

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 2 月 11 日 (11.02.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/019726 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/24 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/074528

(22) 国际申请日: 2015 年 3 月 18 日 (18.03.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201410390493.4 2014 年 8 月 8 日 (08.08.2014) CN

(71) 申请人: 北京天成新脉生物技术有限公司 (AB-MAX BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区科创 14 街 99 号 18 号楼 2-201B, Beijing 101111 (CN)。

(72) 发明人: 孙乐 (SUN, Le); 中国北京市经济技术开发区科创 14 街 99 号 18 号楼 2-201B, Beijing 101111 (CN)。 张小刚 (ZHANG, Xiaogang); 中国北京市经济技术开发区科创 14 街 99 号 18 号楼 2-201B, Beijing 101111 (CN)。 李茂华 (LI, Maohua); 中国北京市经济技术开发区科创 14 街 99 号 18 号楼 2-201B, Beijing 101111 (CN)。 张翠娟 (ZHANG, Cuijuan); 中国北京市经济技术开发区科创 14 街 99 号 18 号楼 2-201B, Beijing 101111 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LIMITED); 中国北京市海淀区丹棱街 3 号中国电子大厦 B 座 18 层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: ANTI-TNF- α FULLY HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES WITH LOW IMMUNOGENICITY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 低免疫原性抗 TNF- α 全人源单抗及其应用

(57) Abstract: The present invention provides anti-TNF- α fully human monoclonal antibodies with low immunogenicity and an application thereof. A non-antigen combining sequence with high immunogenicity is modified on the basis of analysis on an amino acid sequence of a monoclonal antibody of adalimumab, a plurality of anti-TNF- α fully human monoclonal antibodies with effectively reduced immunogenicity is constructed and screened out, and the combination affinity of the monoclonal antibodies to the human TNF- α is close to that of an original adalimumab antibody, so that the combination of the TNF- α and TNF receptors p55 and p75 on the surface of a cell can be specifically blocked.

(57) 摘要: 本发明提供了一种低免疫原性的抗 TNF- α 全人源单抗及其应用。通过对阿达木(adalimumab)单抗氨基酸序列分析, 对其中免疫原性高的非抗原结合序列进行改进, 构建并筛选出多个免疫原性有效降低的抗 TNF- α 全人源单抗, 其与人 TNF- α 结合的亲和力和原始 adalimumab 抗体相近, 可特异性地阻断 TNF- α 与细胞表面 TNF 受体 p55 和 p75 的结合。



WO 2016/019726 A1

低免疫原性抗 TNF- α 全人源单抗及其应用

技术领域

本发明涉及治疗用人源基因工程抗体的制备及应用，主要是涉及特异性针对人 TNF- α 的抗体及其应用。

背景技术

TNF- α 是一种在炎症和免疫应答中自然出现的细胞因子。研究发现在类风湿性关节炎 (RA) 患者的滑膜液中，TNF- α 水平升高，并在病理性炎症和关节破坏方面起重要作用。目前一般采用单克隆 IgG 抗体或者可溶性的 TNF- α 受体来中和体内的 TNF- α 。市售的单抗有如下：英夫利昔是人源化的 TNF- α 鼠单克隆抗体，依那西普是由两条人 TNF- α 受体 (p75) 偶联到 Fc 端的融合蛋白。利用放射性标记的 TNF- α 进行结合能力测定，结果显示英夫利昔能结合单体 (无活性) 及三聚体 (有活性) 类型的可溶 TNF；依那西普更倾向于结合有活性的聚体形式的 TNF- α 及 TNF- β 。阿达木 (adalimumab) 单抗是美国雅培公司研制的一个全人的 TNF- α 单克隆抗体，其可特异性地与 TNF 结合并阻断其与 p55 和 p75 细胞表面 TNF 受体的相互作用。但 adalimumab 单抗在宿主体内免疫原性较强，高达 26% 以上的患者使用该单抗会发生免疫反应，这给临床患者的使用带来了风险和不便，同时药物半衰期也相对较短，使用的过程中也需要增大药物剂量来弥补该方面的缺陷。基于此，若能够在不影响抗体亲和力和特异性的前提下，通过将抗体中高免疫原性的非抗原结合位点换成低免疫原性的同源序列来降低抗体药的免疫原性，则一方面可使单抗的安全性得到提高；另一方面可增加药物半衰期，在减少其用剂量同时也能起到提高疗效的作用。目前未见低免疫原性 TNF- α 的抗体的报道。

发明内容

本发明的第一个目的在于提供一种低免疫原性的全人源抗 TNF- α 的单克隆抗体。

本发明的另一个目的在于提供一种制备低免疫原性全人源抗 TNF- α 的

单克隆抗体的方法。

本发明利用商业化的 DNASTar™ 软件对阿达木单抗(购自美国雅培公司)的原始序列进行评价,结果显示,阿达木免疫原性系数为 16。利用上述软件对抗体的可变区里面的非抗原结合片段(FR)进行免疫原性评价,找到免疫原性强的相关序列。随后,查找人抗体基因库中所有涉及轻重链的 FR 区段,通过比较后选择出一些免疫原性相对较低的区段。将区段中相应变动的部分分别得同阿达木单抗中对应的区段进行替换,随后用 Pymol 蛋白分子模拟软件进行 3D 建模,选择保持了原有的抗原结合位点的序列进行基因合成,测序,选择测序正确的序列。

本发明的低免疫原性抗 TNF- α 全人源单克隆抗体,即是在原始阿达木序列的轻链可变区和重链可变区的 FR 区进行氨基酸改造,降低其免疫原性,所述原始阿达木序列的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.23、24 所示。

进一步地,本发明提供的低免疫原性抗 TNF- α 全人源单克隆抗体,其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO.11~15 或 SEQ ID NO.23 任一所示,其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO.16~20 任一所示。

更进一步地,本发明提供的低免疫原性抗 TNF- α 全人源单克隆抗体,其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.19 所示。编码其的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.9 所示。

本发明提供的全人源的抗人 TNF- α 单克隆抗体,其轻链可变区具有 L1 至 L5 (SEQ ID NO.1~5 所示)这五条碱基序列所示的任一个轻链可变区序列,重链可变区具有 h1 至 h5 (SEQ ID NO.6~10 所示)这五条碱基序列所示的任一个重链可变区序列。

具备上述轻链可变区和重链可变区的组合中,本发明共筛选得到 10 个单抗序列,它们既保持了原有抗原结合位点、又与人 TNF- α 结合的亲和力和原始 adalimumab 抗体相近,可特异性地阻断 TNF- α 与细胞表面 TNF 受体 p55 和 p75 的结合。

这 10 个单克隆抗体都具有相同的 CDR 区域且具有同样的功能，但对这 10 个抗体 FR 区域中某些氨基酸进行了不同的调整，这可使它们的免疫原性得到有效的降低。

本发明提供上述 10 种单抗的轻链可变区和重链可变区的编码基因。

本发明得到的 10 个低免疫原性的全人源抗 TNF- α 的单克隆抗体，分别为 L3h2、L3h4、L5h2、L4h1、L4h2、L4h4、L1h3、L2h1、L0h4、L2h5。

其中 L3h2 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.3 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.7 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.13 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.17 所述。

其中 L3h4 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.3 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.9 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.13 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.19 所述。

其中 L5h2 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.5 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.7 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.15 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.17 所述。

其中 L4h1 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.4 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.14 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.16 所述。

其中 L4h2 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.4 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.7 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.14 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.17 所述。

其中 L4h4 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.4 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.9 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.14 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.19 所述。

其中 L1h3 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1 所述，重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.8 所述，其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.11 所述，重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.18 所述。

其中 L2h1 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.2 所述，重链的

核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6 所述,其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.12 所述,重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.16 所述。

其中 L2h5 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.2 所述,重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.10 所述,其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.12 所述,重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.20 所述。

其中 L0h4 单抗的轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.21 所述,重链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.9 所述,其轻链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.23 所述,重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.19 所述。

本发明提供了含有上述 10 个中任一个低免疫原性的全人源抗 TNF- α 的单克隆抗体轻链可变区和重链可变区基因的表达载体。含有所述表达载体的宿主菌、宿主细胞或表达盒也在本发明的保护范围内。

本发明提供上述 10 个低免疫原性的全人源抗 TNF- α 的单克隆抗体在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用。

