



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113135994 A

(43) 申请公布日 2021. 07. 20

(21) 申请号 202010063141.3

(22) 申请日 2020.01.19

(71) 申请人 迈威(上海)生物科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区李冰路576号  
(创想园)3号楼4楼

(72) 发明人 王双 曾大地 王荣娟 焦莎莎  
张畅

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

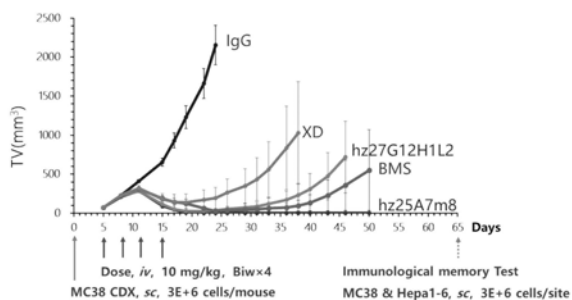
序列表34页 附图9页

(54) 发明名称

一种激活型抗OX40抗体、生产方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种表达在活化的CD4+T、CD8+T细胞表面的激活型受体(OX40)的抗体或其片段,以及所述抗体或其片段用于预防或治疗疾病的用途。本发明所述抗体对OX40亲和力高、激活OX40信号通路的效果明显;具有相对广谱的免疫增强作用,并且能够增强T细胞应答免疫记忆;动物模型体内实验中取得了较好的肿瘤抑制和杀伤效果,具有良好的临床应用前景。



1. 抗体或其片段,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含:

VH CDR1选自SEQ ID NO:40、52、64所示氨基酸序列,

VH CDR2选自SEQ ID NO:41、53、65所示氨基酸序列,

VL CDR3选自SEQ ID NO:42、54、66所示氨基酸序列;

轻链可变区包含:

VL CDR1选自SEQ ID NO:46、58、70所示氨基酸序列,

VL CDR2选自SEQ ID NO:47、59、71所示氨基酸序列,

VL CDR3选自SEQ ID NO:48、60、72所示氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其特征在于:

(1) 重链可变区与选自SEQ ID NO:2、14、22、30所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区与选自SEQ ID NO:4、16、18、20所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性;

(2) 重链可变区选自SEQ ID NO:6、24所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区选自SEQ ID NO:8、26、28、32所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性;

(3) 重链可变区为SEQ ID NO:10所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性。

3. 一种免疫偶联物,其包括

(1) 权利要求1-2任一所述的抗体或其片段,

(2) 偶联部分。

4. 一种多特异性抗体或其衍生物,其特征在于包括至少一个如权利要求1-2任一所述的抗体或其片段的抗原结合域。

5. 一种重链抗体,其在权利要求1-2任一所述抗体的基础上获得的二聚体重链抗体。

6. 一种组合物,其包括

(1) 权利要求1-2任一所述的抗体或其片段、权利要求3所述抗体偶联物、权利要求4所述多特异性抗体或其衍生物、或权利要求5所述重链抗体

(2) 药学上可接受的载体。

7. 一种核酸,其编码权利要求1-2任一所述的抗体或其片段、权利要求4所述多特异性抗体或其衍生物、或权利要求5所述重链抗体。

8. 一种重组载体或重组宿主细胞,其包括权利要求7所述核酸。

9. 权利要求1-2任一所述的抗体或其片段、权利要求3任一所述抗体偶联物、权利要求4所述多特异性抗体或其衍生物、权利要求5所述重链抗体、权利要求6所述组合物、权利要求7所述核酸、权利要求8所述重组载体或重组宿主细胞的用途,其特征在于:

用于制备结合OX40、抑制OX40与OX40L的结合、激活OX40+T细胞、激活人体免疫应答反应、肿瘤治疗性疫苗等药物;

用于制备增强特异性免疫应答的分子佐剂,优选与CpG等佐剂组合用于制备肿瘤疫苗;

用于制备诱导OX40+细胞产生IL-8和/或启动NFκB基因转录药物;

用于制备刺激PBMC产生IL-2和IFN- $\gamma$ 的药物；  
用于制备抑制实体瘤生长和转移的药物；  
用于制备定性或定量检测OX40的试剂盒。

10. 一种生产抗体的方法,包括:

- (1) 培养权利要求8中的重组宿主细胞,
- (2) 回收抗体。

## 一种激活型抗OX40抗体、生产方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于抗体工程领域,具体涉及一种抗OX40抗体、其生产方法和用途,特别是涉及一种抗人OX40的人源化抗体、其重组表达方法及在治疗实体肿瘤中的用途。

### 背景技术

[0002] OX40,又称CD134、ACT45、TNFRSF4,属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族的一员,是表达在活化的CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T细胞表面的激活性受体。OX40信号可以激活下游的NF- $\kappa$ B、PI3K和PKB通路,这些通路的持续激活最终能够延长T细胞的存活时间,并扩展T细胞记忆,促进T细胞的细胞杀伤能力;另外,OX40还能通过抑制调节性T细胞(Treg)的分化和活性,改善肿瘤微环境中的免疫抑制作用,进一步增强效应T细胞的功能。

[0003] OX40基因位于人1号染色体(小鼠4号染色体),编码一种50kD的一型跨膜糖蛋白。胞外区有191个氨基酸,包含了三个完整的以及一个稍短的富含半胱氨酸结构域(CRDs)。主要在活化的效应T细胞(Teffs)和调节性T细胞(Tregs)上表达,也在NKT细胞,NK细胞和嗜中性粒细胞上表达。

[0004] OX40与配体OX40L(CD252, TNFSF4)结合传递共刺激信号。OX40L基因位于人和小鼠的1号染色体,编码34kD的二型跨膜糖蛋白。OX40L可在抗原提呈细胞(APC),如:B细胞、树突细胞、巨噬细胞上表达;另外在其它细胞类型如Langerhans细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肥大细胞、和NK细胞也可诱导表达。

[0005] OX40和OX40L的结合参与了T细胞与淋巴细胞和非淋巴细胞之间多种生理反应。OX40和OX40L的相互作用能够在OX40的胞内区域内招募TNFR相关(TRAFFs)分子,形成包含IKK $\alpha$ 和IKK $\beta$ 以及PI3k和PKB(Akt)的信号传导复合物;OX40还与TCR信号协同作用,通过未知机制增强细胞内Ca<sup>2+</sup>,从而增强NFAT入核。OX40可激活经典的NF- $\kappa$ B1途径或非经典的NF- $\kappa$ B2途径、PI3k/PKB和NFAT途径,进而调控制T细胞分裂和存活的基因,以及促进细胞因子基因的转录以及细胞因子受体的表达,对于细胞存活至关重要。OX40信号传导会引起包括CTLA-4和Foxp3的下调。

[0006] 抗OX40激活型抗体可以发挥OX40L类似的功能激活抗原依赖性T效应细胞,并且可以通过消除Treg细胞的抑制功能,从而发挥抗肿瘤作用。抗OX40激活型抗体已经有多个临床在研品种,其中有3项实验公布了部分实验数据,分别是Pfizer的PF-04518600、BMS的BMS-986178和AbbVie的ABBV-368。国内目前有两家OX40进入临床阶段,分别是信达生物制药的重组全人源抗肿瘤坏死因子受体超家族成员4(OX40)单克隆抗体和丽珠医药集团的重组全人源抗OX40单克隆抗体注射液。现有技术中的OX40单抗大部分都是通过杂交瘤技术获得抗OX40的抗体。当然,也可以通过转基因小鼠技术、噬菌体抗体库技术,以及B细胞sorting技术等方法获得目标抗体,评估和分析手段与杂交瘤抗体制备方案相同或相似。

[0007] 尽管目前已有多个抗OX40激活型抗体临床在研品种,但由于抗OX40激活型抗体的早期筛选表现与最终临床治疗效果之间不完全一致、难以预期的不良反应、针对不同适应

症的效果等方面的原因,仍然需要开发出更多具有高亲和力、高生物活性特别是更好地激发免疫记忆的激活型抗OX40抗体,以满足临床治疗的迫切需求。

### 发明内容

[0008] 为解决上述问题,本发明通过杂交瘤技术获得鼠抗体,通过抗体结合活性、激活活性、阻断活性分析获得候选激活型抗OX40鼠抗体后;将激活型抗OX40鼠抗体基因进行抗体序列人源化设计,获得的人源化抗体再次通过抗体活性分析(结合活性、激活活性、阻断活性),以及小鼠体内药效分析,最终确定激活型抗OX40人源化抗体。具体而言:

[0009] 一方面,本发明提供一种抗体或其片段,包括重链可变区和轻链可变区,其中

[0010] 重链可变区包含:

[0011] VH CDR1选自SEQ ID NO:40、52、64所示氨基酸序列,

[0012] VH CDR2选自SEQ ID NO:41、53、65所示氨基酸序列,

[0013] VH CDR3选自SEQ ID NO:42、54、66所示氨基酸序列;

[0014] 轻链可变区包含:

[0015] VL CDR1选自SEQ ID NO:46、58、70所示氨基酸序列,

[0016] VL CDR2选自SEQ ID NO:47、59、71所示氨基酸序列,

[0017] VL CDR3选自SEQ ID NO:48、60、72所示氨基酸序列。

[0018] 进一步,本发明所述的抗体或其片段,其重链可变区包括SEQ ID NO:2、6、10、14、22、24或30所示氨基酸序列。

[0019] 更进一步,本发明所述的抗体或其片段,其重链可变区包括SEQ ID NO:4、8、12、16、18、20、26、28、32所示氨基酸序列。

[0020] 更进一步,本发明所述的抗体或其片段,其特征在于:

[0021] (1)重链可变区选自SEQ ID NO:2、14、22、30所示氨基酸序列,轻链可变区选自SEQ ID NO:4、16、18、20所示氨基酸序列;

[0022] (2)重链可变区选自SEQ ID NO:6、24所示氨基酸序列,轻链可变区选自SEQ ID NO:8、26、28、32所示氨基酸序列;

[0023] (3)重链可变区为SEQ ID NO:10所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列。

[0024] 更进一步,本发明所述的抗体或其片段,其特征在于:

[0025] 重链可变区为SEQ ID NO:2所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:4所示氨基酸序列;

[0026] 重链可变区为SEQ ID NO:6所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:8所示氨基酸序列;

[0027] 重链可变区为SEQ ID NO:10所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列;

[0028] 重链可变区为SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:16、18、或20所示氨基酸序列;

[0029] 重链可变区为SEQ ID NO:22所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:16、18或20所示氨基酸序列;

[0030] 重链可变区为SEQ ID NO:24所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:26或28所示氨基酸序列;

[0031] 重链可变区为SEQ ID NO:30所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:16所示氨基酸序列;

[0032] 或

[0033] 重链可变区为SEQ ID NO:24所示氨基酸序列,轻链可变区为SEQ ID NO:32所示氨基酸序列。

[0034] 更进一步,本发明所述的抗体或其片段,其包括SEQ ID NO:34所示的重链恒定区、和/或SEQ ID NO:36所示轻链恒定区。

[0035] 更进一步,本发明所述的抗体或其片段,其中所述抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体;所述抗体片段包括F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、scFv、Fd、纳米抗体等。

[0036] 第二方面,本发明提供一种免疫偶联物,其包括

[0037] (1) 本发明第一方面所述抗体或其片段,

[0038] (2) 偶联部分。

[0039] 进一步,本发明所述的免疫偶联物,其中所述偶联部分包括可检测标记、细胞毒性分子、生物活性分子等。

[0040] 更进一步,本发明所述的免疫偶联物,其中可检测标记包括化学发光标记、荧光标记、酶标记、放射性标记、量子点、纳米颗粒等。

[0041] 更进一步,本发明所述的免疫偶联物,其中细胞毒性分子包括白喉毒素、绿脓杆菌外毒素、蓖麻毒素、白素毒素等。

[0042] 更进一步,本发明所述的免疫偶联物,其中生物活性分子包括细胞因子、酶、化疗剂、脂质体、病毒颗粒等。

[0043] 第三方面,本发明提供一种多特异性抗体或其衍生物,其特征在于包括至少一个本发明第一方面所述的抗体或其片段的抗原结合域。

[0044] 进一步,本发明所述的多特异性抗体或其衍生物,其进一步包括结合其它靶点的抗原结合域。

[0045] 更进一步,本发明所述的多特异性抗体或其衍生物,其中所述其它靶点包括PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3、TIGIT、TIM3、CD47、4-1BB、CD73、ROR1、HER2、HER3、EGFR等。

[0046] 第四方面,本发明提供一种重链抗体,其是在本发明第一方面所述抗体或其片段的基础上获得的二聚体重链抗体。

[0047] 进一步,本发明所述的重链抗体,其不具有Fc区。

[0048] 第五方面,本发明提供一种组合物,其包括

[0049] (1) 本发明第一方面所述抗体或其片段、本发明第二方面所述抗体偶联物、本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物、或本发明第四方面所述重链抗体;

[0050] (2) 药学上可接受的载体。

[0051] 进一步的,本发明所述组合物,其进一步包括其它用于治疗肿瘤的活性成分。

[0052] 第六方面,本发明提供一种试剂盒,包括本发明第一方面所述抗体或其片段,用于定性或定量检测OX40。

[0053] 第七方面,本发明提供一种核酸,其编码本发明第一方面所述抗体或其片段,或编

码本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物。

[0054] 第八方面,本发明提供一种载体,其包括本发明第七方面所述的核酸。

[0055] 第九方面,本发明提供一种重组宿主细胞,其包括本发明第七方面所述的核酸或包括本发明第八方面所述的载体。

[0056] 第十方面,本发明提供本发明第一方面所述抗体或其片段、本发明第二方面所述抗体偶联物、本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物、本发明第四方面所述重链抗体、本发明第五方面所述组合物在制备结合OX40、抑制OX40与OX40L的结合、激活OX40+T细胞、激活人体免疫应答反应、肿瘤治疗性疫苗等药物中的用途。例如用于增强特异性免疫应答的分子佐剂,与CpG等佐剂组合运用用于肿瘤疫苗等用途。

[0057] 第十一方面,本发明提供本发明第一方面所述抗体或其片段、本发明第二方面所述抗体偶联物、本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物、本发明第四方面所述重链抗体、本发明第五方面所述组合物在制备诱导OX40+细胞产生IL-8和启动NF $\kappa$ B基因转录药物中的用途。

[0058] 第十二方面,本发明提供本发明第一方面所述抗体或其片段、本发明第二方面所述抗体偶联物、本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物、本发明第四方面所述重链抗体、本发明第五方面所述组合物在制备刺激PBMC产生IL-2和IFN- $\gamma$ 药物中的用途。

[0059] 第十三方面,本发明提供本发明第一方面所述抗体或其片段、本发明第二方面所述抗体偶联物、本发明第三方面所述多特异性抗体或其衍生物、本发明第四方面所述重链抗体、本发明第五方面所述组合物在制备抑制实体瘤生长和转移药物中的用途。

[0060] 进一步,本发明所述的用途,其特征在于,所述实体瘤包括消化系统肿瘤、呼吸系统肿瘤、泌尿和生殖系统肿瘤。

[0061] 进一步,本发明所述的用途,其特征在于,所述消化系统肿瘤包括肝癌、胰腺癌、胃癌、十二指肠癌、结直肠癌、食道癌。

[0062] 进一步,本发明所述的用途,其特征在于,所述呼吸系统肿瘤包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、喉癌、间皮瘤等。

[0063] 进一步,本发明所述的用途,其特征在于,所述泌尿生殖系统肿瘤包括乳腺癌、卵巢癌等。

[0064] 第十四方面,本发明提供一种生产抗体的方法,包括:

[0065] (1) 培养本发明第九方面的宿主细胞,

[0066] (2) 回收抗体。

[0067] 为更好理解本发明,首先定义一些术语。其他定义则贯穿具体实施方式部分而列出。

[0068] 术语“OX40”是指肿瘤坏死因子超家族的第四个成员。该术语包括变体、异体、同源物、直向同源物和平行同源物。例如,对人OX40特异的抗体可以在某些情况下与另一物种例如猴的OX40蛋白交叉反应。在其他实施方式中,对人OX40蛋白特异的抗体可以完全地对人OX40蛋白特异而不与其他物种或其他类型的蛋白交叉反应,或者可以与一些其他物种而非所有其他物种的OX40蛋白交叉反应。

[0069] 术语“人OX40”是指具有人氨基酸序列的OX40蛋白,例如Genbank登录号为NP\_003318的氨基酸序列。术语“猴OX40”和“鼠OX40”分别指猴和小鼠的OX40序列,例如分别具

有Genbank登录号为NP\_001090870和Genbank登录号为NP\_035789的序列。

[0070] 本文中的术语“抗体”意在包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即,抗原结合部分)或单链。全长抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,重链和轻链由二硫键连接。各重链由重链可变区(简称VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成,即CH1、CH2和CH3。各轻链由轻链可变区(简称VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH和VL区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其由较为保守的框架区(FR)区分隔开。各VH和VL由三个CDR以及四个FR构成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和传统补体系统的第一组分(C1q)。

