入所述细胞中。在一个特定实施方案中，所述方法进一步包括纯化获自所述细胞或宿主细胞的抗体或抗原结合片段的步骤。

[0324] 抗体的抗原结合片段可例如自单克隆抗体并使用本领域中已知的多种技术制备，包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体呈现技术或其组合。举例而言，单克隆抗体可使用杂交瘤技术产生，包括本领域中已知的和教示的技术，例如Harlow E和Lane D,《抗体：实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual)》，(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988); Hammerling GJ等人,《单克隆抗体和T细胞杂交瘤 (Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)》，563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于经由杂交瘤技术产生的抗体。举例而言，单克隆抗体可由外源表达本文所述的抗体的宿主细胞重组产生。本文所述的单克隆抗体可例如通过如Kohler G和Milstein C (1975) Nature 256:495中所述的杂交瘤方法来制备，或可例如使用例如如本文所述的技术自噬菌体文库分离。用于制备克隆细胞系和由其所表达的单克隆抗体的其他方法为本领域中所熟知（参见例如《精编分子生物学实验指南 (Short Protocols in Molecular Biology)》，(2002) 第5版, Ausubel FM等人 (同上) 中的第11章）。

[0325] 此外，本文所述的抗体或其抗原结合片段亦可使用本领域中已知的各种噬菌体呈现方法产生。在噬菌体呈现方法中，使蛋白质呈现于携带编码其的聚核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特定而言，自动物cDNA文库（例如受影响的组织的人类或鼠类cDNA文库）扩

增编码VH结构域和VL结构域的DNA序列。用scFv连接符通过PCR将编码VH结构域和VL结构域的DNA重组在一起且克隆至噬菌粒载体中。将所述载体在大肠杆菌中电穿孔且用辅助噬菌体感染大肠杆菌。此等方法中所用的噬菌体通常为包括fd和M13的丝状噬菌体,且VH结构域和VL结构域通常重组融合至噬菌体基因III或基因VIII。可用抗原,例如使用标记的抗原或结合或捕捉至固体表面或珠粒的抗原,以选择或识别表达结合特定抗原的抗体或片段的噬菌体。可用于制备本文所述的抗体的噬菌体呈现方法的实例包括以下文献中所揭示的方法:Brinkman U等人,(1995) *J Immunol Methods* 182:41-50;Ames RS等人,(1995) *J Immunol Methods* 184:177-186;Kettleborough CA等人,(1994) *Eur J Immunol* 24:952-958;Persic L等人,(1997) *Gene* 187:9-18;Burton DR和Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57:191-280;PCT申请第PCT/GB91/001134号;国际公布第W0 90/02809号、第W0 91/10737号、第W0 92/01047号、第W0 92/18619号、第W0 93/1 1236号、第W0 95/15982号、第W0 95/20401号、和第W0 97/13844号;以及美国专利第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号、和第5,969,108号。

[0326] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择之后,可分离来自噬菌体的抗体编码区且用于产生抗体(包括人类抗体)且使其表达于任何所需的宿主中,宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如如下文所述。亦可使用本领域中已知的方法以利用重组产生抗体(诸如Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段)的技术,诸如以下文献中所揭示的方法:PCT公布第W0 92/22324号;Mullinax RL等人,(1992) *BioTechniques* 12(6):864-9;Sawai H等人,(1995) *Am J Reprod Immunol* 34:26-34;和Better M等人,(1988) *Science* 240:1041-1043。

[0327] 在一个方面中,为产生抗体,可使用包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧接序列的PCR引子来自模板(例如scFv克隆体)扩增VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,可将PCR扩增的VH结构域克隆至表达VH恒定区的载体中,且可将PCR扩增的VL结构域克隆至表达VL恒定区(例如人类κ或λ恒定区)的载体中。亦可将VH结构域和VL结构域克隆至表达必需的恒定区的一个载体中。接着使用本领域技术人员已知的技术将重链转化载体和轻链转化载体共转染至细胞系中以产生表达抗体(例如IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0328] 嵌合抗体为如下分子,其中抗体的不同部分源自于不同免疫球蛋白分子。举例而言,嵌合抗体可含有小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区,其融合至人类抗体的恒定区。用于产生嵌合抗体的方法为本领域中已知的。参见例如Morrison SL (1985) *Science* 229:1202-7; Oi VT和Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4:214-221;Gillies SD等人,(1989) *J Immunol Methods* 125:191-202;以及美国专利第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号和第6,331,415号。

[0329] 人类化抗体能够结合预定抗原且包含实质上具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和实质上具有非人类免疫球蛋白(例如鼠类免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在特定实施方案中,人类化抗体亦包含免疫球蛋白(通常为人类免疫球蛋白)恒定区(Fc)的至少一部分。抗体亦可包括重链的CH1区、铰链区、CH2区、CH3区和CH4区。人类化抗体可选自任

何类别的免疫球蛋白,其包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE;以及任何同型,其包括IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>和IgG<sub>4</sub>。人类化抗体可使用本领域中已知的多种技术产生,包括(但不限于)CDR移植(欧洲专利第EP 239400号;国际公布第W0 91/09967号;和美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号);镶饰或表面重整(欧洲专利第EP 592106号和第EP 519596号; Padlan EA(1991) *Mol Immunol* 28(4/5):489-498; Studnicka GM等人,(1994) *Prot Engineering* 7(6):805-814;和Roguska MA等人,(1994) *PNAS* 91:969-973);链改组(美国专利第5,565,332号);和例如以下文献中所揭示的技术:美国专利第6,407,213号、美国专利第5,766,886号、国际公布第W0 93/17105号;Tan P等人,(2002) *J Immunol* 169:1119-25;Caldas C等人,(2000) *Protein Eng.* 13(5):353-60;Morea V等人,(2000) *Methods* 20(3):267-79;Baca M等人,(1997) *J Biol Chem* 272(16):10678-84;Roguska MA等人,(1996) *Protein Eng* 9(10):895-904;Couto JR等人,(1995) *Cancer Res.* 55(23增刊):5973s-5977s;Couto JR等人,(1995) *Cancer Res* 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994) *Gene* 150(2):409-10;和Pedersen JT等人,(1994) *J Mol Biol* 235(3):959-73。亦参见美国申请公布第US 2005/0042664A1号(2005年2月24日),其以全文引用的方式并入本文中。

[0330] 在特定实施方案中,人类抗体包含本文所述的抗原结合域,抗原结合域与本文所述的其抗GITR或OX40抗原结合片段结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的相同表位。在特定实施方案中,人类抗体包含抗原结合片段,所述抗原结合片段竞争性阻断(例如以剂量依赖性方式)本文所述的抗原结合片段中的任一者(例如pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w)结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)。人类抗体可使用本领域中已知的任何方法产生。举例而言,可使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可表达人类免疫球蛋白基因的转殖基因小鼠。特定而言,可随机或通过同源重组将人类重链和轻链免疫球蛋白基因复合物引入至小鼠胚胎干细胞中。或者,除人类重链和轻链基因之外,亦可将人类可变区、恒定区和多样性区域引入至小鼠胚胎干细胞中。可与通过同源重组引入人类免疫球蛋白基因座分开或同时使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因变成非功能性的。特定而言, J<sub>H</sub>区的同型接合缺失防止内源性抗体产生。使经修饰的胚胎干细胞扩增且显微注射至胚泡中以产生嵌合小鼠。接着使嵌合小鼠繁殖以产生表达人类抗体的同型接合子代。以正常方式用所选抗原,例如抗原(例如OX40)的全部或部分对转殖基因小鼠进行免疫接种。可使用熟知的杂交瘤技术自接受免疫接种的转殖基因小鼠获得针对所述抗原的单克隆抗体。由转殖基因小鼠所带有的内源性免疫球蛋白转殖基因在B细胞分化期间重排,且随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用所述技术,有可能产生治疗上可用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。对于此种用于产生人类抗体的技术的概述,参见Lonberg N和Huszar D(1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93。对于此种用于产生人类抗体和人类单克隆抗体的技术和用于产生此等抗体的方案的详细论述,参见例如国际公布第W0 98/24893号、第W0 96/34096号和第W0 96/33735号;以及美国专利第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号和第5,939,598号。能够产生人类抗体的小鼠的实例包括Xenomouse™(Abgenix公司;美国专利第6,075,181号和第6,150,184号)、HuAb-Mouse™(Medarex公司/Gen Pharm公司;美国专利第5,545,806号和第5,569,825号)、Trans Chromo Mouse™(Kirin公司)和KM Mouse™(Medarex公司/Kirin公司)。

[0331] 特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)的人类抗体或抗原结合片段可通过本领域中已知的多种方法制备,包括上文所述的使用源自于人类免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体呈现方法。亦参见美国专利第4,444,887号、第4,716,111号、和第5,885,793号;以及国际公布第W0 98/46645号、第W0 98/50433号、第W0 98/24893号、第W0 98/16654号、第W0 96/34096号、第W0 96/33735号和第W0 91/10741号。

[0332] 在一些实施方案中,人类抗体可使用小鼠-人类杂交瘤产生。举例而言,可使经埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)转型的人类周边血淋巴球与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生分泌人类单克隆抗体的小鼠-人类杂交瘤,且可筛选此等小鼠-人类杂交瘤以确定分泌免疫特异性地结合靶抗原(例如OX40(例如人类OX40))的人类单克隆抗体的杂交瘤。此等方法在本领域中为已知且被描述,参见例如Shinmoto H等人,(2004)Cytotechnology 46:19-23;Naganawa Y等人,(2005)Human Antibodies 14:27-31。

### [0333] 7.3.1聚核苷酸

[0334] 在某些方面中,本发明提供聚核苷酸,其包含编码本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)抗原的抗体或其片段(例如轻链可变区和/或重链可变区)的核苷酸序列;以及载体,例如包含此等聚核苷酸的用于在宿主细胞(例如大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的载体。本文提供包含编码本文提供的任何抗体的核苷酸序列的聚核苷酸和包含此等聚核苷酸序列的载体,例如用于使其在宿主细胞(例如哺乳动物细胞)中有效表达的表达载体。

[0335] 如本文所用的“分离”的聚核苷酸或核酸分子为与存在于核酸分子的天然来源中(例如小鼠或人类中)的其他核酸分子分离的聚核苷酸或核酸分子。此外,“分离”的核酸分子(诸如cDNA分子)在通过重组技术产生时可实质上不含其他细胞物质或培养基或在化学合成时实质上不含化学前体或其他化学品。举例而言,措辞“实质上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特定而言少于约10%)的其他物质的聚核苷酸或核酸分子的制备物,所述其他物质例如细胞物质、培养基、其他核酸分子、化学前体和/或其他化学品。在一个特定实施方案中,编码本文所述的抗体的核酸分子经分离或纯化。

[0336] 在特定方面中,本文提供包含编码以下抗体的核苷酸序列的聚核苷酸:免疫特异性地结合GITR和/或OX40多肽(例如人类GITR和/或OX40)且包含如本文所述的氨基酸序列的抗体;以及与此等抗体竞争结合GITR和/或OX40多肽(例如以剂量依赖性方式)或与此等抗体结合相同的表位的抗体。

[0337] 在某些方面中,本文提供聚核苷酸,其包含编码本文所述的抗体的轻链或重链的核苷酸序列。聚核苷酸可包含编码包含本文所述的抗体的VL CDR(参见例如表1、4和7)的轻链或轻链可变域的核苷酸序列。聚核苷酸可包含编码包含本文所述的抗体的VH CDR(参见例如表1、5和8)的重链或重链可变域的核苷酸序列。在特定实施方案中,本文所述的聚核苷酸编码包含在SEQ ID NO:19、21、23、26、55或56中示出的氨基酸序列的VL结构域。在特定实施方案中,本文所述的聚核苷酸编码包含在SEQ ID NO:18、20、22、24、25和54中示出的氨基酸序列的VH结构域。

[0338] 在特定实施方案中,本文提供包含编码抗GITR或OX40抗原结合域的核苷酸序列的聚核苷酸,所述抗GITR或OX40抗原结合域包含三个VL链CDR,例如含有本文所述的抗体中任一者的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3(例如参见表1、4和7)。在特定实施方案中,本文提供聚

核苷酸,聚核苷酸包含三个VH链CDR,例如含有本文所述的抗体中任一者的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3(例如参见表1、5和8)。在特定实施方案中,本文提供包含编码抗GITR或OX40抗原结合域的核苷酸序列的聚核苷酸,所述抗GITR或OX40抗原结合域包含三个VH链CDR,例如含有本文所述的抗体中任一者的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3(例如参见表1、4和7);以及三个VH链CDR,例如含有本文所述的抗体中任一者的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3(例如参见表1、5、和8)。

[0339] 在某些实施方案中,本文所述的聚核苷酸包含编码本文提供的抗体或抗原结合域的核苷酸序列,所述抗体或抗原结合域包含含有本文所述的氨基酸序列(例如SEQ ID NO: 19、21、23、26、55或56)的轻链可变区,其中所述抗体或抗原结合域免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)。

[0340] 在某些实施方案中,本文所述的聚核苷酸包含编码本文提供的抗体或抗原结合域的核苷酸序列,所述抗体或抗原结合域包含重链可变区,所述重链可变区含本文所述的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:18、20、22、24、25或54),其中所述抗体或抗原结合域免疫特异性地结合GITR或OX40(例如人类GITR或OX40)。

[0341] 在特定方面中,本文提供一种聚核苷酸,所述聚核苷酸包含编码包含轻链和重链(例如各别轻链和重链)的抗体的核苷酸序列。对于轻链,在一个特定实施方案中,本文所述的聚核苷酸包含编码 $\kappa$ 轻链的核苷酸序列。在另一个特定实施方案中,本文所提供的聚核苷酸包含编码 $\lambda$ 轻链的核苷酸序列。在另一个特定实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含编码本文所述的包含人类 $\kappa$ 轻链或人类 $\lambda$ 轻链的抗体的核苷酸序列。在一个特定实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含编码免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的抗体的核苷酸序列,其中所述抗体包含轻链,其中VL结构域的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:19、21、23、26、55或56中示出的氨基酸序列且其中所述轻链的恒定区包含人类 $\kappa$ 轻链恒定区的氨基酸序列。在另一个特定实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含编码免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)且包含轻链的抗体的核苷酸序列,其中VL结构域的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:19、21、23、26、55或56中示出的氨基酸序列且其中所述轻链的恒定区包含人类 $\lambda$ 轻链恒定区的氨基酸序列。举例而言,人类恒定区序列可为美国专利第5,693,780号中所述的序列。

[0342] 在一个特定实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含编码本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的抗体的核苷酸序列,其中所述抗体包含重链,其中VH结构域的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:18、20、22、24、25或54中示出的氨基酸序列且其中所述重链的恒定区包含人类 $\gamma$ 重链恒定区的氨基酸序列。

[0343] 在某个实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含核苷酸序列,其编码本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类OX40)的抗体的VH结构域和/或VL结构域(诸如VH结构域的SEQ ID NO:18、20、22、24、25或54和/或VL结构域的SEQ ID NO:19、21、23、26、55或56)。

[0344] 在另一个特定实施方案中,本文提供的聚核苷酸包含编码本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类OX40)的抗体的核苷酸序列,其中所述抗体包含含有本文所述的任何氨基酸序列的VL结构域和VH结构域,其中恒定区包含人类IgG<sub>1</sub>(例如同种异型1、17或3)、人类IgG<sub>2</sub>或人类IgG<sub>4</sub>的恒定区的氨基酸序列。

[0345] 在一个特定实施方案中,本文提供包含核苷酸序列的聚核苷酸,所述核苷酸序列编码本文所指定的抗OX40抗体或其结构域,参见例如表1至9。

[0346] 本文亦提供编码抗GITR和/或OX40抗体或其片段的聚核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列置换和消除mRNA不稳定性组件来优化。可通过相应地调适例如以下文献中所述的优化方法来进行通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制区以产生用于重组表达的经优化的编码抗GITR和/或OX40抗体或其片段(例如轻链、重链、VH结构域或VL结构域)的核酸的方法:美国专利第5,965,726号;第6,174,666号;第6,291,664号;第6,414,132号;和第6,794,498号。举例而言,可使RNA内的潜在剪接位点和不稳定性组件(例如富含A/T或A/U的组件)突变而不改变由核酸序列编码的氨基酸以增加用于重组表达的RNA的稳定性。所述改变利用遗传密码的简并,例如使用用于相同氨基酸的替代性密码子。在一些实施方案中,可能需要改变一或多个密码子以编码保守突变,例如与原始氨基酸具有相似的化学结构和特性和/或功能的相似氨基酸。

[0347] 在某些实施方案中,优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段(例如VL结构域或VH结构域)的聚核苷酸序列可与未优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段(例如VL结构域或VH结构域)的聚核苷酸序列的反义(例如互补)聚核苷酸杂交。在特定实施方案中,优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段的核苷酸序列在高严格度条件下与未优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段的聚核苷酸序列的反义聚核苷酸杂交。在一个特定实施方案中,优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段的核苷酸序列在高严格度、中等严格度或较低严格度杂交条件下与未优化的编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体或其片段的核苷酸序列的反义聚核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已被描述,参见例如美国专利申请公布第US 2005/0048549号(例如第72-73段),其以引用的方式并入本文中。

[0348] DNA亦可例如通过用人类重链和轻链恒定域的编码序列取代鼠类序列、或通过使免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接来修饰。

[0349] 亦提供在高严格度、中等或较低严格度杂交条件下与编码本文所述的抗体的聚核苷酸杂交的聚核苷酸。在特定实施方案中,本文所述的聚核苷酸在高严格度、中等或较低严格度杂交条件下与编码本文提供的VH结构域(例如SEQ ID NO:18、20、22、24、25或54)和/或VL结构域(例如SEQ ID NO:19、21、23、25、55或56)的聚核苷酸杂交。

[0350] 杂交条件已在本领域中被描述且为本领域技术人员已知。举例而言,在严格条件下杂交可包括在约45°C下在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与过滤器结合的DNA杂交,继而在约50°C至65°C下在0.2×SSC/0.1%SDS中进行一或多次洗涤;在高度严格条件下杂交可包括在约45°C下在6×SSC中与过滤器结合的核酸杂交,继而在约68°C下在0.1×SSC/0.2%SDS中进行一或多次洗涤。在其他严格杂交条件下的杂交为本领域技术人员已知且已被描述,参见例如Ausubel FM等人编,(1989)《最新分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)》,第I卷,纽约的Green Publishing Associates公司和John Wiley& Sons公司中的第6.3.1-6.3.6页和第2.10.3页。

[0351] 7.3.2细胞和载体

[0352] 在某些方面中,本文提供细胞(例如宿主细胞),其表达(例如重组)本文所述的特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的抗体以及相关聚核苷酸和表达载

体。本文提供用于在宿主细胞中,较佳在哺乳动物细胞中重组表达的载体(例如表达载体),其包含含有编码抗GITR和/或OX40抗体或片段的核苷酸序列的聚核苷酸。本文亦提供用于重组表达本文所述的抗GITR和/或OX40抗体(例如人类或人类化抗体)的宿主细胞,其包含此等载体。在一个特定方面中,本文提供用于产生本文所述的抗体的方法,其包括在宿主细胞中表达此种抗体。

[0353] 本文所述的特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类OX40)的抗体或其片段(例如本文所述的抗体的重链或轻链)的重组表达涉及构筑含有编码所述抗体或片段的聚核苷酸的表达载体。一旦已获得编码本文所述的抗体或其片段(例如重链可变域或轻链可变域)的聚核苷酸,即可通过重组DNA技术,使用本领域中熟知的技术以产生用于产生所述抗体分子的载体。因此,通过表达含有编码抗体或抗体片段(例如轻链或重链)的核苷酸序列的聚核苷酸来制备蛋白质的方法描述于本文中。可使用本领域技术人员熟知的方法来构筑表达载体,其含有抗体或抗体片段(例如轻链或重链)编码序列和适当的转录和翻译控制信号。此等方法包括例如试管内重组DNA技术、合成技术和活体内遗传重组。亦提供可复制的载体,其包含编码本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链可变域或轻链可变域或其片段或重链或轻链CDR的可操作连接至启动子的核苷酸序列。此等载体可例如包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如国际公布第WO 86/05807号和第WO 89/01036号;和美国专利第5,122,464号),且可将抗体的可变域克隆至此种载体中以表达整个重链、整个轻链、或整个重链和轻链两者。

[0354] 可通过熟知技术将表达载体转移至细胞(例如宿主细胞)中,且接着可通过熟知技术培养所得的细胞以产生本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)或其片段。因此,本文提供宿主细胞,其含有编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)或其片段(例如其重链或轻链或其片段)的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接至启动子以在宿主细胞中表达此等序列。在某些实施方案中,为表达双链抗体,可使个别地编码重链和轻链两者的载体共表达于宿主细胞中以表达整个免疫球蛋白分子,如下文所详述。在某些实施方案中,宿主细胞含有载体,所述载体包含编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的重链和轻链两者或其片段的聚核苷酸。在特定实施方案中,宿主细胞含有两种不同的载体,即第一载体,其包含编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的重链或重链可变区或其片段的聚核苷酸;和第二载体,其包含编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的轻链或轻链可变区或其片段的聚核苷酸。在其他实施方案中,第一宿主细胞包含第一载体,其包含编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的重链或重链可变区或其片段的聚核苷酸,且第二宿主细胞包含第二载体,其包含编码本文所述的抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的轻链或轻链可变区的聚核苷酸。在特定实施方案中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区缔合以形成本文所述的抗GITR和/或OX40抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)。在某些实施