所述的疾病为风湿性关节炎,红斑狼疮。

本发明提供了上述全人源抗 TNF- α 单克隆抗体在制备以 TNF- α 为靶标的疾病治疗药物中的应用。

所述的药物为抗肿瘤药、抗炎药物或治疗自身免疫性疾病的药物。

本发明提供含有上述全人源抗 TNF- α 单克隆抗体的药物或检测试剂。

本发明提供了制备上述全人源抗 TNF- α 单克隆抗体的方法,包括以下步骤:(1)对 NCBI 数据库里的人源抗体的 FR 序列进行分析(详见图 2、3),根据上述结果同时利用商业化的 DNASTar 软件对抗体的可变区里面的 4 个非抗原结合片段(FR)进行免疫原性评价,找到免疫原性强的片段。然后通过对已知的人抗体基因库里面找出所有重链的 FR3 段,挑选出一些免疫原性低的相应区段。将阿达木单抗上相应的重链及轻链区段进行替换,随后用 Pymol 蛋白分子模拟软件进行 3D 建模,结果发现大部分替换排列组合导致抗体的抗原结合位点构象变动很大,但是也有部分基本保持了原有的抗原结合位点;

(2)根据以上信息,本发明对相应修改后的序列进行全基因合成,对

合成的基因进行测序同时选择测序正确的序列进行下一步操作，将轻链可变区设计酶切位点为 Kpn I + BamH I，重链可变区设计酶切位点为 KpnI+AgeI，分别与表达载体 pJH16 载体连接，同时转化大肠杆菌 DH5 α ，得到重链、轻链嵌合抗体表达载体，结果详见图 1。同时对构建的抗体进行测序和序列对比；

(3) 对上述表达的载体进行质粒大提工作，选取 Qiagen 的无内毒素质粒大提试剂盒（详见该质粒试剂盒说明书）；

(4) 对选取的质粒进行优化组合，同时利用 293F 细胞进行瞬时转染表达，对表达的抗体进行亲和力和 EC50 检测（详见图 4）根据检测结果来选定哪些组合进行稳定转染；

(5) 根据上述检测结果，本发明选取相应的组合利用电转染方式构建稳定株，同时利用 MTX 进行抗体表达程度的筛选，对于加压后的稳定株进行单克隆筛选，最终挑选出抗体产量较高的稳定株，用于后续实验所用；

(6) 本发明生产的单克隆抗体在小鼠体内的免疫反应比 adalimumab 低，同时半衰期明显延长。

本发明提供的全人源抗 TNF- α 抗体和 adalimumab 针对的是 TNF- α 相同位点，但其免疫原性和抗体构象同 adalimumab 不同，同 adalimumab 相比其药物半衰期延长，有望成为非常理想的生物靶向治疗抗体。本发明通过对 adalimumab 单抗进行免疫原性改造，使抗体中部分氨基酸序列改变，将显著降低该抗体药在病人体内产生免疫原性的风险。本发明实施例显示本发明的改进型 adalimumab 抗体与 TNF- α 结合的亲和力和原始 adalimumab 相近，并延长抗体药的半衰期，提高疗效。

附图说明：

图 1 为质粒及合成基因酶切结果；其中 a 图为 pJH16 质粒双酶切结果（kpn I 和 Age I），1：质粒双酶切结果。b 图为 pJH16 质粒双酶切结果（kpn I 和 BamH I），1：质粒双酶切结果。c 图为阿达木原始重链（kpn I 和 Age I）及轻链（Kpn I + BamH I）基因双酶切结果，1：重链双酶切结果，2：

轻链双酶切结果；其中 M 为 DL 15000 marker。

图 2 人源化轻链氨基酸序列 BLAST 比对结果；其中，图 2a、图 2b、图 2c 三个图均为该 BLAST 比对结果。

图 3 人源化重链氨基酸序列 BLAST 比对结果；其中，图 3a、图 3b、图 3c 三个图均为该 BLAST 比对结果。

图 4 改进型阿达木亲和力 EC_{50} 。

图 5 改进型阿达木抑制 TNF- α 诱导 L929 细胞毒性实验。其中，图 5a 代表 TNF- α 诱导 L929 细胞毒性实验，作为实验的阳性对照；图 5b 代表改进型阿达木抗体抑制 TNF- α 诱导 L929 细胞毒性。

图 6 改进型阿达木抗体药代动力学检测。

具体实施方式

以下实施实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。

若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1 降低免疫原性阿达木序列的分析及设计

利用商业化 DNASTarTM 软件对阿达木原始序列进行评价，评价结果显示，阿达木免疫原性系数为 16，针对此本发明需要进行下一步免疫原性的降低工作。

通过利用上述软件对抗体的可变区里面的非抗原结合片段（FR）进行免疫原性评价，找到免疫原性强的相关序列。随后，查找人抗体基因库中所有涉及轻重链的 FR 区段，通过比较后选择出一些免疫原性相对较低的区段。基于上述信息，将区段中相应变动的部分分别得同阿达木单抗中对应的区段进行替换，初步得到的全人源的抗人 TNF- α 单克隆抗体，其轻链可变区选自 L1~L5、L0（SEQ ID NO.1~5、所示 SEQ ID NO.21）任一个碱基

序列组成的轻链可变区序列，重链可变区选自 h1~h5 (SEQ ID NO.6~10) 所示任一个碱基序列组成的重链可变区序列。

随后用 Pymol 蛋白分子模拟软件进行 3D 建模，结果发现大部分替换排列组合导致抗体的抗原结合位点构象变动很大，但是也有部分基本保持了原有的抗原结合位点；因此对保持原有抗原结合位点的修改后的所有序列进行全基因合成（委托金唯智公司合成），对合成的基因进行测序（委托金唯智公司进行测序工作），根据测序比对结果选择正确的序列。

实施例 2 阿达木单抗表达载体的构建

根据实施例 1 测序得到的改进型阿达木重链、轻链可变区碱基序列，设计轻链序列两侧的酶切位点为 Kpn I + BamHI，设计重链序列两侧的酶切位点为 Kpn I + AgeI，以上序列送交金唯智公司合成全基因序列，合成所用的连接载体为 pUC57。以 pJH16 为表达载体，合成基因返回后，将它们分别与金唯智公司合成的序列进行酶切后（见图 1），16℃ 过夜连接。将酶切后得到的目的基因和表达载体（pJH16）进行琼脂糖凝胶电泳分离，随后切下目的条带并用 Qiagen Gel Extraction Kit 回收，按 T4DNA 连接体系连接过夜，然后转化大肠杆菌 DH5α，对相应的菌株进行质粒提取和序列测定工作，测序结果表明二者序列完全一致，这表明抗体表达载体构建成功。

实施例 3 改进型阿达木单抗的瞬时表达与纯化

用实施例 2 构建的 pJH16 重链、轻链表达载体转染大肠杆菌 DH5a。接种于 100ml LB 培养基中，按照常规方法进行培养。收获培养物，用 Qiagen 公司的 UltraPure 质粒 DNA 纯合试剂盒抽提纯化质粒 DNA。将上述纯化的质粒 DNA 采用 Invitrogen 公司的脂质体法试剂盒转染 293F 细胞，操作参照厂家的说明书进行。

首先对 293F 细胞进行不同轻、重链质粒组合的转染，组合见表 1，共 31 组 293F 瞬时表达，需要从这 31 组中筛选出免疫原性降低的组合。培养 3 天后，取培养上清液，进行抗体表达量检测，结果如下表 1 所示：

表 1：原始及改进型阿达木抗体表达量检测结果 (ng/ml)

组合	浓度	组合	浓度	组合	浓度	组合	浓度	组合	浓度	组合	浓度
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

L0h1	1530	L1h1	1371	L2h1	1988	L3h1	2624	L4h1	810.7	L5h1	439.1
L0h2	11172	L1h2	487.6	L2h2	755.8	L3h2	1208	L4h2	1130	L5h2	423.5
L0h3	2021	L1h3	873.3	L2h3	662.2	L3h3	602.9	L4h3	2206	L5h3	797
L0h4	1109	L1h4	1257	L2h4	476	L3h4	1638	L4h4	1381	L5h4	475.9
L0h5	1408	L1h5	868	L2h5	677.7	L3h5	1282	L4h5	1423	L5h5	952.2
Adh010	1892										