[0071] 本文所用的术语“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,与OX40蛋白特异结合的分离抗体基本不含特异结合OX40蛋白之外抗原的抗体。但是,特异结合人OX40蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的OX40蛋白具有交叉结合性。此外,分离的抗体基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0072] 术语“单克隆抗体”或“单抗”或“单克隆抗体组成”是指单一分子组成的抗体分子制品。单克隆抗体组成呈现出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0073] 本文中的术语,抗体的“抗原结合片段”(或简称为抗体部分),是指抗体的保持有特异结合抗原(例如,OX40蛋白)能力的一个或多个片段。已证实,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包含在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1构成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含较链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1构成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂VL和VH构成的Fv片段;(v) 由VH构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR);以及(vii) 纳米抗体,一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,它们可以通过重组法经由使两者成为单蛋白链的合成接头而连接,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fc(scFv);参见例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426;and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这些单链抗体也意在包括在术语涵义中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术而得到,且片段可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

[0074] 本发明的抗原结合片段包括能够特异性结合OX40的那些。抗体结合片段的实例包括例如但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv片段、单链Fv(scFv)片段和单结构域片段。

[0075] Fab片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端处的少数残基的添加,包括来自抗体较链区的一个或多个半胱氨酸。通过切割在F(ab')<sub>2</sub>胃蛋白酶消化产物的较链半胱氨酸处的二硫键产生Fab'片段。抗体片段的另外化学偶联是本领域普通技术人员已知的。Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段缺乏完整抗体的片段可结晶(Fc)区,从动物的循环中更快速地清除,并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合(参见例如,Wahl等人,1983, J. Nucl. Med. 24: 316)。

[0076] 如本领域通常理解的,“Fc”区是不包含抗原特异性结合区的抗体的片段可结晶恒



定区。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中，Fc区由两个相同的蛋白质片段组成，衍生自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域（分别为CH2和CH3结构域）。IgM和IgE Fc区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域（CH2、CH3和CH4结构域）。

[0077] “Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的抗体的最小片段。该区域由以紧密的非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体（VH-VL二聚体）组成。在该构型中，每个可变结构域的三个CDR相互作用，以限定在VH-VL二聚体的表面上的靶结合位点。通常，六个CDR对抗体赋予靶结合特异性。然而，在一些情况下，甚至单个可变结构域（或仅包含对于靶特异性的三个CDR的Fv的一半）可以具有识别且结合靶的能力，尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0078] “单链Fv”或“scFv”抗体结合片段包含抗体的VH和VL结构域，其中这些结构域存在于单条多肽链中。一般地，Fv多肽进一步包含在VH和VL结构域之间的多肽接头，其致使scFv能够形成有利于靶结合的结构。

[0079] “单结构域片段”由对OX40显示出足够亲和力的单个VH或VL结构域组成。在一个具体实施方案中，单结构域片段是骆驼化的（参见例如，Riechmann, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:25-38）。

[0080] 本发明的抗OX40抗体包括衍生化抗体。例如，衍生化抗体通常通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白酶解切割、与细胞配体或其它蛋白质的连接来修饰。可以通过已知技术进行众多化学修饰中的任一种，所述技术包括但不限于特定的化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外，衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸，例如，使用ambrx技术（参见例如，Wolfson, 2006, *Chem. Biol.* 13(10):1011-2）。

[0081] 抗OX40抗体可以是这样的抗体，其序列已进行修饰以改变至少一种恒定区介导的生物效应子功能。例如，在一些实施方案中，可以修饰抗OX40抗体，以相对于未修饰的抗体减少至少一种恒定区介导的生物效应子功能，例如，与一种或多种Fc受体（Fc $\gamma$ R）如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB、Fc $\gamma$ RIIIA和/或Fc $\gamma$ RIIIB的结合减少。可以通过在Fc $\gamma$ R相互作用所必需的特定区域处，使抗体的免疫球蛋白恒定区区段突变来减少Fc $\gamma$ R结合（参见例如，Canfield和Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491；以及Lund等人, 1991, *J. Immunol.* 147:2657-2662）。抗体的Fc $\gamma$ R结合能力中的减少还可以减少依赖于Fc $\gamma$ R相互作用的其它效应子功能，例如调理作用、吞噬作用和抗原依赖性细胞毒性（“ADCC”）。在说明性实例中，与相应的野生型恒定区相比，在Fc区的CH2结构域中具有V263L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S或V273Y取代的变体CH2结构域可以显示出对Fc $\gamma$ RIIIB的亲和力减少。

[0082] 本文所述的抗OX40抗体包括已进行修饰以获得或改善相对于未修饰的抗体的至少一种恒定区介导的生物效应子功能，例如以增强Fc $\gamma$ R相互作用的抗体（参见例如，美国专利申请号2006/0134709）。例如，本发明的抗OX40抗体可以具有的恒定区以比相应的野生型恒定区更大的亲和力结合Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB、Fc $\gamma$ RIIIA和/或Fc $\gamma$ RIIIB。在说明性实例中，与相应的野生型恒定区相比，在Fc区的CH2结构域中具有V263L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S或V273Y取代的变体CH2结构域可以显示出对Fc $\gamma$ RIIIA更大的亲和力。

[0083] 因此,本发明的抗OX40抗体可以具有生物活性中的改变,其导致增加或降低的调理作用、吞噬作用或ADCC。此类改变是本领域已知的。例如,美国专利号5,834,597中描述了减少ADCC活性的抗体中的修饰。示例性ADCC降低变体对应于“突变体3”(也称为“M3”,美国专利号5,834,597的图4中所示),其中残基234和237(使用EU编号)被丙氨酸取代。突变体3(也称为“M3”)变异可以用于许多抗体同种型中,例如人IaG2 M3。

[0084] 可以修饰抗OX40抗体的Fc $\gamma$ R结合和/或ADCC效应子功能的另外取代包括Fc区中的K322A取代或L234A和L235A双重取代,例如具有L234A/L235A双重取代的人IgG1。参见例如,Hezareh等人*J.Virol.*,75(24):12161-12168(2001)。

[0085] 在一些实施方案中,抗OX40抗体具有低水平的岩藻糖或缺乏岩藻糖。缺乏岩藻糖的抗体已与增强的ADCC活性相关联,尤其是在低剂量的抗体下。参见Shields等人,2002,*J.Biol.Chem.*277:26733-26740;Shinkawa等人,2003,*J.Biol.Chem.*278:3466-73。制备岩藻糖较少的抗体的方法包括在大鼠骨髓瘤YB2/0细胞(ATCC CRL 1662)中的生长。YB2/0细胞表达低水平的FUT8 mRNA,其编码 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶,关于多肽的岩藻糖基化所必需的酶。

[0086] 抗OX40抗体可以包含包括氨基酸取代的修饰的(或变体)CH2结构域或整个Fc结构域,与相应的野生型CH2或Fc区的结合相比,所述氨基酸取代增加与Fc $\gamma$ RIIB的结合和/或技术与Fc $\gamma$ RIIIA的结合。变体CH2或变体Fc结构域已在美国专利申请号2014/0377253中描述。变体CH2或变体Fc结构域通常包括在位置263、位置266、位置273和位置305处的一个或多个取代,其中Fc结构域中的残基编号是如Kabat中的EU索引的那种。在一些实施方案中,相对于野生型CH2结构域,抗OX40抗体包含选自V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305K和V305W的一个或多个取代。在具体实施方案中,相对于人IgG1的CH2结构域,CH2结构域的一个或多个取代选自V263L、V273E、V273F、V273M、V273S和V273Y。例如,IgG1 CH2结构域的一个或多个取代可以是V273E。在另一个具体实施方案中,本发明的抗OX40抗体包含变体IaG1 CH2结构域,其包含氨基酸取代V263L。

[0087] 与相应的野生型CH2或Fc区的结合相比,可以提供与Fc $\gamma$ RIIB的增加结合和/或与Fc $\gamma$ RIIIA的减少结合的变体CH2或变体Fc结构域的其它实例包括在Vonderheide等人*Clin.Cancer Res.*,19(5),1035-1043(2013)中发现的那些,例如人IgG1中的S267E或S267E/L328F。

[0088] 在一些实施方案中,抗OX40抗体包括增加或降低其对胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力的修饰,例如,通过在涉及FcRn相互作用的特定区域处使免疫球蛋白恒定区区段突变(参见例如,WO 2005/123780)。在特定实施方案中,使IgG类别的抗OX40抗体突变,使得重链恒定区的氨基酸残基250、314和428中的至少一个被单独取代,或以其任何组合取代,例如在位置250和428处,或在位置250和314处,或在位置314和428处,或在位置250、314和428处,其中位置250和428是特定组合。对于位置250,取代氨基酸残基可以是除苏氨酸外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于位置314,取代氨基酸残基可以是除亮氨酸外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或

酪氨酸。对于位置428,取代氨基酸残基可以是除甲硫氨酸外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。已知修饰Fc效应子功能的示例性取代是Fc取代M428L,其可以与Fc取代T250Q组合出现。合适的氨基酸取代的另外特定组合在美国专利号7,217,797的表1中鉴定。此类突变增加与FcRn的结合,其保护抗体免于降解并增加其半衰期。

[0089] 抗OX40抗体可以具有插入其一个或多个CDR内的一个或多个氨基酸,例如如Jung和Plückthun,1997,Protein Engineering 10:8,959-966;Yazaki等人,2004,ProteinEng.Des Sel.17(5):481-9.Epub 2004 Aug 17;和美国专利申请号2007/0280931中所述。

[0090] 术语“小鼠源抗体”是指可变区框架和CDR区得自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外,如果抗体包含恒定区,其也得自小鼠种系免疫球蛋白序列。本发明的鼠源抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变而导入的突变。然而,术语“鼠源抗体”不包括在小鼠框架序列中插入得自其他哺乳动物物种的CDR序列的抗体。

[0091] 术语“嵌合抗体”是指通过组合非人源遗传物质与人源遗传物质而得来的抗体。或者更笼统地说,嵌合抗体是指组合有一个物种的遗传物质与另一物种遗传物质的抗体。

[0092] 术语“人源化”形式的非人(例如鼠)抗体是嵌合免疫球蛋白,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最低限度序列。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且通常为两个可变结构域的基本上全部,其中CDR区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白共有序列的那种。抗体人源化的方法是本领域已知的。参见例如,Riechmann等人,1988,Nature 332:323-7;给予Queen等人的美国专利号:5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370;PCT公开WO 91/09967;美国专利号5,225,539;EP592106;EP519596;Padlan,1991,Mol.Immunol.,28:489-498;Studnicka等人,1994,Prot.Eng.7:805-814;Roguska等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.91:969-973;以及美国专利号5,565,332。

[0093] “人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或动物中分离的抗体,所述动物对于一种或多种人免疫球蛋白是转基因的,并且不表达内源免疫球蛋白。人抗体可以通过本领域已知的各种方法制备,所述方法包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;以及PCT公开WO 98/46645;WO 98/50433;WO 98/24893;WO 98/16654;WO 96/34096;WO96/33735;和WO 91/10741。还可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白,但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体。参见例如,PCT公开WO 98/24893;WO 92/01047;WO 96/34096;WO 96/33735;美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;和5,939,598。另外,使用与上述类似的技术,公司例如LakePharma,Inc.(Belmont,CA)或Creative BioLabs(Shirley,NY)可以从事于提供针对所选抗原的人抗体。可以使用被称为“引导选择”的技术生成识别所选表位的全人抗体。在该方法中,选择的非人单克隆抗体,例如小鼠抗体,用于引导识别

相同表位的完全人抗体的选择(参见,Jespers等人,1988,Biotechnology 12:899-903)。

[0094] 术语“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体”在本文中与术语“特异结合抗原的抗体”交替使用。

[0095] 在本文中,“特异结合人OX40”的抗体是指与人OX40(还可能是其他非人物种的OX40)结合但是基本不与非OX40蛋白结合的抗体。优选地,抗体以“高亲和力”结合人OX40蛋白,即KD值为 $5.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下,优选 $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下,更优选为 $5.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下。

[0096] 术语“基本不结合”蛋白或细胞是指,不与蛋白或细胞结合,或者不以高亲和力与其结合,即结合蛋白或细胞的KD为 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上,更优选 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上,更优选 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 以上、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 以上,更优选 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 以上。

[0097] 术语“高亲和性”对于IgG抗体而言,是指对于抗原的KD为 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下,优选 $5.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下,更优选 $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下、 $5.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下,更优选 $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下。对于其他抗体亚型,“高亲和性”结合可能会变化。例如,IgM亚型的“高亲和性”结合是指KD为 $10^{-6} \text{M}$ 以下,优选 $10^{-7} \text{M}$ 以下,更优选 $10^{-8} \text{M}$ 以下。

[0098] 术语“Kassoc”或“Ka”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而术语“Kdis”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的离解速率。术语“KD”是指解离常数,由Kd与Ka比(Kd/Ka)得到,并以摩尔浓度(M)表示。抗体的KD值可以通过领域内已知的方法确定。优选的确定抗体KD的方式是使用表面等离子共振仪(SPR)测得的,优选使用生物传感系统例如Biacore™系统测得。

[0099] 术语“EC50”,又叫半最大效应浓度,是指引起50%最大效应的抗体浓度。

[0100] 术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳类和非哺乳类,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类、和爬行类,尽管优选哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

[0101] 本文中所用的术语“激动型OX40抗体”是指能够与OX40结合并激活或引发OX40信号通路从而促进T细胞增殖和存活的OX40抗体。而术语“拮抗型OX40抗体”是指阻断OX40信号通路的OX40抗体,从而纠正过度活跃的T细胞病理,可以用于治疗例如哮喘、肠炎和关节炎。

[0102] 术语“治疗有效量”是指足以防止或减缓与疾病或病症(例如癌症)相关的症状和/或减轻疾病严重程度的本发明抗体量。治疗有效量与被治疗的疾病相关,其中本领域技术人员可以方便地判别出实际的有效量。

[0103] 本发明的多个方面在以下更加具体地加以描述。

[0104] OX40抗体具有对人OX40的结合特异性以及其他有益的功能特征

[0105] 本发明的抗体以高亲和力特异性地结合人OX40,例如,KD值为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下。抗体还具有与猴OX40的交叉反应性,不与小鼠OX40结合。

[0106] 本发明的抗体是激活或引发OX40信号通路并参与T细胞共刺激的激动型OX40抗体,促进IL-2分泌和CD8<sup>+</sup>T细胞增殖。

[0107] 本发明的抗体具有与良好的体内抗肿瘤效应。在抗体施用停止后,肿瘤不会生长,甚至肿瘤会完全消除,并且可以产生免疫记忆。

[0108] 本发明的抗体可以是多克隆的、单克隆的、遗传改造的和/或以其它方式实质上修饰的,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一些实施方案中,恒定区是选自以

下的同种型：IgA（例如IgA1或IgA2）、IgD、IgE、IgG（例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4）和IgM。在具体实施方案中，本文所述的抗OX40抗体包含IgG1。在其它实施方案中，抗OX40抗体包含IgG2或IgG4。如本文使用的，抗体的“恒定区”包括天然恒定区，同种异型或天然变体，例如人IgG1中的D356E和L358M、或A431G。参见例如，Jefferis和Lefranc, MAbs, 1(4):332-338 (2009年7月至8月)。优选的本发明抗体是单克隆抗体。此外，抗体可以是例如鼠源的、嵌合的或人源化的单克隆抗体。

[0109] 抗OX40抗体的轻链恒定区可以是C kappa ( $\kappa$ ) 区或C lambda ( $\lambda$ ) 区。 $\lambda$ 区可以是已知亚型中的任何一种，例如 $\lambda$ 1、 $\lambda$ 2、 $\lambda$ 3或 $\lambda$ 4。在一些实施方案中，抗OX40抗体包含C kappa ( $\kappa$ ) 区。

[0110] 对于人OX40 (SEQ ID NO:1) 具有高亲和力的抗OX40抗体可能是关于治疗和诊断用途所期望的。相应地，本发明考虑了对人OX40具有高结合亲和力的抗体。在具体实施方案中，抗OX40抗体以至少约100nM的亲合力结合人OX40，但可以显示出更高的亲合力，例如至少约90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM或甚至更高。在一些实施方案中，抗体以在约1pM至约100nM范围内的亲合力、或范围在任何前述值之间的亲合力结合人OX40，例如但不限于约0.001至10nM、0.001至5nM、0.01至100nM、0.01至50nM、0.01至10nM、0.01至5nM、或0.01至1nM。

[0111] 可以使用本领域众所周知的或本文描述的技术，例如但不限于，ELISA、等温滴定量热法 (ITC)、表面等离子共振或荧光偏振测定，来测定抗OX40抗体对于人OX40的亲合力。