方案中,本文提供包含此种第一宿主细胞和此种第二宿主细胞的宿主细胞群组体。

[0355] 在一个特定实施方案中,本文提供载体的群组体,所述群组体包含第一载体,其包含编码本文所述的抗GITR和/或OX40抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的轻链/轻链可变区的聚核苷酸;和第二载体,其包含编码本文所述的抗OX40抗体(例如包含pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w的CDR的抗体)的重链/重链可变区的聚核苷酸。

[0356] 可利用多种宿主表达载体系统来表达本文所述的抗体分子(参见例如美国专利第5,807,715号)。此等宿主表达系统代表可用来产生且随后纯化相关编码序列的运载体,且亦代表在用适当的核苷酸编码序列转型或转染时可原位表达本文所述的抗体分子的细胞。此等系统包括(但不限于)微生物,诸如细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)),其经含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转型;经含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转型的酵母(例如毕赤酵母(*Saccharomyces Pichia*));经含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;植物细胞系统(例如绿藻,诸如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)),其经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(CaMV);烟草花叶病毒(TMV))感染或经含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转型;或哺乳动物细胞系统(例如COS(例如COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、和NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞),其带有含有源自于哺乳动物细胞的基因组(例如金属硫蛋白启动子)或源自于哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构筑体。在一个特定实施方案中,用于表达本文所述的抗体(例如包含抗体pab1949w、pab2049w、pab1876w、pab1967w、pab1975w或pab1979w中任一者的CDR的抗体)的细胞为CHO细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza公司)的CHO细胞。在一个特定实施方案中,用于表达本文所述的抗体的细胞为人类细胞,例如人类细胞系。在一个特定实施方案中,哺乳动物表达载体为pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一个特定实施方案中,使用尤其用于表达整个重组抗体分子的诸如大肠杆菌的细菌细胞或真核细胞(例如哺乳动物细胞)来表达重组抗体分子。举例而言,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的哺乳动物细胞结合诸如来自人类巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子组件的载体为抗体的有效表达系统(FoeckingMK和Hofstetter H(1986) Gene 45:101-105;和Cockett MI等人,(1990) Biotechnology 8:662-667)。在某些实施方案中,本文所述的抗体由CHO细胞或NS0细胞产生。在一个特定实施方案中,编码本文所述的免疫特异性地结合GITR和/或OX40(例如人类GITR和/或OX40)的抗体的核苷酸序列的表达由组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0357] 此外,可选择宿主细胞系,其以所需的特定方式调节插入的序列的表达、或修饰和加工基因产物。此等对蛋白质产物的修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)对于蛋白质的功能而言可尤为重要。不同的宿主细胞具有翻译后加工和修饰蛋白质和基因产物的特征性和特定机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保正确修饰和加工所表达的外来蛋白。为此,可使用具有基因产物的适当初级转录物加工、糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此等哺乳动物宿主细胞包括(但不限于)CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠类

骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS (例如COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方案中,本文所述的抗GITR和/或OX40抗体是在哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)中产生。

[0358] 在一个特定实施方案中,本文所述的抗体具有降低的海藻糖含量或无海藻糖含量。此等抗体可使用本领域技术人员已知的技术产生。举例而言,可使抗体在海藻糖基化的能力有缺陷或缺乏海藻糖基化的能力的细胞中表达。在一个特定实施例中,可使用具有 $\alpha$ 1,6-海藻糖基转移酶的两个等位基因的基因剔除的细胞系产生具有降低的海藻糖含量的抗体。Potelligent<sup>®</sup>系统(Lonza公司)为此种可用于产生具有降低的海藻糖含量的抗体的系统的实例。

[0359] 为长期高产率产生重组蛋白,可产生稳定表达细胞。举例而言,可工程改造稳定表达本文所述的抗GITR和/或OX40抗体的细胞系。

[0360] 一旦已通过重组表达产生本文所述的抗体分子,即可将其通过本领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化,例如通过层析(例如离子交换层析;亲和层析,尤其通过在蛋白A之后对特定抗原的亲和力;和筛分管柱层析)、离心、差异溶解度、或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。此外,本文所述的抗体可融合至本文所述或本领域中另外已知的异源性多肽序列以促成纯化。

[0361] 在特定实施方案中,本文所述的抗体经分离或纯化。一般而言,分离抗体为实质上不含与分离抗体具有不同的抗原特异性的其他抗体的抗体。举例而言,在一个特定实施方案中,本文所述的抗体的制剂实质上不含细胞物质和/或化学前体。措辞“实质上不含细胞物质”包括抗体的制剂,其中所述抗体与用于分离出或重组产生其的细胞的细胞组分相分离。因此,实质上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(在本文亦称为“污染蛋白”)和/或抗体的变异体(例如抗体的不同翻译后修饰形式)的抗体制剂。当重组产生抗体或片段时,其亦一般实质上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂的体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当通过化学合成来产生抗体或片段时,其一般实质上不含化学前体或其他化学品,即其与参与合成蛋白质的化学前体或其他化学品分离。因此,抗体或片段的此等制剂具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的除相关抗体或片段以外的化学前体或化合物。在一个特定实施方案中,本文所述的抗体经分离或纯化。

[0362] 7.4医药组合物

[0363] 本文提供组合物,其在生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(《雷明顿医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,(1990),宾夕法尼亚州伊斯顿的Mack Publishing公司)中包含具有所需纯度的本文所述的抗体。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对接受者无毒。

[0364] 本文所述的包含本文所述的促效性抗体的医药组合物可用于增强、诱导或活化GITR和/或OX40活性且治疗诸如癌症或感染性疾病的病况。可根据本文所述的方法治疗的癌症的实例包括(但不限于)B细胞淋巴瘤(例如B细胞慢性淋巴球性白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(B cell non-Hodgkin's lymphoma)、皮肤B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、母细胞瘤、脑转移、乳癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、癌瘤(例如腺癌(例如胃食管连接部腺癌))、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫

内膜癌、食管癌、尤文氏肉瘤 (Ewing sarcoma)、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管连接部癌、胃肠癌、胶质母细胞瘤 (例如多形性胶质母细胞瘤, 例如新诊断或复发)、胶质瘤、头颈部癌 (例如头颈部鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、肾癌 (例如肾细胞癌和韦尔姆斯氏肿瘤 (Wilms' tumor))、喉癌、白血病 (例如慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病)、肝脏癌症 (例如肝癌和肝细胞瘤)、肺癌 (例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、淋巴母细胞性淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、转移性脑肿瘤、转移癌、骨髓瘤 (例如多发性骨髓瘤)、神经母细胞瘤、眼部黑素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰脏癌 (例如胰脏导管腺癌)、前列腺癌 (例如激素难治性 (例如去势抗性)、转移性、转移性激素难治性 (例如去势抗性、非雄激素依赖性))、肾细胞癌 (例如转移性)、唾液腺癌、肉瘤 (例如横纹肌肉瘤)、皮肤癌 (例如黑素瘤 (例如转移性黑素瘤))、软组织肉瘤、实体肿瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、移行细胞癌 (尿路上皮细胞癌)、葡萄膜黑素瘤 (例如转移性)、疣状癌、阴道癌和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom macroglobulinemia)。

[0365] 本文所述的包含本文所述的拮抗性抗体的医药组合物可用于降低、抑制或去活化GITR和/或OX40活性且治疗诸如发炎性或自体免疫疾病或病症或感染性疾病的病本文所述的包含本文所述的拮抗性抗体的医药组合物可用于降低、去活化或抑制GITR和/或OX40活性且治疗选自以下组成的群组的病况: 感染 (病毒、细菌、真菌和寄生物)、与感染相关的内毒素性休克、关节炎、类风湿性关节炎、气喘、慢性阻塞性肺病 (COPD)、盆腔发炎性疾病、阿兹海默氏病 (Alzheimer's Disease)、发炎性肠病、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病 (Peyronie's Disease)、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛疾病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术黏连、中风、第I型糖尿病、莱姆病 (lyme disease)、关节炎、脑膜脑炎、葡萄膜炎、自体免疫葡萄膜炎、中枢和周边神经系统的免疫介导的发炎性病症 (诸如多发性硬化)、狼疮 (诸如全身性红斑狼疮) 和吉兰-巴利症候群 (Guillain-Barr syndrome)、皮炎、异位性皮炎、自体免疫肝炎、纤维性肺泡炎、格雷氏病 (Grave's disease)、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、美尼尔氏病 (Meniere's disease)、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、类肉瘤病、硬皮病、韦格纳肉牙肿病 (Wegener's granulomatosis)、胰脏炎、创伤 (手术)、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心脏病 (即心血管疾病), 包括缺血性疾病, 诸如心肌梗塞以和动脉粥样硬化、血管内凝血; 骨骼再吸收、骨质疏松症、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少症和视神经脊髓炎。

[0366] 欲用于活体内投药的组合物可无菌。这容易通过通过经由例如无菌滤膜过滤来实现。

[0367] 7.5用途和方法

[0368] 7.5.1治疗用途和方法

[0369] 在一个方面中, 本文提供用于调节个体的一或多种免疫功能或反应的方法, 其包括对有需要的个体授予本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性 (例如双特异性) 抗体或包含此种抗体的组合物。在一个特定方面中, 本文提供用于活化、增强或诱导个体的一或多种免疫功能或反应的方法, 其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性 (例如双特异性) 抗体或包含此种抗体的组合物。在一个特定实施方案中, 本文提供用于预防和/或治疗需要活化或增强一或多种免疫功能或反应的疾病的方法, 其包括对有需要的个体授予本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性 (例如双特异性) 抗体或其组合物。在某

个实施方案中,本文提供治疗感染性疾病的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某个实施方案中,本文提供治疗癌症的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。所述癌症可选自由黑素瘤、肾癌和前列腺癌组成的群组。所述癌症可选自由黑素瘤、肾癌、前列腺癌、结肠癌和肺癌组成的群组。在某个实施方案中,本文提供治疗黑素瘤的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某个实施方案中,本文提供治疗肾癌的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某个实施方案中,本文提供治疗前列腺癌的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某些实施方案中,本文提供治疗结肠癌的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某些实施方案中,本文提供治疗肺癌的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某些实施方案中,本文提供治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。

[0370] 在某个实施方案中,本文提供治疗选自由以下组成的群组的癌症的方法: B细胞淋巴瘤(例如B细胞慢性淋巴球性白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、皮肤B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、母细胞瘤、脑转移、乳癌、伯基特淋巴瘤、癌瘤(例如腺癌(例如胃食管连接部腺癌))、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫内膜癌、食管癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管连接部癌、胃肠癌、胶质母细胞瘤(例如多形性胶质母细胞瘤,例如新诊断或复发)、胶质瘤、头颈部癌(例如头颈部鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、肾癌(例如肾细胞癌和韦尔姆斯氏肿瘤)、喉癌、白血病(例如慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病)、肝脏癌症(例如肝癌和肝细胞瘤)、肺癌(例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、淋巴母细胞性淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、转移性脑肿瘤、转移癌、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、神经母细胞瘤、眼部黑素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰脏癌(例如胰脏导管腺癌)、前列腺癌(例如激素难治性(例如去势抗性)、转移性、转移性激素难治性(例如去势抗性、非雄激素依赖性))、肾细胞癌(例如转移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如横纹肌肉瘤)、皮肤癌(例如黑素瘤(例如转移性黑素瘤))、软组织肉瘤、实体肿瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、移行细胞癌(尿路上皮细胞癌)、葡萄膜黑素瘤(例如转移性)、疣状癌、阴道癌和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

[0371] 在另一个实施方案中,向经诊断患有癌症的患者授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体以增加患者的一或多个免疫细胞群组体(例如T细胞效应细胞,诸如CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞)的增殖和/或效应功能。

[0372] 在一个特定实施方案中,使用本领域中熟知的分析(例如ELISPOT、ELISA和细胞增殖分析),相对于未接受本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体投药的个体的免疫功能,本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体将个体的一或多种免疫功能或反应活化或增强或诱导至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或10%至25%、25%至

50%、50%至75%或75%至95%的范围。在一个特定实施方案中,免疫功能为细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13产生)。在另一个实施方案中,免疫功能为T细胞增殖/扩增,其可例如通过流式细胞术来分析以检测表达T细胞标志物(例如CD3、CD4或CD8)的细胞数目。在另一个实施方案中,免疫功能为抗体产生,其可例如通过ELISA来分析。在一些实施方案中,免疫功能为效应功能,其可例如通过细胞毒性分析或本领域中熟知的其他分析来分析。在另一个实施方案中,免疫功能为Th1反应。在另一个实施方案中,免疫功能为Th2反应。在另一个实施方案中,免疫功能为记忆反应。

[0373] 在特定实施方案中,可由结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体增强或诱导的免疫功能的非限制性实例为效应淋巴球的增殖/扩增(例如效应T淋巴球数目增加)和对效应淋巴球(例如效应T淋巴球)的细胞凋亡的抑制。在特定实施方案中,由本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体增强或诱导的免疫功能为以下细胞的数目的增殖/扩增或活化:CD4<sup>+</sup>T细胞(例如Th1和Th2辅助T细胞)、CD8<sup>+</sup>T细胞(例如细胞毒性T淋巴球、 $\alpha/\beta$ T细胞、和 $\gamma/\delta$ T细胞)、B细胞(例如浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤驻留T细胞、CD122<sup>+</sup>T细胞、自然杀手(NK)细胞、巨噬细胞、单核球、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性球、嗜碱性球或多形核白血球。在一个实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体活化或增强淋巴球祖细胞的增殖/扩增或数目。在一些实施方案中,相对于阴性对照(例如未用本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体处理、培养或接触的对应细胞的数目),本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体使以下细胞的数目增加约至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或10%至25%、25%至50%、50%至75%或75%至95%的范围:CD4<sup>+</sup>T细胞(例如Th1和Th2辅助T细胞)、CD8<sup>+</sup>T细胞(例如细胞毒性T淋巴球、 $\alpha/\beta$ T细胞、和 $\gamma/\delta$ T细胞)、B细胞(例如浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤驻留T细胞、CD122<sup>+</sup>T细胞、自然杀手细胞(NK细胞)、巨噬细胞、单核球、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性球、嗜碱性球或多形核白血球。

[0374] 在一些实施方案中,对个体授予本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体与靶向免疫调节酶的化合物的组合,所述免疫调节酶诸如IDO(吡啶胺-(2,3)-二氧化酶)和TDO(色氨酸2,3-二氧化酶)。在特定实施方案中,此种化合物选自自由以下组成的群组:埃帕多塔(Incyte公司)、F001287(Flexus Biosciences公司)、吡啶西莫(NewLink Genetics公司)和NLG919(NewLink Genetics公司)。在一个实施方案中,所述化合物为埃帕多塔。在另一个实施方案中,所述化合物为F001287。在另一个实施方案中,所述化合物为吡啶西莫。在另一个实施方案中,所述化合物为NLG919。

[0375] 在一些实施方案中,对个体授予本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体与疫苗的组合。

[0376] 在一些实施方案中,对个体授予本文所述的结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗的组合。在一个特定实施方案中,对个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性(例如双特异性)抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗的组合。热休克蛋白(HSP)为所有物种中普遍存在的高度保守蛋白质的家族。其表达可由于热休克或其他形式的应激而强有力地诱导至较高的程度,所

述应激包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖剥夺。已根据分子量分为五个家族：HSP-110、HSP-90、HSP-70、HSP-60和HSP-28。HSP经由交叉呈现途径在抗原呈现细胞（APC）（诸如巨噬细胞和树突细胞（DC））中传递免疫原性肽，从而引起T细胞活化。HSP用作形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合物的肿瘤相关抗原肽的伴侣载体。在由垂死的肿瘤细胞释放时，HSP-抗原复合物由抗原呈现细胞（APC）摄取，其中抗原是加工成结合MHC I类和II类分子的肽，从而引起抗肿瘤CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞活化。由源自于肿瘤制剂的HSP复合物引出的免疫特异性针对由各个体的癌症所表达的独特抗原肽谱系。

[0377] 热休克蛋白肽复合物（HSPPC）为由与抗原肽非共价复合的热休克蛋白组成的蛋白质肽复合物。HSPPC引出先天免疫反应和适应性免疫反应两者。在一个特定实施方案中，所述抗原肽呈现所治疗的癌症的抗原性。HSPPC由APC经由膜受体（主要为CD91）或通过结合至Toll样受体而有效捕获。HSPPC内化引起APC的功能成熟，趋化因子和细胞激素产生引起自然杀手细胞（NK）、单核球和Th1和Th-2介导的免疫反应的活化。在一些实施方案中，用于本文所揭示的方法中的HSPPC包含与抗原肽复合的来自应激蛋白的hsp60、hsp70、或hsp90家族的一或多种热休克蛋白。在一些实施方案中，HSPPC包含hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白或其两者或更多者的组合。

[0378] 在一个特定实施方案中，对个体授予结合GITR和/或OX40的多特异性（例如双特异性）抗体与热休克蛋白肽复合物（HSPPC）（例如热休克蛋白肽复合物-96（HSPPC-96））的组合以治疗癌症。HSPPC-96包含与抗原肽复合的96kDa热休克蛋白（Hsp）gp96。HSPPC-96为由个体的肿瘤制成的癌症免疫治疗且含有癌症的抗原“指纹”。在一些实施方案中，此指纹含有仅存在于所述特定个体的特定癌细胞中的独特抗原且注射疫苗意欲刺激个体的免疫系统来识别且攻击带有所述特定癌症指纹的任何细胞。

[0379] 在一些实施方案中，例如HSPPC-96的HSPPC由个体的肿瘤组织产生。在一个特定实施方案中，HSPPC（例如HSPPC-96）由所治疗的癌症或其转移的类型的肿瘤产生。在另一个特定实施方案中，HSPPC（例如HSPPC-96）为所治疗的受试者自体的。在一些实施方案中，肿瘤组织为非坏死肿瘤组织。在一些实施方案中，使用至少1公克（例如至少1公克、至少2公克、至少3公克、至少4公克、至少5公克、至少6公克、至少7公克、至少8公克、至少9公克或至少10公克）的非坏死肿瘤组织产生疫苗方案。在一些实施方案中，在手术切除之后，在用于疫苗制备之前，将非坏死肿瘤组织冷冻。在一些实施方案中，例如HSPPC-96的HSPPC是通过纯化技术自肿瘤组织分离，过滤且制备用于可注射的疫苗。在一些实施方案中，对个体授予6至12次剂量的HSPPC，例如HSPPC-96。在此等实施方案中，HSPPC（例如HSPPC-96）剂量可每周一次授予前4次剂量，且接着每两周一次授予2至8次额外的剂量。

[0380] 可根据本文所述的方法使用的HSPPC的其他实例揭示于以下专利和专利申请案中，出于所有目的其以全文引用的方式并入本文中：美国专利第6,391,306号、第6,383,492号、第6,403,095号、第6,410,026号、第6,436,404号、第6,447,780号、第6,447,781号和第6,610,659号。

[0381] 在一个方面中，如本文所提供的用于调节个体的一或多种免疫功能或反应的方法为去活化、降低或抑制个体的一或多种免疫功能或反应的方法，其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性（例如双特异性）抗体或其组合物。在一个特定实施方案中，本文提供用于预防和/或治疗需要去活化、降低或抑制一或多种免疫功能或反应

的疾病的方法,其包括对有需要的个体授予结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。

[0382] 在某个实施方案中,本文提供治疗自体免疫性或炎症性疾病或病症的方法,其包括对有需要的个体授予有效量的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体或其组合物。在某些实施方案中,所述疾病或病症选自以下组成的群组:感染(病毒、细菌、真菌和寄生物)、与感染相关的内毒素性休克、关节炎、类风湿性关节炎、气喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔发炎性疾病、阿兹海默氏病、发炎性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛疾病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术黏连、中风、第I型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、葡萄膜炎、自体免疫葡萄膜炎、中枢和周边神经系统的免疫介导的炎症性疾病(诸如多发性硬化)、狼疮(诸如全身性红斑狼疮)和吉兰-巴利症候群、皮炎、异位性皮炎、自体免疫肝炎、纤维性肺泡炎、格雷氏病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、美尼尔氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、类肉瘤病、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、胰脏炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心脏病(即心血管疾病),包括缺血性疾病,诸如心肌梗塞和动脉粥样硬化、血管内凝血;骨骼再吸收、骨质疏松症、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少症、和视神经脊髓炎。在某些实施方案中,所述自体免疫性或炎症性疾病或病症为移植排斥反应、移植物抗宿主病、血管炎、气喘、类风湿性关节炎、皮炎、发炎性肠病、葡萄膜炎、狼疮、结肠炎、糖尿病、多发性硬化或气管发炎。在某些实施方案中,所述个体为人类。

[0383] 在另一个实施方案中,向经诊断患有自体免疫性或炎症性疾病或病症的患者授予结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体以减少所述患者的一或多个免疫细胞群体(例如T细胞效应细胞,诸如CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞)的增殖和/或效应功能。在某些实施方案中,所述自体免疫性或炎症性疾病或病症为移植排斥反应、移植物抗宿主病、血管炎、气喘、类风湿性关节炎、皮炎、发炎性肠病、葡萄膜炎、狼疮、结肠炎、糖尿病、多发性硬化或气管发炎。

[0384] 在一个特定实施方案中,使用本领域中熟知的分析(例如ELISPOT、ELISA和细胞增殖分析),相对于未接受本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体投药的个体的免疫功能,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体将个体的一或多种免疫功能或反应去活化或降低或抑制至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或10%至25%、25%至50%、50%至75%或75%至95%的范围。在一个特定实施方案中,免疫功能为细胞激素产生(例如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10和/或IL-13产生)。在另一个实施方案中,免疫功能为T细胞增殖/扩增,其可例如通过流式细胞术来分析以检测表达T细胞标志物(例如CD3、CD4、或CD8)的细胞数目。在另一个实施方案中,免疫功能为抗体产生,其可例如通过ELISA来分析。在一些实施方案中,免疫功能为效应功能,其可例如通过细胞毒性分析或本领域中熟知的其他分析来分析。在另一个实施方案中,免疫功能为Th1反应。在另一个实施方案中,免疫功能为Th2反应。在另一个实施方案中,免疫功能为记忆反应。