(注：表中组合是不同轻重链的组合，L0h1 即指原始阿达木轻链可变区与本发明改进型阿达木重链可变区 h1 的组合，以此类推。Adh010 是原始阿达木的组合)

对上述表达后的抗体分别进行预包 TNF- α 实验，从中筛选出较好的组别，实验结果如下：

加入预包有 TNF- α 的 96 孔板中，采用 ELISA 间接法，初步评价分泌抗体结合 TNF- α 的活性。上述 31 组的检测结果如下表 2 所示。NC 为以抗体稀释液作为阴性对照。

表 2：筛选的不同重链、轻链组合的抗体活性评价结果

一抗	L0h1		L0h2		L0h3		L0h4		L0h5		NC	
	2.158	2.182	0.057	0.054	0.68	0.768	3.339	3.133	1.03	0.873	0.09	0.059
一抗	L1h1		L1h2		L1h3		L1h4		L1h5		NC	
	1.926	2.401	2.268	2.459	1.413	1.431	2.621	2.552	0.824	1.051	0.045	0.057
一抗	L2h1		L2h2		L2h3		L2h4		L2h5		NC	
	1.891	2.384	2.802	2.704	0.709	0.973	2.235	2.848	0.894	1.255	0.047	0.051
一抗	L3h1		L3h2		L3h3		L3h4		L3h5		原始阿达木	
	2.178	2.329	2.434	2.498	0.888	0.815	2.616	2.664	0.959	1.104	3.008	3.244
一抗	L4h1		L4h2		L4h3		L4h4		L4h5		原始阿达木	
	1.978	2.182	2.968	2.546	1.617	1.607	2.904	2.757	0.714	0.972	2.877	3.041
一抗	L5h1		L5h2		L5h3		L5h4		L5h5		原始阿达木	
	0.864	1.583	1.857	1.821	1.366	1.404	1.528	1.643	0.885	0.903	2.926	3.172

实施例 4 改进型阿达木单抗的稳定表达与纯化

根据上述检测结果，选取质检结果较优的 10 个组合进行稳定转染。

采用电转染方法转染 CHO (购自美国英俊公司) 细胞，并利用选择性培养基 Opti-CHO(美国英俊-opti-cho medium)进行 MTX 加压筛选 (MTX 购自 sigma 公司)，分别以 50、100、200、400、800 nM 这五个梯度进行加压，对于每轮加压后的细胞进行 7d 滴度测定，测定方法采用 ELISA-双抗夹心法确定每步加压后工程细胞株的抗体产量。该过程完成后，利用有限稀释法进行单克隆筛选，该方法主要是通过对细胞进行稀释铺板(96 孔板)，

在 37℃ 5%CO₂ 条件下培养大约 14 天后取 50 微升进行抗体产量初筛（采用 ELISA-双抗夹心法测定）对于筛选结果较好的进行克隆挑取并扩大培养。

部分结果如表 3：结果显示，不同轻重链的组合均得到表达，工程细胞株产生了相应的抗体（ELISA 评价结果数据）。

表 3：不同重链、轻链组合的抗体表达浓度评价

项目编号	转染方式	opti-cho 滴度测定结果 (ng/ml)	50nM 加压后滴度测定结果 (ng/ml)	100nM 加压后滴度测定结果(ng/ml)
adh010	电转染	30	134	346
L3h2	电转染	92.7	122	237
L3h4	电转染	87.4	251	367
L5h2	电转染	30.8	129	452
L4h1	电转染	104	176	258
L4h2	电转染	127	318	523
L4h4	电转染	72.5	939	734
L1h3	电转染	97	160	270
L2h1	电转染	64	208.6	471
L0h4	电转染	30	389	598
L2h5	电转染	29.2	226	476

抗体纯化部分工作利用 GE 公司的 Protein A 进行纯化，选取 200nM 加压组进行抗体稳定株生产工作，利用 Protein A 亲和层析柱对上述 11 个稳定细胞系的培养上清直接分离纯化进而得到本发明的人源单克隆抗体（注：其中 10 个为改进型，1 个为原始 adalimumab）。实验过程详见 GE 公司说明书，纯化后产品利用紫外分光光度计进行定量检测，计算公式如下：

浓度计算：将收集的洗脱峰读 OD280 后，计算浓度。抗体浓度 = OD280/1.4。抗体纯化下来后进行 SDS-PAGE 电泳验证。

实施例 5 改进型阿达木单抗的生物活性测定

1、亲和力评价

本部分利用 ELISA 间接法测抗体 EC₅₀ 评价抗体亲和力。

实验方法如下：用 PBS 将 TNF-α 稀释抗原到 0.3 ug/ml；将稀释好的抗原按 100ul/孔加到 96 孔板中，加盖，4℃ 过夜；甩去孔内液体，用 PBS 洗三次，200ul/孔，拍干；用 5% 牛乳-PBS 200ul/孔封闭 1h，每 15min 轻拍；

甩去孔内液体，用 PBS 洗一次，200ul/孔，拍干；分梯度加入纯化抗体（0-10ug/ml），抗体名称见表 4，5% 牛乳-PBS 稀释，100ul/孔，孵育 1h，每 15min 轻拍；甩去孔内液体，用 PBS 洗三次，200ul/孔，拍干；加二抗，5% 牛乳-PBS 稀释，100ul/孔，孵育 1h，每 15min 轻拍；预热 TMB 底物于室温，同时开启酶标仪预热；PBS 洗 5 次，250ul/well，前三次 5min，后两次 10min，拍干；TMB 底物 A B 各加 50ul/孔，室温显色 20min；使用扫描仪将图片扫描记录，加入终止液 50ul/孔，使用酶标仪读取 OD450。实验结果见图 4。实验数据见下表 4。

表 4：优选的改进型阿达木轻重链可变区组合的 EC50 结果

组合名称	10h4	12h1	13h2	13h4	14h1	14h2	14h4	adh010
EC50(nM)	0.37	0.43	0.40	0.34	0.47	0.60	0.69	0.49

以上结果表明：改进型阿达木亲和力与原始阿达木亲和力基本一致，有的甚至比原始阿达木要高。

2、特异性评价

该过程验证所表达的抗体是否有针对 rhTNF α 具有特异性，利用不同的因子包板并采用间接法测定。

具体实验过程如下：用 PBS 将 rhTNF α 、rhTNF β 、rIFN γ （重组人干扰素 γ ），IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4 和 IL-8，稀释抗原到 1ug/ml；将稀释好的抗原 100ul/孔加到 96 孔板中，并加盖，4℃过夜；甩去孔内液体，用 PBS 洗三次，200ul/孔，手动拍干；用 5% 牛乳 200ul/孔封闭，封闭 1h，每 15min 轻拍酶标板边以促进反应；甩去孔内液体，用 PBS 洗一次，200ul/孔，手动拍干；加不同轻链重链组合的抗体，5% 牛乳 稀释，100ul/孔，孵育 1h，每 15min 轻拍酶标板边以促进反应；甩去孔内液体，用 PBS 洗三次，200ul/孔，手动拍干；加入羊抗人二抗，5% 牛乳 稀释，100ul/孔；孵育 1h，每 15min 轻拍酶标板边以促进反应；预热 TMB 底物于室温，同时开启酶标仪预热；PBS 洗 5 次，250ul/孔，前三次 5min，后两次 10min，手动拍干；TMB 底物 A B 各加 50ul/孔，室温显色 20min；使用扫描仪将图片扫描记录，加入终止液 50ul/孔，使用酶标仪读取 OD450，存档。实验结果如表 5。