[0112] 抗OX40抗体一般包括包含具有三个互补决定区 (“CDR”) 的可变区 (VH) 的重链，所述三个互补决定区在本文中称为 (以N→C次序) VH CDR#1、VH CDR#2和VH CDR#3，以及包含具有三个互补决定区的可变区 (VL) 的轻链，所述三个互补决定区在本文中称为 (以N→C次序) VL CDR#1、VL CDR#2和VL CDR#3。本文提供了示例性CDR的氨基酸序列，以及示例性抗OX40的重链和轻链的VH和VL区的氨基酸序列。抗OX40抗体的具体实施方案包括这些示例性CDR和/或VH和/或VL序列，以及与此类抗体竞争结合人OX40的抗体。

[0113] 与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下优点：

[0114] 第一，本发明提供了一种新的人源化抗OX40激活型抗体，氨基酸序列结构明确、对OX40亲合力高、激活OX40信号通路的效果确切，具有较低的异源性和较高的临床应用潜力。

[0115] 第二，本发明提供的人源化抗OX40激活型抗体生物活性好，不仅能够诱导OX40+细胞产生IL-8和NF $\kappa$ B，还能刺激PBMC产生IL-2和IFN- $\gamma$ ，具有相对广谱的免疫增强作用，并且能够增强T细胞应答免疫记忆。hz25A7m8、hz27G12H1L2对OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型治疗后的体内免疫记忆研究结果表明，经治疗所有组别的小鼠再次接种MC38细胞均不再成瘤，接种Hepa1-6细胞虽然可以成瘤，但是肿瘤生长明显受到抑制，hz25A7m8、hz27G12H1L2抑制效果与PC2 (可变区序列来源于BMS专利：W02016196228A1；重链：SEQ NO ID:124，轻链：SEQ NO ID:116；本发明中也简称：BMS；下同) 相比更加明显。

[0116] 第三，本发明提供的人源化抗OX40激活型抗体在动物模型体内实验中取得了较好的肿瘤抑制和杀伤效果，甚至在部分实验个体中出现肿瘤完全消退的情况，对结直肠癌等OX40相关癌症的临床使用效果较为明朗。hz25A7m8、hz27G12H1L2对OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型的体内药效学研究结果表明，在OX40转基因小鼠体内，候选抗体hz25A7m8、

hz27G12H1L2均可以显著抑制肿瘤生长,使大部分肿瘤消退。其中hz25A7m8可以使肿瘤完全消退,活性优于PC2和PC3(可变区序列来源于信达专利:WO2018177220A1;重链:SEQ NO ID:111,轻链:SEQ NO ID:130;本发明中也简称:XD;下同)等对照抗体。

### 附图说明

[0117] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。而且在整个附图中,用相同的参考符号表示相同的部件。在附图中:

[0118] 图1:ELISA鉴定鼠源单克隆抗体与OX40结合活性结果图。

[0119] 图2:抗OX40鼠源单克隆抗体激活HT1080-hOX40细胞表达IL8检测结果图。每个抗体自左至右抗体浓度逐步降低。

[0120] 图3:抗OX40鼠源单克隆抗体与HT1080-hOX40细胞结合结果图。

[0121] 图4:抗OX40嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7 Fortebio测定亲和力结果图。

[0122] 图5A:HT1080-huOX40分泌IL-8法鉴定OX40嵌合抗体激活活性结果图。

[0123] 图5B:NFκB通路激活-荧光素检测法鉴定OX40嵌合抗体激活活性结果图,每个抗体自左至右抗体浓度逐步降低。

[0124] 图6:嵌合抗体ch25A7、ch27G12阻断OX40L结合HT1080-huOX40细胞的活性。

[0125] 图7A.25A7、27G12人源化前后激活活性检测结果图;图7B.27G12人源化分子突变体激活活性检测结果图;图7C.25A7人源化分子突变体激活活性检测结果图(部分);图7D.25A7人源化分子突变体激活活性检测结果图(部分)。

[0126] 图8:抗OX40抗体hz25A7m8种属特异性鉴定结果图。

[0127] 图9:抗OX40抗体hz27G12H1L2种属特异性鉴定结果图。

[0128] 图10A:OX40抗体hz25A7、hz27G12的免疫学功能(IFN-γ),Von为PC1,BMS为PC2,XD为PC3。

[0129] 图10B:体外测试OX40抗体hz25A7、hz27G12的免疫学功能(IL-2),Von为PC1,BMS为PC2,XD为PC3。

[0130] 图10C:体外测试OX40抗体hz25A7、hz27G12的免疫学功能(细胞增殖),Von为PC1,BMS为PC2,XD为PC3。

[0131] 图11A:hz25A7m8、hz27G12H1L2有效抑制OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型肿瘤生长(个体数据),BMS为PC2,XD为PC3。

[0132] 图11B:hz25A7m8、hz27G12H1L2有效抑制OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型肿瘤生长(平均数据),BMS为PC2,XD为PC3。

[0133] 图12A:经抗OX40抗体治疗先后小鼠皮下成瘤实验分析免疫记忆结果图(MC38),BMS为PC2;hz25A7m8、hz27G12H1L2、BMS、以及isotype对照组的治疗方案均为0h,10mg/kg,ip,biw×4。

[0134] 图12B:经抗OX40抗体治疗先后小鼠皮下成瘤实验分析免疫记忆结果图(Hepal-6),BMS为PC2;hz25A7m8、hz27G12H1L2、BMS、以及isotype组的治疗方案均为0h,10mg/kg,ip,biw×4。

[0135] 图13:FACS法检测免疫记忆T细胞分群结果图,BMS为PC2。

## 具体实施方式

[0136] 下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式,然而应当理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反,提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开,并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0137] 具体而言,本发明提供抗体或其片段,包括重链可变区和轻链可变区,其中

[0138] 重链可变区包含:

[0139] VH CDR1选自SEQ ID NO:40、52、64所示氨基酸序列,

[0140] VH CDR2选自SEQ ID NO:41、53、65所示氨基酸序列,

[0141] VH CDR3选自SEQ ID NO:42、54、66所示氨基酸序列;

[0142] 轻链可变区包含:

[0143] VL CDR1选自SEQ ID NO:46、58、70所示氨基酸序列,

[0144] VL CDR2选自SEQ ID NO:47、59、71所示氨基酸序列,

[0145] VL CDR3选自SEQ ID NO:48、60、72所示氨基酸序列。

[0146] 本发明所述的抗体或其片段,其特征在于:

[0147] (1) 重链可变区与选自SEQ ID NO:2、14、22、30所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区与选自SEQ ID NO:4、16、18、20所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性;

[0148] (2) 重链可变区选自SEQ ID NO:6、24所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区选自SEQ ID NO:8、26、28、32所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性;

[0149] (3) 重链可变区为SEQ ID NO:10所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性,轻链可变区为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%以上同源性。

[0150] 本发明还提供一种免疫偶联物,其包括

[0151] (1) 本发明所述的抗体或其片段,

[0152] (2) 偶联部分。

[0153] 本发明还提供一种多特异性抗体或其衍生物,其中包括至少一个如本发明所述的抗体或其片段的抗原结合域。

[0154] 本发明还提供一种重链抗体,其在本发明所述抗体的基础上获得的二聚体重链抗体。

[0155] 本发明还提供一种组合物,其包括

[0156] (1) 本发明所述的抗体或其片段、本发明所述抗体偶联物、本发明所述多特异性抗体或其衍生物、或本发明所述重链抗体

[0157] (2) 药学上可接受的载体。

[0158] 本发明还提供一种核酸,其编码本发明所述的抗体或其片段、本发明所述多特异性抗体或其衍生物、或本发明所述重链抗体。

[0159] 本发明还提供一种重组载体或重组宿主细胞,其包括本发明所述编码核酸。

[0160] 本发明还提供所述抗体或其片段、所述抗体偶联物、所述多特异性抗体或其衍生

物、所述重链抗体、所述组合物、所述核酸、所述重组载体或重组宿主细胞的用途,其包括

[0161] 用于制备结合OX40、抑制OX40与OX40L的结合、激活OX40+T细胞、激活人体免疫应答反应、肿瘤治疗性疫苗等药物;

[0162] 用于制备增强特异性免疫应答的分子佐剂,优选与CpG等佐剂组合用于制备肿瘤疫苗;

[0163] 用于制备诱导OX40+细胞产生IL-8和/或启动NF $\kappa$ B基因转录药物;

[0164] 用于制备刺激PBMC产生IL-2和IFN- $\gamma$ 的药物;

[0165] 用于制备抑制实体瘤生长和转移的药物;

[0166] 用于制备定性或定量检测OX40的试剂盒。

[0167] 本发明还提供一种生产抗体的方法,包括:

[0168] (1) 培养本发明所述的重组宿主细胞,

[0169] (2) 回收抗体。

[0170] 实施例1:抗人OX40抗体杂交瘤细胞制备

[0171] 免疫:采用人OX40/mFc重组蛋白(序列号:P43489-1,29aa-216aa)免疫Balb/c小鼠,用包被重组人OX40-his蛋白的96孔酶标板以ELISA法检测血清滴度;血清滴度达到符合要求的小鼠用于下一步的细胞融合。

[0172] 细胞融合及杂交瘤制备:初次免疫后第67天,选取滴度达到要求的小鼠,无菌取小鼠脾脏,制备B淋巴细胞悬液,与FO骨髓瘤细胞以5:1的比例混合,在PEG4000作用下使两种细胞融合。融合后的细胞用HAT培养基重悬后,分装96孔细胞培养板。置37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

[0173] 实施例2:抗人OX40抗体阳性杂交瘤细胞株的筛选

[0174] 方案1.阳性杂交瘤ELISA结合筛选

[0175] 融合后10-14天,以人OX40-His重组蛋白(序列号:P43489-1,29aa-216aa)(10ug/ml,pH9.6,0.1M NaHCO<sub>3</sub>)包被酶标板,4 $^{\circ}$ C,过夜;用4%脱脂奶粉-PBS封闭,37 $^{\circ}$ C,2hr;用PBST(0.05%Tween20-PBS)洗三遍,加入杂交瘤克隆培养上清,37 $^{\circ}$ C,1hr。设以下对照:(1)阳性对照(PC):免疫后小鼠血清(用PBS 1:1000稀释);(2)阴性对照(NC):免疫前小鼠血清(用PBS 1:1000稀释)。经PBST(0.05%Tween20-PBS)洗三遍,加入HRP-羊抗小鼠IgG(Fc $\gamma$ ),1:20000稀释,37 $^{\circ}$ C,1hr;再经PBST(0.05%Tween20-PBS)洗五遍,加入OPD显色液,避光显色10-15min,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应;酶标仪读A492值。检测孔A492值大于阴性对照孔A492值2.1倍以上判断为阳性。为确定阳性克隆的可靠性,在一次筛选换液后隔一天再进行第二轮筛选。经检测鉴定(图1),共获得14个抗体分泌阳性细胞株(11F7-1,13D3-3,17B9-5,18D6-4,18G11-1,22H1-1,24H1-11,25A7-11,27H7-1,27G12-7,28C2-4,29G2-4,30B8-8,30812-5),继续对这14株抗体进行进一步筛选。

[0176] 方案2.抗OX40鼠源单克隆抗体激活HT1080-hOX40细胞表达IL8的活性筛选

[0177] 实验前一天消化HT1080-hOX40细胞(康源博创:Cat.No:KC-0140),用完全培养基(1640培养基+10%FBS+0.5 $\mu$ g/mL)重悬细胞,调整细胞密度至10<sup>5</sup>个/mL,在96孔细胞培养板中每孔加入200 $\mu$ L细胞悬液。然后将细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养过夜。第二天将待测抗体稀释至适当浓度,并加入细胞培养板中,置于37 $^{\circ}$ C5%CO<sub>2</sub>孵箱中孵育6小时。同时设置阳性对照PC1(PC1,即Vonlerolizumab,可变区序列来源于WHO Drug information,



Vol.31,NO.3,2017,本发明中也简称Von,下同)。最后将细胞培养上清吸出,参照说明书用IL-8ELISA定量试剂盒(货号:批号)检测上清中IL-8的含量。结果如图2所示,大部分克隆均可以很好的激活HT1080-hOX40细胞,使其表达IL8的水平升高。

[0178] 方案3.阳性杂交瘤与HT-1080细胞表面OX40结合筛选

[0179] 根据上述活性结果,挑选10株克隆(11F7-1,18D6-4,18G11-1,22H1-1,24H1-11,25A7-11,27H7-1,27G12-7,29G2-4,3088-8)的杂交瘤上清通过亲和纯化,获得的鼠抗体(5ug/ml)与重组表达人OX40的293细胞(293/OX40)悬液在37℃孵育30min,设以下对照:(1)阳性对照PC1,本实施例中该抗体分子Fc替换为鼠IgG1,5μg/ml;(2)阴性对照NC:无关鼠IgG1 5μg/ml。以PBS洗涤细胞3次后,加入1:64稀释的羊抗鼠IgG-FITC(Cat:F9006,Sigma)并孵育30min。PBS洗涤细胞3次后通过流式细胞仪(型号B49007AD,SNAW31211,BECKMAN COULTER)检测细胞的平均荧光强度(MFI)以验证杂交瘤分泌的抗体是否可以与293细胞表面的OX40结合,如图3所示,大部分克隆与293细胞表面的OX40有很好的结合。

[0180] 实施例3:鼠源抗人OX40抗体的序列测定

[0181] 将分泌抗人OX40抗体的杂交瘤细胞m25A7、m27G12、m11F7扩大培养后,用Mouse Monoclonal Antibody IgG Subclass Test Card(Cat.:A12403,VicNovo)及Mouse Monoclonal Antibody Light/Heavy Chain Test Card(Cat.:A12401,VicNovo)按照试剂操作规程进行亚型检测,亚型鉴定结果显示,m25A7、m27G12、m11F7重链均为IgG1,轻链均为Kappa链,为抗体基因的克隆提供依据。

[0182] 将m25A7、m27G12、m11F7杂交瘤细胞按照TRIzol试剂盒(Cat:15596026,Invitrogen)说明书步骤提取细胞总RNA;利用M-MuLV反转录酶(Cat:M0253S,NEB)将杂交瘤细胞总RNA反转录成cDNA;使用简并引物和Phusion试剂盒(Cat:E0553L,NEB)扩增抗体轻链可变区IgVL(κ)和重链可变区V<sub>H</sub>序列;利用胶回收试剂盒(Cat:AP-GX-250,Axygen)纯化PCR扩增产物;按照T载体克隆试剂盒(Cat:ZC205,庄盟生物)说明书将扩增PCR产物连接至T载体并转化大肠杆菌感受态细胞,菌株扩增、抽提质粒后进行DNA测序获得单克隆抗体可变区序列。测序结果显示鼠抗体m25A7重链可变区DNA的核苷酸序列见序列1,由该DNA序列推测得到鼠抗体m25A7重链可变区氨基酸序列见序列2。鼠抗体m25A7轻链可变区DNA的核苷酸序列见序列3,由该DNA序列推测得到鼠抗体m25A7轻链可变区氨基酸序列见序列4;鼠抗体m27G12重链可变区DNA的核苷酸序列见序列5,由该DNA序列推测得到鼠抗体m27G12重链可变区氨基酸序列见序列6。鼠抗体m27G12轻链可变区DNA的核苷酸序列见序列7,由该DNA序列推测得到鼠抗体m27G12轻链可变区氨基酸序列见序列8。鼠抗体m11F7重链可变区DNA的核苷酸序列见序列9,由该DNA序列推测得到鼠抗体m11F7重链可变区氨基酸序列见序列10。鼠抗体m11F7轻链可变区DNA的核苷酸序列见序列11,由该DNA序列推测得到鼠抗体m11F7轻链可变区氨基酸序列见序列12。

[0183] 实施例4:抗人OX40嵌合抗体的制备

[0184] 将克隆获得的鼠源抗体轻链可变区和重链可变区基因通过PCR引入酶切位点,分别克隆至装有人-kappa轻链恒定区和人IgG1重链恒定区编码基因上游的真核表达载体中,获得m25A7的人-鼠嵌合轻链(pKN019-Ch25A7L)和人-鼠嵌合重链(pKN041-Ch25A7H)表达质粒,m27G12的人-鼠嵌合轻链(pKN019-Ch27G12L)和人-鼠嵌合重链(pKN041-Ch27G12H)表达质粒,以及m11F7的人-鼠嵌合轻链(pKN019-Ch11F7L)和人-鼠嵌合重链(pKN041-Ch11F7H)

表达质粒。通过转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含人-鼠嵌合抗体轻链和重链的质粒。根据转染试剂293fectin (Cat:12347019,Gibco)的操作说明,将嵌合抗体Ch 25A7、Ch 27G12和Ch11F7的轻、重链质粒分别配对转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的m25A7、m27G12、m11F7嵌合抗体。

[0185] 实施例5:抗人OX40嵌合抗体的活性分析

[0186] 方案1.抗人OX40嵌合抗体的亲和力分析

[0187] 利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将抗人OX40嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7及对照抗体PC1用PBS缓冲液稀释至4ug/mL,流经AHC探针 (Cat:18-0015, PALL) 表面,时间为120s。人OX40-His重组蛋白(序列号:P43489-1,29aa-216aa)作为流动相,OX40-His重组蛋白浓度为100nM。结合时间为300s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1 Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0188] 抗人OX40嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7与人OX40重组蛋白的反应曲线如图4(其中的Von即阳性对照PC1)所示,拟合曲线并计算亲和力,结果显示嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7的亲和力(KD,表1)分别为:1.36E-08、4.34E-08、6.61E-09。结果表明嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7与人OX40重组蛋白具有高亲和力,亲和力低于对照抗体PC1。