[0385] 在特定实施方案中,可由结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体降低或抑制的免疫功能的非限制性实例为效应淋巴球的增殖/扩增(例如效应T淋巴球

数目减少)和对效应淋巴球(例如效应T淋巴球)的细胞凋亡的刺激。在特定实施方案中,由本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体降低或抑制的免疫功能为以下细胞的数目的增殖/扩增或活化:CD4<sup>+</sup>T细胞(例如Th1和Th2辅助T细胞)、CD8<sup>+</sup>T细胞(例如细胞毒性T淋巴球、 $\alpha/\beta$ T细胞、和 $\gamma/\delta$ T细胞)、B细胞(例如浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤驻留T细胞、CD122<sup>+</sup>T细胞、自然杀手(NK)细胞、巨噬细胞、单核球、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性球、嗜碱性球或多形核白血球。在一个实施方案中,本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体去活化或减少淋巴球祖细胞的增殖/扩增或数目。在一些实施方案中,相对于阴性对照(例如未用本文所述的结合GITR和/或OX40抗体的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体处理、培养或接触的对应细胞的数目),本文所述的结合GITR和/或OX40的拮抗性多特异性(例如双特异性)抗体使以下细胞的数目减少约至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或10%至25%、25%至50%、50%至75%或75%至95%的范围:CD4<sup>+</sup>T细胞(例如Th1和Th2辅助T细胞)、CD8<sup>+</sup>T细胞(例如细胞毒性T淋巴球、 $\alpha/\beta$ T细胞、和 $\gamma/\delta$ T细胞)、B细胞(例如浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤驻留T细胞、CD122<sup>+</sup>T细胞、自然杀手细胞(NK细胞)、巨噬细胞、单核球、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性球、嗜碱性球或多形核白血球。

#### [0386] 7.5.1.1投药途径和剂量

[0387] 本文所述的抗体或组合物可通过多种途径向个体投递。

[0388] 将有效治疗和/或预防病况的抗体或组合物的量将视疾病的性质而定,且可通过标准临床技术确定。

[0389] 欲用于组合物中的精确剂量亦将视投药途径和疾病的严重程度而定,且应当根据专业人员的判断和各受试者的情况来决定。举例而言,有效剂量亦可视投药方式、靶向部位、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康情况)、患者为人类还是动物、投予的其他药物或治疗为预防性还是治疗性而不同。通常,患者为人类,但亦可治疗非人类哺乳动物,包括转殖基因哺乳动物。最佳对治疗剂量进行滴定以优化安全性和功效。

[0390] 在某些实施方案中,使用试管内分析来帮助识别最佳剂量范围。有效剂量可自由试管内或动物模型测试系统获得的剂量反应曲线外推。

[0391] 一般而言,与来自其他物种的抗体相比,由于对外来多肽的免疫反应,因此人类抗体在人体内具有较长的半衰期。因此,人类抗体的较低剂量和不太频繁的投药常常为可能的。

#### [0392] 7.5.2检测和诊断用途

[0393] 本文所述的抗OX40抗体(参见例如章节7.2)可用于使用本领域技术人员已知的典型免疫组织学方法分析生物样品中的OX40蛋白含量,包括免疫分析,诸如酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫沉淀或西方印迹术。适合的抗体分析标记为本领域中已知的且包括酶标记,诸如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(<sup>125</sup>I、<sup>121</sup>I)、碳(<sup>14</sup>C)、硫(<sup>35</sup>S)、氚(<sup>3</sup>H)、铟(<sup>121</sup>In)和铪(<sup>99</sup>Tc);发光标记,诸如鲁米诺;和荧光标记,诸如荧光素和若丹明;和生物素。此等标记可用于标记本文所述的抗体。或者,识别本文所述的抗OX40抗体的二级抗体可经标记且与抗OX40抗体组合用于检测OX40蛋白含量。

[0394] 分析OX40蛋白质的表达含量意欲包括直接(例如通过测定或估计绝对蛋白含量)



或相对(例如通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白含量相比)定性或定量量测或估计第一生物样品中OX40蛋白质的含量。可量测或估计第一生物样品中的OX40多肽表达含量且将其与标准OX40蛋白含量相比,所述标准取自获自未患所述病症的个体的第二生物样品或通过计算来自未患所述病症的个体的群组体的含量的平均值来确定。如此项技术中所将了解,一旦已知“标准”OX40多肽含量,即可将其反复用作标准以进行比较。

[0395] 如本文所用的术语“生物样品”是指获自潜在表达OX40的个体、细胞系、组织或其他细胞来源的任何生物样品。自动物(例如人类)获得组织活检和体液的方法为本领域所熟知。生物样品包括周边单核血球。

[0396] 本文所述的抗OX40抗体可用于预后、诊断、监测和筛选应用,其包括本领域技术人员熟知和标准且基于本发明描述的试管内和活体内应用。用于试管内评定和评估免疫系统状态和/或免疫反应的预后、诊断、监测和筛选分析和试剂盒可用于预测、诊断和监测以评估患者样品,包括已知有或疑似有免疫系统功能障碍或与预期或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应相关的样品。评定和评估免疫系统状态和/或免疫反应亦可用于确定患者对于药物临床试验或相比于不同药剂或抗体,对于特定化学治疗剂或抗体(包括其组合)的投药的适合性。此种类型的预后和诊断监测和评定已在实践中利用针对乳癌中的HER2蛋白质的抗体(HerceptTest™,Dako公司),其中所述分析亦用于评估患者以使用Herceptin®进行抗体治疗。活体内应用包括定向细胞治疗和免疫系统调节以和免疫反应的放射性成像。

[0397] 在一个实施方案中,抗OX40抗体可以用于活检样品的免疫组织化学。

[0398] 在另一个实施方案中,抗OX40抗体可用于检测OX40的含量或在膜表面上含有OX40的细胞的含量,接着可使其含量与某些疾病症状相关联。本文所述的抗OX40抗体可携带可检测标记或功能标记。当使用荧光标记时,可利用此项技术中已知的目前可用的显微术和荧光活化细胞分选仪分析(FACS)或所述两种方法程序的组合来识别和定量特异性地结合成员。本文所述的抗OX40抗体可携带荧光标记。例示性荧光标记包括例如反应性和结合的探针,例如氨基香豆素、荧光素、得克萨斯红(Texas red)、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗OX40抗体可携带放射性标记,诸如同位素<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>36</sup>Cl、<sup>51</sup>Cr、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>59</sup>Fe、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>117</sup>Lu、<sup>121</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>198</sup>Au、<sup>211</sup>At、<sup>213</sup>Bi、<sup>225</sup>Ac和<sup>186</sup>Re。当使用放射性标记时,可利用本领域中已知的目前可用的计数程序来识别和定量抗OX40抗体与OX40(例如人类OX40)的特异性地结合。在标记为酶的情况下,检测可通过本领域中已知的任何目前利用的比色、分光亮度、荧光分光亮度、电流滴定或气体定量技术来实现。此可通过使样品或对照样品与抗OX40抗体在允许形成抗体与OX40之间的复合物的条件下接触。在样品和对照中检测抗体与OX40之间形成的任何复合物且比较。鉴于本文所述的抗体对OX40的特异性地结合,其抗体可用于特异性检测细胞表面上的OX40表达。本文所述的抗体亦可用于经由免疫亲和纯化来纯化OX40。

[0399] 本文亦包括分析系统,其可制备成测试试剂盒的形式,所述测试试剂盒用于定量分析例如OX40或OX40/OX40L复合物的存在程度。所述系统或测试试剂盒可包括标记的组分,例如标记的抗体;和一或多种额外的免疫化学试剂。有关试剂盒的更多信息,参见例如下文章节7.6。

[0400] 7.6试剂盒

[0401] 本文提供试剂盒,其包括本文所述的一或多种抗体或其结合物。在一个特定实施

方案中,本文提供一种医药包装或试剂盒,其包括填充有本文所述的医药组合物的一或多种成分(诸如本文提供的一或多种抗体)的一或多个容器。在一些实施方案中,试剂盒含有本文所述的医药组合物和任何预防剂或治疗剂,诸如本文所述的药剂。在某些实施方案中,试剂盒可含有T细胞有丝分裂原,诸如植物血球凝集素(PHA)和/或佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体,诸如抗CD3抗体和抗CD28抗体。注记可视情况与容器缔合,所述注记呈由监管医药制品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,所述注记反映用于人类投药的制造、使用或销售由所述机构批准。

[0402] 本文亦提供可用于上述方法中的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒在一或多个容器中包括本文所述的抗体,较佳为纯化的抗体。在一个特定实施方案中,本文所述的试剂盒含有实质上分离的OX40抗原(例如人类OX40),其可用作对照。在另一个特定实施方案中,本文所述的试剂盒进一步包括对照抗体,其不与OX40抗原反应。在另一个特定实施方案中,本文所述的试剂盒含有用于检测抗体与OX40抗原的结合的一或多种组件(例如抗体可结合至可检测的受质,诸如荧光化合物、酶受质、放射性化合物或发光化合物、或识别一级抗体的二级抗体可结合至可检测的受质)。在特定实施方案中,本文提供的试剂盒可包括重组产生或化学合成的OX40抗原。试剂盒中所提供的OX40抗原亦可连接至固体载体。在一个更特定实施方案中,上述试剂盒的检测装置包括与OX40抗原连接的固体载体。此种试剂盒亦可包括非连接的报告体标记的抗人类抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在此实施方案中,抗体与OX40抗原的结合可通过所述报告体标记的抗体的结合来检测。

[0403] 以说明方式而非以限制方式提供以下实施例。

[0404] 8. 实施例

[0405] 这个章节(即章节8)中的实施例是以说明方式,而非以限制方式提供。

[0406] 8.1 实施例1: 肿瘤内调节性T细胞上GITR和OX40表达的表征

[0407] 使用流式细胞术来表征肿瘤内调节性T细胞(Treg)和效应T细胞(Teff)上GITR和OX40的表达。简言之,来自多种肿瘤类型(卵巢, IIC期; 结肠直肠, IIIB期; 子宫内膜, IB期; 肾, III期; 和非小细胞肺癌, II期)的冷冻保存的肿瘤细胞是获自Conversant Bio有限责任公司。肿瘤细胞是在治疗介入之前经分离。在解冻之后,在室温下用人类Fc受体阻断剂(FcR阻断剂, Biolegend®)将细胞处理15分钟以减少非特异性地结合。将样品洗涤两次。将抗体混合物在FACS缓冲液(PBS、2mM EDTA、0.5% BSA, pH 7.2)中稀释且添加至各样品中,所述抗体混合物含有识别CD4 (BV605, OKT4, 批号: B185762)、CD127 (APC, A019D5, 批号: B193084)和CD25 (PECy7, M-A251, 批号: B190207)的抗体、Zombie Green™可固定活力染料(FITC, 批号: B201900)以及抗OX40抗体(PE, BER-ACT35, 批号: B203538)、抗GITR抗体(PE, 110416, 批号: LAV0614061)、或同源同型对照抗体(PE, MOPC-21, 批号: B197832),全部均为2.5μg/ml。在4℃下将样品培育30分钟。在染色之前,留出额外的样品以用于单染色补偿对照(CD45-FITC、CD45-PE、CD45-PECy7、CD45-APC、和CD45-BV605;全部为克隆体H130)。接着将样品在FACS缓冲液中洗涤三次且在室温下在暗处在1×固定-透化缓冲液(Foxp3染色试剂盒, eBioscience公司)中培育45分钟。在固定后,将细胞在1×透化缓冲液(Foxp3染色试剂盒, eBioscience公司)中洗涤三次且在4℃下与在1×透化缓冲液中稀释的2.5μg/ml的抗FOXP3或大鼠IgG2a抗体一起培育45分钟。将样品在1×透化缓冲液中洗涤两次,再悬浮于FACS缓冲液中,且使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences公司)分析。使用FACS DIVA和

WEHI Weasel软件的组合分析FACS图。

[0408] 效应T细胞限定为CD4+CD127+CD25+/-FOXP3-。调节性T细胞限定为CD4+CD127-CD25+FOXP3+。如图1A中所示,来自子宫内膜癌肿瘤组织、肾细胞癌(RCC)肿瘤组织、和非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤组织的肿瘤内调节性T细胞显示GITR和OX40的表达升高,而来自相同肿瘤组织的肿瘤内效应T细胞并非如此。

[0409] 对于受体定量,使用确定的仪器设置来分析具有预定数目的PE分子的珠粒(Quantum™ R-PE MESF;Bangs Laboratories公司)。使用珠粒和先前分析的GITR/OX40抗体两者的平均荧光强度(MFI),计算肿瘤内调节性T细胞和效应T细胞的GITR和OX40受体的预测数目。

[0410] 来自卵巢肿瘤组织、结肠直肠癌(CRC)肿瘤组织、子宫内膜癌肿瘤组织、RCC肿瘤组织和NSCLC肿瘤组织的调节性T细胞均比来自相同肿瘤组织的效应T细胞显示更高的GITR和OX40表达(图1B)。

[0411] 8.2实施例2:抗GITR/OX40双特异性抗体的表征

[0412] 在此实施例中,研究使用Genmab DuoBody技术构筑的抗GITR/OX40双特异性抗体的结合和功能特征。DuoBody pab1876×pab2049和DuoBody pab1876×pab1949两者均包含GITR结合臂(pab1876)和OX40结合臂(pab2049或pab1949)。使用三种其他DuoBody抗体作为对照:DuoBody pab1876×同型、DuoBody pab2049×同型和DuoBody pab1949×同型。对应于此等DuoBody抗体的重链和轻链序列的SEQ ID NO列于表10中。此外,在一些实验中亦使用二价单特异性抗体pab1876、pab2049和pab1949w。pab1876w为包含SEQ ID NO:29的重链和SEQ ID NO:37的轻链的IgG<sub>1</sub>抗体。pab1876与pab1876w包含相同的重链和轻链序列,不同的处在于pab1876在轻链恒定域中含有T109S取代(即相对于野生型轻链恒定域,在位置109处苏氨酸经丝氨酸取代)(根据Kabat来编号),所述取代促成可变区在框内克隆至恒定区。所述突变为不影响抗体结合或功能的保守修饰。pab2049w为包含SEQ ID NO:59的重链和SEQ ID NO:67的轻链的IgG<sub>1</sub>抗体。除轻链恒定区中的T109S突变(根据Kabat编号)之外,pab2049与pab2049w包含相同的重链和轻链序列。pab1949w为包含SEQ ID NO:59的重链和SEQ ID NO:69的轻链的IgG<sub>1</sub>抗体。除轻链恒定区中的T109S突变(根据Kabat编号)之外,pab1949与pab1949w包含相同的重链和轻链序列。

[0413] 表10. DuoBody重链(HC)和轻链(LC)序列

[0414]

DuoBody	第一臂		第二臂	
	HC (SEQ ID NO:)	LC (SEQ ID NO:)	HC (SEQ ID NO:)	LC (SEQ ID NO:)
pab1876 × pab2049	31	38	61	68
pab1876 × pab1949	31	38	61	70

[0415]

pab1876 × 同型	31	38	N/A	N/A
pab2049 × 同型	61	68	N/A	N/A
pab1949 × 同型	61	70	N/A	N/A
pab1876 × pab2049 (不含重链末端赖氨酸)	76	38	120	68
pab1876 × pab1949 (不含重链末端赖氨酸)	76	38	120	70
pab1876 × 同型(不含重链末端赖氨酸)	76	38	N/A	N/A
pab2049 × 同型 (不含重链末端赖氨酸)	120	68	N/A	N/A
pab1949 × 同型 (不含重链末端赖氨酸)	120	70	N/A	N/A

[0416] 8.2.1抗GITR/OX40双特异性抗体的选择性

[0417] 使用悬浮数组技术评定DuoBody pab1876 × pab2049对GITR和OX40相对于对TNFR超家族的其他成员的选择性。使用山羊抗人类IgG F(ab')<sub>2</sub>(Jackson Immuno Research公司,COOH偶联,100μg/ml,pH 5.0)使TNFR超家族的许多重组蛋白偶联至Luminex<sup>®</sup>珠粒,所述重组蛋白包括重组人类GITR-His(Sino Biological公司,50μg/ml)、重组人类OX40-His(Sino Biological公司,50μg/ml)、重组人类淋巴毒素β受体(LTBR)-Fc(AcroBiosystems公司,65μg/ml)、重组人类死亡受体6(DR6)-bio(Sino Biological公司,50μg/ml)、重组人类肿瘤坏死因子样弱细胞凋亡诱导因子受体(TWEAKR)-Fc(Sino Biological公司,50μg/ml)、重组人类CD137-Fc(SrtA-bio公司,50μg/ml)、和重组人类B细胞活化因子受体(BAFFR)-Fc(R&D Systems公司,50μg/ml)。接着在20℃下将多个浓度(最终8333ng/ml、833.3ng/ml、83.3ng/ml和8.33ng/ml)的DuoBody pab1876 × pab2049与抗原偶联的珠粒一起培育1小时(650RPM,在暗处)。在洗涤以移除非特异性地结合(在PBS中两次)后,在20℃下将珠粒与检测抗体(藻红蛋白包被的山羊抗huIgG F(ab')<sub>2</sub>,最终2.5μg/ml)一起培育1小时(650RPM,在暗处)。接着将珠粒洗涤两次且在Luminex 200<sup>®</sup>上读取。通过截止检测值(基于LX200对照)来确定高于(+)或低于(-)临界值的结合。

[0418] DuoBody pab1876 × pab2049显示与人类GITR和OX40的特异性地结合,且在测试浓度下未观测到与其他TNFR家族成员的显著结合(表11)。

[0419] 表11.DuoBody pab1876 × pab2049对TNFR超家族成员的选择性

[0420]

标靶	GITR	OX40	LTBR	DR6	TWEAKR	CD137	BAFFR
结合	+	+	-	-	-	-	-

[0421] 8.2.2抗GITR/OX40双特异性抗体与表达GITR和OX40的细胞的结合

[0422] 通过流式细胞术研究DuoBody pab1876 × pab2049与共表达GITR和OX40的细胞、仅表达GITR的细胞和仅表达OX40的细胞的结合。

[0423] 在37℃和5%CO<sub>2</sub>下将Hut102细胞(人类T细胞淋巴瘤,ATCC)在补充有1μg/ml植物

血球凝集素 (PHA) 和10%热灭活FBS的RPMI培养基中培育72小时以诱导GITR和OX40表达。通过将慢病毒载体 (EF1a启动子) 转导至Jurkat细胞中来产生异位表达GITR或OX40的细胞。经由单细胞分选 (FACS ARIA Fusion) 产生稳定克隆体。通过流式细胞术验证表达。对于结合分析,在4℃下将稳定的Jurkat细胞或活化的Hut102细胞与在FACS缓冲液 (PBS、2mM EDTA、0.5%BSA,pH 7.2) 中稀释的测试抗体 (12点剂量滴定,0.01至10,000ng/ml) 一起培育30分钟。将样品在FACS缓冲液中洗涤两次且接着在4℃下与APC结合的小鼠抗人类κ检测抗体 (Life Technologies公司,HP6062) 一起培育30分钟。接着将样品洗涤两次且使用LSRFortessa流式细胞仪 (BD Biosciences公司) 分析。使用FACS DIVA和WEHI Weasel软件的组合分析FACS图。用Graphpad Prism软件对数据进行作图。

[0424] 如图2A中所示,相较于二价单特异性抗体pab1876和pab2049,DuoBody pab1876×pab2049显示增强的与共表达GITR和OX40的细胞的结合。增强的与共表达GITR和OX40的细胞的结合由两个臂所促成,因为用两种对照DuoBody抗体pab1876×同型和pab2049×同型中的同型臂置换任一臂引起与活化的Hut102细胞的结合减少。如所预期,对于仅表达GITR或OX40而非表达两者的细胞,在所测试的除最高浓度以外的所有浓度下,DuoBody pab1876×pab2049的结合弱于二价单特异性抗体pab1876和pab2049的结合 (图2B和2C)。

[0425] 8.2.3抗GITR/OX40双特异性抗体对FcγRIIIA报告细胞系的作用

[0426] 随后,使用表达FcγRIIIA的报告细胞系 (Promega公司) 以及共表达GITR和OX40的靶细胞来评估DuoBody pab1876×pab2049接合GITR和OX40且经由FcγRIIIA进行信号传导的能力。使用稳定表达FcγRIIIA V158变异体和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应组件的工程改造的Jurkat细胞作为效应细胞。抗体/抗原复合物 (其中所述抗原位于靶细胞的表面上) 与FcγRIIIA的结合向效应细胞的启动子/报告体构筑体进行信号传导且引起荧光素酶基因转录。