表 5: 全人源阿达木改进型单抗特异性检测

Ab 包被因子	原始阿达木		L0h4		L2h1		L3h2		L3h4	
rTNF α	2.877	3.041	3.339	3.238	2.251	2.325	2.434	2.498	2.804	2.789
rTNF β	0.097	0.089	0.058	0.064	0.081	0.082	0.071	0.065	0.064	0.071
rINF γ	0.082	0.078	0.062	0.068	0.065	0.071	0.057	0.068	0.068	0.065
IL-1 α	0.059	0.065	0.080	0.072	0.057	0.062	0.064	0.072	0.072	0.077
IL-1 β	0.067	0.058	0.059	0.068	0.063	0.071	0.059	0.073	0.068	0.063
IL-2	0.053	0.059	0.074	0.069	0.073	0.075	0.067	0.061	0.069	0.073
IL-4	0.049	0.05	0.055	0.049	0.072	0.069	0.078	0.069	0.059	0.062
IL-8	0.063	0.057	0.067	0.060	0.058	0.061	0.069	0.074	0.060	0.058
Ab 包被因子	L4h1		L4h2		L4h4		NC		NC	
rTNF α	2.018	2.121	2.754	2.802	2.826	2.855	0.054	0.051	0.044	0.051
rTNF β	0.065	0.064	0.082	0.071	0.064	0.071	0.068	0.065	0.058	0.055
rINF γ	0.068	0.068	0.071	0.067	0.068	0.065	0.052	0.057	0.054	0.061
IL-1 α	0.072	0.072	0.062	0.064	0.072	0.077	0.058	0.063	0.052	0.053
IL-1 β	0.073	0.068	0.071	0.069	0.068	0.063	0.069	0.063	0.059	0.061
IL-2	0.061	0.069	0.075	0.067	0.069	0.073	0.049	0.052	0.059	0.062
IL-4	0.069	0.059	0.069	0.078	0.069	0.072	0.060	0.058	0.062	0.058
IL-8	0.074	0.060	0.061	0.069	0.060	0.058	0.064	0.051	0.054	0.057

以上结果表明：改进型阿达木单抗针对 rhTNF α 具有特异性

3、细胞毒作用实验

本部分使用 CCK-8 试剂盒进行相应的实验，本实验主要利用小鼠成纤维细胞株 L929 进行细胞凋亡的检测。具体操作步骤如下：

在 96 孔板中加入 100ul 三倍梯度稀释的改进型阿达木单抗（RPMI-1640 培养基含 10%FBS 稀释）（改进型阿达木单抗加入浓度依照 FDA 中提及阿达木此实验 IC₅₀ 分别上下 3-5 个梯度浓度），随后加入 50ul 终浓度为 500pg/ml 的 rhTNF- α （RPMI-1640 培养基含 10%FBS 稀释），室温孵育 30min。向每孔加入 50ul L929 细胞 5×10^4 /孔,包含终浓度为 1ug/ml 的放线菌素-D。37℃培养箱孵育过夜培养(18-24h)。对照包括阴性对照和阳性对照，阴性对照只加入 RPMI-1640 及细胞，阳性对照只加入 rhTNF α 及细胞，rhTNF α 浓度从 2ng/ml 到 8.2pg/ml 梯度。向每孔加入 20 μ L CCK8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。将培养板

在 37℃ 培养箱内孵育 1-4 h。用酶标仪测定在 470nm 处的吸光度。若暂时不测定 OD 值,可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液,并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 小时内测定,吸光度不会发生变化。

计算抗体在不同浓度下的细胞杀伤率和 IC_{50} (阿达木的细胞毒性 IC_{50} 值: $1.25 \pm 0.01e-10$ M)

计算公式: 改进阿达木处理细胞-TNF- α 处理细胞/TNF- α 细胞 $\times 100\%$

结果显示,本发明的改进型阿达木单抗与原始阿达木单抗相比,抑制 TNF- α 诱导的细胞毒作用相当(图 5b)。

实施例 6 改进型阿达木单抗免疫原性评价

1. 小鼠免疫实验

1) 基础免疫: 将抗原与福氏完全佐剂等体积混合并充分乳化,分点皮下注射,每只 Balb/c 小鼠每次注射量为 100 μ g。

2) 加强免疫: 加强免疫采用抗原与福氏不完全佐剂的乳化液。

上述实验完成后进行 ELISA 检测试验,结果见表 6。

表 6: 小鼠免疫原性评价实验

稀释度		1:500	1:1000	1:5000	1:10000	1:50000	NC
小鼠编号	L3h2	0.974	0.459	0.056	0.064	0.051	0.042
	L3h4	0.676	0.385	0.044	0.043	0.046	0.046
	L5h2	0.854	0.435	0.042	0.047	0.047	0.047
	L4h1	0.699	0.311	0.054	0.058	0.047	0.045
	L4h2	1.207	0.607	0.062	0.049	0.042	0.042
	L4h4	0.713	0.379	0.059	0.048	0.048	0.047
	L0h4	1.016	0.591	0.048	0.067	0.054	0.056
	L1h3	1.156	0.548	0.043	0.080	0.053	0.055
	L2h1	0.781	0.389	0.041	0.056	0.059	0.057
	L2h5	0.802	0.410	0.032	0.066	0.053	0.047
	原始	2.614	1.311	0.2614	0.144	0.131	0.144

上述结果表明,本发明的 10 个改进型阿达木单抗同原始阿达木单抗相比,免疫原性得到了有效的降低。

2. 抗体生物分布和药代试验

分别对原始阿达木及改进型阿达木进行抗体生物分布实验及药代试验，基本过程如下：

抗体生物分布：选取 16 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组，每组 4 只。每只由尾静脉注射 563.5 kBq (100 μ L, 2.5 μ g) 125 I-抗体，并于注射后 2、4、8 和 24 h，按组将实验裸鼠断颈处死，取血液及主要脏器和组织，称重并量放射性计数，计算各器官或组织的百分注射剂量率 (%ID/g)。

表 7：改进型阿达木抗体分布检测

抗体名称 \ 时间	百分注射剂量率 (%ID/g)			
	2h	4h	8h	24h
原始阿达木	1.37 $\pm$ 0.28	1.84 $\pm$ 0.13	2.21 $\pm$ 0.15	3.56 $\pm$ 0.66
L0h4	1.56 $\pm$ 0.21	2.36 $\pm$ 0.24	2.87 $\pm$ 0.13	4.53 $\pm$ 0.52
L2h1	1.47 $\pm$ 0.2	1.94 $\pm$ 0.11	2.31 $\pm$ 0.11	3.86 $\pm$ 0.46
L3h2	1.57 $\pm$ 0.22	1.98 $\pm$ 0.15	2.25 $\pm$ 0.14	3.76 $\pm$ 0.38
L3h4	1.54 $\pm$ 0.18	1.87 $\pm$ 0.12	2.19 $\pm$ 0.10	3.69 $\pm$ 0.43
L4h1	1.43 $\pm$ 0.12	1.74 $\pm$ 0.15	2.04 $\pm$ 0.21	3.46 $\pm$ 0.36
L4h2	1.59 $\pm$ 0.21	2.04 $\pm$ 0.11	2.35 $\pm$ 0.17	3.96 $\pm$ 0.51
L4h4	1.58 $\pm$ 0.24	1.93 $\pm$ 0.14	2.41 $\pm$ 0.16	4.06 $\pm$ 0.56

药代分布试验：取 5 只 BALB/c 小白鼠，每只经尾静脉注射 100 μ L 125 I-抗体(370 kBq, 2 μ g)，分别于注射后不同时间点(5、12、30 min, 1、2、4、8、11、22、34、48、72 h) 眼眶取血，称重并用 γ 计数仪测量其放射性计数，计算每克血液百分注射剂量率(%ID/g)。采用 Graph Prism 软件进行分析，计算药代动力学参数。结果发现本发明的 10 个改进型阿达木单抗比原始阿达木单抗的半衰期长（图 6）。

工业实用性

本发明提供的低免疫原性的抗 TNF- α 全人源单抗与人 TNF- α 结合的亲和力和原始 adalimumab 抗体相近，可特异性地阻断 TNF- α 与细胞表面 TNF 受体 p55 和 p75 的结合。本发明的低免疫原性的抗 TNF- α 全人源单抗可用于制备针对 TNF- α 靶标的抗肿瘤及其他疾病如炎症及自身免疫性疾病的预防和治疗性抗体药物，该抗体药有望降低其在病人体内产生免疫原性的风险，延长抗体药的半衰期，提高疗效，具有优异的临床应用价值。

序列表

<110> 北京天成新脉生物技术有限公司
 <120> 低免疫原性抗 TNF- α 全人源单抗及其应用
 <130> KHP153811354
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L1
 <400> 1

```
atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt attagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagctcctaa actcctgata tatgtgcat ccactttgca atcaggggtc      240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acaggtttca ctctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagctct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctgcctcgt cacaagagag ttcaacaggg gagagtgtta gtaa          714
```