[0189] 表1.抗OX40嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7 Fortebio测定亲和力拟合结果

Sample	Conc. (nM)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	RMax
ch25A7	100	1.36E-08	1.35E+05	1.84E-03	0.2571
ch27G12	100	4.34E-08	2.66E+05	1.16E-02	0.2574
ch11F7	100	6.61E-09	2.28E+05	1.51E-03	0.2749
PC1	100	1.86E-09	1.56E+05	2.90E-04	0.3613

[0191] 方案2.抗人OX40嵌合抗体激活活性分析

[0192] 按照实施例2方案2的方法,对嵌合抗体ch25A7、ch27G12、ch11F7进行激活活性分析。此外还基于荧光素检测的NFκB信号通路激活实验对嵌合抗体x进行了活性分析。具体的,实验前一天消化HT1080-hOX40细胞,用完全培养基(1640培养基+10%FBS+0.5μg/mL)重悬细胞,调整细胞密度至10<sup>5</sup>个/mL,在96孔细胞培养板中每孔加入200μL细胞悬液。随后将细胞培养板置于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养过夜。第二天用脂质体法转染NFκB报告基因质粒(pGL4.32[Iuc2P/NF-κB-RE/Hygro])至HT1080-hOX40细胞中。转染后24h更换培养基,继续培养细胞24h,保证细胞转染后恢复48h。然后将待测抗体稀释至适当浓度,并加入细胞培养板中,置于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱中孵育18小时。移去细胞处理培养基,用PBS彻底洗涤细胞,最后彻底晾干细胞。每孔加入25u1裂解液(如果裂解液充足可以加50u1左右,保证下一步操作不会产生气泡),保证覆盖细胞层,室温振荡裂解20min。吸取20u1细胞裂解液加入检测板对应孔中,配置好荧光素酶反应底物(100u1/sample),准备上机检测。根据机器读取的荧光素数值(RLU)绘制抗体浓度-RLU柱状图或曲线图。如果采用双荧光素酶报告系统同时读取实验反应荧光素数值(RLU1)和内参荧光素数值(RLU2),计算二者比值,绘制抗体浓度-RLU1/RLU2柱状图或曲线图。结果如图5A(Von代表PC1)、图5B所示,25A7和27G12具有较好的激活

活性,其活性不弱于对照抗体PC1。

[0193] 实施例6:ELISA检测抗人OX40嵌合抗体对人OX40/OX40L结合的抑制作用

[0194] 将人OX40稀释至1 $\mu$ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜,用5%BSA于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱封闭60min。将ch25A7、ch27G12和对照抗体PC1,以及同型对照NC-hIgG1(起始浓度为20 $\mu$ g/mL,3倍连续稀释,8个梯度),37 $^{\circ}$ C恒温培养箱反应60min后,加入10 $\mu$ g/mL的OX40L-mFc(OX40L序列号:NP\_003317,51-Leu 183,mFc Tag)与抗体共孵育,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱反应60min。PBST洗板4次;然后加入1:5000稀释的HRP-anti-mouse Fc(Cat:115-035-071,Jackson Immuno Research),反应45min,加入TMB(Cat:ME142,北京泰天河生物)底物显色15min,2M HCl终止后读板。以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度值A450nm-630nm。结果显示ch25A7可以有效阻断重组人OX40与其受体OX40L的结合作用,其半数有效抑制浓度(IC50)值分别0.92 $\mu$ g/mL,与对照抗体PC1相当(0.91 $\mu$ g/mL)(图6)。ch27G12无明显抑制作用。

[0195] 实施例7:抗人OX40单克隆抗体25A7、27G12人源化及重组表达

[0196] 方案1.25A7的人源化设计及重组表达

[0197] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体template,选择VH3(3-21)为基础模板,结合全序列blast结果,考虑重排(rearranged)抗体在特定FR区位点氨基酸出现频率,与HCDR3序列情况,进行CDR移植,实现了m25A7重链可变区(VH)在Framework区的高度人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体template,分别选择VK I(L5)、VK II(O1)、VK VI(A26)为基础模板,结合全序列blast结果,考虑重排(rearranged)抗体在特定FR区位点氨基酸出现频率,与LCDR3序列情况,进行CDR移植,实现了m25A7轻链Framework区的全人源化。m25A7抗体CDR移植(CDR Grafted)的人源化重链可变区核苷酸序列见序列13,氨基酸序列见序列14;人源化轻链1可变区核苷酸序列见序列15,氨基酸序列见序列16;人源化轻链2可变区核苷酸序列见序列17,氨基酸序列见序列18;人源化轻链3可变区核苷酸序列见序列19,氨基酸序列见序列20。随后根据鼠源25A7序列特点,对CDR移植的人源化重链可变区序列进行回复突变设计,回复突变位点见下表2。25A7人源化回复突变后最终选用序列的重链可变区核苷酸序列见序列21,氨基酸序列见序列22,轻链可变区核苷酸序列见序列15,氨基酸序列见序列16。随后将25A7的人源化轻链hz25A7\_L1和人源化重链突变体(亲本hz25A7\_H1、突变体hz25A7\_H1m1-hz25A7\_H1m8)分别组合配对(表3)并转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的hz25A7的各种突变体人源化抗体(顺次记做hz25A7\_H1m1-hz25A7\_H1m9)。

[0198] 表2.25A7重链人源化回复突变序列设计

[0199]	hz25A7_H	
	hz25A7_H1	CDR Grafted
	hz25A7_H1m1	R16E
	hz25A7_H1m2	R16G
	hz25A7_H1m3	A23E,A24S
	hz25A7_H1m4	S30P
	hz25A7_H1m5	W47L
	hz25A7_H1m6	T97A
	hz25A7_H1m7	S25N,G26E,F27Y,T28E
	hz25A7_H1m8	W47L, T97A

[0200] 注:如R16E标示依照Kabat编号系统,将16位氨基酸R突变回E

[0201] 表3.25A7轻、重链序列组合

[0202]		hz25A7	hz25A7	hz25A7	hz25A7	hz25A7	hz25A7	hz25A7	hz25A7
		_H1	_H1m1	_H1m2	_H1m3	_H1m4	_H1m5	_H1m6	_H1m8
	hz25A7_L1	25A7m1	25A7m2	25A7m3	25A7m4	25A7m5	25A7m6	25A7m7	25A7m9

[0203] 注:该表表示各种人源化25A7轻重链组合所得序列,如25A7-1表示,该抗体由25A7人源化轻链hz25A7\_L1和人源化重链hz25A7\_H1组成,其他类推。

[0204] 方案2.27G12的人源化设计及重组表达

[0205] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体template,选择VH1(1-46)为基础模板,结合全序列blast结果,考虑重排(rearranged)抗体在特定FR区位点氨基酸出现频率,PTM风险与HCDR3序列情况,进行CDR移植,实现了m27G12重链可变区(VH)在Framework区的全人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体template,分别选择VK III(L2)、VK II(A2)为基础模板,结合全序列blast结果,与LCDR3序列情况,进行CDR移植,实现了m27G12轻链Framework区的全人源化。m27G12抗体CDR移植(CDR Grafted)的人源化重链可变区核苷酸序列见序列23,氨基酸序列见序列24;人源化轻链1可变区核苷酸序列见序列25,氨基酸序列见序列26;人源化轻链2可变区核苷酸序列见序列27,氨基酸序列见序列28。随后将27G12的人源化重链hz27G12H1和人源化轻链hz27G12L1、hz27G12L2分别组合配对并转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得hz27G12的突变体人源化抗体hz27G12H1L1、hz27G12H1L2。

[0206] 实施例8:抗人OX40人源化抗体的活性分析

[0207] 方案1.Fortebio检测抗体亲和力

[0208] 参照实施例5方案1的方法,对hz25A7、hz27G12的各种突变体进行亲和力分析。结果显示(表4)突变体hz25A7m8、hz27G12H1L2保持了和嵌合抗体相当或略高的亲和力水平,亲和力(KD)分别为 $0.65E-08M$ 、 $1.32E-08M$ 。

[0209] 表4.25A7人源化突变体亲和力测定结果表

Sample	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
ch25A7	0.2603	$0.91E-08$	$1.82E+05$	$1.65E-03$
hz25A7H1L1	0.1161	$2.28E-08$	$3.14E+05$	$7.16E-03$
hz25A7m1	0.1614	$2.26E-08$	$3.02E+05$	$6.82E-03$
hz25A7m2	0.1534	$2.14E-08$	$3.01E+05$	$6.43E-03$
hz25A7m3	0.1709	$2.24E-08$	$2.97E+05$	$6.65E-03$
hz25A7m4	0.1527	$1.96E-08$	$2.52E+05$	$4.95E-03$
hz25A7m5	0.243	$1.19E-08$	$1.47E+05$	$1.75E-03$
hz25A7m6	0.2039	$1.63E-08$	$3.46E+05$	$5.63E-03$
hz25A7m7	0.1519	$1.48E-08$	$3.56E+05$	$5.26E-03$
hz25A7m8	0.3062	$0.65E-08$	$1.58E+05$	$1.02E-03$
ch27G12	0.2562	$1.71E-08$	$2.85E+05$	$4.88E-03$
h27G12HL	0.2323	$1.63E-08$	$3.35E+05$	$5.45E-03$
27G12H1L1	0.208	$1.43E-08$	$3.36E+05$	$4.82E-03$
h27G12H1L2	0.1866	$1.32E-08$	$3.15E+05$	$4.15E-03$

[0212] 参照实施例5方案2的方法,对hz25A7、hz27G12及各突变体进行H1080激活活性分析。结果如图7A-D所示(Von表示PC1),人源化后的25A7和27G12及其突变体均保持了良好的激活H1080表达IL-8的活性。

[0213] 实施例9.hz25A7-mut8、hz27G12-H1L2的种属交叉

[0214] 将人OX40(序列号:P43489-1,29aa-216aa)、食蟹猴OX40(Cat:90846-C08H,北京义翘神州)、以及小鼠OX40(Cat:50808-MCCH,北京义翘神州)胞外区重组蛋白稀释至 $1\mu\text{g/mL}$ , $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;PBS洗板3次后,加入5%BSA PBS, $37^{\circ}\text{C}$ 封闭60min,PBST洗板3次;加入PBS梯度稀释的h25A7mut8、h27G12H1L2, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育60min,PBST洗板4次;加入1:5000稀释的HRP-羊抗人IgG抗体(Cat:115-035-071,Jackson Immuno Research), $37^{\circ}\text{C}$ 孵育30min,PBST洗板4次;加入TMB底物显色, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育10min后,加入2M HCl终止反应;以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度 $A_{450\text{nm}-630\text{nm}}$ 。结果(图8、图9)显示,h25A7mut8、h27G12H1L2与人、猴OX40均有结合,与鼠OX40无结合。h25A7mut8与人、猴OX40的结合活性相当,

h27G12H1L2与猴OX40的结合活性低于与人OX40的结合活性。

[0215] 实施例10:体外测试OX40抗体hz25A7、hz27G12的免疫学功能

[0216] 取健康受试者外周抗凝血,分离得到单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC),将梯度稀释的OX40抗体或对照抗体与PBMC共孵育,通过检测细胞增殖情况及细胞因子(IL-2、IFN- $\gamma$ )分泌水平来评价OX40抗体的功能活性。具体的,抗人CD3抗体及抗人CD28抗体单独或一起包被酶联板,作为对照孔;抗人OX40抗体包被酶联板,作为待检测孔。取健康人外周血,根据Dynabeads™ FlowComp™ Human CD3 Kit说明书,分离获得CD3+T细胞;洗涤2次后,使用培养基将细胞调整至合适浓度,加入96孔板中;5天后采用CTG法检测细胞增殖情况,收获细胞培养上清,采用ELISA法检测IL-2、IFN- $\gamma$ 。最终以Anti-Human CD3/CD28组作为阳性对照,以PBS组作为阴性对照,评价OX40抗体的生物活性。实验结果显示,和对照抗体一样,hz25A7m8(本实施例中标记为KNAb-1)、hz27G12H1L2(本实施例中标记为KNAb-2)均可以剂量依赖地显著增加培养基中细胞因子IL-2和IFN- $\gamma$ 的浓度(图10A、图10B),提示其可以活化T淋巴细胞,增强其分泌细胞因子的功能。细胞增殖检测结果显示(图10C),hz25A7m8、hz27G12H1L2均可以有效促进细胞增殖,且促进细胞增殖的能力与对照抗体品PC2、PC3相当。

[0217] 实施例12:抗OX40抗体hz25A7m8、hz27G12H1L2的体内活性分析

[0218] 方案1.hz25A7m8、hz27G12H1L2对OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型的体内药理学研究

[0219] MC38小鼠结直肠癌细胞,用含有10%灭活胎牛血清,100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素的DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每隔3至4天待细胞长满后分瓶传代,收获对数生长期的肿瘤细胞,PBS重悬后接种于人OX40转基因小鼠的右侧肋部皮下,当平均肿瘤体积达到60-100mm<sup>3</sup>左右时分组给药,每组6只动物,按照10mg/kg的剂量,每周两次,一共给药4次。分组后每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行3次测量,测量肿瘤的长径和短径,其体积计算公式为:体积=0.5 $\times$ 长径 $\times$ 短径<sup>2</sup>。在进行肿瘤体积测量的同时,称量小鼠体重。记录小鼠体重的变化与给药时间的关系。同时观察小鼠的存活情况和健康状况如给药期间动物活动、进食等一般状态。实验结束时,将小鼠安乐死,剥离肿瘤称重,并将对照组和受试组剥离的肿瘤摆放整齐进行拍照。结果(图11A、图11B)显示,OX40转基因小鼠体内,候选抗体hz25A7m8、hz27G12H1L2均可以显著抑制肿瘤生长,使大部分肿瘤消退。其中hz25A7m8可以使肿瘤完全消退,活性优于PC2和PC3等对照抗体。

[0220] 方案2.hz25A7m8、hz27G12H1L2对OX40人源化小鼠结直肠癌MC38模型治疗后的体内免疫记忆研究

[0221] MC38小鼠结直肠癌肿瘤细胞和Hepa1-6小鼠肝癌肿瘤细胞用含有灭活的10%胎牛血清,100U/ml的青霉素和100 $\mu$ g/ml的链霉素以及2mM谷氨酰胺的DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每隔3至4天待细胞长满后分瓶传代,收获对数生长期的肿瘤细胞,接种于本实施例方案1中经hz25A7m8、hz27G12H1L2、PC2治疗后MC38肿瘤完全消退的huOX40小鼠,以及未接种过肿瘤的C57BL/6J小鼠,将PBS重悬的肿瘤细胞接种于实验动物的左右两侧肋部皮下。接种肿瘤细胞后每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行2-3次测量,测量肿瘤的长径和短径,其体积计算公式为:体积=0.5 $\times$ 长径 $\times$ 短径<sup>2</sup>。在进行肿瘤体积测量的同时,称量小鼠体重。记录小鼠体重的变化与接种时间的关系。同时观察小鼠的存活情况和健康状

况,如接种后动物活动、进食等一般状态。实验结束时,将小鼠安乐死,剥离肿瘤称重,并将对照组和受试组剥离的肿瘤摆放整齐进行拍照。结果(图12A)显示,经治疗所有组别的小鼠再次接种MC38细胞均不再成瘤,接种Hepa1-6细胞虽然可以成瘤,但是肿瘤生长明显受到抑制,hz25A7m8、hz27G12H1L2抑制效果与PC2相比更加明显(图12B)。

[0222] 方案3.FACS法检测免疫记忆T细胞分群

[0223] 取本实施例方案2小鼠的脾脏,制备单细胞悬液,加入anti-mouse CD3/CD4/CD44/CD62L将与脾脏细胞共孵育,分析免疫记忆T细胞分群。具体的,无菌环境解剖荷瘤小鼠,获取脾脏;将70 $\mu$ M细胞筛网置于无菌平皿中,将脾脏转移至细胞筛网中,使用研磨棒将脾脏研磨成分散的单细胞;收集细胞悬液至50mL离心管中,200 $\times$ g,离心10min;弃上清,裂解红细胞,洗涤2次后,将细胞悬液经40 $\mu$ M细胞筛网处理,得到脾脏单细胞悬液;将脾脏单细胞悬液转移至流式管中,根据实验设计加入相应抗体(anti-mouse CD3/CD4/CD44/CD62L),避光孵育30min;加入PBS洗涤1次后,重悬细胞,进行流式检测。结果(图13)显示,与对照组相比,经hz25A7m8、hz27G12H1L2、PC2治疗的小鼠辅助性T细胞(CD3+CD4+)显著增加。进一步分析发现其中记忆性T细胞(CD3+CD4+CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>)和天然T细胞(CD3+CD4+CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>)比例均有不同程度的增加。