[0427] 活化自然调节性T细胞 (nTreg) 以产生共表达GITR和OX40的靶细胞。经由Ficoll梯度 (Research Blood Components有限责任公司) 自健康供者白细胞层分离PBMC且对其进行基于磁性的nTreg增浓 (Miltenyi Biotec公司,130-093-631,批号:5150629039)。接着在37℃和5%CO<sub>2</sub>下使用Miltenyi Biotec公司的Treg扩增试剂盒 (130-095-345,批号:5150420196) 在补充有10%热灭活FBS的RPMI培养基中将细胞活化8天。每3天-4天将含有Treg扩增试剂盒的新鲜培养基添加至分离的nTreg中。在第8天,通过流式细胞术确认GITR和OX40的细胞表达。简言之,在室温下用人类Fc受体阻断剂处理20,000个细胞15分钟以减少非特异性地结合 (FcR阻断剂,Biolegend公司)。将样品洗涤两次且将抗体混合物在FACS缓冲液 (PBS、2mM EDTA、0.5%BSA,pH 7.2) 中稀释,添加至各样品中且在4℃下培育30分钟,所述抗体混合物含有识别CD4 (BV605,OKT4,批号:B185762)、CD127 (APC,A019D5,批号:B193084)、和CD25 (PECy7,M-A251,批号:B195168) 的抗体和Zombie Green™可固定活力染料 (FITC,批号:B201900) 以及抗OX40抗体 (PE,BER-ACT35,批号:B203538)、抗GITR抗体 (PE,110416,批号:LAV0614061) 或同源同型对照抗体 (PE,MOPC-21,批号:B197832),全部均为2.5μg/ml。在染色之前,留出额外的样品以用于单染色补偿对照 (CD45-FITC、CD45-PE、CD45-PECy7、CD45-APC和CD45-BV605;全部为克隆体H130)。接着将样品在FACS缓冲液中洗涤三次且在室温下在暗处在1×固定-透化缓冲液 (Foxp3染色试剂盒,eBioscience公司,批号:E00029-1691) 中培育45分钟。在固定后,将细胞在1×透化缓冲液 (Foxp3染色试剂盒,

eBioscience公司)中洗涤三次且在4℃下与在1×透化缓冲液中稀释的2.5μg/ml的抗FOXP3 (eFluor450,PCH101,批号:E11056-1635)或大鼠IgG2a (eFluor450,eBR2a,批号:E08519-1633)抗体一起培育45分钟。将样品在1×透化缓冲液中洗涤两次,再悬浮于FACS缓冲液中,且使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences公司)分析。

[0428] 如图3A中所示,活化的nTreg在细胞表面上表达GITR和OX40两者。

[0429] 为了评定对Fc γ RIIIA报告细胞的影响,将活化8天的125,000个nTreg与递增浓度(6点剂量滴定,0.04μg/ml至10μg/ml)的DuoBody pab1876×pab2049、二价单特异性抗体pab1876、二价单特异性抗体pab2049、或同型对照抗体一起培育。在37℃和5%CO<sub>2</sub>下将表达Fc γ RIIIA<sup>V158</sup>的NFAT报告细胞于补充有4%热灭活低IgG FBS的RPMI培养基中以1:1比率(125,000个细胞)添加至抗体-nTreg混合物中。在20小时培育之后,将Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶分析受质(Promega公司,G720A)添加至各样品中(1:1v/v)。使用EnVision<sup>®</sup>多标记盘读取器(Perkin-Elmer公司)量测发光。使用FACS DIVA和WEHIWeasel软件的组合分析FACS图。用Graphpad Prism软件对数据进行作图。

[0430] 与相较于二价单特异性抗体pab1876和pab2049,DuoBody pab1876×pab2049显示增强的与共表达GITR和OX40的细胞的结合的观测结果(图2A)相一致,在结合共表达GITR和OX40的nTreg时,与pab1876和pab2049相比,DuoBody pab1876×pab2049表达出较强的Fc γ RIIIA活化(图3B)。

[0431] 此外,使用上文所述的表达Fc γ RIIIA的报告细胞系以及表达GITR或OX40而非表达两者的靶细胞来评估DuoBody pab1876×pab2049接合GITR或OX40且经由Fc γ RIIIA进行信号传导的能力。简言之,对表达GITR或OX40的Jurkat靶细胞进行计数且将其以6×10<sup>6</sup>个细胞/毫升的浓度再悬浮于含4%低IgG FBS的RPMI-1640中。向多个96孔白色分析盘的内部60个孔中,向各孔中添加25μl的细胞悬浮液。以10μg/ml的起始最终浓度用3倍稀释液连续稀释测试抗体。在两个重复孔中,将25μl的各抗体稀释液添加至靶细胞中。最终,将表达Fc γ RIIIA<sup>V158</sup>的NFAT报告细胞以6×10<sup>6</sup>个细胞/毫升的浓度再悬浮于含4%低IgG FBS的RPMI-1640中。将25μl的报告细胞添加至各孔中,从而产生1:1的效应细胞与靶细胞的比率。在37℃和5%CO<sub>2</sub>下将盘培育20小时。在此培育后,将Bio-Glo荧光素酶分析试剂(Promega公司)在室温下解冻且将75μl添加至96孔白色分析盘各孔中。在5分钟-10分钟内,使用EnVision多标记盘读取器(PerkinElmer公司)量测发光。将背景发光(空白外部孔)自各样品读数中扣除且记录调整的相对光单位(RLU)。用Graphpad Prism软件对数据进行作图。所测试的抗体为:DuoBody pab1876×pab2049、二价抗GITR抗体pab1876 (F405L/F405L)、二价抗OX40抗体pab2049 (K409R/K409R)、DuoBody pab1876×同型、DuoBody pab2049×同型和同型对照抗体。抗体pab1876 (F405L/F405L)在两个重链恒定区中包含F405L取代且抗体pab2049 (K409R/K409R)在两个重链恒定区中包含K409R取代,其是根据EU编号系统来编号。

[0432] 对于仅表达GITR或OX40而非表达两者的细胞,与DuoBody pab1876×pab2049的结合弱于pab1876和pab2049的结合的观测结果(图2B和2C)相一致,当结合表达GITR或OX40而非表达两者的Jurkat细胞时,与pab1876 (F405L/F405L)和pab2049 (K409R/K409R)相比,在所测试的除最高浓度以外的所有浓度下,DuoBody pab1876×pab2049表达出较弱的Fc γ RIIIA活化(图3C和3D)。

[0433] 8.2.4抗GITR/OX40双特异性抗体对NK细胞介导的ADCC活性的作用

[0434] 在此实施例中,研究DuoBody pab1876×pab2049诱导对共表达GITR和OX40的细胞的自然杀手(NK)细胞介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。

[0435] 使用磁性珠粒分离(MACS,Miltenyi公司,130-094-775)将经由ficoll梯度(ResearchBlood Components有限责任公司)自健康供者白细胞层分离的人类PBMC针对效应T细胞或自然Treg进一步增浓。在37℃和5%CO<sub>2</sub>下在补充有10%热灭活FBS的RPMI培养基中用CD3-CD28微珠(1:1珠粒:细胞,Invitrogen公司,11132D)和重组人类IL-2(20U/ml用于效应T细胞;100U/ml用于Treg)(Peprotech公司,200-02)将增浓的效应T细胞或Treg活化7天。在刺激后,经由流式细胞术评估细胞的GITR和OX40表达。为了减少非特异性地结合,在环境温度下将细胞与FcγR阻断抗体(Biolegend公司,422302)一起培育15分钟。接着将样品洗涤两次且在4℃下与CD3、CD4、CD8、和CD25的谱系抗体组以及可固定的活/死标记一起培育30分钟。对于Treg划分,接着将样品洗涤两次,固定,透化,且在4℃下与抗FOXP3抗体(eBiosciences公司,克隆体#PCH101)一起培育30分钟。接着将样品洗涤两次且使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences公司)分析。使用FACS DIVA和WEHI Weasel软件的组合分析流式细胞术图。为了评估ADCC活性,经由磁性珠粒分离(MACS,Miltenyi公司,130-092-657)自健康供者PBMC中分离原生NK细胞。将NK细胞与20U/ml的重组人类IL-2(Peprotech公司,200-02)一起静置隔夜。将NK细胞与靶细胞(效应T细胞或Treg)一起共培养且在补充有热灭活0.5%FBS的RPMI 1640无酚红培养基中以10:1的E:T比率与抗体(滴定范围:0.0004至1.9μg/ml)一起培育4小时。存在五个处理组:同型对照、单独pab1876、单独pab2049、DuoBody pab1876×pab2049和pab1876与pab2049的组合。在最后一组中,将pab1876与pab2049以等莫耳浓度添加以达成与其他组相同的最终浓度。在各孔中以100μl的总体积添加总共2×10<sup>5</sup>个靶细胞(效应T细胞或Treg)和2×10<sup>6</sup>个NK细胞。在培育后,使用CytoTox 96非放射性细胞毒性分析(Promega公司,G1780),根据制造商的说明书来量测如由乳酸脱氢酶(LDH)释放所证实的细胞裂解。细胞毒性(细胞裂解%)是使用下式来确定:细胞毒性%=(实验-效应细胞自发-靶细胞自发)/(靶细胞最大-靶细胞自发)×100。

[0436] 如图3E中所示,与活化的效应T细胞相比,活化的Treg表达较高含量的GITR和OX40。与上述差异表达模式相一致,针对GITR和/或OX40的抗体未诱导高于背景水平的显著的活化效应T细胞裂解(图3F),而相同抗体以剂量依赖性方式诱导对活化的Treg强烈的NK细胞介导的ADCC活性(图3G)。值得注意的是,与单独pab1876、单独pab2049或pab1876和pab2049的组合相比,DuoBody pab1876×pab2049诱导较高度度的活化Treg裂解。

[0437] 8.2.5在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后抗GITR/OX40双特异性抗体对人类T细胞的作用

[0438] 在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后评估DuoBody pab1876×pab2049对原生人类T细胞的功能活性。简言之,在37℃和5%CO<sub>2</sub>下将经由Ficoll梯度(Research Blood Components有限责任公司)自健康供者白细胞层分离的PBMC在补充有100ng/ml SEA超抗原(Sigma-Aldrich公司)和10%热灭活FBS以及递增浓度的测试抗体(7点剂量滴定,0.02至20μg/ml)的RPMI培养基中培育5天。在培育后,使用AlphaLISA免疫分析(Perkin-Elmer公司)分析无细胞上清液中的IL-2产生。使用EnVision<sup>®</sup>多标记盘读取器(Perkin-Elmer公司)收集数据且使用IL-2标准曲线确定IL-2的浓度。将值使用Graphpad Prism软件内插和作图。

[0439] DuoBody pab1876×pab2049在所述使用来自两个供者的细胞的原生人类PBMC分

析中诱导IL-2产生(图4A和4B)。重要的是,DuoBody pab1876×pab2049能够以药理学相关抗体浓度诱导高度的IL-2产生。由DuoBody pab1876×pab2049诱导的IL-2产生为在较宽的抗体浓度范围(例如图4A中的0.08μg/ml至20μg/ml和图4B中的0.009μg/ml至20μg/ml)内抗体浓度的实质上递增函数。

[0440] 8.3实施例3:作为拮抗剂抗体的抗GITR/OX40双特异性抗体

[0441] GITR和OX40信号传导的活化依赖于受体簇集以形成较高级的受体复合物,其有效募集顶端衔接蛋白以驱动细胞内信号转导。不受理论所束缚,章节8.2.4中所示的DuoBody pab1876×pab2049的促效活性的一个可能的机制是通过经由辅助骨髓或淋巴样细胞(例如树突细胞、单核球、巨噬细胞、自然杀手(NK)细胞和/或B细胞)上Fc-Fc受体(FcR)的共接合以使GITR受体和/或OX40受体簇集。表达FcR的一些肿瘤细胞亦可介导抗体簇集,例如血液学癌症(急性骨髓性白血病(AML)、浆细胞癌和非霍奇金氏淋巴瘤(NHL))以及某些实体(上皮)肿瘤细胞(例如黑素瘤)。因此,研发抗GITR/OX40双特异性拮抗剂抗体的一种方法为选择与GITR配体(GITRL)和OX40配体(OX40L)竞争结合其对应受体的双特异性抗体且减少或消除双特异性抗体的Fc区与Fc受体的结合。在此实施例中,研发两种报导基因试验以首先确认在不存在FcR相互作用的情况下DuoBody pab1876×pab2049的促效活性的损失,且其次研究DuoBody pab1876×pab2049拮抗GITRL和OX40L经由GITR和OX40受体诱导的信号传导的能力。

[0442] 8.3.1抗GITR/OX40双特异性抗体对GITR NF-κB-荧光素酶报告细胞的作用

[0443] 首先,使用GITR报导基因试验评估DuoBody pab1876×pab2049对GITR的促效活性。所述报导基因试验是使用表达最少量(若存在)的FcR的Jurkat细胞来构建,从而减小FcR介导的GITR分子簇集的可能性。

[0444] 通过将慢病毒载体(EF1a启动子)转导至Jurkat细胞中来产生异位表达GITR和NF-κB-荧光素酶(纳米荧光素酶, NanoLuc<sup>®</sup>)报告体的细胞。经由单细胞分选(FACS ARIA Fusion)产生稳定克隆体。通过流式细胞术验证GITR的表达。为评估促效活性,在37°C和5% CO<sub>2</sub>下在补充有10%热灭活FBS的RPMI培养基中将Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶细胞与递增浓度的DuoBody pab1876×pab2049或三聚体GITRL(12点剂量滴定,0.05至10,000ng/ml)一起培育2小时。对于检测荧光素酶活性,在室温下在被动裂解缓冲液中将样品与所制备的Nano-Glo<sup>®</sup>荧光素酶分析受质(Promega公司,1:1v/v)一起培育5分钟。使用EnVision<sup>®</sup>多标记盘读取器(Perkin-Elmer公司)收集数据。将值使用Graphpad Prism软件作图。

[0445] 与诱导高度的如由RLU(相对荧光素酶单位)所表示的NF-κB-荧光素酶活性的三聚体GITRL相反,DuoBody pab1876×pab2049甚至在所测试的最高浓度下亦显示最低的GITR报告细胞促效活性(图5A)。

[0446] 随后,研究DuoBody pab1876×pab2049中和GITRL诱导的NF-κB信号传导的能力,所述能力为DuoBody的配体阻断活性的替代结果。

[0447] 简言之,将Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶细胞与递增浓度的DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体(10点剂量滴定,0.5至10,000ng/ml)一起培育30分钟。接着将样品用RPMI洗涤两次,再悬浮于1μg/ml的三聚体GITRL中且在37°C下再培育2小时。如上文所述检测且分析荧光素酶活性。为确定GITRL活性%,将在不添加抗体的情况下GITRL(1μg/



ml)的RLU值确定为100%活性。相应计算DuoBody pab1876×pab2049和同型对照的相对值。

[0448] 如图5B中所示, Jurkat-huGITR-NF-κB-荧光素酶报告细胞与递增浓度的DuoBody pab1876×pab2049预培育以剂量依赖性方式显著降低GITRL诱导的NF-κB-荧光素酶活性。

[0449] 8.3.2抗GITR/OX40双特异性抗体对OX40NF-κB-荧光素酶报告细胞的作用

[0450] 类似地, 研发OX40报导基因试验以测试DuoBody pab1876×pab2049对表达OX40的细胞的促效活性。此OX40报导基因试验亦使用FcR表达最低的Jurkat细胞来构筑。

[0451] 通过将慢病毒载体(EF1a启动子)转导至Jurkat细胞中来产生异位表达OX40和NF-κB-荧光素酶(纳米荧光素酶, NanoLuc<sup>®</sup>)报告体的细胞。经由单细胞分选(FACS ARIA Fusion)产生稳定克隆体。通过流式细胞术验证OX40的表达。为评估促效活性, 在37°C和5% CO<sub>2</sub>下在补充有10%热灭活FBS的RPMI培养基中将Jurkat-huOX40-NF-κB-荧光素酶细胞与递增浓度的多聚体OX40L、DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体(10点剂量滴定, 0.5至10,000ng/ml)一起培育2小时。对于检测荧光素酶活性, 在室温下在被动裂解缓冲液中将样品与所制备的Nano-Glo<sup>®</sup>荧光素酶分析受质(Promega公司, 1:1v/v)一起培育5分钟。使用EnVision<sup>®</sup>多标记盘读取器(Perkin-Elmer公司)收集数据。将值使用Graphpad Prism软件作图。

[0452] 虽然多聚体OX40L在较宽的浓度范围内诱导NF-κB-荧光素酶活性, 但在与DuoBody pab1876×pab2049一起培育之后观测到最小的荧光素酶信号(图6A)。

[0453] 随后, 评定DuoBody pab1876×pab2049阻断OX40L诱导的NF-κB信号传导的能力。将Jurkat-huOX40-NF-κB-荧光素酶细胞与递增浓度的DuoBody pab1876×pab2049或同型对照抗体(10点剂量滴定, 0.5至10,000ng/ml)一起培育30分钟。接着将样品用RPMI洗涤两次, 再悬浮于1μg/ml的多聚体OX40L中且在37°C下再培育2小时。如上文所述检测且分析荧光素酶活性。为确定OX40L活性%, 将在不添加抗体的情况下OX40L(1μg/ml)的RLU值确定为100%活性。相应计算DuoBody pab1876×pab2049和同型对照的相对值。

[0454] 如图6B中所示, Jurkat-huOX40-NF-κB-荧光素酶报告细胞与递增浓度的DuoBody pab1876×pab2049预培育以剂量依赖性方式显著降低OX40L诱导的NF-κB-荧光素酶活性。

[0455] 8.4实施例4: 抗GITR抗体的表位定位

[0456] 此实施例表征下列抗GITR抗体的结合表位: 嵌合亲本231-32-15抗体和其人类化型式(pab1876、pab1875、pab1967、pab1975和pab1979)。此外, 在一些研究中亦使用命名为m6C8的参考抗GITR抗体来进行比较。抗体m6C8是基于PCT申请公布第WO 2006/105021号(以引用方式并入本文)中所提供的抗体6C8的可变区来产生。对应于此等抗GITR抗体的重链可变区和轻链可变区的SEQ ID NO列于表12中。

[0457] 表12. 抗GITR抗体的VH和VL序列

抗体	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
[0458] 231-32-15	101	102
pab1876	18	19

抗体	VH (SEQ ID NO:)	VL (SEQ ID NO:)
pab1875	18	103
pab1967	20	21
pab1975	22	23
pab1979	24	23
m6C8	104	105

[0460] 8.4.1表位竞争——细胞结合分析

[0461] 为确认人类化变异抗体保留嵌合231-32-15亲本抗体的表位特异性,进行细胞结合分析。收集表达嵌合亲本231-32-15抗体的1624-5前B细胞且将 $1 \times 10^6$ 个细胞再悬浮于200 $\mu$ l FACS缓冲液加上以下物质中:i)与2 $\mu$ g嵌合亲本231-32-15抗体预培育15分钟生物素化的GITR(GITR-bio)(1:1000);ii)与2 $\mu$ g pab1875预培育15分钟GITR-bio(1:1000);iii)与2 $\mu$ g pab1876预培育15分钟GITR-bio(1:1000);或iv)GITR-bio(1:1000)。将细胞在4 $^{\circ}$ C下培育20分钟且接着用4ml FACS缓冲液洗涤且在4 $^{\circ}$ C下以300g离心5分钟。将细胞沉淀物再悬浮于200 $\mu$ l FACS缓冲液加上链霉亲和素-PE(1:1000)中且接着如前所述培育和洗涤。接着将细胞再悬浮于200 $\mu$ l FACS缓冲液中以使用FACS-AriaII(BD Biosciences公司)分析。

[0462] 图7显示人类化变异抗体保留嵌合亲本231-32-15抗体的表位特异性。右侧曲线显示GITR-bio与表达嵌合亲本231-32-25抗体的1624-5前B细胞的结合。然而,当将GITR-bio与嵌合亲本231-32-15、pab1875或pab1876抗体预培育时,存在GITR-bio与1624-5细胞的结合损失(左侧曲线)。重迭的FACS曲线表明人类化变异体亦彼此且与嵌合亲本231-32-15抗体显示极相似的GITR结合特性。

[0463] 8.4.2表位竞争——悬浮数组技术

[0464] 将抗GITR抗体(25 $\mu$ l)在分析缓冲液(Roche公司,11112589001)中稀释至2 $\mu$ g/ml且在暗处在振荡条件下在0.5ml LoBind管(Eppendorf公司,0030108.116)中与偶联抗人类IgG(F(ab)<sub>2</sub>特异性,JIR公司,105-006-097)的1500个Luminex<sup>®</sup>珠粒(5 $\mu$ l,Luminex公司,编号:5LC10005-01)一起培育隔夜。接着将此混合物转移至预润湿的96孔过滤盘(Millipore公司,MABVN1250)中。将盘用200微升/孔PBS洗涤两次以移除未结合的抗体。同时,在暗处以650rpm将20 $\mu$ g/ml的相同抗GITR抗体、不同抗GITR抗体、或分析缓冲液与20 $\mu$ l(1 $\mu$ g/ml)R-PE标记的GITR抗原(R&D systems公司,二硫键连接的同二聚体;689-GR;内部用AbDSerotec公司的LYNX试剂盒(LNK022RPE)标记)一起培育1小时。将珠粒混合物与抗原/抗体混合物1:1混合(各20 $\mu$ l)且在振荡条件(20 $^{\circ}$ C、650rpm)下再培育一小时。在量测之前直接将40 $\mu$ l的分析缓冲液添加至各孔中且使用Luminex<sup>®</sup> 200系统(Millipore公司)和48 $\mu$ l样品体积中100个珠粒的读数进行分析。使用非竞争对照(100%结合,仅分析缓冲液作为竞争化合物)的MFI值来确定结合。

[0465] 当使用嵌合亲本231-32-15抗体作为捕捉抗体时,观测到与人类化抗体pab1875和pab1876两者的完全结合竞争。当使用抗GITR抗体m6C8作为捕捉抗体时,未观测到与嵌合亲本231-32-15抗体或两种人类化变异体pab1875和pab1876的结合竞争(数据未示)。此等结