<210> 2
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L2
 <400> 2

```
atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt attagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagctcctaa actcctgata tatgtgcat ccactttgca atcaggggtc      240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acaggtttca ctctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagctct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctgcctcgt cacaagagag ttcaacaggg gagagtgtta gtaa          714
```

<210> 3

<211> 714

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L3

<400> 3

```

atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tctccctgtg ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt atttagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagctcctaa actcctgate tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc      240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acaggtttca ctctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctgcctcgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtaa              714

```

<210> 4

<211> 714

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L4

<400> 4

```

atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tctccctgtg ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt atttagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagctcctaa actcctgate tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc      240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acaggtttca ctctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctgcctcgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtaa              714

```

<210> 5

<211> 714

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L5

<400> 5

```

atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tctccctgtg ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt atttagcctg gtatcagcag      180

```

aaaccaggga aagtgcctgt actcctgate tatgetgeat ccactttgca atcaggggtc	240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acaggtttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt	360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgttgctg caccatctgt ctctatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctcgcccg cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtaa	714

<210> 6

<211> 522

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h1

<400> 6

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggetatit taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcccc gcaggctcct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaaggggc ttggaatgggt ctacagctatc acttggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg agggccgatt caccatctcc ctggacacct ccaagtccac cgcttatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggattca gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctctccct tgactattgg ggccaaggaa ccctgggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca agggcccac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc cc	522

<210> 7

<211> 522

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h2

<400> 7

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggetatit taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcccc gcaggctcct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaaggggc ttggaatgggt ctacagctatc acttggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg agggccgatt caccttctcc ctggacacct ccaagtccac cgcttatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggatacg gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctctccct tgactattgg ggccaaggaa ccctgggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca agggcccac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc cc	522

<210> 8

<211> 522

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h3

<400> 8

atggagttgg gactgagctg gatttttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggettg gtacagcccg gcggatccct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggatacac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaagggcc tggaatgggt ctcagctatc acttggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg agggecgatt caccatctcc ctggacacct ccaagtcac cgttatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggattca gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctctccct tgactattgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca agggeccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctggtaag gactacttcc cc	522

<210> 9

<211> 522

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h4

<400> 9

atggagttgg gactgagctg gatttttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggettg gtacagcccg gcggatccct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggatacac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaagggcc tggaatgggt ctcagctatc acttggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg agggecgatt caccctctcc ctggacacct ccaagtcac cgttatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggatacg gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctctccct tgactattgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca agggeccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctggtaag gactacttcc cc	522

<210> 10

<211> 522

<212> DNA

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h5

<400> 10

atggagttgg gactgagctg gatttttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggettg gtacagcccg gcggatccct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggatacac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaagggcc tggaatgggt ctcagctatc acttggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg agggecgatt caccatctcc ctggacacct ccgtatccac cgttatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggattca gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctctccct tgactattgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca agggeccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctggtaag gactacttcc cc	522

<210> 11

<211> 236

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L1

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 236

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L2

<400> 12

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15
Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
           20           25           30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
           35           40           45

```

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

<210> 13

<211> 236

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L3

<400> 13

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

Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 4

<211> 236

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L4

<400> 4

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 15

<211> 236

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗轻链可变区 L5

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h1
 <400> 16

```

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

```

<210> 17
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h2
 <400> 17

```

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

```

85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170

<210> 18

<211> 174

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h3

<400> 18

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

<210> 19

<211> 174

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h4

<400> 19

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

<210> 20

<211> 174

<212> PRT

<213> 改进型阿达木单抗重链可变区 h5

<400> 20

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

100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp		
115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
130	135	140
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
145	150	155
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
165	170	

<210> 21

<211> 714

<212> DNA

<213> 原始阿达木单抗轻链可变区 L0

<400> 21

atggacatga gggtcctgc tcagtcctg ggactcctgc tgetctggct cccagatacc	60
agatgtgaca tccagatgac ccagtcctca tcttcctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attaggaatt atttagcctg gtatcagcag	180
aaaccaggga aagtcctaa actcctgac tatgtgcat ccactttgca atcaggggtc	240
ccatctcggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaggtata acagagcccc gtacactttt	360
ggccagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgect gctgaataac	480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctcgcccgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtaa	714

<210> 22

<211> 522

<212> DNA

<213> 原始阿达木单抗重链可变区 h0

<400> 22

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggttg gtacagcccg gcaggtcct gagactctcc	120
tgtgcggcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca	180
gggaagggcc tggaatgggt ctacgtatc acttgggaata gtggtcacat agactatgcg	240
gactctgtgg aggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg	300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggatacg gccgtatatt actgtgcgaa agtctcgtac	360
cttagcaccg cgctcctcct tgactattgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt	420
gcctccacca aggcccac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctggccaag gactacttcc cc	522

<210> 23

<211> 236

<212> PRT

<213> 原始阿达木单抗轻链可变区 L0

<400> 23

```

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

```

<210> 24

<211> 174

<212> PRT

<213> 原始阿达木单抗重链可变区 h0

<400> 24