[0224] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

[0225] 本申请中涉及的序列如下:

[0226] 序列1:m25A7重链可变区DNA核苷酸序列

GAGGTT CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGAGTCCCTGAAACTC

TCCTGTGAATCCAATGAATACGAATTCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTCCGCAAGACTCCG

GAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGAATCTACTATCCAGA

[0227]

CACCATGGAGAGACGATTCATCATCTCCAGAGACAATACCAAGAAGACCCTGTACCTGCAAA

TGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTACAAGACACTATGATGGTTAC

GCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0228] 其中,CDRs编码区为序列37-39

[0229] 序列2:m25A7重链可变区氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGESLKLSCESNEYEFPSHDMSWVRKTPEKRLELVAAINSDGGRIYYPDTM

[0230]

ERRFIISRDNKTKTLYLQMSSLRSEDTALYCTRHYDGYAWFAYWGQGLTVTSA

[0231] 其中,CDRs区为序列40-42

[0232] 序列3:m25A7轻链可变区DNA核苷酸序列

- GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCAT  
 CTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTCTAGTTATATACACTGGTACCAACA  
 GAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCC  
 [0233] CTGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGA  
 GGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGCTCACGTTCGGT  
 GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA  
 [0234] 其中,CDRs编码区为序列43-45  
 [0235] 序列4:m25A7轻链可变区氨基酸序列  
 DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGSSYIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARF  
 [0236] SGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELR  
 [0237] 其中,CDRs区为序列46-48  
 [0238] 序列5:m27G12重链可变区DNA核苷酸序列  
 AAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGGGCTGGTGAACCCGGGGCATCAGTGAAGCTG  
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGAATATATTATACACTGGGTAAAACAGAGGTCT  
 GGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGGTGGTTTTACCCTGAAAGTGGTAGTATAAAGTACAACG  
 [0239] AGAAATTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCGGACAAATCCTCCAACACAGTCTATATGGAG  
 CTTAGTAGATTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGACACGAAGATCCGATT  
ACCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA  
 [0240] 其中,CDRs编码区为序列49-51  
 [0241] 序列6:m27G12重链可变区氨基酸序列  
 KVQLQQSGAGLVKPGASVKLSCKASGYTFEYIIHWVKQRSGQGLEWIGWWFYPESGSIKYNEKF  
 [0242] KDKATLTADKSSNTVYMELSRLTSEDSAVYFCARHEDPITFAYWGQTLVTVSA  
 [0243] 其中,CDRs区为序列52-54  
 [0244] 序列7:m27G12轻链可变区DNA核苷酸序列  
 GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCAT  
 CTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACA  
 GAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCC  
 [0245] AGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAG  
 GAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTTACACGTTCGGAG  
 GGGGACCAAGCTGGAAATTA  
 [0246] 其中,CDRs编码区为序列55-57  
 [0247] 序列8:m27G12轻链可变区氨基酸序列  
 DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAASNLESGIPA  
 [0248] RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK



- [0249] 其中,CDRs区为序列58-60
- [0250] 序列9:m11F7重链可变区DNA核苷酸序列  
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGAGTCCCTGAAACTC  
TCCTGTGAATCCAATGAATACGAATCCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTCCGCAAGACTCCG  
GAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAAATAGTGATGGTGATAACACCTACTATCCAGA
- [0251] CACCTTGGAGAGACGATTCATCATCTCCAGAGACAATACCAAGAAGACCCTGTACCTGCAAA  
TGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTTTATTACTGTACAAGACACTATGATAATTACT  
ACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTAGTCACTGTCTCTGCA
- [0252] 其中,CDRs编码区为序列61-63
- [0253] 序列10:m11F7重链可变区氨基酸序列  
EVQLVESGGGLVQPGESEKLSKESNEYEPSHDMSWVRKTPEKRLELVATINSDGDNTYYPDTL
- [0254] ERRFIISRDNKTKTLYLQMSSLRSEDTAFYYCTRHYDNYAWFAYWGQGLVTVSA
- [0255] 其中,CDRs区为序列64-66
- [0256] 序列11:m11F7轻链可变区DNA核苷酸序列  
GACATTGTGATGACCCAGTCTCCTGCTTCTTAAGTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATC  
TCATGCAGGGCCAGCGAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACA  
GAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCACTCCAACCTAGAATCTGGGGTCC
- [0257] CTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGA  
GGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTGAGCACAGTAGGGAGCTTCCGCTCACGTTCCGGT  
GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
- [0258] 其中,CDRs编码区为序列67-69
- [0259] 序列12:m11F7轻链可变区氨基酸序列  
DIVMTQSPASLTIVSLGQRATISCRASESVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPAR
- [0260] FSGSGSFTDFLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK
- [0261] 其中,CDRs区为序列70-72
- [0262] m25A7人源化重链可变区核苷酸序列见序列13;
- [0263] SEQ.ID NO.13:  
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGACGGTCCCTGCGACT  
GTCCTGCGCTGCCTCTGGCTTACCTTCTCCTCCACGACATGCTCTGGGTGCGGCAGGCTC  
CTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCTGCCATCAACTCCGACGGAGGCCGGATCTACTACCC
- [0264] TGACACCATGGAGCGACGGTTCACCATCTCTCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
AGATGAACTCCCTGCGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGCACTACGACGG  
CTACGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC
- [0265] 其中,CDRs编码区为序列73-75

- [0266] 25A7人源化重链可变区氨基酸序列见序列14；
- [0267] SEQ.ID NO.14：  
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHDMSWVRQAPGKGLEWVAAINS DGGRIYYPD
- [0268] TMERRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRHYDGYAWFAYWGQGLTVTVSS
- [0269] 其中,CDRs区为序列76-78
- [0270] 25A7人源化轻链1可变区核苷酸序列见序列15；
- [0271] SEQ.ID NO.15：  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACCGAGTGACCAT  
CACCTGCCGAGCCTCCAAGTCCGTGTCCACCTCTGGCTCCTCCTACATCCACTGGTACCAGCA
- [0272] GAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGGAGTCTGGAGTG  
CCCTCTCGTTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAG  
CCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGGGAGCTGCCTCTGACCTTCGGAG
- [0273] GAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0274] 其中,CDRs编码区为序列79-81
- [0275] 25A7人源化轻链1可变区氨基酸序列见序列16
- [0276] SEQ.ID NO.16：  
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSTSGSSYIH WYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF
- [0277] SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK
- [0278] 其中,CDRs区为序列82-84
- [0279] 25A7人源化轻链2可变区核苷酸序列见序列17；
- [0280] SEQ.ID NO.17：  
GACATCGTGATGACCCAGACACCTCTGTCCCTGCCCGTGACACCTGGCCAGCCTGCCTCCAT  
CTCCTGCCGAGCCTCCAAGTCCGTGTCCACCTCCGGCTCCTCCTACATCCACTGGTACCTGCA
- [0281] GAAGCCTGGACAGTCTCCTCGGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGGAGTCTGGCGTGC  
CCGACCGTTCTCCGGATCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGGGTGGA  
GGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCCAGCACTCCAGGGAGCTGCCTCTGACCTTCGGA  
GGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0282] 其中,CDRs编码区为序列85-87
- [0283] 25A7人源化轻链2可变区氨基酸序列见序列18；
- [0284] SEQ.ID NO.18：  
DIVMTQTPLSLPVTPGQPASISCRASKSVSTSGSSYIH WYLQKPGQSPRLLIYLASNLESGVPSRF
- [0285] SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK
- [0286] 其中,CDRs区为序列88-90
- [0287] 25A7人源化轻链3可变区核苷酸序列见序列19。
- [0288] SEQ.ID NO.19：

- [0289] GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCCCTGTCTCCTGGCGAGCGAGCCACCCT  
GTCCTGCAGAGCCTCCAAGTCCGTGTCCACCTCTGGCTCCTCCTACATCCACTGGTACCAGCA  
GAAGCCTGGACAGTCTCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGGAGTCTGGAGTG
- [0290] CCCTCCCGTTCTCCGGATCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACTCCCTGGA  
GGCCGAGGACGCTGCCACCTACTACTGCCAGCACTCTCGGGAGCTGCCTCTGACCTTCGGA  
GGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0291] 其中,CDRs编码区为序列91-93
- [0292] 25A7人源化轻链3可变区氨基酸序列见序列20。
- [0293] SEQ. ID NO. 20:  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGSSYIHWHYQQKPGQSPKLLIYLASNLESGVPSRFS
- [0294] GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQHSRELPLTFGGGKVEIK
- [0295] 其中,CDRs区为序列94-96
- [0296] 25A7人源化backmutation后重链可变区核苷酸序列见序列21
- [0297] SEQ. ID NO. 21:  
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGACGGTCCCTGCGACT  
GTCCTGCGCTGCCTCTGGCTTACCTTCTCTCCACGACATGTCTGGGTGCGGCAGGCTC  
CTGGCAAGGGACTGGAGCTGGTGGCTGCCATCAACTCCGACGGAGGCCGGATCTACTACCC  
TGACACCATGGAGCGACGGTTCACCATCTCTCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
AGATGAACTCCCTGCGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGCACTACGACGG  
CTACGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC
- [0299] 其中,CDRs编码区为序列97-99
- [0300] 25A7人源化backmutation后重链可变区氨基酸序列见序列22
- [0301] SEQ. ID NO. 22:  
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFS~~SHDMS~~WVRQAPGKGLLELVA~~AINSD~~GGRIYYPDT
- [0302] ~~MERRFTISR~~DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~HYDGYAWFAY~~WGQGLTVTVSS
- [0303] 其中,CDRs区为序列100-102
- [0304] 27G12人源化重链可变区编码核苷酸序列见序列23
- [0305] SEQ. ID NO. 23:  
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGGT  
GTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCGAGTACATCATCCACTGGGTGAGGCAGGCTC  
CTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGTTCTACCCTGAGTCCGGCTCCATCAAGTACAA  
CGAGAAGTTCAAGGACCGGGTGACCATCACCAGGGACACCTCCACCTCCACCGTGTACATG  
GAGCTGTCCTCCCTGCGGTCCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGACACGAGGACC  
CCATCACCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC
- [0306]

- [0307] 其中,CDRs编码区为序列103-105
- [0308] 27G12人源化重链可变区氨基酸序列见序列24
- [0309] SEQ.ID NO.24:  
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYIIHWVRQAPGQGLEWIGWFYPESGSIKYNEK
- [0310] FKDRVITITRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARHEDPITFAYWGQGLTVTVSS
- [0311] 其中,CDRs区为序列106-108
- [0312] 27G12人源化轻链1可变区编码核苷酸序列见序列25
- [0313] SEQ.ID NO.25:  
GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCTGGCGAGCGAGCCACCCT  
GTCCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACATGAACTGGTACCAGC  
AGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCTGCCTCCAACCTGGAGTCCGGCAT  
CCCTGCTCGGTTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGGA  
GCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCAACGAGGACCCCTACACCTTCGGC  
GGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0314] 其中,CDRs编码区为序列109-111
- [0315] 27G12人源化轻链1可变区氨基酸序列见序列26
- [0316] SEQ.ID NO.26:  
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQAPKLLIYAASNLESGIPA  
RFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFATYYCQQSNE DPYTFGGGTKVEIK
- [0317] 其中,CDRs区为序列112-114
- [0318] 27G12人源化轻链2可变区编码核苷酸序列27
- [0319] SEQ.ID NO.27:  
GACATCGTGATGACCCAGACACCTCTGTCCCTGTCCGTGACACCTGGCCAGCCTGCCTCCAT  
CTCCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACATGAACTGGTACCTGC  
AGAAGCCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACGCTGCCTCCAACCTGGAGTCTGGCGTG  
CCCGACCGGTTCTCCGGATCTGGATCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGGGTGGA  
GGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACGAGGACCCCTACACCTTCGGC  
GGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0320] 其中,CDRs编码区为序列115-117
- [0321] 27G12人源化轻链2可变区氨基酸序列见序列28
- [0322] SEQ.ID NO.28:  
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYDGD SYMNWYLQKPGQSPQLLIYAASNLESGVP  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSNE DPYTFGGGTKVEIK
- [0323] 其中,CDRs区为序列118-120
- [0324] 25A7人源化最终重链可变区核苷酸序列见序列29
- [0325] SEQ.ID NO.29:

- GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGACGGTCCCTGCGACT  
 GTCCTGCGCTGCCTCTGGCTTACCTTCTCCTCCACGACATGTCCTGGGTGCGGCAGGCTC  
 CTGGCAAGGGACTGGAGCTGGTGGCTGCCATCAACTCCGAGGGAGGCCGGATCTACTACCC  
 [0331] TGACACCATGGAGCGACGGTTCACCATCTCTCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
AGATGAACTCCCTGCGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGCCACTACGACAA  
CTACGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC
- [0332] 其中,CDRs编码区为序列121-123
- [0333] 25A7人源化最终重链可变区氨基酸序列见序列30
- [0334] SEQ. ID NO. 30:  
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHDMSWVRQAPGKLELVAAINSEGGRIYYPDT  
 [0335] MERRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYDNYAWFAYWGQGLTVTVSS
- [0336] 其中,CDRs区为序列124-126
- [0337] 25A7人源化最终轻链可变区编码核苷酸序列见序列15
- [0338] SEQ. ID NO. 15:  
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACCGAGTGACCAT  
 CACCTGCCGAGCCTCCAAGTCCGTGTCCACCTCTGGCTCCTCCTACATCCACTGGTACCAGCA  
 GAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGGAGTCTGGAGTG  
 [0339] CCCTCTCGGTTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAG  
 CCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGGGAGCTGCCTCTGACCTTCGGAG  
 GAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0340] 其中,CDRs编码区为序列127-129
- [0341] 25A7人源化最终轻链可变区氨基酸序列见序列16
- [0342] SEQ. ID NO. 16:  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSTSGSSYIHWHYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRF  
 [0343] SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK
- [0344] 其中,CDRs区为序列130-132
- [0345] 27G12人源化最终重链可变区编码核苷酸序列见序列23
- [0346] SEQ. ID NO. 23:  
 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGGT  
 GTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGAGTACATCCTACTGGGTGAGGCAGGCTC  
 [0347] CTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGTTCTACCCTGAGTCCGGCTCCATCAAGTACAA  
CGAGAAGTTCAAGGACCGGGTGACCATCACCAGGGACACCTCCACCTCCACCGTGTACATG  
GAGCTGTCTCCTGCGGTCCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGACACGAGGACC  
 [0348] CCATCACCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC

- [0349] 其中,CDRs编码区为序列133-135
- [0350] 27G12人源化最终重链可变区氨基酸序列见序列24
- [0351] SEQ.ID NO.24:  
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYIIHWVRQAPGQGLEWIGWFYPESGSIKYNEK
- [0352] FKDRVITITRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARHEDPITFAYWGQGLTVTVSS
- [0353] 其中,CDRs区为序列136-138
- [0354] 27G12人源化最终轻链可变区编码核苷酸序列见序列31
- [0355] SEQ.ID NO.31:  
GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCTGGCGAGCGAGCCACCCT  
GTCCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGAGGGCGACTCCTACATGAACTGGTACCAG  
CAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCTGCCTCCAACCTGGAGTCCGGCA  
TCCCTGCTCGGTTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGG  
AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCAACGAGGACCCCTACACCTTCGG  
CGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
- [0356] 其中,CDRs编码区为序列139-141
- [0357] 27G12人源化最终轻链可变区氨基酸序列见序列32
- [0358] SEQ.ID NO.32:  
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVDYEGDSYMNWYQQKPGQAPKLLIYAASNLESGIPA
- [0359] RFSGSGSGTDFLTISLPEPDTFATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIK
- [0360] 其中,CDRs区为序列142-144
- [0361] 重链恒定区核苷酸序列33
- [0362] SEQ.ID NO.33:  
GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG

- GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG  
 GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA  
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT  
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT  
 TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG  
 TCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACAT  
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC  
 [0365] GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG  
 CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC  
 AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA  
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG  
 CTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT  
 GTCTCCGGGTAAA
- [0366] 重链恒定区氨基酸序列34
- [0367] SEQ. ID NO. 34:  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 [0368] QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKLSLSLSPGK
- [0369] 轻链恒定区核苷酸序列35
- [0370] SEQ. ID NO. 35:
- [0371] CGGACCGTGGCGGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGT  
 ACCGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA  
 GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA  
 [0372] GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA  
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC  
 AACAGGGGAGAGTGT

[0373] 轻链恒定区氨基酸序列36

[0374] SEQ.ID NO.36:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

[0375]

STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



## 序列表

<110> 申请人名称(迈威)