果表明m6C8与本文所述的抗GITR抗体识别人类GITR上的不同表位。

[0466] 8.4.3表位竞争——表面等离子体共振

[0467] 对于使用表面等离子体共振的表位框并 (epitope binning), 使用“串联方法” (AbdicheYN等人, (2009) *Analytical Biochemistry*, 386:172-180)。为了所述目的, 使用不同密度的GITR抗原 (R&D systems公司, 二硫键连接的同二聚体; 689-GR) 的固定在CM5传感器芯片 (GE Healthcare公司, S CM5系列, BR-1005-30) 上产生不同芯片表面。流槽2容纳低密度 (667RU) 的GITR抗原, 在流槽3中评定中等密度 (1595RU) 且在流槽4中, 达成高密度 (4371RU)。在流槽1中, 固定卵白蛋白 (1289RU, Pierce ThermoFisher公司, 77120) 用于参考。根据来自制造商 (GE Healthcare公司) 的用于胺偶联的标准方案 (用0.4M EDC和0.1M NHS活化表面, GE Healthcare胺偶联试剂盒, BR-1000-50) 来进行固定。用1M乙醇-胺-HCl (pH 8.5) 使未反应基团失活。之后, 使300nM (45 $\mu$ g/ml) 浓度的抗GITR抗体以5 $\mu$ l/分钟通过不同表面, 持续240秒。使用此等条件, 应已达到GITR表面的饱和。在添加竞争性抗体 (300nM, 5 $\mu$ l/分钟) 之前包括60秒的解离时间。使用10mM甘氨酸 (pH 2.0) (GE Healthcare公司, BR-1003-55) 以10 $\mu$ l/分钟进行芯片表面的再生, 持续60秒。使用非竞争对照 (100%结合, 饱和条件) 的反应单位 (RU) 数进行框并。

[0468] 如图8中所示, 当嵌合亲本231-32-15抗体首先结合至GITR时, 不存在此抗体的进一步结合。然而, 当嵌合亲本231-32-15抗体首先结合至GITR且施加抗体m6C8时, 此抗体仍能结合至GITR。

[0469] 8.4.4表位定位——PCR突变诱发和丙氨酸扫描

[0470] 为了定位GITR上与本文所述的抗GITR抗体结合的表位, 使用易错PCR产生人类GITR抗原的变异体。使变异型GITR蛋白表达在细胞文库中细胞的表面上且针对抗GITR抗体的结合筛选此等细胞。作为阳性对照, 使用多克隆抗GITR抗体确认GITR蛋白质的正确折迭。对于存在减少的抗体结合或不存在抗体结合的人类GITR抗原变异体, 进行丙氨酸扫描突变诱发以确定为由本文所述的抗GITR抗体结合所需的精确表位残基。

[0471] 8.4.4.1人类GITR变异体的产生

[0472] 使用易错PCR突变诱发以产生在细胞外结构域中具有随机突变的人类GITR变异体。对于易错PCR, 根据制造商的说明书使用GeneMorphII随机突变诱发试剂盒 (Stratagene公司)。简言之, 使用作为模板的内部构筑体 (13ng, 构筑体编号: 4377pMA-T-huGITR)、0.05U/ $\mu$ l Mutazyme II DNA聚合酶、1 $\times$ Mutazyme II反应缓冲液、0.2 $\mu$ M的各引子和0.2mM各脱氧核苷三磷酸 (dATP、dCTP、dGTP和dTTP) 以50 $\mu$ l的体积进行20个PCR循环。使用下列程序通过PCR (德国Eppendorf公司) 扩增样品: 95 $^{\circ}$ C持续2分钟; 95 $^{\circ}$ C持续30秒、56 $^{\circ}$ C持续30秒、72 $^{\circ}$ C持续1分钟的20个循环; 和72 $^{\circ}$ C持续10分钟的最终延伸步骤。使用1%琼脂糖凝胶对PCR产物进行凝胶纯化, 将对应于720bp的预期尺寸的DNA条带剪出且使用NucleoSpin凝胶和PCR净化试剂盒 (Macherey&Nagel公司) 根据产品手册进行凝胶提取。使用T4DNA连接酶和1:3的比率 (载体:插入物) 经由XhoI/EcoRI位点将纯化的DNA连接至内部表达载体中。在2小时之后用在65 $^{\circ}$ C下进行10分钟的热变性步骤停止连接 (25 $^{\circ}$ C)。使用酵母t-RNA使来自连接反应的DNA进行EtOH沉淀。使用标准消化和连接技术。将连接反应物电穿孔至DH10B细胞 (大肠杆菌ElectroMax DH10B电感受态细胞, Invitrogen公司; 1900V/5ms) 中。将电穿孔的细菌接种至LB琼脂+100 $\mu$ g/ml安比西林 (ampicillin) 平板上且获得约 $1.9 \times 10^8$ 个菌落。

[0473] 接着自平板刮下所有电穿孔的细菌且用于根据制造商的说明书进行大规模DNA质粒制备 (Macherey&Nagel公司, NucleoBond Xtra Maxi Plus试剂盒) 以产生DNA文库。使用XhoI/EcoRI和BsrGI/EcoRI进行限制酶消化以对文库进行质量控制。挑取单一克隆体且送去定序以确定最终的文库多样性。

[0474] 8.4.4.2具有人类GITR变异体的细胞文库的产生

[0475] 使用先转染, 继而转导的标准技术以在1624-5细胞表面上表达人类GITR突变体。对于反转录病毒颗粒的产生, 使用X-tremeGENE 9DNA转染试剂 (德国Roche Diagnostics有限公司) 将DNA文库和表达反转录病毒蛋白质Gag、Pol和Env的载体转染至反转录病毒包装细胞系 (HEK细胞) 中。所得的反转录病毒颗粒在反转录病毒包装细胞的细胞培养上清液中积聚。在转染后两天时, 收集无细胞的含有病毒载体颗粒的上清液且对1624-5细胞进行旋感染 (spin-infection)。获得约4%的转导效率 (表达人类GITR的细胞%)。在再连续培养至少一天时, 使用嘌呤霉素 (1.5 $\mu$ g/ml) 选择细胞。未转导的细胞用作阴性对照 (NC)。在抗生素选择之后, 大部分细胞在细胞表面上稳定表达人类GITR抗原文库。经由Ficoll分离步骤移除非存活细胞。

[0476] 使用FACS以使用多克隆抗GITR抗体选择表达正确折迭的人类GITR突变体的细胞且随后选择表达不结合抗GITR嵌合亲本231-32-15抗体的人类GITR变异体的个别细胞。简言之, 通过FACS分析抗体结合细胞且通过制备型高速FACS (FACSAriaII, BD Biosciences公司) 将表达出特异性抗体结合的细胞与非结合细胞群组体分离。在组织培养中再次扩增抗体反应性或非反应性细胞池且由于反转录病毒转导的细胞的稳定表达表型, 重复抗体导向细胞分选和组织培养扩增的循环, 直至获得明确可检测的抗GITR抗体 (嵌合亲本231-32-15) 非反应性细胞群组体之时为止。对此抗GITR抗体 (嵌合亲本231-32-15) 非反应性细胞群组体进行最终的单细胞分选步骤。在细胞扩增数日之后, 在FACSCalibur (BD Biosciences公司) 上使用96孔板分析再次测试单细胞分选的细胞与抗GITR嵌合亲本231-32-15抗体的非结合和与多克隆抗GITR抗体的结合。

[0477] 8.4.4.3表位分析

[0478] 为了使表型 (多克隆抗GITR+、嵌合亲本231-32-15-) 与基因型相关联, 对单细胞分选的huGITR变异体进行定序。图9A和9B显示来自此等变异体的序列的比对。图9A和9B中的氨基酸残基是根据人类GITR的未成熟氨基酸序列 (SEQ ID NO:41) 来编号。定序识别出具有增加的突变或“热点” (例如P62和G63) 的区域, 从而提供有关人类GITR上由抗GITR嵌合亲本231-32-15抗体识别的表位的指示。

[0479] 为了确认人类GITR的参与结合抗GITR抗体的精确氨基酸, 对热点氨基酸进行丙氨酸置换。分别将下列位置 (根据SEQ ID NO:41编号) 突变成丙氨酸: P28A、T29A、G30A、G31A、P32A、T54A、T55A、R56A、C57A、C58A、R59A、D60A、Y61A、P62A、G63A、E64A、E65A、C66A、C67A、S68A、E69A、W70A、D71A、C72A、M73A、C74A、V75A和Q76A。使用先转染, 继而转导的标准技术以在1624-5细胞表面上表达此等人类GITR丙氨酸突变体。

[0480] 最终, 在流式细胞术 (FACSCalibur; BD Biosciences公司) 中测试1624-5细胞上表达的丙氨酸突变体与抗GITR人类化抗体pab1876、pab1967、pab1975和pab1979以及参考抗体m6C8的结合。简言之, 在4 $^{\circ}$ C下将表达个别人类GITR丙氨酸突变体的1624-5细胞与在100 $\mu$ l FACS缓冲液 (PBS+2%FCS) 中稀释的2 $\mu$ g/ml的单克隆抗GITR抗体pab1876、pab1967、

pab1975、pab1979或m6C8;或与APC结合的多克隆抗GITR抗体(AF689,R&D systems公司)、和Fc受体阻断剂(1:200;BD公司,目录号:553142)一起培育20分钟。在洗涤后,若需要检测,则在4℃下将细胞与在100μl FACS缓冲液(PBS+2%FCS)中稀释的二级抗IgG抗体(与APC结合;BD公司,目录号:109-136-097)一起培育20分钟。接着洗涤细胞且使用流式细胞仪(BD Biosciences公司)获得细胞。将测试的单克隆抗体的平均荧光强度(MFI)值除以多克隆抗体的MFI值,从而产生个别GITR丙氨酸突变体的MFI比率(单克隆抗体/多克隆抗体)。基于所有突变体的个别MFI比率计算平均MFI比率(“AMFI比率”)。图10A为汇总pab1876、pab1967、pab1975、pab1979和参考抗体m6C8与表达人类GITR丙氨酸突变体的1624-5细胞的结合的表。认为高于AMFI比率的60%的个别MFI比率指示在归一化(normalization)之后与多克隆抗体相似的结合且在图10A中由“+”表示。介于AMFI比率的30%与60%之间的个别MFI比率在图10A中由“+/-”表示。低于AMFI比率的30%的个别MFI比率在图10A中由“-”表示。

[0481] 如图10A中所示,D60A突变体和G63A突变体(根据SEQ ID NO:41来编号)特异性破坏或减弱pab1876、pab1967、pab1975和pab1979的结合,而不破坏或减弱参考抗体m6C8的结合。C58A突变体破坏所有五种抗体的结合且可能为结构突变,而非表位特异性突变。C74A突变体具有较弱的表达且不能用于结合比较。

[0482] 此外,比较抗GITR抗体231-32-15、pab1876和m6C8与野生型或突变型人类GITR的结合。简言之,如上文所述使野生型人类GITR和两种GITR丙氨酸突变体(D60A突变体和G63A突变体,其是根据SEQ ID NO:41编号)在1624-5细胞表面上表达且如上文所述在流式细胞术分析中测试,其中将细胞首先使用2μg/ml的单克隆抗体231-32-15、pab1876和m6C8、或与APC结合的多克隆抗体染色,且接着若需要检测,则使用二级抗IgG抗体(与APC结合;1:1000;BD公司,目录号:109-136-097)染色。将所有平均荧光强度(MFI)值计算为两次量测的平均值。将所测试的单克隆抗体对特定细胞类型的MFI值除以多克隆抗体对相同细胞类型的MFI值,从而产生总共九个MFI比率(单克隆抗体/多克隆抗体):MFI比率<sub>231-32-15,WT</sub>、MFI比率<sub>pab1876,WT</sub>、MFI比率<sub>m6C8,WT</sub>、MFI比率<sub>231-32-15,D60A</sub>、MFI比率<sub>pab1876,D60A</sub>、MFI比率<sub>m6C8,D60A</sub>、MFI比率<sub>231-32-15,G63A</sub>、MFI比率<sub>pab1876,G63A</sub>和MFI比率<sub>m6C8,G63A</sub>。通过将GITR丙氨酸突变体的特定MFI比率除以野生型的相应MFI比率(例如用MFI比率<sub>pab1876,D60A</sub>除以MFI比率<sub>pab1876,WT</sub>)来计算相对于与野生型GITR的结合,抗体与GITR丙氨酸突变体的结合百分比。结合减少百分比是通过计算例如 $100\% \times (1 - (\text{MFI比率}_{\text{pab1876,D60A}} / \text{MFI比率}_{\text{pab1876,WT}}))$ 来确定。

[0483] 如图10B中所示,D60A突变体和G63A突变体特异性破坏或减弱231-32-15和pab1876的结合,而不破坏或减弱m6C8的结合。图10B中所示的百分比为各图中GITR阳性细胞的百分比。当使用表达GITR D60A的细胞测试时,231-32-15和pab1876的抗体结合分别减少82%和88%,相比之下,m6C8的抗体结合减少10%。类似地,当使用表达GITR G63A的细胞测试时,231-32-15和pab1876的结合分别减少37%和59%,而m6C8的结合增加62%。

[0484] 作为抗GITR抗体的结合特征的进一步证据,比较抗体与石蟹猕猴GITR的结合。石蟹猕猴GITR的未成熟蛋白质包含氨基酸序列SEQ ID NO:44。为了增加蛋白质表达,将石蟹猕猴GITR的信号肽的第一个残基置换为甲硫氨酸,从而产生V1M石蟹猕猴GITR。接着产生突变型石蟹猕猴GITR V1M/Q62P/S63G,其中位置62和63处的氨基酸残基(GlnSer)(根据SEQ ID NO:44编号)经人类GITR中的相应残基(ProGly)置换。图11A为人类GITR、V1M石蟹猕猴GITR、和V1M/Q62P/S63G石蟹猕猴GITR之间的序列比对。如上文所述使图11A中所示的三种

蛋白质在1624-5细胞表面上表达且如上文所述在流式细胞术分析中测试,其中将细胞首先使用2 $\mu$ g/ml的单克隆抗体231-32-15、pab1876和m6C8、或与APC结合的多克隆抗体染色,且接着使用二级抗IgG抗体(与APC结合;1:1000;BD公司,目录号:109-136-097)染色。

[0485] 如图11B中所示,抗GITR抗体231-32-15和pab1876显示仅与表达V1M/Q62P/S63G石蟹猕猴GITR的细胞结合,而不与表达V1M石蟹猕猴GITR的细胞结合。

[0486] 8.5实施例5:抗OX40抗体的表位定位

[0487] 此实施例表征抗OX40抗体pab1949w、pab2049和参考抗OX40抗体pab1928的表位。抗体pab1928是基于美国专利公布第US 2013/0280275号(以引用的方式并入本文中)中所提供的抗体Hu106-122的可变区而产生。pab1928包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的重链和氨基酸序列SEQ ID NO:107的轻链。

[0488] 8.5.1表位定位——丙氨酸扫描

[0489] 通过丙氨酸扫描评定pab1949w、pab2049和参考抗体pab1928的结合特征。简言之,使用QuikChange HT蛋白质工程改造系统(Agilent Technologies公司,G5901A)产生在细胞外结构域中具有丙氨酸取代的人类OX40突变体。如上文所述使用先转染,继而转导的标准技术使人类OX40突变体在1624-5细胞表面上表达。

[0490] 在如由在流式细胞术中与多克隆抗OX40抗体的结合所证实的表达正确折迭的人类OX40突变体的细胞中进一步选择表达不结合单克隆抗OX40抗体pab1949w、pab2049或pab1928的人类OX40突变体的子群组。通过制备型高速FACS(FACS Aria II, BD Biosciences公司)将表达出特异性抗体结合的细胞与非结合细胞群组体分离。在组织培养中再次扩增抗体反应性或非反应性细胞池且由于反转录病毒转导的细胞的稳定表达表型,重复抗体导向细胞分选和组织培养扩增的循环直至获得明确可检测的抗OX40抗体(pab1949w、pab2049或pab1928)非反应性细胞群组体之时为止。对此抗OX40抗体非反应性细胞群组体进行最终的单细胞分选步骤。在细胞扩增数日之后,再次使用流式细胞术来测试单细胞分选的细胞与多克隆抗OX40抗体的结合和与单克隆抗体pab1949w、pab2049或pab1928的非结合。简言之,将表达个别人类OX40丙氨酸突变体的1624-5细胞与单克隆抗OX40抗体pab1949w、pab2049或pab1928一起培育。对于各抗体,测试两个抗体浓度(pab1949w:2 $\mu$ g/ml和0.5 $\mu$ g/ml;pab2049:1.8 $\mu$ g/ml和0.3 $\mu$ g/ml;pab1928:1.1 $\mu$ g/ml和0.4 $\mu$ g/ml)。以1:2000稀释与APC结合的多克隆抗OX40抗体(AF3388,R&D systems公司)。添加Fc受体阻断剂(1:200;BD公司,目录号:553142),且在4 $^{\circ}$ C下将样品培育20分钟。在洗涤后,若需要检测,则在4 $^{\circ}$ C下将细胞与二级抗IgG抗体(与PE结合;BD公司,目录号:109-116-097)一起培育20分钟。接着洗涤细胞且使用流式细胞仪(BD Biosciences公司)获得细胞。

[0491] 为使表型(多克隆抗OX40抗体+、单克隆抗OX40抗体-)与基因型相关联,对单细胞分选的人类OX40突变体进行定序。图12为显示仍结合多克隆抗OX40抗体,但不结合单克隆抗OX40抗体pab1949w、pab2049或pab1928的人类OX40丙氨酸突变体的表。所有残基是根据人类OX40的成熟氨基酸序列(SEQ ID NO:72)编号。基于流式细胞术分析,“+”指示结合且“-”指示结合损失。

[0492] \*\*\*

[0493] 本发明的范畴不受本文所述的特定实施方案限制。实际上,除所述的修改之外,对本发明的各种修改对于本领域技术人员而言亦因上述描述和随附图式而将变得显而易见。

此等修改意欲落入随附权利要求的范畴内。

[0494] 本文引用的所有参考文献(例如公布或专利或专利申请)出于所有目的以全文引用的方式并入本文中,其引用程度就如同特定且个别指示各个别参考文献(例如公布或专利或专利申请案)出于所有目的以全文引用的方式并入本文中一般。

[0495] 其他实施方案落入随附的权利要求内。





<223> Xaa为Val或Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为Asp或Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa为Thr或Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16) .. (16)

<223> Xaa为Lys,Arg或Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa为Asp,Glu或Gly

<400> 2

Xaa Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Xaa Val Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa

1

5

10

15

Xaa

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR HCDR3共同序列 (pab1876/pab1967/pab1975/pab1979 HCDR3)

<400> 3

Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr

1

5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR LCDR1共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa为Gly或Ser

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Xaa Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Thr

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR LCDR2共同序列 (pab1876/pab1967/pab1975/pab1979 LCDR2)

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR LCDR3共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa为Asp或Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa为Tyr或Phe

<400> 6

Gln Asn Xaa Tyr Ser Xaa Pro Tyr Thr

1

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HCDR1

<400> 7

Asp Tyr Ala Met Tyr



<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1975 HCDR2

<400> 12

Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1979 HCDR2

<400> 13

Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1                    5                    10                    15

Glu

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876/pab1975/pab1979 LCDR1

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1                    5                    10                    15

Thr

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1967 LCDR1

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1                    5                    10                    15



100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 19		
<211> 113		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab1876 VL		
<400> 19		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
	20	25
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35	40
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
	50	55
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn		
	85	90
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
	100	105
110		
Lys		
<210> 20		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab1967 VH		
<400> 20		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		
	20	25
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40
Gly Leu Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		

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

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1967 VL

<400> 21

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

Lys

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1975 VH

<400> 22

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

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

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1975/pab1979 VL

<400> 23

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

Lys

<210> 24

<211> 118



<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1979 VH  
 <400> 24  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
           20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
           35                   40                   45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Gly Val Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
           50                   55                   60  
 Gln Glu Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
           85                   90                   95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
           100                   105                   110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115  
 <210> 25  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> GITR VH共同序列  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24) .. (24)  
 <223> Xaa为Gly或Ala  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31) .. (31)  
 <223> Xaa为Asp,Gly或Glu  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (35) .. (35)  
 <223> Xaa为Tyr或His

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (48) .. (48)  
 <223> Xaa为Ile或Met  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50) .. (50)  
 <223> Xaa为Val或Leu  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (57) .. (57)  
 <223> Xaa为Asp或Gly  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (59) .. (59)  
 <223> Xaa为Thr或Ser  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (65) .. (65)  
 <223> Xaa为Lys、Arg或Gln  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (66) .. (66)  
 <223> Xaa为Asp、Glu或Gly  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (68) .. (68)  
 <223> Xaa为Ala或Val  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (74) .. (74)  
 <223> Xaa为Lys或Thr  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (114) .. (114)  
 <223> Xaa为Val或Ile  
 <400> 25

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



<223> Xaa为Asp或Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (100) .. (100)

<223> Xaa为Tyr或Phe

<400> 26

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

Lys

<210> 27

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GITR VH种系IGHV1-2\*02

<400> 27

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

	85	90	95
Ala Arg			
<210> 28			
<211> 101			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> GITR VL种系IGKV4-1*01			
<400> 28			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser			
	20	25	30
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	85	90	95
Tyr Tyr Ser Thr Pro			
	100		
<210> 29			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> pab1876 HC IgG1			
<400> 29			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg	Leu Arg Ser Asp	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
	145	150	155
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	225	230	235
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
245	250	255	260
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	260	265	270
260	265	270	275
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
275	280	285	290
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
290	295	300	305
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
	305	310	315
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
325	330	335	340
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
340	345	350	355
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
355	360	365	370
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
370	375	380	



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

<210> 31

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 F405L

<400> 31



Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
                   115                    120                    125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
                   130                    135                    140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                   165                    170                    175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                   180                    185                    190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
                   195                    200                    205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                   210                    215                    220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                    230                    235                    240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                   245                    250                    255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
                   260                    265                    270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
                   275                    280                    285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
                   290                    295                    300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210> 32			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> pab1876 HC IgG1 F405L N297A			
<400> 32			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			