```

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1           5           10           15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
           20           25           30

```

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

权 利 要 求 书

1、一种低免疫原性抗 TNF- α 全人源单克隆抗体，其特征在于，在原始阿达木序列的轻链可变区和重链可变区的 FR 区进行氨基酸改造，降低其免疫原性，所述原始阿达木序列的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.23、24 所示。

2、如权利要求 1 所述的低免疫原性抗 TNF- α 全人源单克隆抗体，其特征在于，其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO.11~15 或 SEQ ID NO.23 任一所示，其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO.16~20 任一所示。

3、如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.19 所示。

4、编码权利要求 1~3 任一所述单克隆抗体的基因。

5、含有权利要求 4 所述的基因的表达载体。

6、权利要求 4 所述的基因或权利要求 5 所述的表达载体在制备治疗以人 TNF- α 为靶标的疾病药物中的应用。

7、权利要求 1~3 任一所述单克隆抗体在制备治疗以人 TNF- α 为靶标的疾病药物中的应用。

8、权利要求 1~3 任一所述单克隆抗体在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用。

9、如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述的疾病为风湿性关节炎、红斑狼疮。

10、含有权利要求 1~3 任一所述单克隆抗体的药物或检测试剂。

说明书附图

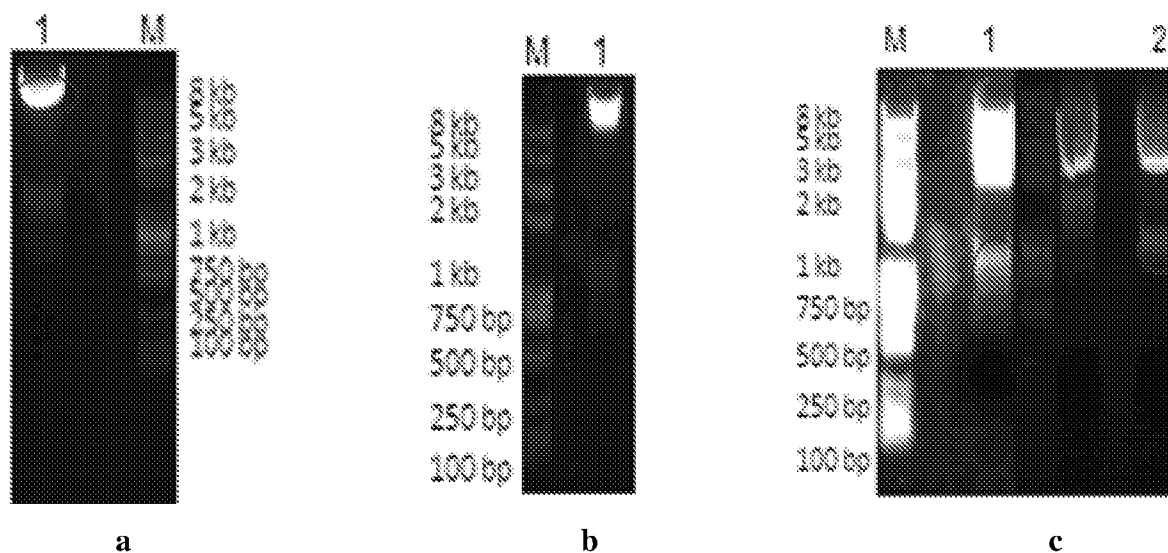


图 1

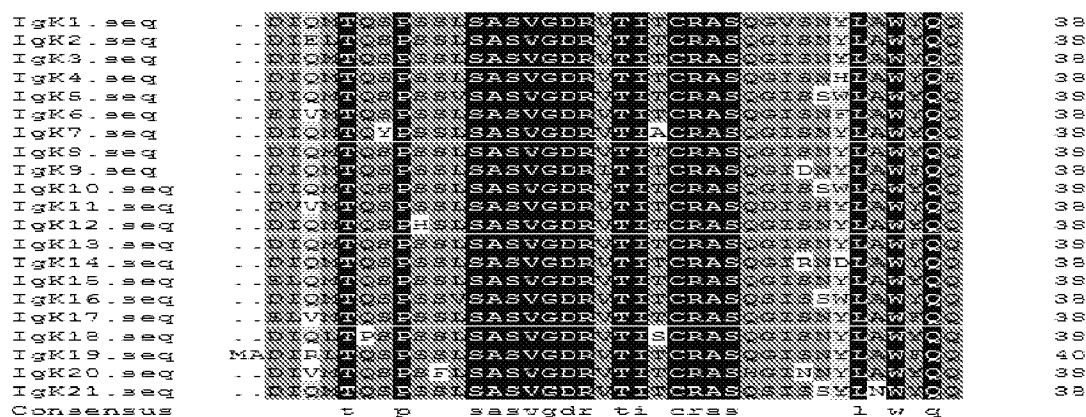


图 2a

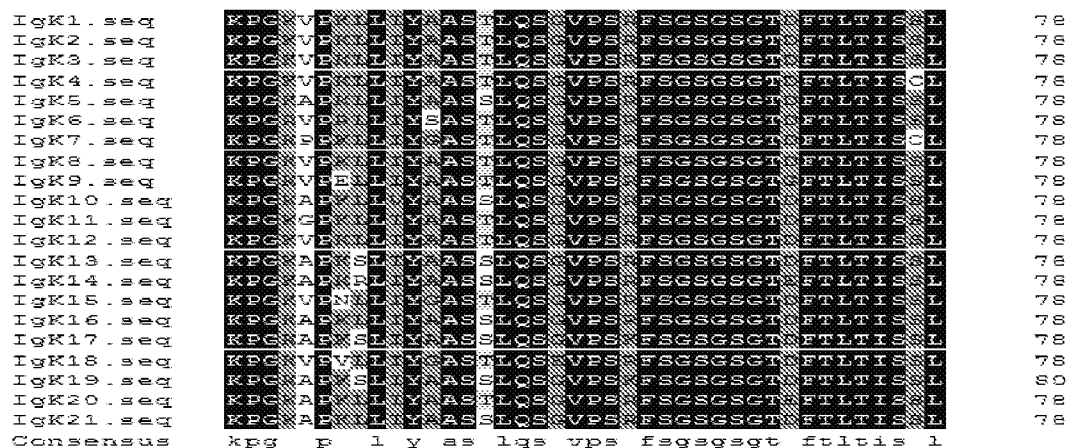


图 2b

IgK1..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	AF	..	YTFG	GT	LEIN		107	
IgK2..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	AF	..	RTFG	GT	VEIR	RTVAAP	113	
IgK3..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	AF	..	RMVYTFG	GT	LEIN		109	
IgK4..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	AF	..	DTFG	GT	VDI	RTVAAPS	114	
IgK5..seq	QPE	..	DEA	YYC	QAN	FP	..	WTFG	GT	VEIN		107	
IgK6..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	DB	..	RTFG	GT	VEIN		107	
IgK7..seq	QPE	..	DVA	YYC	QKMT	SP	..	WTFG	GT	VEIR		107	
IgK8..seq	QPE	..	DVA	V	YYC	QQV	YTF	..	TEFG	GT	VEIR	107	
IgK9..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	AF	..	LTFCG	GT	VDI	RT	109	
IgK10..seq	QPE	..	DEA	YYC	QAN	FP	..	RTFG	GT	VEIN		107	
IgK11..seq	QPE	..	DVA	I	YYC	KYN	AF	..	LTFC	GT	VDI	107	
IgK12..seq	QPE	..	DVA	V	YYC	QQR	FTV	..	TEFG	GT	LEIN	107	
IgK13..seq	QPE	..	DEA	YYC	QAN	YP	..	ITEFG	GT	VEIR		108	
IgK14..seq	QPE	..	DEA	YYC	LQHN	YP	..	WTFG	GT	VEIN		108	
IgK15..seq	QPE	..	DVA	YYC	KYN	DB	AF	..	RTFG	GT	VDI	RTVAAPS	114
IgK16..seq	QPE	DE	DEA	YYC	QKND	SP	..	ITEFG	GT	VEIR	RTV	112	
IgK17..seq	QPE	..	DEA	YYC	QKND	YP	..	ITEFG	GT	VEIN		107	
IgK18..seq	QPE	..	DEA	YYC	KYN	AF	..	YTFG	GT	LEIR		108	
IgK19..seq	QPE	..	DEA	YYC	QKND	YP	..	ITEFG	GT	LEIN		109	
IgK20..seq	QPE	..	DEA	YYC	QKND	YP	..	PTFG	GT	VEIR		108	
IgK21..seq	QPE	..	DE	YYC	QQS	TE	..	YTFG	GT	LEIN		107	
Consensus	qpe		d	yyc		p		tfq	gt				

图 2c

[illegible]

图 3a

[illegible]

图 3b

.EVMVEREGGVVPSCHIRKQASGCTFEE..YMMNRQAPGCHSVS.VYSGSSVNLDSVKEFTTERDNKMLILQNNLRADDAAYQAA.....DAFGEE...LEHNGEGLNIVSI
AENRPLSLVKNQRTSGCTFPL..SYHNRQAPGCHSYNGWNPNGGGSSSQFQFQVMMTSTSTINAWELNLSSTDAAYVTA.....EVAGRE...FLDASGCTNIVSI
 .QVQPSHPRVPSSTISLQVSGEVSSTENYSTRASGCHGWIS.VIYVLSYNNHPSLEGLMSVDTWNGFELRSFTALDEAYQAG...LRPNTSGYTHYTFKGLVWV...
 .EVMVEREGGVVPSCHIRKQASGCTFEE..YAMNRQAPGCHVWVASSESGSTVNLDSVKEFTTERDNKMLILQNNLRADDAAYQAA.....TAR.....AFHNGEGLNIVSI
 CEVVEREGGVVPSCHIRKQASGCTFEE..YMMNRQAPGCHVWVRINSEDETSVNLDSVKEFTTERDNKMLILQNNLRADDAAYQAA.....DFTGEE...YIFTSGCTNIVSI
 SQVWVDAENKPKLAEVWKEPSCCTITG..HYMNRQAPGCHVWGWNPNGSGTWALEMFOFVITITPTSTINAWELSPARSDAAYQAA.....ASYCGDYCYFTFSGCTNIVSI
 SQVWVDAENKPKLAEVWKEPSCCTFEE..YAMNRQAPGCHVWGWNPNGSGTWALEMFOFVITITPTSTINAWELSPARSDAAYQAA.....SPALLADVILNFGELSETNIVSI

 p c en w r n g d l r d d a v c g g v

图 3c

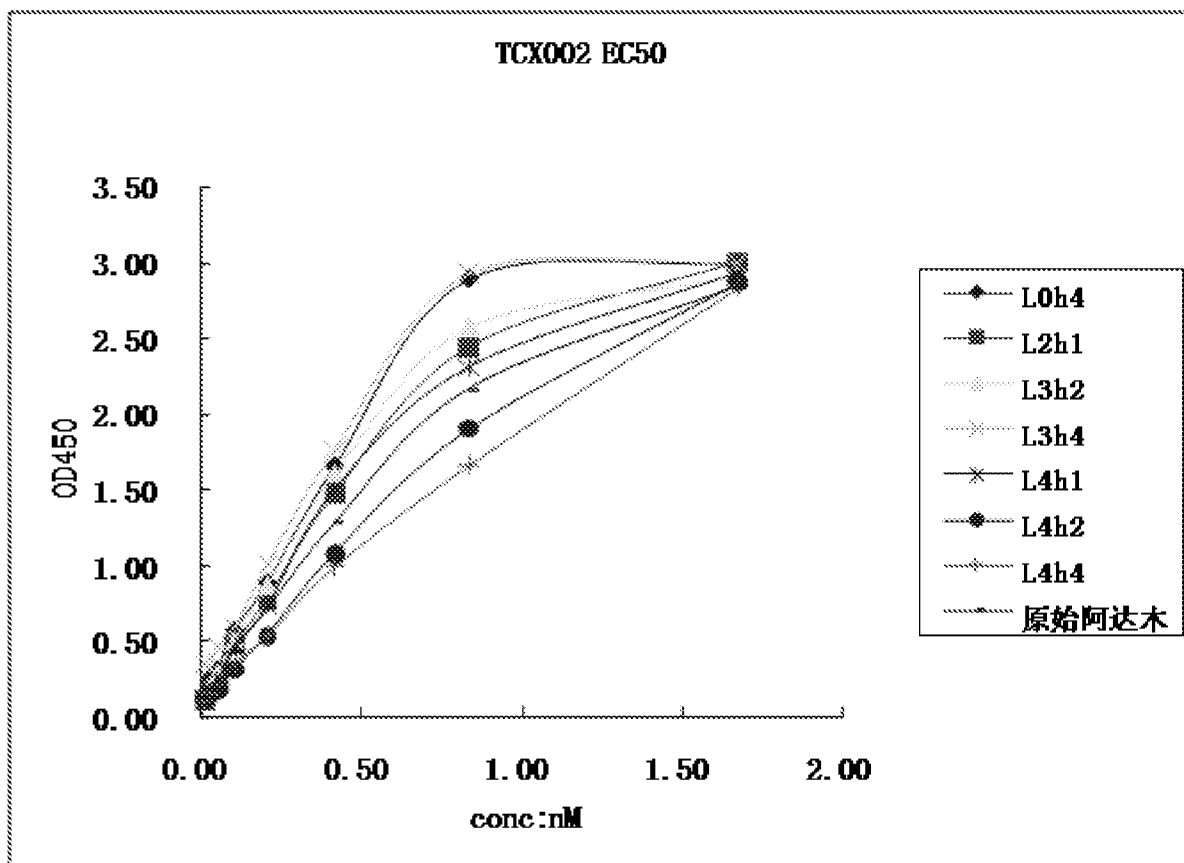


图 4

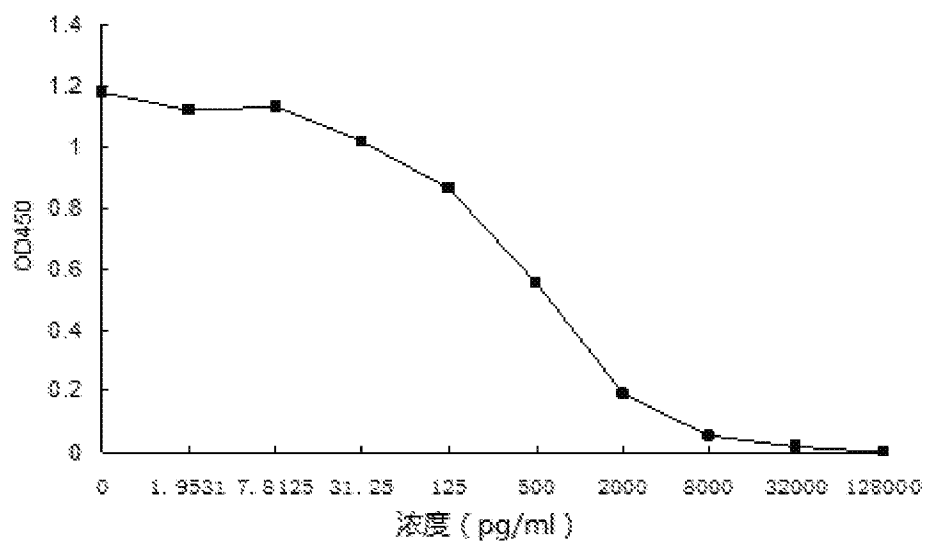