<120> 一种激活型抗OX40抗体、生产方法及应用

<130> 无

<160> 144

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
gaggttcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagagtc cctgaaactc 60
tctctgtaat ccaatgaata cgaattccct tcccatgaca tgtcttgggt cgcgaagact 120
ccggagaaga ggctggagtt ggtcgcagcc attaatagtg atggtggtag aatctactat 180
ccagacacca tggagagacg attcatcadc tccagagaca ataccaagaa gaccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagccttgt attactgtac aagacactat 300
gatggttacg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

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

<210> 3

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gacatccagc tgactcagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ctagtatat acactggtac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttccgctc 300  
 acgttccggtg ctgggaccaa gctggagctg aga 333

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

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

<210> 5

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

aaggtccagc tgcagcagtc tggagctggg ctggtgaaac ccggggcadc agtgaagctg 60  
 tcttgcaagg cttctggeta caccttcact gaatatatta tacactgggt aaaacagagg 120  
 tctggacagg gtcttgagtg gattgggtgg ttttacctg aaagtgtag tataaagtac 180  
 aacgagaaat tcaaggacaa ggccacattg actgcggaca aatcctccaa cacagtctat 240

atggagctta gtagattgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagacacgaa 300  
 gatccgatta cctttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

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

<210> 7

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

gacattgtga tgaccagtc tccagcttct ttggetgtgt ctctagggca gaggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180  
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccttac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaatt aaa 333

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagagtc cctgaaactc 60  
 tctctgtaat ccaatgaata cgaattcct tccatgaca tgtcttgggt ccgcaagact 120  
 ccggagaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagtg atggtgataa cacctactat 180  
 ccagacacct tggagagacg attcatcatc tccagagaca ataccaagaa gaccctgtac 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagcctttt attactgtac aagacactat 300  
 gataattact acgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctagtcac tgtctctgca 360

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

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

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 11

gacattgtga tgaccagtc tctgettec ttaactgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 atctcatgca gggccagcga aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcaactgtac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatcaa cctagaatct 180  
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttccgctc 300  
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

gaggtgcagc tggaggagtc cggaggaggc ctggtgcagc ctggacggtc cctgcgactg 60  
 tcctgcgctg cctctggctt caccttctcc tcccacgaca tgcctgggt gcggcaggct 120  
 cctggcaagg gactggagtg gttggctgcc atcaactccg acggaggccg gatctactac 180  
 cctgacacca tggagcgacg gttcaccatc tctcgggaca actccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg agccgaggac accgcccgtg actactgcac ccggcactac 300  
 gacggctacg cctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtctctcc 357

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

gacatccaga tgaccagtc tcctctctcc ctgtctgect ccgtgggcca ccgagtgacc 60  
 atcacctgcc gagcctccaa gtccgtgtcc acctctgget cctctacat ccaactgtac 120  
 cagcagaagc ctggcaaggc tccaagctg ctgatctacc tggcctccaa cctggagtct 180  
 ggagtgcct ctcggttctc cggatctggc tccggcaccg acttcacct gaccatctcc 240

tcctgcagc ccgaggactt cgccacctac tactgccage actccagga gctgcctctg 300  
accttcggag gaggaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

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

<210> 17

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

gacatcgtga tgaccagac acctctgtcc ctgccctga cacctggcca gcctgcctcc 60  
atctcctgcc gagcctcaa gtccgtgtcc acctccggt cctcctacat ccaactgtac 120  
ctgcagaagc ctggacagtc tctcgggtg ctgatctacc tggcctcaa cctggagtct 180  
ggcgtgccc accggttctc cggatctgga tctggaccg acttcacct gaagatctcc 240  
agggtggagg ccgaggacgt gggcgtgtac tactgccage actccagga gctgcctctg 300  
accttcggag gaggaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

gagatcgtgc tgaccagtc tcctgccacc ctgtcctgt ctctggcga gcgagccacc 60  
 ctgtcctgca gagcctcaa gtccgtgtcc acctctgget cctctacat cactgggtac 120  
 cagcagaagc ctggacagtc tccaagctg ctgatctacc tggcctcaa cctggagtct 180  
 ggagtgcct cccggttctc cggatctggc tetggaccg acttcacct gaccatcaac 240  
 tccttgagg ccgaggacgc tgccacctac tactgccagc actctcggga gctgcctctg 300  
 accttcggag gaggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

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



	85	90	95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110
<210> 21			
<211> 357			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 21			
gaggtgcagc tggaggagtc cggaggaggc ctggtgcagc ctggacggtc cctgcgactg 60			
tcctgcgctg cctctggctt caccttctcc tcccacgaca tgtctctgggt gcggcaggct 120			
cctggcaagg gactggagct ggtggctgcc atcaactccg acggaggccg gatctactac 180			
cctgacacca tggagcgacg gttcaccatc tctcgggaca actccaagaa caccctgtac 240			
ctgcagatga actccctgcg agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcggcactac 300			
gacggctacg cctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtctctcc 357			
<210> 22			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 22			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
1                    5                    10                    15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His			
20                    25                    30			
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val			
35                    40                    45			
Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Met			
50                    55                    60			
Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65                    70                    75                    80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85                    90                    95			
Ala Arg His Tyr Asp Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
100                    105                    110			
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 23			
<211> 354			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			



<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 26

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

<210> 27

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 27

gacatcgtga tgaccagac acctctgtcc ctgtccgtga cacctggcca gcctgcctcc 60  
 atctcctgca aggcctccca gtccgtggac tacgacggcg actcctacat gaactggtac 120  
 ctgcagaagc ctggacagtc tcctcagctg ctgatctacg ctgcctccaa cctggagtct 180  
 ggcgtgcccc accggttctc cggatctgga tctggcaccg acttcaccct gaagatctcc 240  
 aggggtggagg ccgaggacgt gggcgtgtac tactgccagc agtccaacga ggaccctac 300  
 accttcggcg gaggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
                   20                   25                   30

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

<210> 29

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

gaggtgcagc tggaggagtc cggaggaggc ctggtgcagc ctggacggtc cctgcgactg 60  
 tctcgcgctg cctctggett caccttctcc tcccacgaca tgtcctgggt gcggcaggct 120  
 cctggcaagg gactggagct ggtggctgcc atcaactccg agggaggccg gatctactac 180  
 cctgacacca tggagcgacg gttcaccatc tctcgggaca actccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcggcactac 300  
 gacaactacg cctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtctctcc 357

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 30

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

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 31		
<211> 333		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 31		
gagatcgtga tgaccacagtc tectgceacc ctgtccgtgt ctctggcga gcgagccacc 60		
ctgtcctgca aggcctccca gtccgtggac tacgagggcg actcctacat gaactggtac 120		
cagcagaagc ctggccagge tcccaagctg ctgatctacg ctgcctccaa cctggagtcc 180		
ggcatccctg ctcggttctc cggatctggc tccggcaccg actteaccct gaccatctcc 240		
tccctggagc ccgaggactt cgccacctac tactgccage agtccaacga ggaccctac 300		
accttcggcg gaggcaccaa ggtggagatc aag 333		
<210> 32		
<211> 111		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 32		
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
1                    5                    10                    15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu		
20                    25                    30		
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
35                    40                    45		
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
50                    55                    60		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65                    70                    75                    80		
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85                    90                    95		
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100                    105                    110		
<210> 33		
<211> 990		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 33		
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 60		



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	Lys						
			325						330						

<210> 35

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 35

```

cggaccgtgg cggcgccatc tgtcttcate ttccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggtagcgcga gctgtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggagg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaaag tctacgctg cgaagtacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

```

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 36

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

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 37

tcccatgaca tgtct 15

<210> 38

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 38

gccattaata gtgatggtgg tagaatctac tatccagaca ccatggagag a 51

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 39

cactatgatg gttacgctg gtttgcttac 30

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 40

Ser His Asp Met Ser



1 5  
 <210> 41  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 41  
 Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Arg  
 <210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 42  
 His Tyr Asp Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 <210> 43  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 43  
 agggccagca aaagtgtcag tacatctggc tctagttata tacac 45  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 44  
 cttgcatcca acctagaatc t 21  
 <210> 45  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 45  
 cagcacagta gggagcttcc gctcacg 27  
 <210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 46

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Ile His  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 47

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1                   5  
 <210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 48

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr  
 1                   5  
 <210> 49  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 49

gaatatatta tacac 15  
 <210> 50  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 50

tggttttacc ctgaaagtgg tagtataaag tacaacgaga aattcaagga c 51  
 <210> 51  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 51

cacgaagatc cgattacett tgettac 27  
 <210> 52  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 52

Glu Tyr Ile Ile His

1                    5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 53

Trp Phe Tyr Pro Glu Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Asp

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 54

His Glu Asp Pro Ile Thr Phe Ala Tyr

1                    5

<210> 55

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 55

aagccagcc aaagtgttga ttatgatggt gatagttata tgaac 45

<210> 56

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 56

gctgcatcca atctagaatc tgggatccca gcc 33

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 57

cagcaaagta atgaggatcc ttacacg 27

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 58

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

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 59

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                    5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 60

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
1                    5

<210> 61

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 61

tcccatgaca tgtct 15

<210> 62

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 62

accattaata gtgatggtga taacacctac tatccagaca cttggagag a 51

<210> 63

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 63

cactatgata attactacgc ctggtttgct tac 33

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 64

Ser His Asp Met Ser

1                    5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 65

Thr Ile Asn Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Leu Glu

1                    5                    10                    15

Arg

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 66

His Tyr Asp Asn Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1                    5                    10

<210> 67

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 67

agggccagcg aaagtgtcag tacatctggc tatagttata tgcac 45

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 68

cttgcaccca acctagaate tggggteect gcc 33

<210> 69

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 69

cagcacagta gggagcttcc gctcag 27

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 70  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 71  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 71  
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 72  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 72  
 Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr  
 1                   5  
 <210> 73  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 73  
 tcccacgaca tgtcc 15  
 <210> 74  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 74  
 gccatcaact ccgacggagg ccggatctac tacctgaca ccatggagcg a 51  
 <210> 75  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 75  
 cactacgacg gctacgctg gttcgctac 30  
 <210> 76  
 <211> 5  
 <212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 76

Ser His Asp Met Ser

1                    5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 77

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

1                    5                    10                    15

Arg

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 78

His Tyr Asp Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1                    5                    10

<210> 79

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 79

cgagcctcca agtccgtgtc cacctctggc tcctcctaca tccac 45

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 80

ctggcctcca acctggagtc t 21

<210> 81

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 81

cagcactcca gggagctgcc tctgacc 27

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 82

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

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 83

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                    5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 84

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr  
1                    5

<210> 85

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 85

cgagcctcca agtccgtgtc cacctccggc tcctcctaca tccac 45

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 86

ctggcctcca acctggagtc t 21

<210> 87

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 87

cagcactcca gggagctgcc tctgacc 27

<210> 88

<211> 15



<212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 88  
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Ile His  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 89  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 89  
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1                    5  
 <210> 90  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 90  
 Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr  
 1                    5  
 <210> 91  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 91  
 agagcctcca agtccgtgtc cacctctggc tcctcctaca tccac 45  
 <210> 92  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 92  
 ctggcctcca acctggagtc t 21  
 <210> 93  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 93  
 cagcactctc gggagctgcc tctgacc 27  
 <210> 94  
 <211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 94

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Ile His

1                    5                    10                    15

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 95

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 96

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr

1                    5

<210> 97

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 97

tcccacgaca tgtcc 15

<210> 98

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 98

gccatcaact ccgacggagg ccgatctac tacctgaca ccatggagcg a 51

<210> 99

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 99

cactacgacg gctacgctg gttcgctac 30

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 100

Ser His Asp Met Ser

1                    5

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 101

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

1                    5                    10                    15

Arg

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 102

His Tyr Asp Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1                    5                    10

<210> 103

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 103

gagtacatca tccac 15

<210> 104

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 104

tggttctacc ctgagtccgg ctccatcaag tacaacgaga agttcaagga c 51

<210> 105

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 105

cacgaggacc ccatcacctt cgcctac 27

<210> 106

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 106  
 Glu Tyr Ile Ile His  
 1                    5  
 <210> 107  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 107  
 Trp Phe Tyr Pro Glu Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Asp  
 <210> 108  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 108  
 His Glu Asp Pro Ile Thr Phe Ala Tyr  
 1                    5  
 <210> 109  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 109  
 aaggcctccc agtccgtgga ctacgacggc gactcctaca tgaac 45  
 <210> 110  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 110  
 gctgcctcca acctggagtc c 21  
 <210> 111  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 111  
 cagcagtcca acgaggaccc ctacacc 27

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 112

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

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 113

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                    5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 114

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
1                    5

<210> 115

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 115

aaggcctccc agtccgtgga ctacgacggc gactcctaca tgaac 45

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 116

gctgcctcca acctggagtc t 21

<210> 117

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 117

cagcagtcca acgaggaccc ctacacc 27

<210> 118  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 118  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1                   5                   10                   15  
<210> 119  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 119  
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                   5  
<210> 120  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 120  
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
1                   5  
<210> 121  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 121  
tcccacgaca tgtcc 15  
<210> 122  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 122  
gccatcaact ccgagggagg ccgatctac tacctgaca ccatggagcg a 51  
<210> 123  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 123  
cactacgaca actacgcctg gttcgctac 30

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 124

Ser His Asp Met Ser

1                    5

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 125

Ala Ile Asn Ser Glu Gly Gly Arg Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

1                    5                    10                    15

Arg

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 126

His Tyr Asp Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1                    5                    10

<210> 127

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 127

cgagcctcca agtccgtgtc cacctctggc tcctctaca tccac 45

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 128

ctggcctcca acctggagtc t 21

<210> 129

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 129

cagcactcca gggagctgcc tctgacc 27

<210> 130

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 130

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Ser Ser Tyr Ile His

1                    5                    10                    15

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 131

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 132

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr

1                    5

<210> 133

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 133

gagtacatca tccac 15

<210> 134

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 134

tggttctacc ctgagtcagg ctccatcaag tacaacgaga agttcaagga c 51

<210> 135

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 135



cacgaggacc ccatcacctt cgcctac 27

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 136

Glu Tyr Ile Ile His

1                    5

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 137

Trp Phe Tyr Pro Glu Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Asp

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 138

His Glu Asp Pro Ile Thr Phe Ala Tyr

1                    5

<210> 139

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 139

aaggcctccc agtccgtgga ctacgagggc gactcctaca tgaac 45

<210> 140

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 140

gctgcctcca acctggagtc cggcatcct gct 33

<210> 141

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 141

cagcagtcca acgaggaccc ctacacc 27

<210> 142

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 142

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1                    5                    10                    15