115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 33  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 F405L L234F L235E D265A  
 <400> 33  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240



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

355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 35		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab1876 HC IgG1 K409R N297A		
<400> 35		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		

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

<210> 36

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列





Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350  
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 37  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876w LC  
 <400> 37  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 <210> 38  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876 LC T109S  
 <400> 38  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Asn  
 85 90 95  
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 <210> 39  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 K409R L234F L235E D265A  
 <400> 39  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

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

<210> 40

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

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

<210> 41

<211> 241

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro  
                   20                   25                   30

Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg  
 35 40 45  
 Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu  
 50 55 60  
 Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His  
 65 70 75 80  
 Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro  
 85 90 95  
 Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys  
 100 105 110  
 Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys  
 115 120 125  
 Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro  
 130 135 140  
 Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys  
 165 170 175  
 Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu  
 180 185 190  
 Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val  
 195 200 205  
 Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu  
 210 215 220  
 Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp  
 225 230 235 240  
 Val  
 <210> 42  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 42  
 Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro  
 20 25 30  
 Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg  
 35 40 45  
 Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu

50	55	60															
Glu	Cys	Cys	Ser	Glu	Trp	Asp	Cys	Met	Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Phe	His		
65					70					75					80		
Cys	Gly	Asp	Pro	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	His	His	Pro	Cys	Pro	Pro		
				85					90					95			
Gly	Gln	Gly	Val	Gln	Ser	Gln	Gly	Lys	Phe	Ser	Phe	Gly	Phe	Gln	Cys		
			100					105					110				
Ile	Asp	Cys	Ala	Ser	Gly	Thr	Phe	Ser	Gly	Gly	His	Glu	Gly	His	Cys		
		115					120					125					
Lys	Pro	Trp	Thr	Asp	Cys	Cys	Trp	Arg	Cys	Arg	Arg	Arg	Pro	Lys	Thr		
		130					135					140					
Pro	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	Pro	Arg	Lys	Ser	Gly	Ala	Ser	Asp	Arg	Gln		
					145					150				155		160	
Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Trp	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Glu	Pro	Gly	Arg	Pro		
					165					170				175			
Pro	Gly	Pro	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Ala		
					180					185				190			
Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Trp	Gln		
					195					200				205			
Gln	Lys	Trp	Val	Gln	Glu	Gly	Gly	Ser	Asp	Gln	Arg	Pro	Gly	Pro	Cys		
					210					215				220			
Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Glu	Arg	Glu	Thr	Gln		
					225					230				235		240	
Ser	Trp	Pro	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Gly	Pro	Asp	Gly	Val	Gly	Ser			
					245					250				255			
<210>	43																
<211>	234																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<400>	43																
Met	Ala	Gln	His	Gly	Ala	Met	Gly	Ala	Phe	Arg	Ala	Leu	Cys	Gly	Leu		
1				5					10					15			
Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Pro	Thr	Gly	Gly	Pro		
				20					25					30			
Gly	Cys	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Thr	Asp	Ala	Arg		
				35					40					45			
Cys	Cys	Arg	Val	His	Thr	Thr	Arg	Cys	Cys	Arg	Asp	Tyr	Pro	Gly	Glu		
				50					55					60			
Glu	Cys	Cys	Ser	Glu	Trp	Asp	Cys	Met	Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Phe	His		



65		70		75		80
Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro						
		85		90		95
Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys						
		100		105		110
Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys						
		115		120		125
Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro						
		130		135		140
Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala						
145		150		155		160
Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys						
		165		170		175
Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu						
		180		185		190
Arg Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala						
		195		200		205
Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu						
		210		215		220
Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val						
225		230				
<210> 44						
<211> 234						
<212> PRT						
<213> 石蟹猕猴						
<400> 44						
Val Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu						
1		5		10		15
Ala Leu Leu Cys Ala Ala Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro						
		20		25		30
Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg						
		35		40		45
Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Gln Ser Glu						
		50		55		60
Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His						
65		70		75		80
Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser						
		85		90		95
Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys						

100	105	110
Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys		
115	120	125
Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro		
130	135	140
Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala		
145	150	155
Glu Pro Pro Gly Trp Leu Thr Ile Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys		
165	170	175
Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu		
180	185	190
Gly Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala		
195	200	205
Ser Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Ala Glu		
210	215	220
Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val		
225	230	
<210> 45		
<211> 234		
<212> PRT		
<213> 石蟹猕猴		
<400> 45		
Met Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu		
1	5	10
Ala Leu Leu Cys Ala Ala Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro		
20	25	30
Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg		
35	40	45
Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Gln Ser Glu		
50	55	60
Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His		
65	70	75
Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser		
85	90	95
Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys		
100	105	110
Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys		
115	120	125
Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro		

130	135	140
Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala		
145	150	155
Glu Pro Pro Gly Trp Leu Thr Ile Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys		
	165	170
Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu		
	180	185
Gly Lys Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala		
	195	200
Ser Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Ala Glu		
	210	220
Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val		
225	230	
<210> 46		
<211> 234		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> V1M/Q62P/S63G石蟹猕猴GITR未成熟蛋白		
<400> 46		
Met Ala Arg His Gly Ala Met Cys Ala Cys Gly Thr Leu Cys Cys Leu		
1	5	10
Ala Leu Leu Cys Ala Ala Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro		
	20	25
Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Asp Ala Arg		
	35	40
Cys Cys Arg Val His Pro Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu		
	50	55
Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Val Cys Val Gln Pro Glu Phe His		
65	70	75
Cys Gly Asn Pro Cys Cys Thr Thr Cys Gln His His Pro Cys Pro Ser		
	85	90
Gly Gln Gly Val Gln Pro Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Arg Cys		
	100	105
Val Asp Cys Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Gly His Asp Gly His Cys		
	115	120
Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro		
	130	140
Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala		



<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 LCDR1

<400> 50

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1                    5                    10                    15

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 LCDR2

<400> 51

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1                    5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049 LCDR3

<400> 52

Met Gln Gly Ser Lys Trp Pro Leu Thr

1                    5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1949 LCDR3

<400> 53

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 54

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049/pab1949 VH

<400> 54

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

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2049 VL

<400> 55

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

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

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1949 VL

<400> 56

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95

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

<210> 57

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OX40 HC种系IGHV3-73\*01

<400> 57

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

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

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr





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

355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		
<210> 60		
<211> 451		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 N297A		
<400> 60		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
225	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr			
	290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly Lys			
450			

<210> 61  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R  
 <400> 61  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                   120                   125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                   135                   140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                   165                   170                   175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                   180                   185                   190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                   195                   200                   205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
                   210                   215                   220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   245                   250                   255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 62  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R N297A  
 <400> 62  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		
<210> 63		
<211> 451		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab2049/pab1949 HC K409R L234F L235E D265A		
<400> 63		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly			
225	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His			
	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly Lys			
450			



<210> 64  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC F405L  
 <400> 64  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                   120                   125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                   135                   140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                   165                   170                   175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                   180                   185                   190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                   195                   200                   205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
                   210                   215                   220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   245                   250                   255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 65  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC F405L N297A  
 <400> 65  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		
<210> 66		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab2049/pab1949 HC IgG4 S228P		
<400> 66		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 219

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049w LC  
 <400> 67  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
                   20                   25                   30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                   40                   45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
                   50                   55                   60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
                   85                   90                   95  
 Ser Lys Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
                   115                   120                   125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                   130                   135                   140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                   165                   170                   175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
                   180                   185                   190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                   195                   200                   205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                   215  
 <210> 68  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049 LC T109S

&lt;400&gt; 68

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

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Pab1949w LC

&lt;400&gt; 69

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

	20		25		30														
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser				
	35		40		45														
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro				
	50		55		60														
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile				
65			70		75										80				
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala				
			85		90										95				
Leu	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
	100		105		110														
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu				
	115		120		125														
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe				
	130		135		140														
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln				
145			150		155										160				
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
			165		170										175				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
	180		185		190														
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
	195		200		205														
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210		215																
<210>	70																		
<211>	219																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	Pab1949 LC T109S																		
<400>	70																		
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly				
1			5		10										15				
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser				
	20		25		30														
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser				
	35		40		45														
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro				



50	55	60																		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile					
65	70	75	80																	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala					
	85	90	95																	
Leu	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
	100	105	110																	
Arg	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu					
	115	120	125																	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe					
130	135	140																		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln					
145	150	155	160																	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser					
	165	170	175																	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu					
	180	185	190																	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser					
	195	200	205																	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210	215																			
<210>	71																			
<211>	451																			
<212>	PRT																			
<213>	人工序列																			
<220>																				
<223>	pab2049/pab1949	HC	F405L	L234F	L235E	D265A														
<400>	71																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly					
1	5	10	15																	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ser					
	20	25	30																	
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val					
	35	40	45																	
Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Ala	Ala					
50	55	60																		
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr					
65	70	75	80																	
Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr					

85					90					95									
Tyr	Cys	Thr	Ser	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly				
100					105					110									
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser				
115					120					125									
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala				
130					135					140									
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val				
145					150					155					160				
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala				
165					170					175									
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val				
180					185					190									
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His				
195					200					205									
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys				
210					215					220									
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly				
225					230					235					240				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met				
245					250					255									
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His				
260					265					270									
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val				
275					280					285									
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr				
290					295					300									
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly				
305					310					315					320				
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile				
325					330					335									
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val				
340					345					350									
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
355					360					365									
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu				
370					375					380									
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
385					390					395					400				

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 72  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 72  
 Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
 1 5 10 15  
 Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
 20 25 30  
 Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
 65 70 75 80  
 Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
 85 90 95  
 Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
 100 105 110  
 Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
 115 120 125  
 Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
 130 135 140  
 Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
 165 170 175  
 Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly  
 180 185 190  
 Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala  
 195 200 205

Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys  
 210 215 220  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
 245  
 <210> 73  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 73  
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val  
 20 25 30  
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro  
 35 40 45  
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys  
 50 55 60  
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys  
 85 90 95  
 Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly  
 100 105 110  
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys  
 115 120 125  
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp  
 130 135 140  
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro  
 165 170 175  
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr  
 180 185 190  
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu  
 195 200 205  
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val  
 210 215 220



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

<210> 75

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1876 HC IgG1 N297A

<400> 75



305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210> 76			
<211> 447			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> pab1876 HC IgG1 F405L			
<400> 76			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			



115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445  
 <210> 77  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876 HC IgG1 F405L N297A  
 <400> 77  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240



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

355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210> 79		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab1876 HC IgG1 K409R		
<400> 79		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		

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

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列



Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445  
 <210> 81  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab1876 HC IgG4 S228P  
 <400> 81  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95



Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

	405		410		415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn					
	420		425		430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly					
	435		440		
<210> 82					
<211> 447					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> pab1876 HC IgG1 K409R L234F L235E D265A					
<400> 82					
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					
	20		25		30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe					
	50		55		60
Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
	100		105		110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro					
	115		120		125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly					
	130		135		140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn					
145	150		155		160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln					
	165		170		175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser					
	180		185		190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser					
	195		200		205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr					

210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro		
	260	265
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	275	280
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	325	330
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	355	360
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440
		445

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pab2049/pab1949 HC F405L L234F L235E D265A

&lt;400&gt; 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		



Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                   340                                  345                                  350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                   355                                  360                                  365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
                   370                                  375                                  380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                                   405                                  410                                  415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                                   420                                  425                                  430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                   435                                  440                                  445  
 Pro Gly  
           450  
 <210> 84  
 <400> 84  
 000  
 <210> 85  
 <400> 85  
 000  
 <210> 86  
 <400> 86  
 000  
 <210> 87  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> H-CDR1抗GITR共同序列  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa为Asp、Glu或Gly  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa为Ala或Val

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa为Tyr或His  
<400> 87  
Xaa Tyr Xaa Met Xaa  
1                    5  
<210> 88  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> H-CDR2抗GITR共同序列  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa为Val或Leu  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa为Arg、Lys或Gln  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa为Tyr或Phe  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa为Asp、Glu或Gly  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa为Val或Leu  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa为Thr或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE







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

<210> 94



	260		265		270														
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
	275						280					285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
	290						295					300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305						310				315					320				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
			325						330										

<210> 95  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人类IgG1 G1m17,1同种异型  
 <400> 95

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

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

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人类IgG1 G1m17,1,2同种异型

&lt;400&gt; 96

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

100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人类IgG4野生型恒定区

&lt;400&gt; 97

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		

	20		25		30												
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
	35						40				45						
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
	50					55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr		
65					70				75					80			
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85				90				95						
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
	100						105				110						
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
	115						120				125						
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
	130					135					140						
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
145					150				155					160			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe		
			165				170				175						
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
	180						185				190						
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu		
	195						200				205						
Ser	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
	210					215					220						
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
225					230					235				240			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
			245						250					255			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
	260						265				270						
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
	275						280				285						
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
	290					295					300						
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
305					310					315				320			
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys											
			325														

<210> 98  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> IgG4恒定区S228P修饰  
 <400> 98  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                   50                   55                   60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                   90                   95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                   100                   105                   110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
                   115                   120                   125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                   130                   135                   140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
                   165                   170                   175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
                   180                   185                   190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
                   195                   200                   205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
                   210                   215                   220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225                   230                   235                   240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                   245                   250                   255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 99

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG2野生型恒定区

<400> 99

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



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

<210> 100

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG2恒定区C127S修饰

<400> 100

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

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

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 231-32-15 VH

<400> 101

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

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

<210> 102

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 231-32-15 VL

<400> 102

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

Lys

<210> 103

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1875 VL

<400> 103

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

Lys

<210> 104

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m6C8 VH

<400> 104

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





370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
	405	410
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	420	425
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	435	440
Ser Pro Gly Lys		445
450		
<210> 107		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Pab1928 (Hu106-122) LC T109S		
<400> 107		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
	20	25
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40
Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg		
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala		
	100	105
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		

	165		170		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
	195		200		205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210				
<210> 108					
<211> 330					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成肽					
<400> 108					
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
1	5		10		15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr					
	20		25		30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser					
	35		40		45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser					
	50		55		60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr					
65	70		75		80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys					
	85		90		95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys					
	100		105		110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
	115		120		125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys					
	130		135		140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp					
145	150		155		160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu					
	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					



195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu		
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成肽

&lt;400&gt; 109

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

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

&lt;210&gt; 110

&lt;400&gt; 110

000

&lt;210&gt; 111

&lt;400&gt; 111

000

&lt;210&gt; 112

&lt;400&gt; 112

000

&lt;210&gt; 113

&lt;400&gt; 113

000

<210> 114  
 <400> 114  
 000  
 <210> 115  
 <400> 115  
 000  
 <210> 116  
 <400> 116  
 000  
 <210> 117  
 <400> 117  
 000  
 <210> 118  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG1  
 <400> 118  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                   120                   125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                   135                   140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145                   150                   155                   160

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

Pro Gly  
 450

<210> 119



260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly		
450		
<210> 120		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R		
<400> 120		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		

50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
	100	105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
	225	230
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	245	250
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	260	265
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	275	280
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	305	310
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	315	320
	325	330
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	335	340
	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	355	360
		365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly  
 450  
 <210> 121  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC IgG1 K409R N297A  
 <400> 121  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160



Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly  
 450  
 <210> 122



260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly		
450		
<210> 123		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> pab2049/pab1949 HC F405L		
<400> 123		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		

50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
	100	105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145	150
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
	225	230
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	245	250
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	260	265
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	275	280
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	305	310
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	325	330
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	340	345
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	355	360
		365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly  
 450  
 <210> 124  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pab2049/pab1949 HC F405L N297A  
 <400> 124  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly  
 450  
 <210> 125



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

<210> 126

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1恒定区共同序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (97) .. (97)

<223> Xaa可为Lys或Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (239) .. (239)

<223> Xaa可为Asp或Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE



<222> (241) .. (241)  
 <223> Xaa可为Leu或Met  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (314) .. (314)  
 <223> Xaa可为Gly或Ala  
 <400> 126  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                   50                   55                   60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                   90                   95  
 Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                   100                   105                   110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                   115                   120                   125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
                   130                   135                   140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145                   150                   155                   160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                   165                   170                   175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                   180                   185                   190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                   195                   200                   205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                   210                   215                   220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu  
 225                   230                   235                   240  
 Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                   245                   250                   255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Xaa Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325

<210> 127

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1 G1m3同种异型

<400> 127

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

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

<210> 128

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1 G1m17,1同种异型

<400> 128

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

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

<210> 129

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1 G1m17,1,2同种异型

<400> 129

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly



	245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
	290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
	325		
<210> 131			
<211> 326			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> IgG4恒定区S228P修饰			
<400> 131			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			

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

<210> 132

<211> 325

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG2野生型恒定区

<400> 132

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



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

<210> 133

<211> 325

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG2恒定区C127S修饰

<400> 133

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg

1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
145	150	155	160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn			
	165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp			
	180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro			
	195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn			
225	230	235	240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
	245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
	260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
	275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
	290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
305	310	315	320

Ser Leu Ser Pro Gly  
325

<210> 134  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Pab1928 (Hu106-122) HC  
<400> 134