图 5a

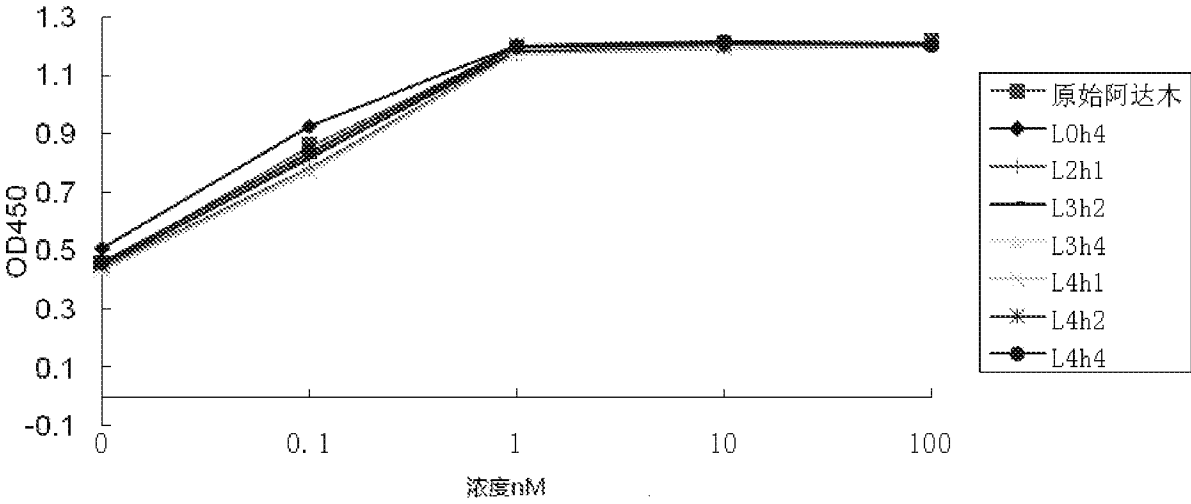


图 5b

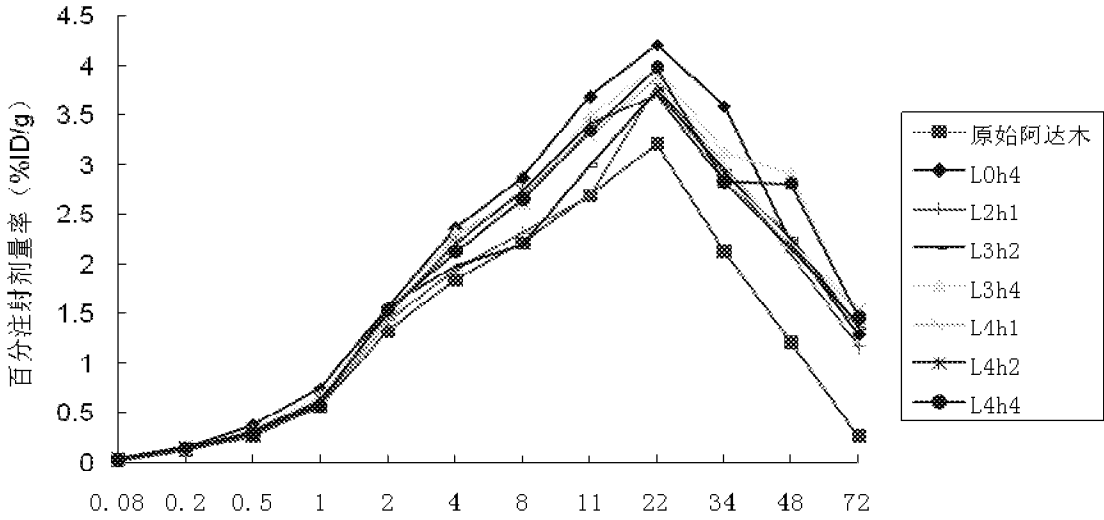


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/074528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/24 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i; A61P 19/02 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI: D2E7, adalimumab, TNF, sequence search based on SEQ ID No: 11-20, 23, 24

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104341502 A (BEIJING TIANCHENG XINMAI BIOLOGICAL TECH) 11 February 2015 (11.02.2015) , see the whole document	1-10
X	CN 102439040 A (FACET BIOTECH CORP.) 02 May 2012 (02.05.2012) , see claims 1, 79, 80	1, 4-10
A	CN 102439040 A (FACET BIOTECH CORP.) 02 May 2012 (02.05.2012) , see claims 1, 79, 80	2, 3
A	CN 102755646 A (ABBOTT BIOTECH LTD) 31 October 2012 (31.10.2012) , see the abstract, claims 1 and 2	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 05 June 2015	Date of mailing of the international search report 29 June 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanxia Telephone No. (86-10)62089438

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/074528

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104341502 A	11 February 2015	None	
CN 102439040 A	02 May 2012	US 2010266613 A1	21 October 2010
		JP 2012524071 A	11 October 2012
		US 8722860 B2	13 May 2014
		EP 2419448 A1	22 February 2012
		AU 2010236256 A1	03 November 2011
		PE 08352012 A1	23 July 2012
		MX 2011010908 A	21 February 2012
		CO 6450656 A2	31 May 2012
		CR 20110526 A	09 February 2012
		EC SP 11011450 A	30 March 2012
		RU 2011145428 A	27 May 2013
		IL 215649 D0	31 January 2012
		TW 201041592 A	01 December 2010
		SG 175181 A1	28 November 2011
		NZ 595687 A	29 November 2013
		DO P2011000316 A	29 February 2012
		WO 2010121140 A1	21 October 2010
		US 2014212424 A1	31 July 2014
		US 2012135005 A1	31 May 2012
		KR 20110138412 A	27 December 2011
		CA 2758964 A1	21 October 2010
CN 102755646 A	31 October 2012	PL 218992 B1	27 February 2015
		IL 166280 D0	15 January 2006
		CN 101745112 A	23 June 2010
		KR 101283877 B1	8 July 2013
		AR 077474 A2	31 August 2011
		CN 102764436 A	7 November 2012
		US 2004219142 A1	4 November 2004
		PL 374865 A1	14 November 2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/074528

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2013243763 A1	19 September 2013
		EP 1944322 A2	16 July 2008
		EP 2298810 A3	3 August 2011
		TW I430810 B	21 March 2014
		EP 2298810 A2	23 March 2011
		EP 1944322 A3	17 December 2008
		PL 401886 A1	27 May 2013
		PL 213925 B1	31 May 2013
		KR 20130001318 A	3 January 2013
		IL 166280 A	30 August 2012
		TW 200412998 A	1 August 2004
		AU 2003267999 B2	11 March 2010
		IL 213400 D0	31 July 2011
		NZ 598346 A	25 October 2013
		JP 2010209070 A	24 September 2010
		US 2004136990 A1	15 July 2004
		WO 2004009776 A2	29 January 2004
		EP 1542720 A2	22 June 2005
		WO 2004009776 A3	21 October 2004
		NZ 576774 A	30 June 2011
		TW 201302221 A	16 January 2013
		US 2004136991 A1	15 July 2004
		IL 210090 D0	31 July 2011
		JP 2013056892 A	28 March 2013
		US 2014286939 A1	25 September 2014
		NZ 563452 A	30 April 2010
		US 2013243786 A1	19 September 2013
		AU 2010200708 B2	5 April 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/074528

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		IL 210091 D0	31 July 2011
		US 2004136989 A1	15 July 2004
		TW 201000131 A	1 January 2010
		NZ 555692 A	28 February 2009
		EP 1542720 A4	18 January 2006
		US 2014286941 A1	25 September 2014
		BR 0312785 A	30 August 2005