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 143

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 144

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1                    5

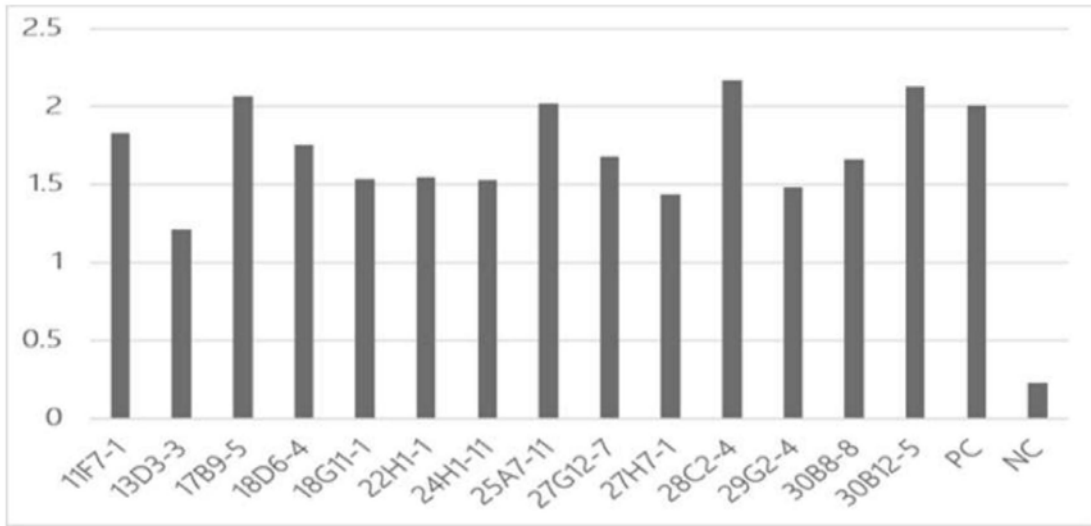


图1

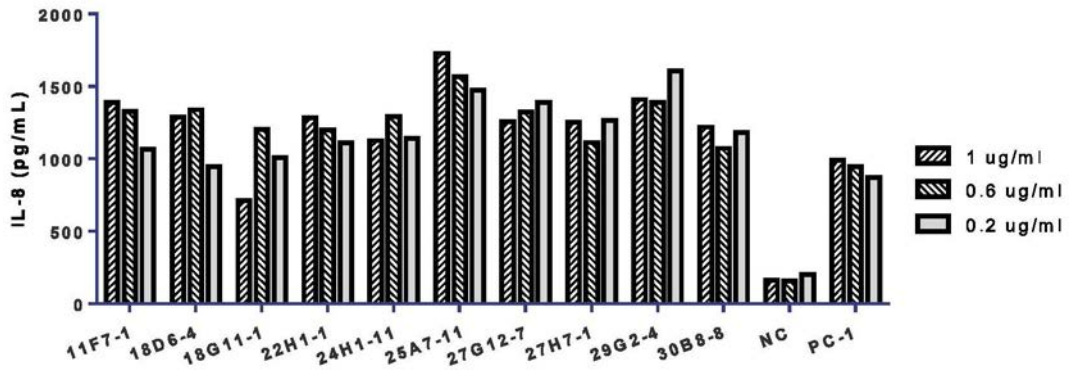


图2

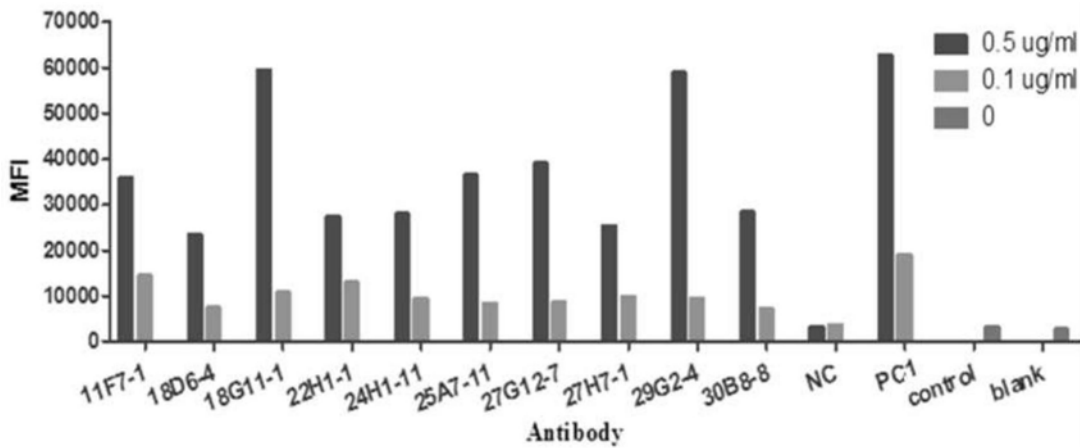


图3

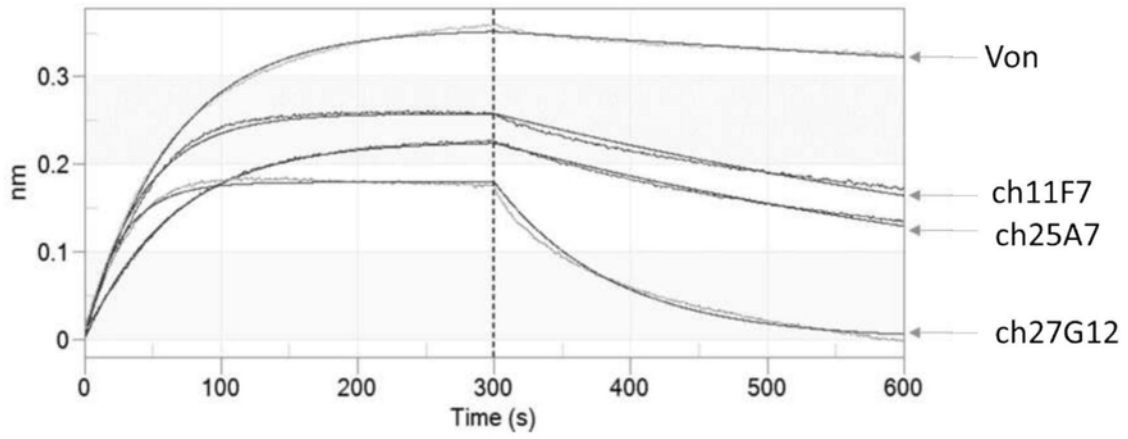
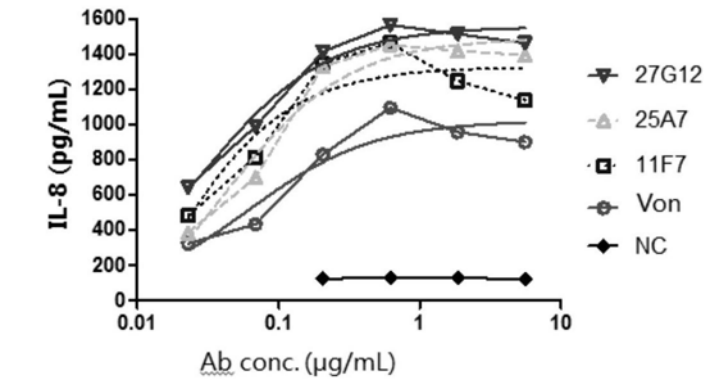