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



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

<210> 136





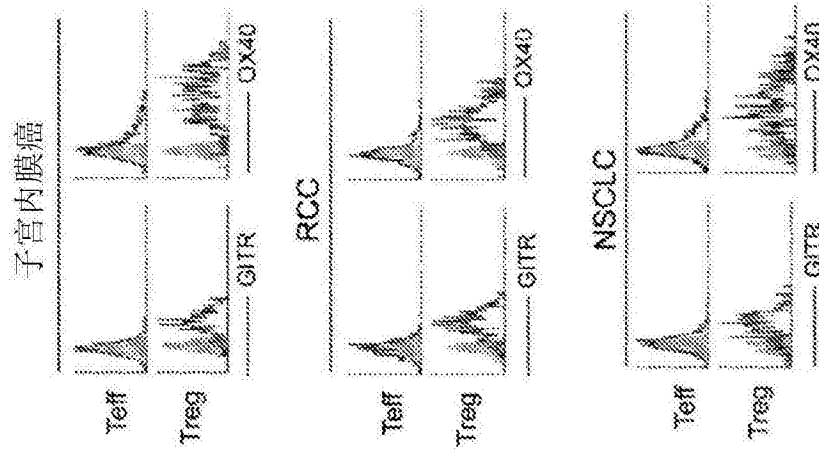


图1A

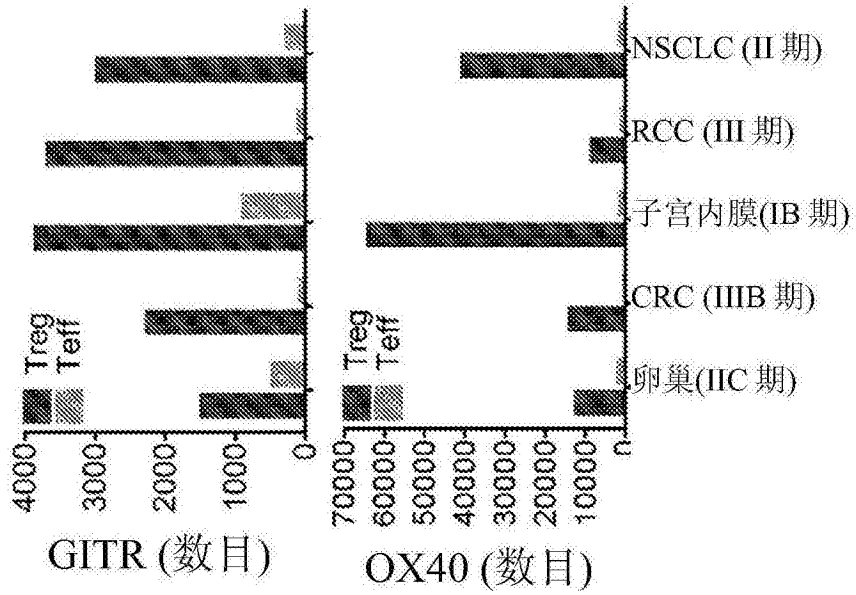


图1B



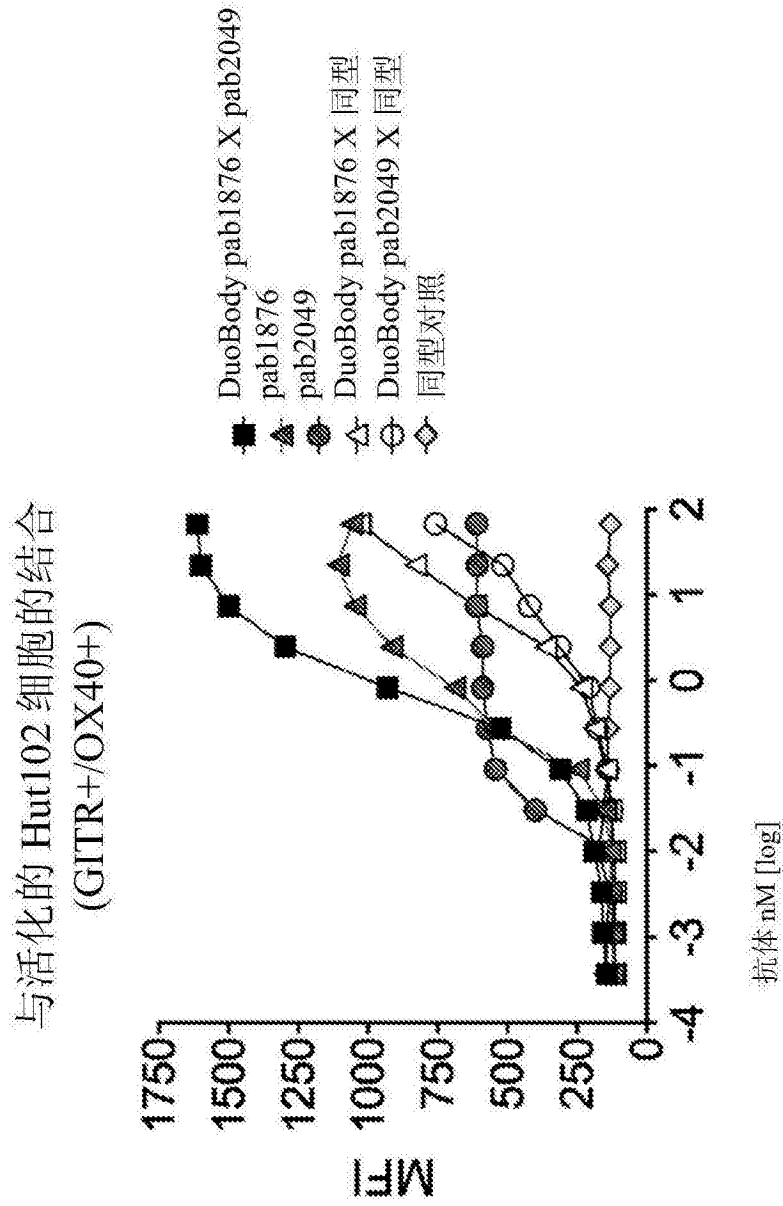


图2A

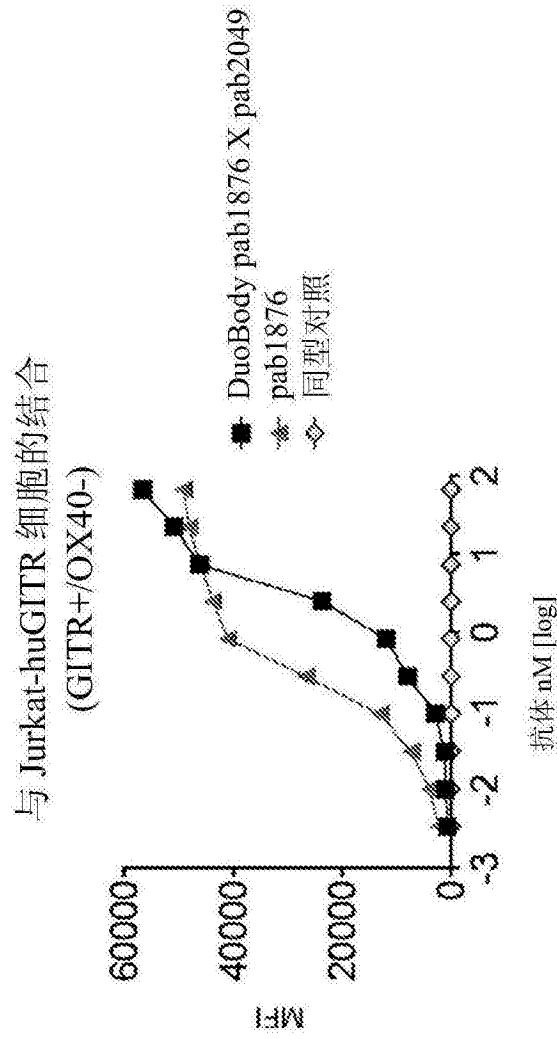


图2B

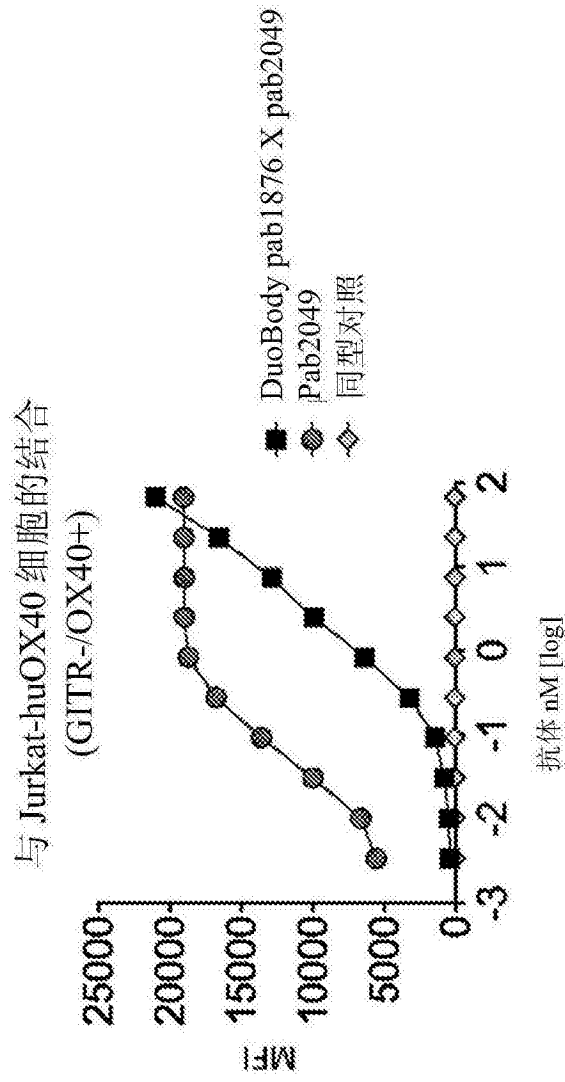


图2C

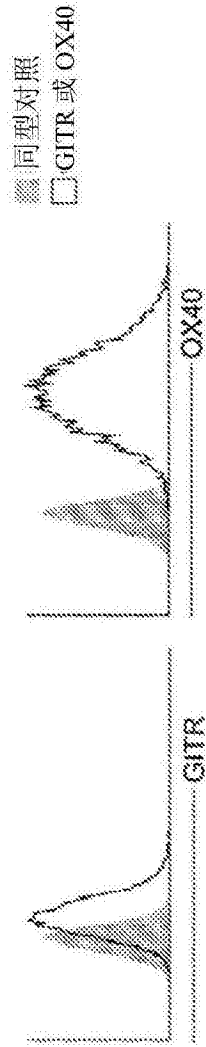


图3A

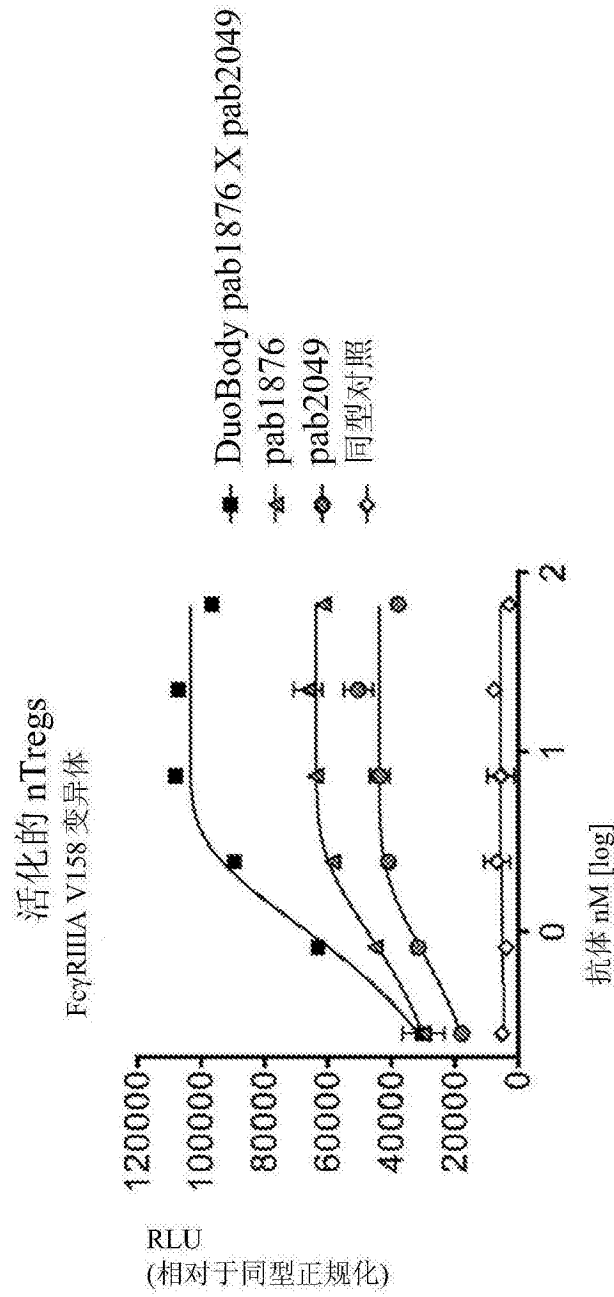


图3B

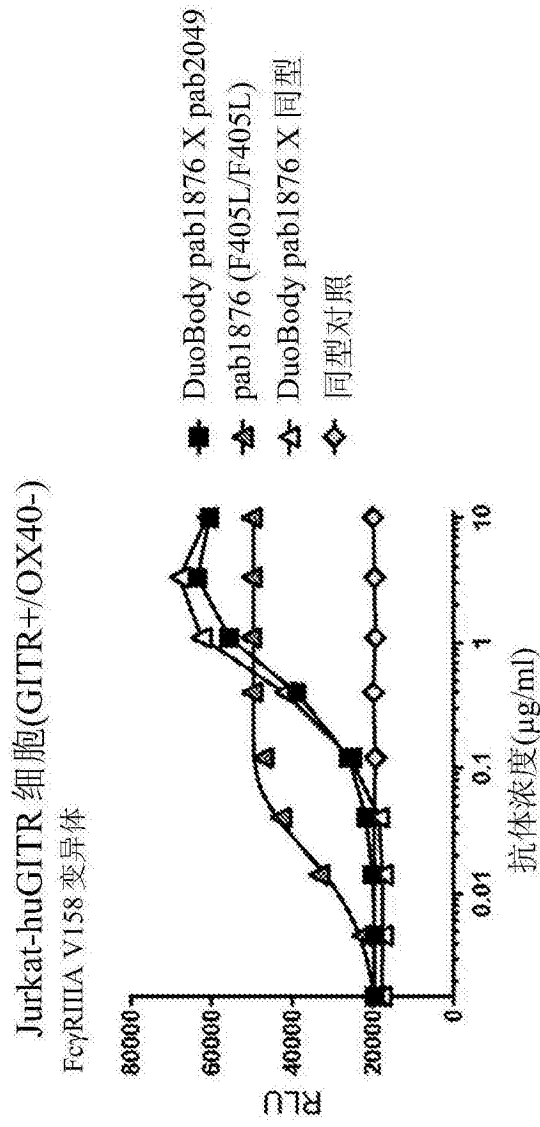


图3C

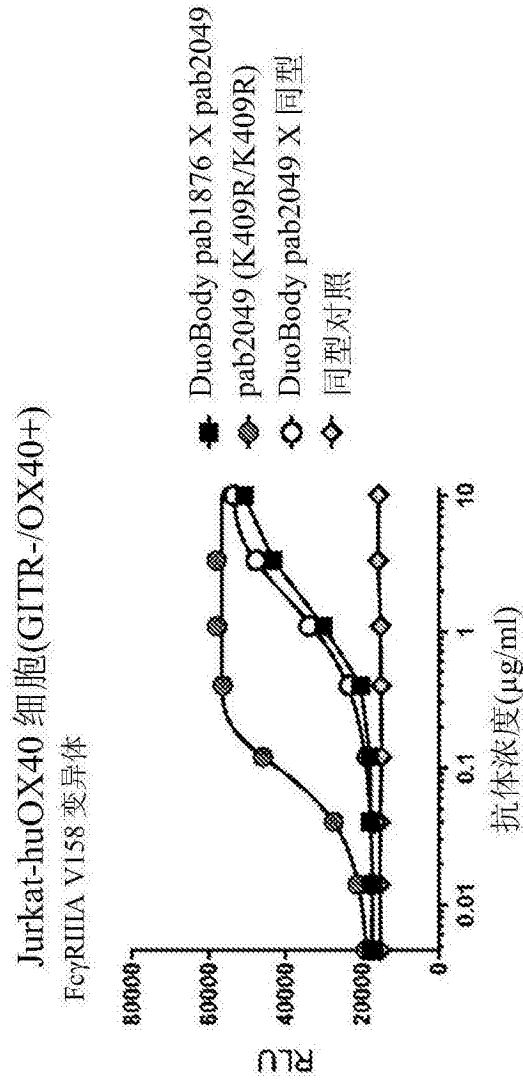


图3D

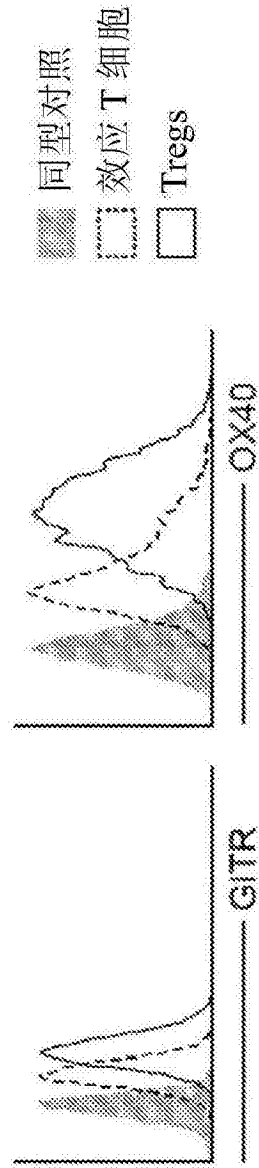


图3E



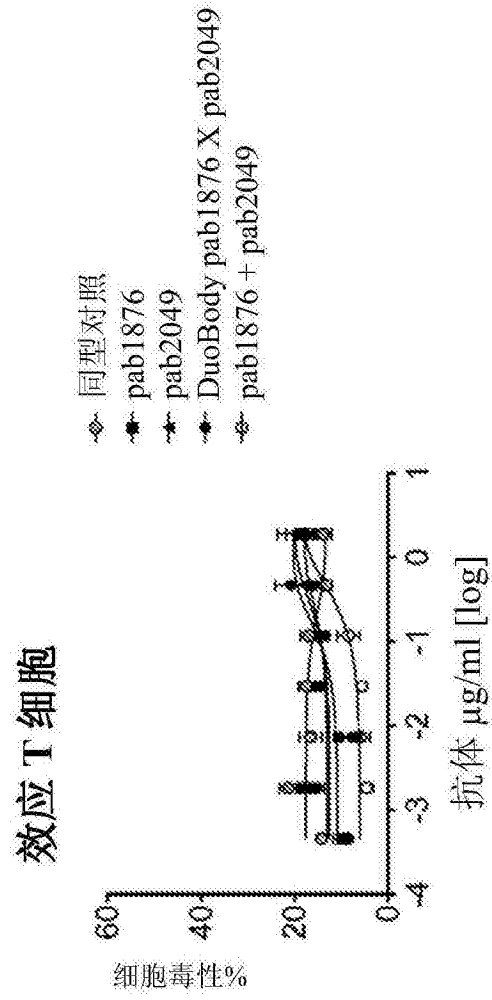


图3F

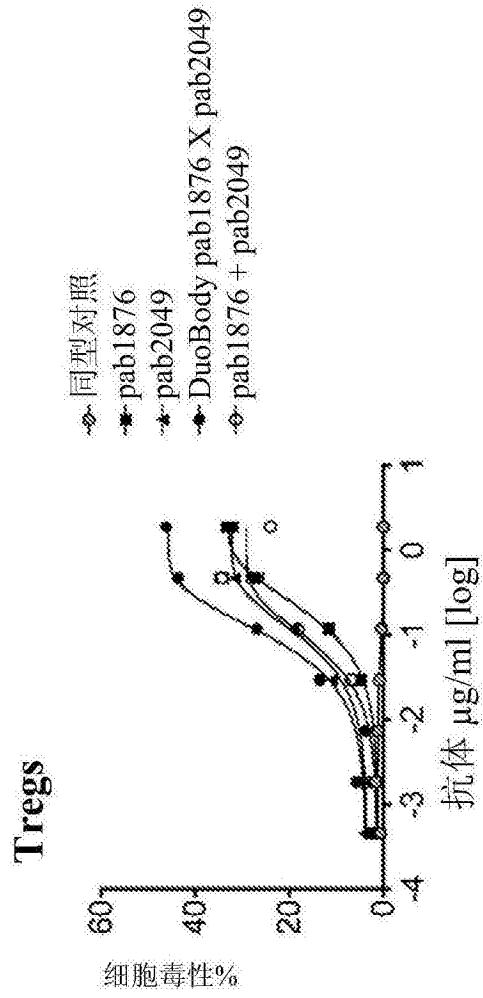


图3G

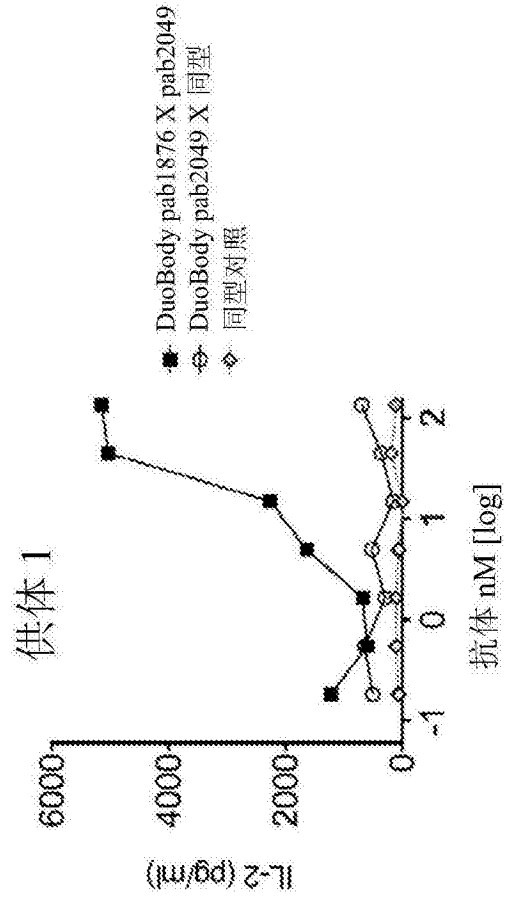


图4A

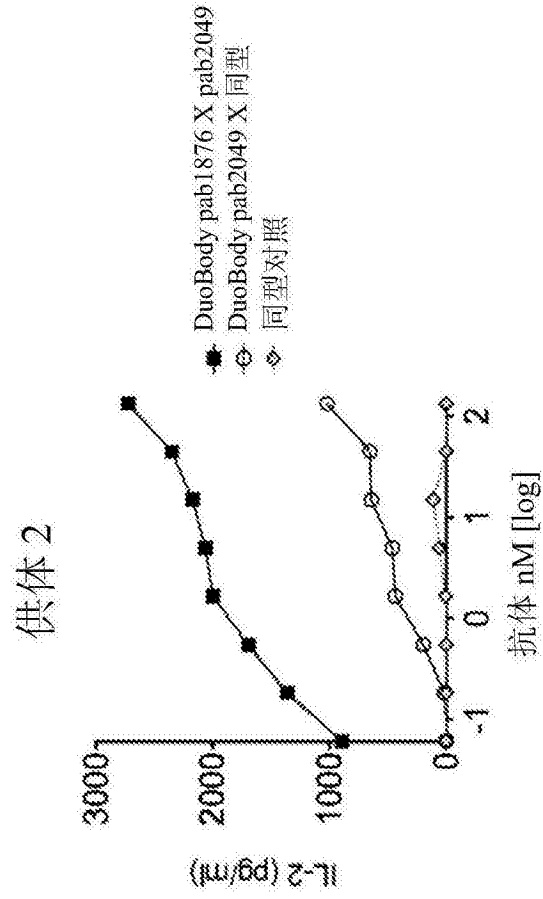


图4B

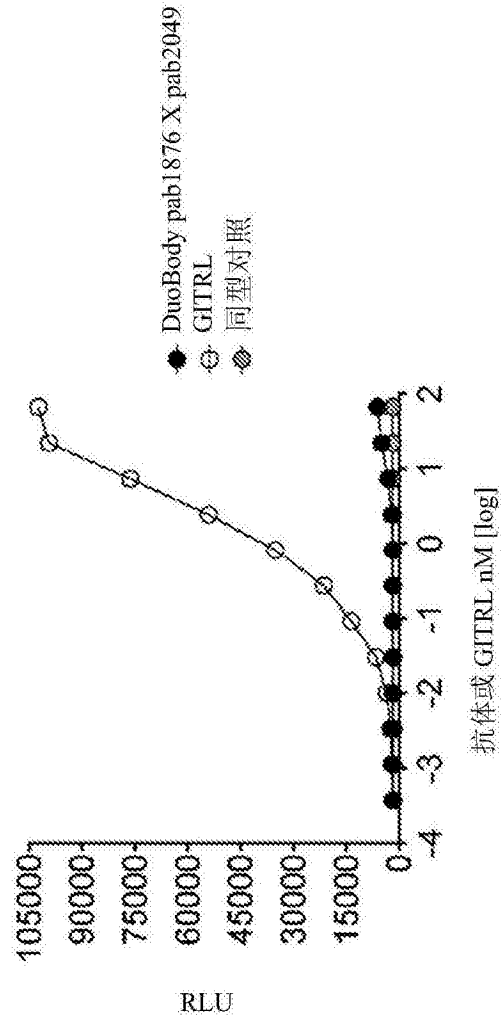


图5A

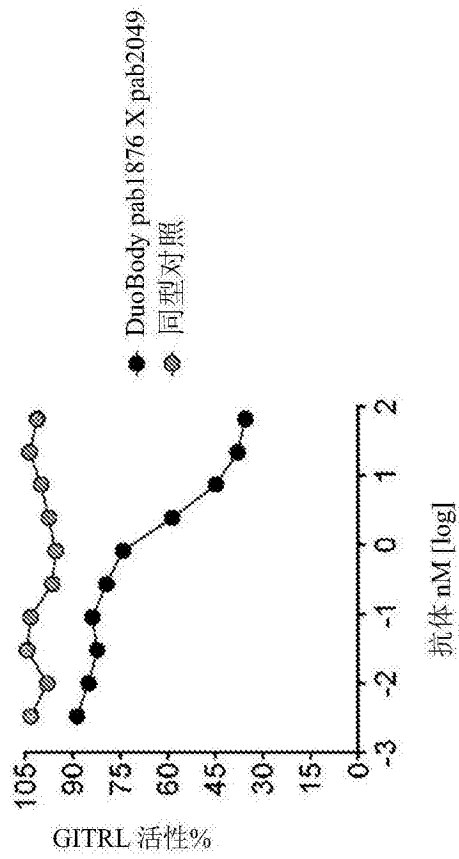


图5B

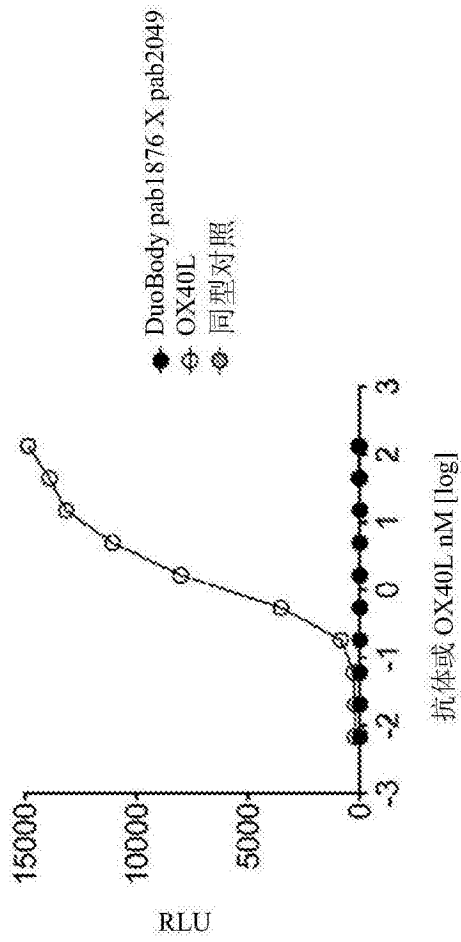


图6A

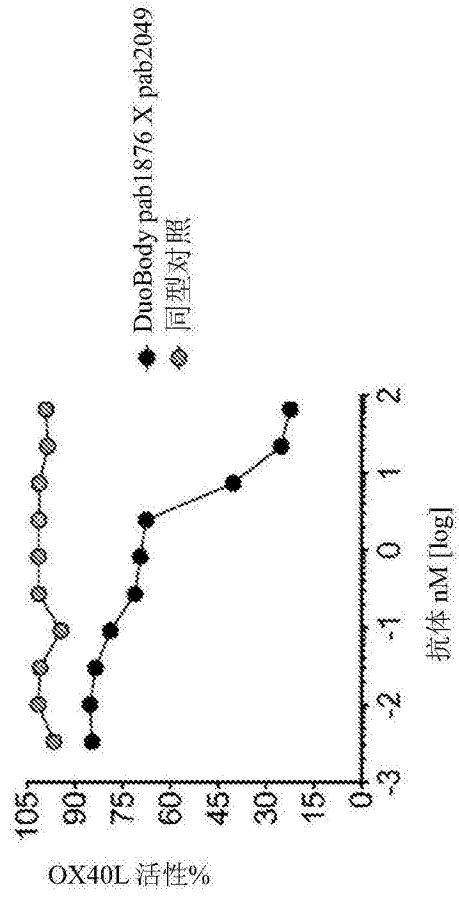


图6B



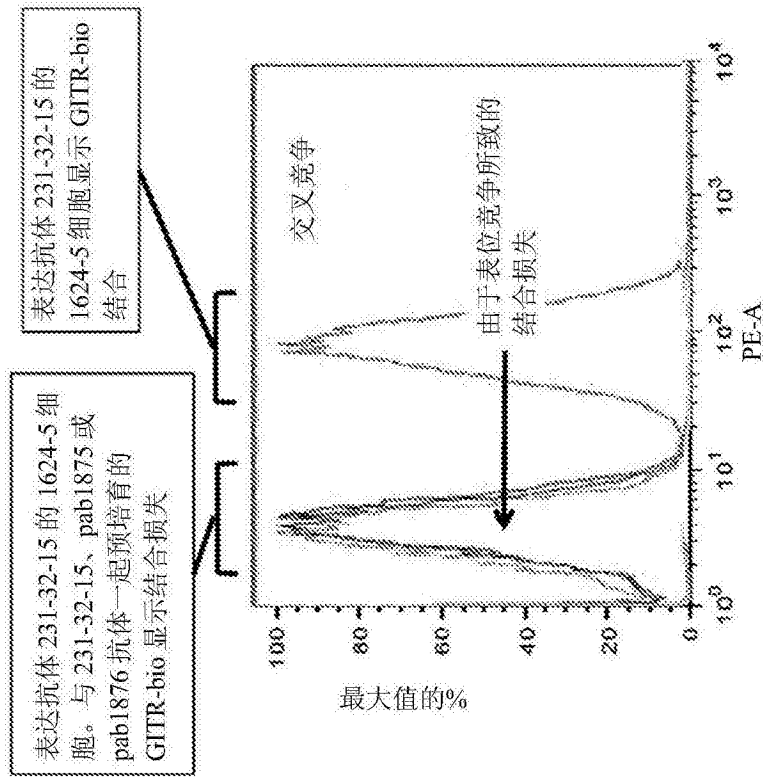


图7

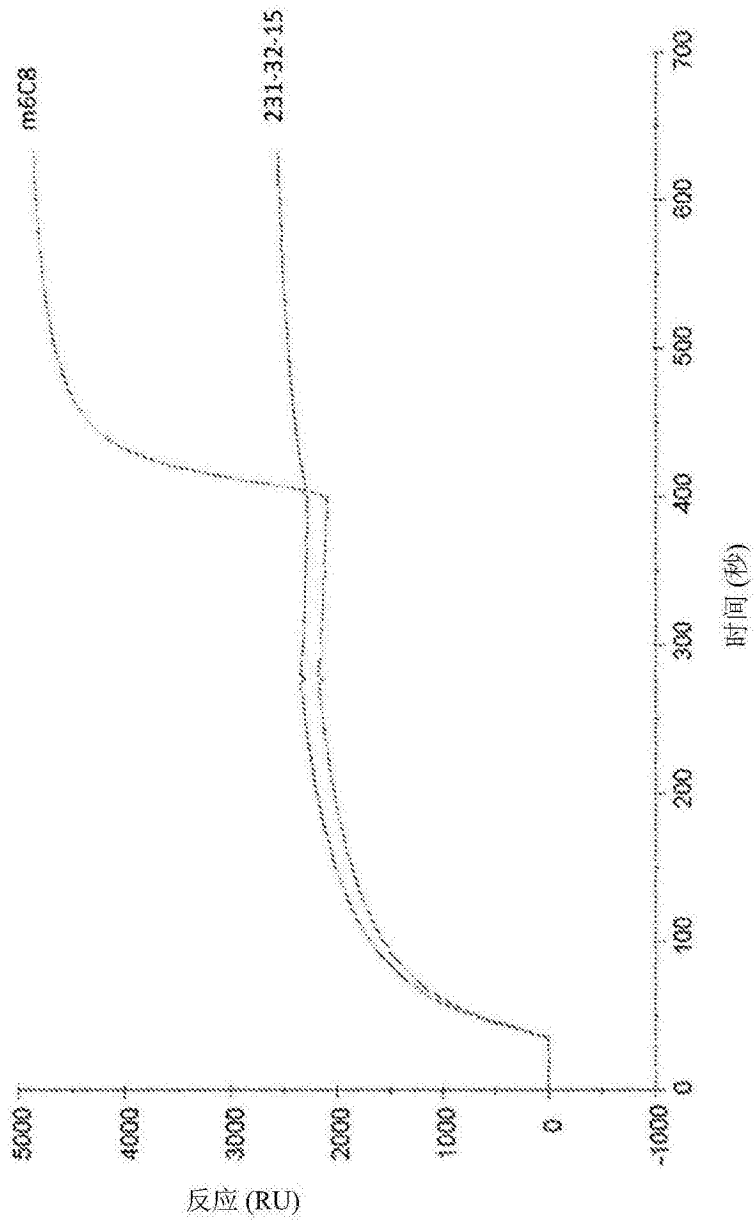


图8

	10	20	30	40	50	60	70	80
1155-37a	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37b	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37c	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37d	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37e	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37f	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37h	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37i	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37j	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37k	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37l	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37m	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37n	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37o	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37p	