		JP 2006506465 A	23 February 2006
		CA 2493067 A1	29 January 2004
		US 2008193466 A1	14 August 2008
		AU 2003267999 A1	9 February 2004
		EP 1944322 B1	11 March 2015
		KR 20120034749 A	12 April 2012

A. 主题的分类		
C07K 16/24(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 19/02(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K, C12N, A61K, A61P, G01N		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI:D2E7, 阿达木单抗, adalimumab, TNF, 基于SEQ ID No: 11-20、23、24的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 104341502 A (北京天成新脉生物技术有限公司) 2015年 2月 11日 (2015 - 02 - 11) 全文	1-10
X	CN 102439040 A (亚培生物医疗股份有限公司) 2012年 5月 2日 (2012 - 05 - 02) 权利要求1, 79, 80	1, 4-10
A	CN 102439040 A (亚培生物医疗股份有限公司) 2012年 5月 2日 (2012 - 05 - 02) 权利要求1, 79, 80	2, 3
A	CN 102755646 A (艾博特生物技术有限公司) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 摘要, 权利要求1、2	1-10
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2015年 6月 5日		2015年 6月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		张艳霞
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62089438

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/074528

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104341502	A	2015年 2月 11日	无			
CN	102439040	A	2012年 5月 2日	US	2010266613	A1	2010年 10月 21日
				JP	2012524071	A	2012年 10月 11日
				US	8722860	B2	2014年 5月 13日
				EP	2419448	A1	2012年 2月 22日
				AU	2010236256	A1	2011年 11月 3日
				PE	08352012	A1	2012年 7月 23日
				MX	2011010908	A	2012年 2月 21日
				CO	6450656	A2	2012年 5月 31日
				CR	20110526	A	2012年 2月 9日
				EC	SP11011450	A	2012年 3月 30日
				RU	2011145428	A	2013年 5月 27日
				IL	215649	D0	2012年 1月 31日
				TW	201041592	A	2010年 12月 1日
				SG	175181	A1	2011年 11月 28日
				NZ	595687	A	2013年 11月 29日
				DO	P2011000316	A	2012年 2月 29日
				WO	2010121140	A1	2010年 10月 21日
				US	2014212424	A1	2014年 7月 31日
				US	2012135005	A1	2012年 5月 31日
				KR	20110138412	A	2011年 12月 27日
				CA	2758964	A1	2010年 10月 21日
CN	102755646	A	2012年 10月 31日	PL	218992	B1	2015年 2月 27日
				IL	166280	D0	2006年 1月 15日
				CN	101745112	A	2010年 6月 23日
				KR	101283877	B1	2013年 7月 8日
				AR	077474	A2	2011年 8月 31日
				CN	102764436	A	2012年 11月 7日
				US	2004219142	A1	2004年 11月 4日
				PL	374865	A1	2005年 11月 14日
				US	2013243763	A1	2013年 9月 19日
				EP	1944322	A2	2008年 7月 16日
				EP	2298810	A3	2011年 8月 3日
				TW	1430810	B	2014年 3月 21日
				EP	2298810	A2	2011年 3月 23日
				EP	1944322	A3	2008年 12月 17日
				PL	401886	A1	2013年 5月 27日
				PL	213925	B1	2013年 5月 31日
				KR	20130001318	A	2013年 1月 3日
				IL	166280	A	2012年 8月 30日
				TW	200412998	A	2004年 8月 1日
				AU	2003267999	B2	2010年 3月 11日
				IL	213400	D0	2011年 7月 31日
				NZ	598346	A	2013年 10月 25日
				JP	2010209070	A	2010年 9月 24日
				US	2004136990	A1	2004年 7月 15日
				WO	2004009776	A2	2004年 1月 29日
				EP	1542720	A2	2005年 6月 22日
				WO	2004009776	A3	2004年 10月 21日
				NZ	576774	A	2011年 6月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/074528

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		TW 201302221 A	2013年 1月 16日
		US 2004136991 A1	2004年 7月 15日
		IL 210090 D0	2011年 7月 31日
		JP 2013056892 A	2013年 3月 28日
		US 2014286939 A1	2014年 9月 25日
		NZ 563452 A	2010年 4月 30日
		US 2013243786 A1	2013年 9月 19日
		AU 2010200708 B2	2012年 4月 5日
		IL 210091 D0	2011年 7月 31日
		US 2004136989 A1	2004年 7月 15日
		TW 201000131 A	2010年 1月 1日
		NZ 555692 A	2009年 2月 28日
		EP 1542720 A4	2006年 1月 18日
		US 2014286941 A1	2014年 9月 25日
		BR 0312785 A	2005年 8月 30日
		JP 2006506465 A	2006年 2月 23日
		CA 2493067 A1	2004年 1月 29日
		US 2008193466 A1	2008年 8月 14日
		AU 2003267999 A1	2004年 2月 9日
		EP 1944322 B1	2015年 3月 11日
		KR 20120034749 A	2012年 4月 12日