图4



	Von	11F7	25A7	27G12
EC50(µg/mL)	0.06243	0.01422	0.04165	0.03018

图5A

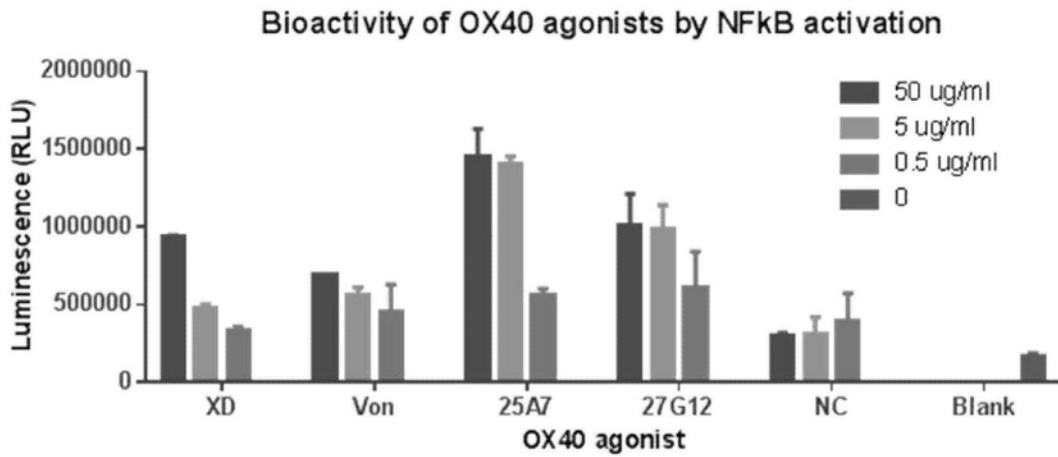


图5B

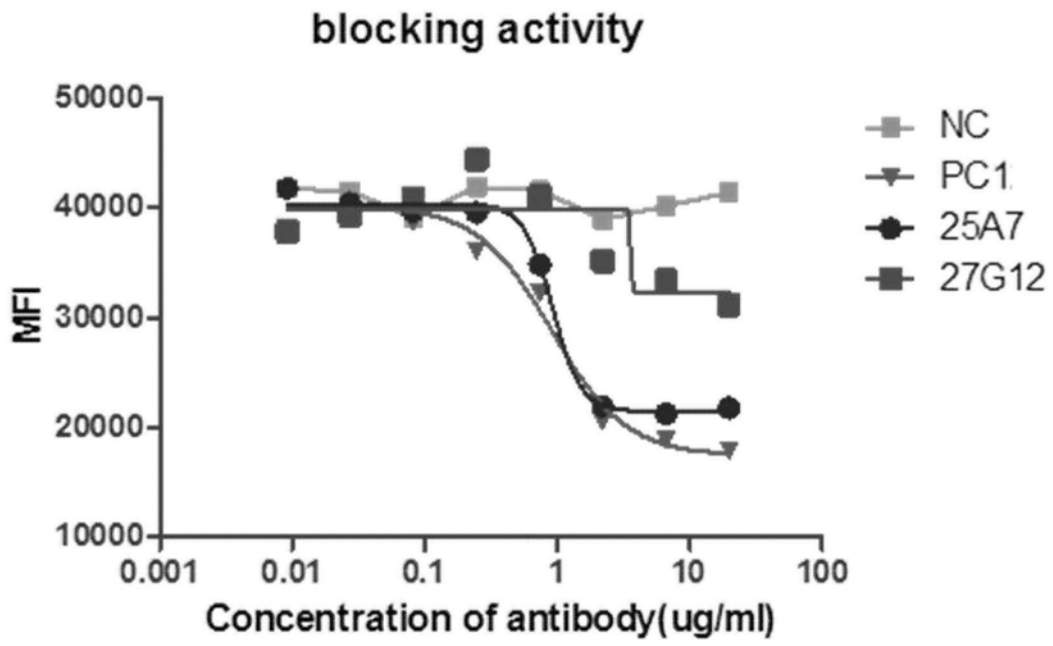


图6

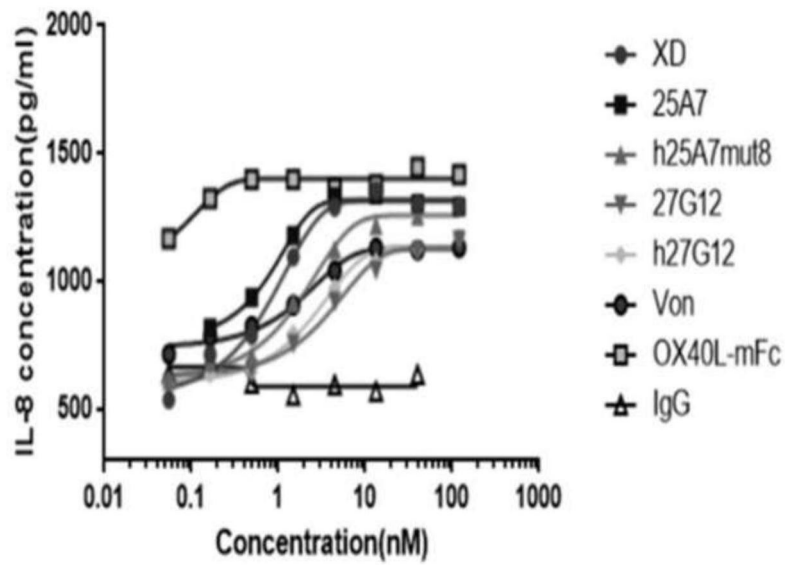


图7A

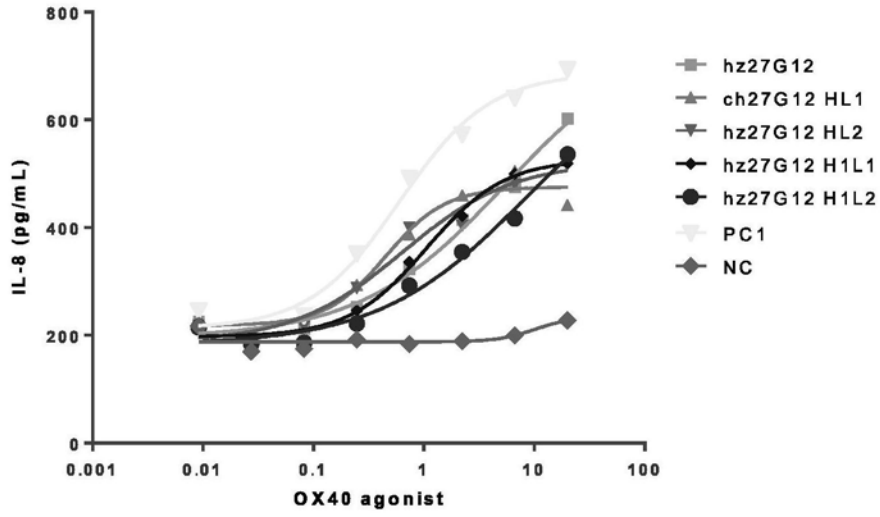


图7B

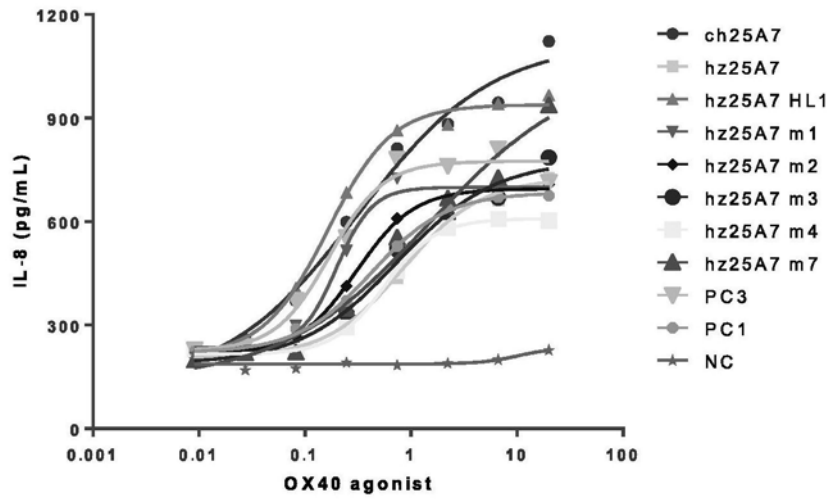


图7C

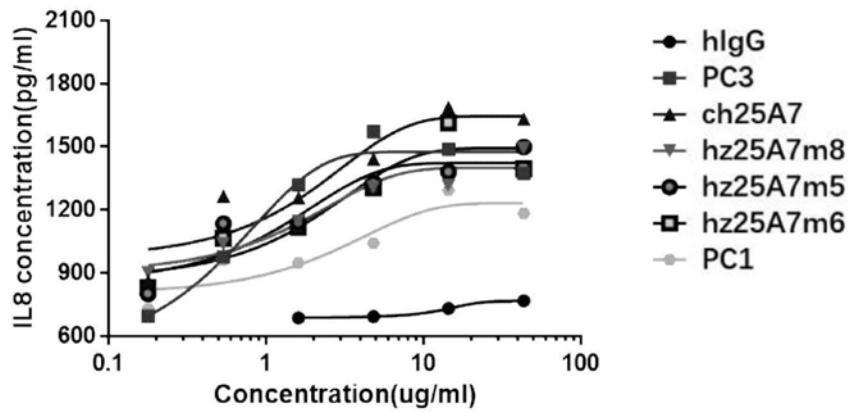


图7D

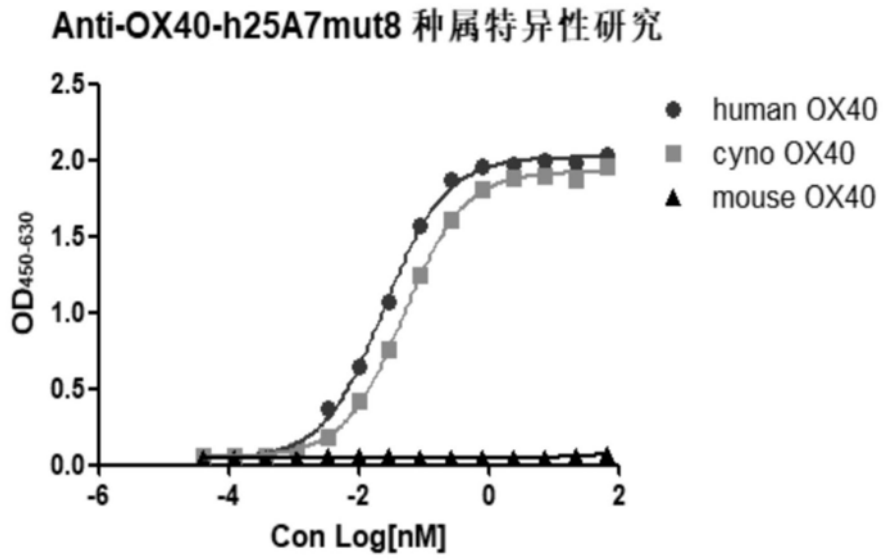


图8

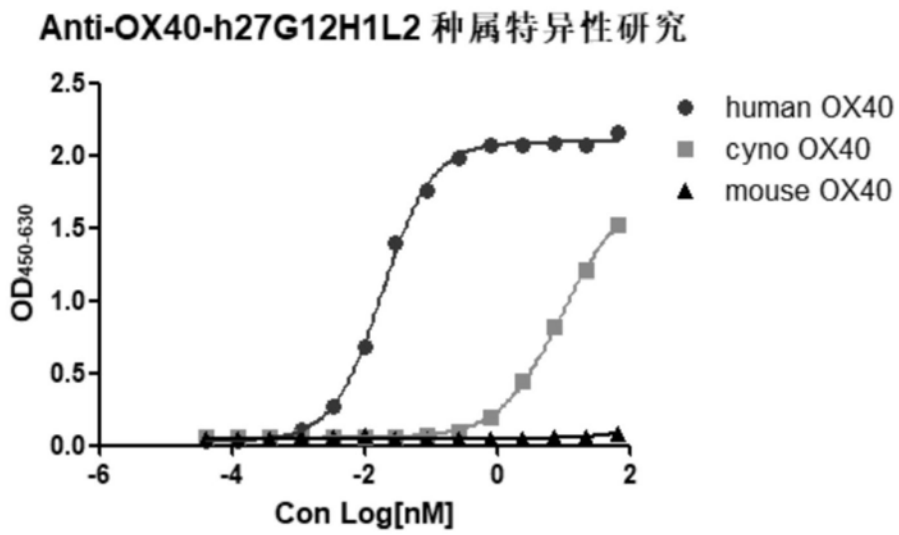


图9

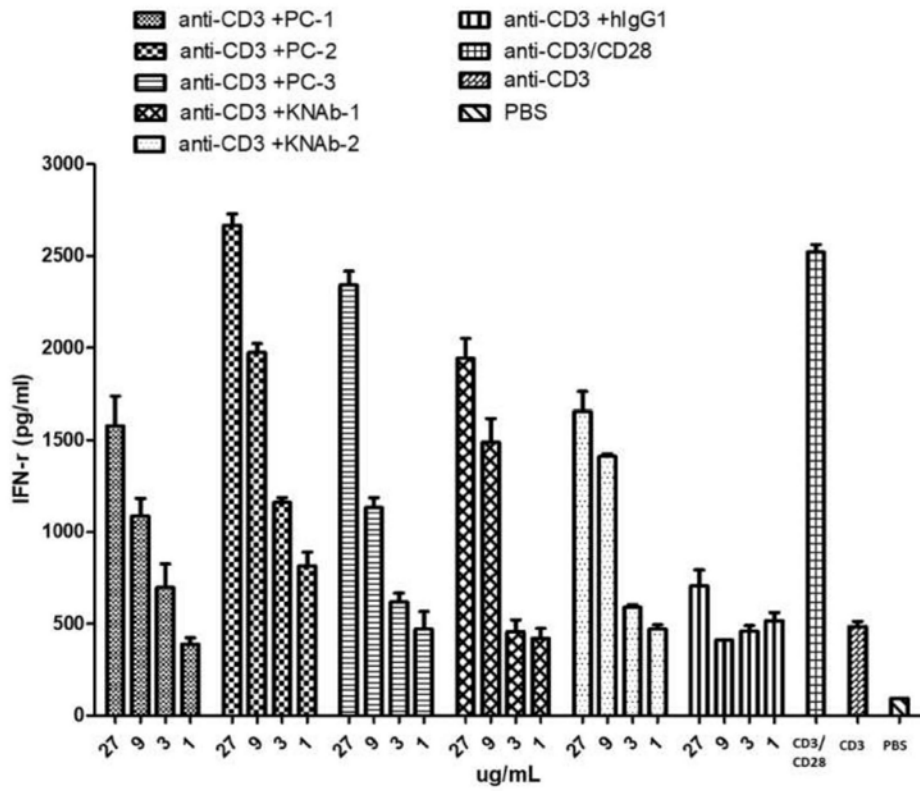


图10A

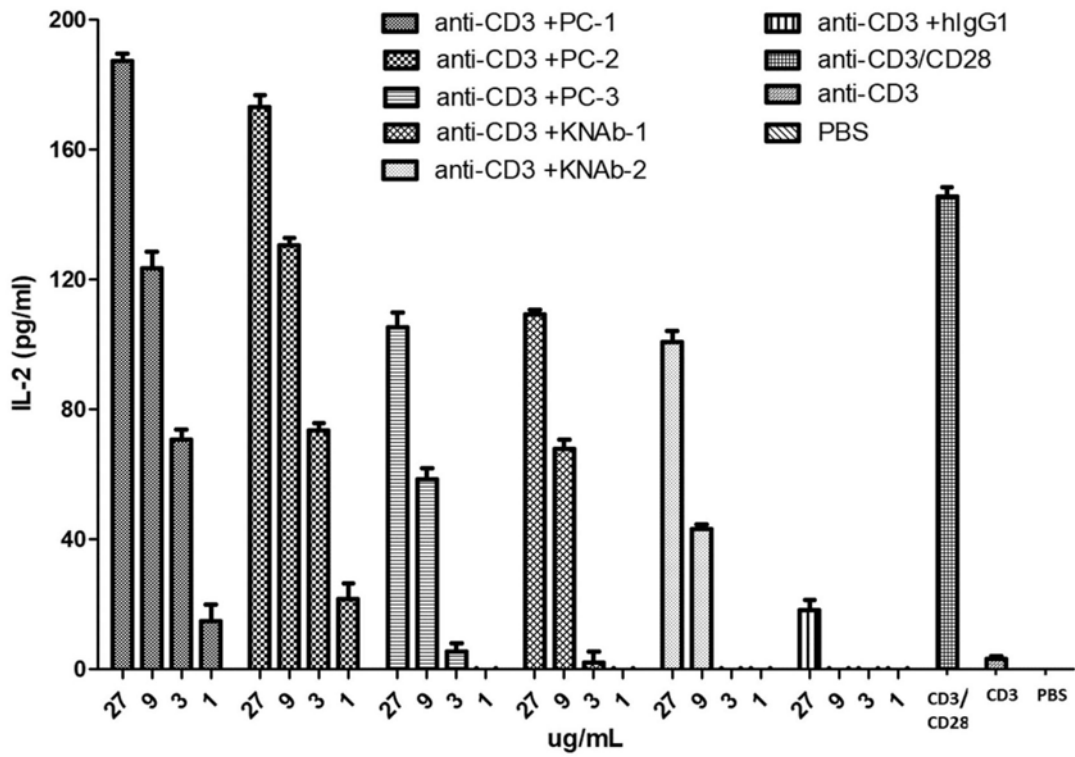


图10B



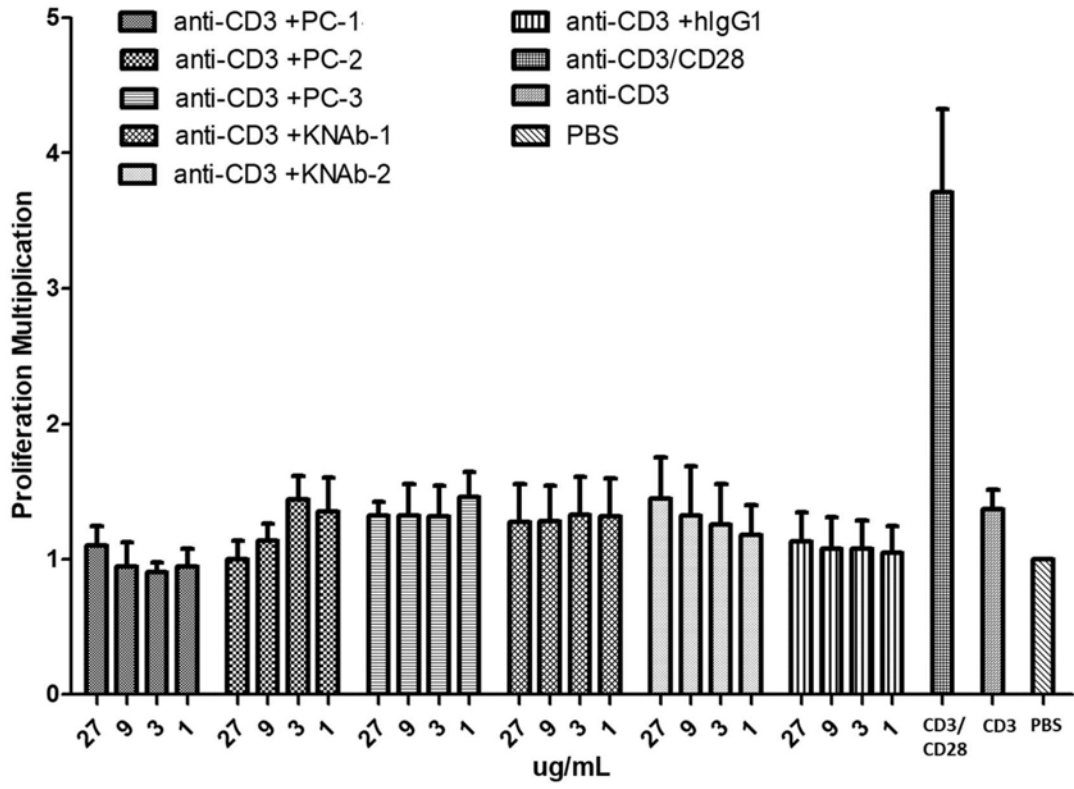


图10C

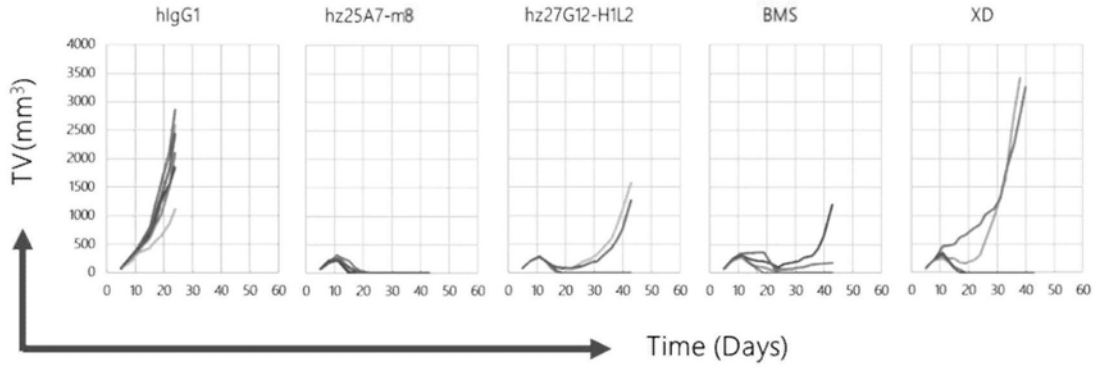


图11A

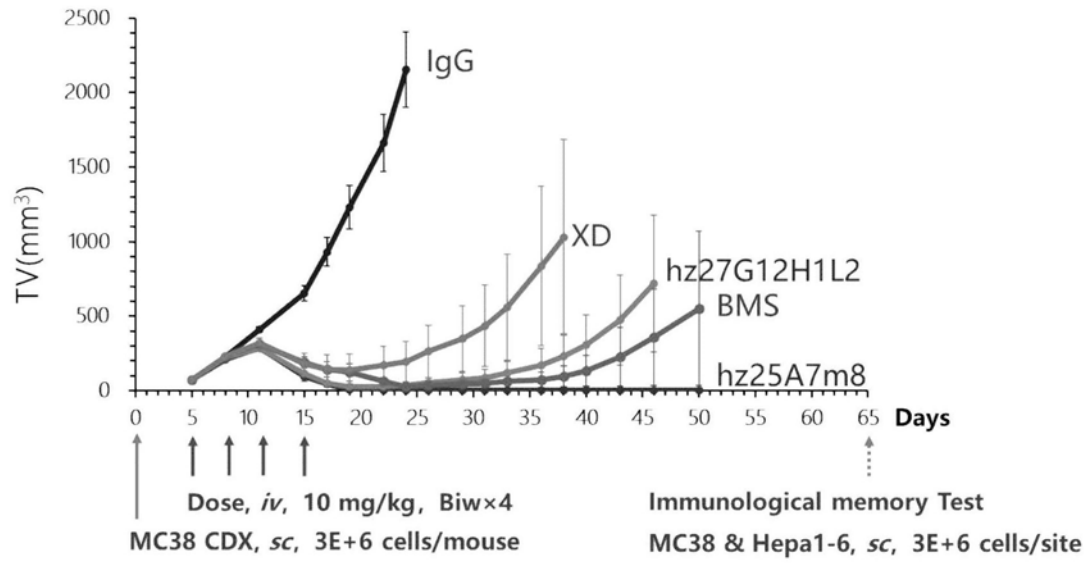


图11B

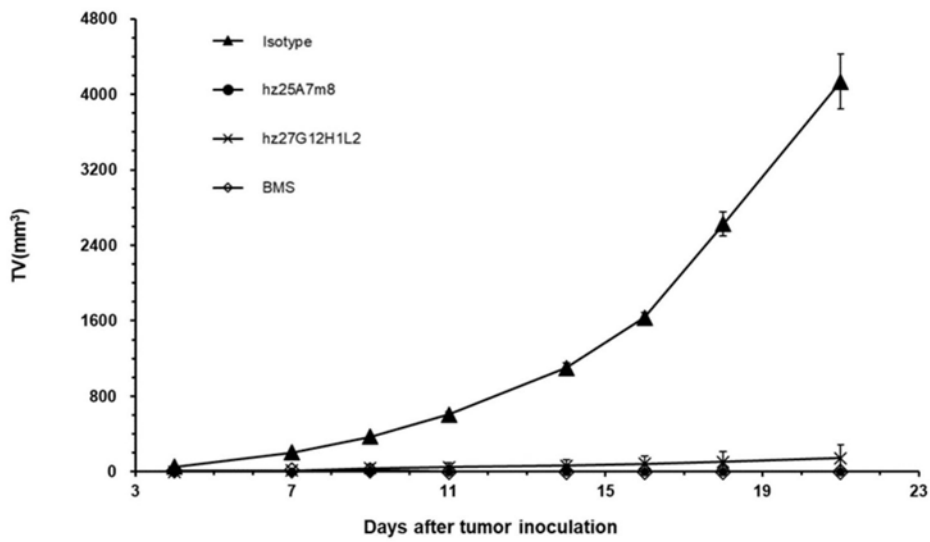


图12A

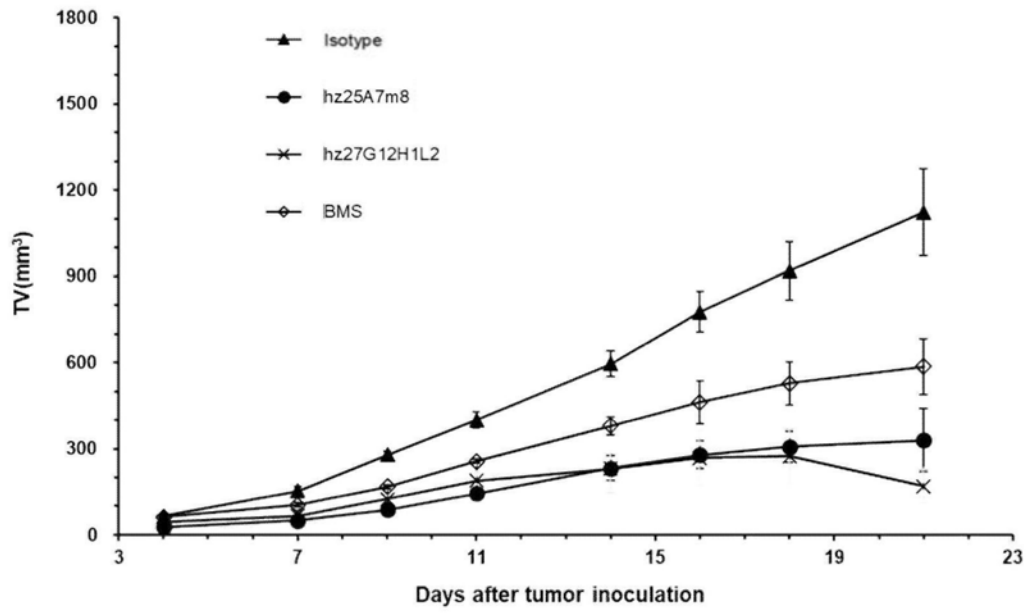


图12B

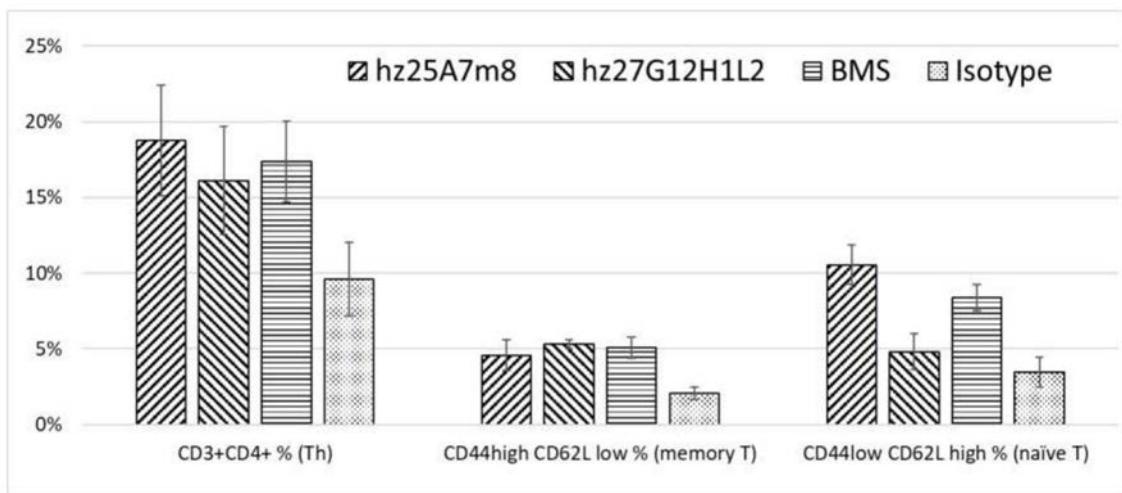


图13