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37q	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37r	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37s	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37t	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37u	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37v	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37w	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37x	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37y	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1155-37z	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

1155-37a	注释序列
1155-37b	注释序列
1155-37c	注释序列
1155-37d	注释序列
1155-37e	注释序列
1155-37f	注释序列
1155-37g	注释序列
1155-37h	注释序列
1155-37i	注释序列
1155-37j	注释序列
1155-37k	注释序列
1155-37l	注释序列
1155-37m	注释序列
1155-37n	注释序列
1155-37o	注释序列
1155-37p	注释序列
1155-37q	注释序列
1155-37r	注释序列
1155-37s	注释序列
1155-37t	注释序列
1155-37u	注释序列
1155-37v	注释序列
1155-37w	注释序列
1155-37x	注释序列
1155-37y	注释序列
1155-37z	注释序列

图9A



类变体	构型体编号	pa81876	pa81967	pa81975	pa81979	pa81978
T84A	4526	+	+	+	+	+
T55A	4527	+	+	+	+	+
R56A	4528	+	+	+	+	+
C57A	4529	+	+	+	+	+
C58A	4530	+/	+/	+/	+/	+/
R59A	4531	+	+	+	+	+
D60A	4532	-	+/	+/	+/	+/
Y61A	4533	+	+	+	+	+
F62A	4534	+	+	+	+	+
G63A	4535	+/	+/	+/	+/	+/
E64A	4536	+	+	+	+	+
E65A	4537	+	+	+	+	+
G66A	4538	+	+	+	+	+
C67A	4539	+	+	+	+	+
S68A	4540	+	+	+	+	+
E69A	4541	+	+	+	+	+
W70A	4542	+	+	+	+	+
D71A	4543	+	+	+	+	+
C72A	4544	+	+	+	+	+
M73A	4545	+	+	+	+	+
C74A	4546	+	+	+	+	+
V75A	4547	+	+	+	+	+
Q76A	4548	+	+	+	+	+
P28A	4595	+	+	+	+	+
T29A	4596	+	+	+	+	+
G30A	4597	+	+	+	+	+
G31A	4598	+	+	+	+	+
P32A	4599	+	+	+	+	+

图10A

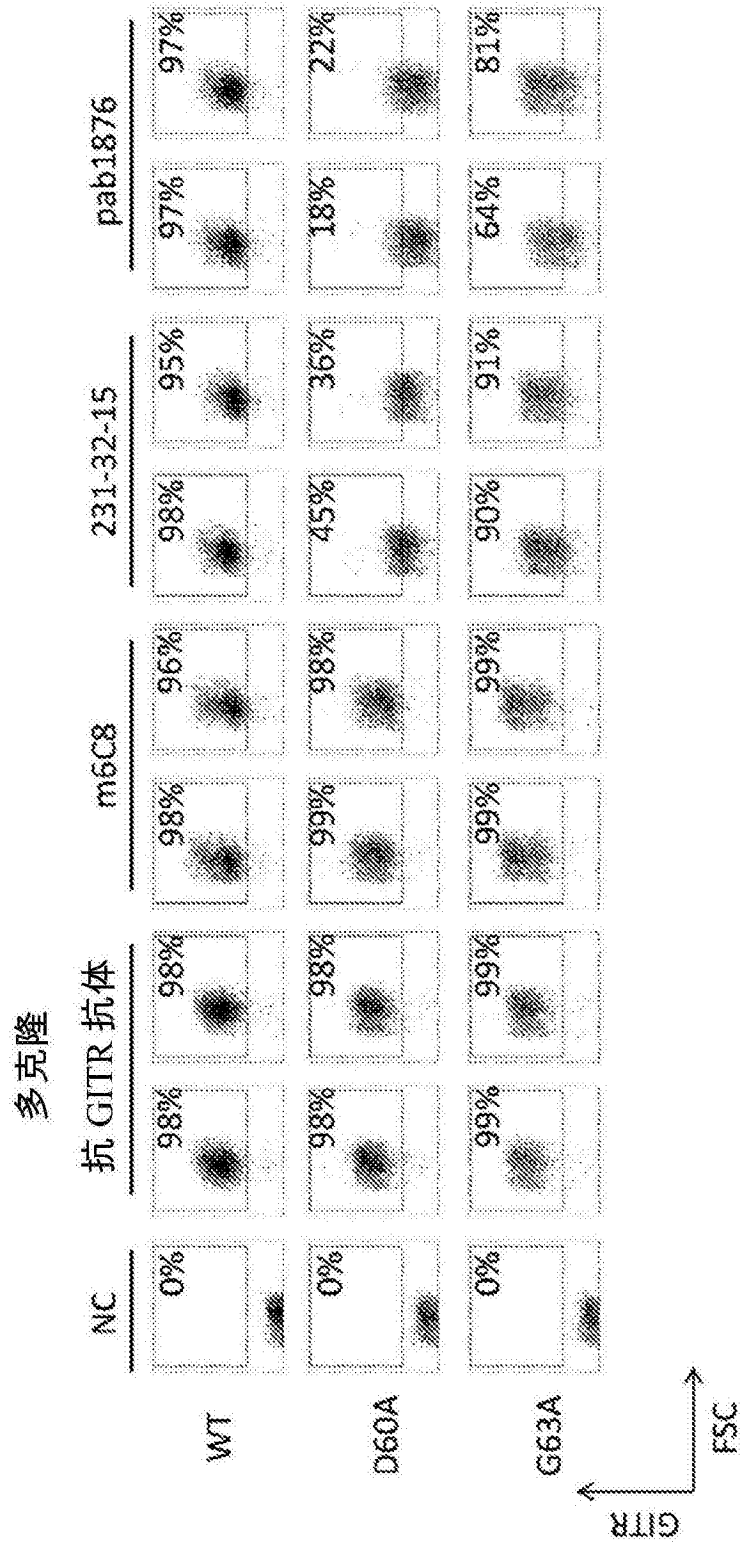


图10B

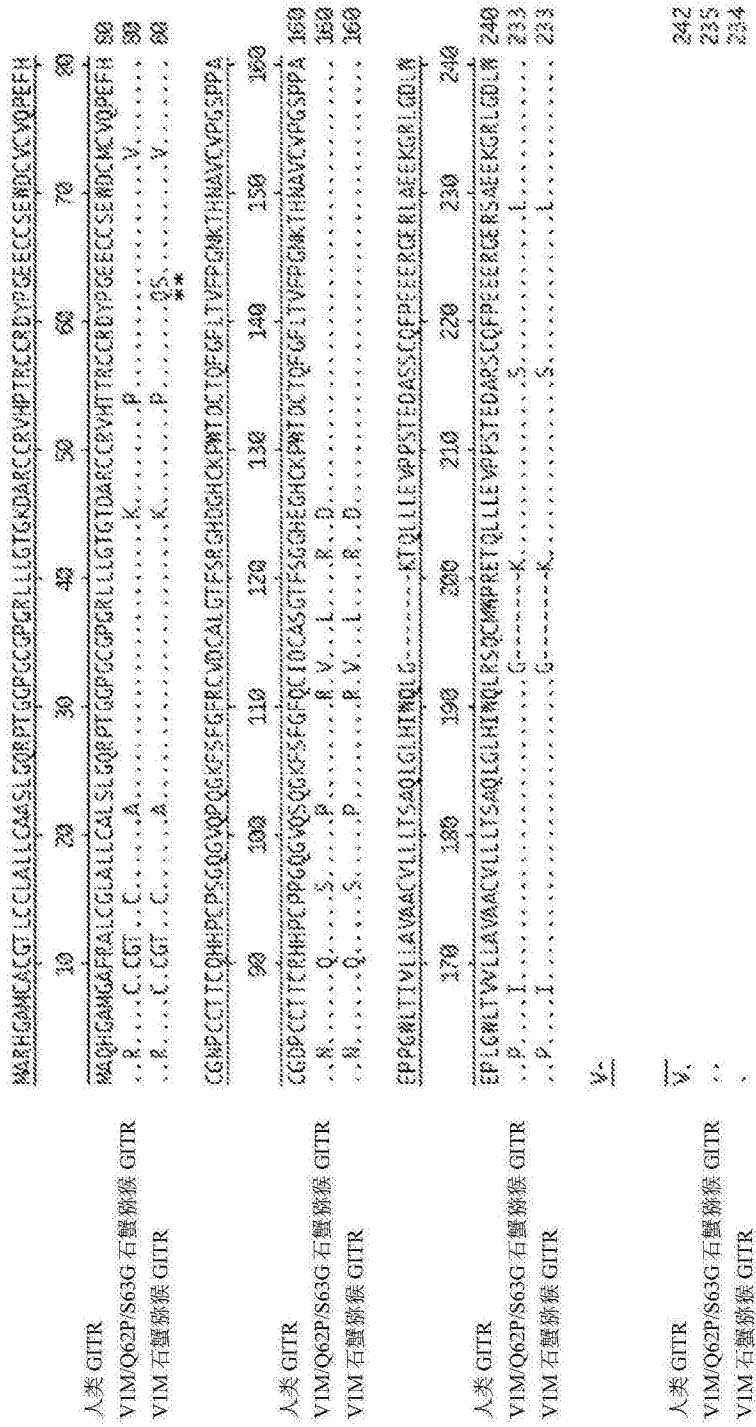


图 11A

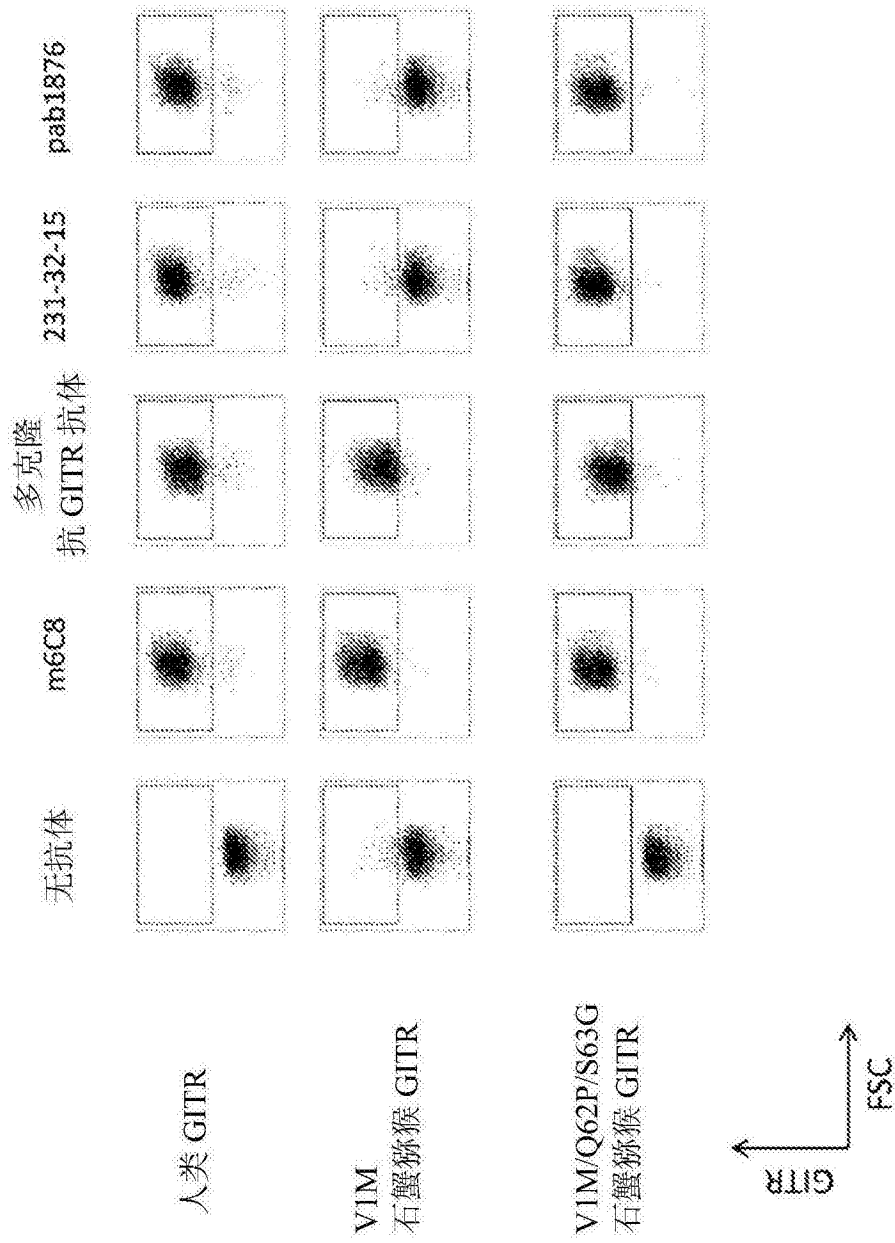


图11B



	pab1949w	pab2049	pab1928
W58A	-	+	-
N60A	-	-	+
R62A	-	-	+
R80A	-	-	+
L88A	-	-	+
P93A	-	-	+
P99A	-	+	+
P115A	-	+	+

图12