



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101443360 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 200780015416. 9

(22) 申请日 2007. 03. 27

(30) 优先权数据

60/786, 569 2006. 03. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2007/001108 2007. 03. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02007/110631 EN 2007. 10. 04

(73) 专利权人 医学免疫有限公司

地址 英国剑桥郡

专利权人 深思操作有限公司

(72) 发明人 E·S·科汉 R·R·明特

P·R·哈里森 M·A·斯利曼

A·D·纳什 L·J·法布里

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 徐雁漪

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 94/09149 A1, 1994. 04. 28, 全文.

W0 94/11404 A, 1994. 05. 26, 全文.

Nicola N A et al. Neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies to the human granulocyte-macrophage colony-stimulation factor receptor alpha-chain. 《blood》. 1993, 第 82 卷 (第 6 期), 1724-1731.

审查员 孙永福

权利要求书3页 说明书44页

序列表110页 附图6页

(54) 发明名称

GM-CSF 受体结合元件

(57) 摘要

本发明公开了粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体 (GM-CSFR) 的 α 链的结合元件, 尤其抗体分子。本发明还公开了所述结合元件在治疗如风湿性关节炎、哮喘、过敏反应、多发性硬化、髓系白血病和动脉硬化的炎性和自体免疫疾病中的应用。

1. 一种分离的人 GM-CSFR α 抗体分子,其抑制 GM-CSF 与 GM-CSFR α 的结合,其中所述抗体分子包含:

抗体 VH 域和抗体 VL 域,所述抗体 VH 域包含互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 及框架,所述抗体 VL 域包含互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 及框架,其中

HCDR1 为 SEQ ID NO:3, HCDR2 为 SEQ ID NO:4, HCDR3 为 SEQ ID NO:5, LCDR1 为 SEQ ID NO:8, LCDR2 为 SEQ ID NO:9 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:10;

HCDR1 为 SEQ ID NO:13, HCDR2 为 SEQ ID NO:14, HCDR3 为 SEQ ID NO:15, LCDR1 为 SEQ ID NO:18, LCDR2 为 SEQ ID NO:19 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:20;

HCDR1 为 SEQ ID NO:33, HCDR2 为 SEQ ID NO:34, HCDR3 为 SEQ ID NO:35, LCDR1 为 SEQ ID NO:38, LCDR2 为 SEQ ID NO:39 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:40;

HCDR1 为 SEQ ID NO:43, HCDR2 为 SEQ ID NO:44, HCDR3 为 SEQ ID NO:45, LCDR1 为 SEQ ID NO:48, LCDR2 为 SEQ ID NO:49 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:50;

HCDR1 为 SEQ ID NO:53, HCDR2 为 SEQ ID NO:54, HCDR3 为 SEQ ID NO:55, LCDR1 为 SEQ ID NO:58, LCDR2 为 SEQ ID NO:59 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:60;

HCDR1 为 SEQ ID NO:63, HCDR2 为 SEQ ID NO:64, HCDR3 为 SEQ ID NO:65, LCDR1 为 SEQ ID NO:68, LCDR2 为 SEQ ID NO:69 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:70;

HCDR1 为 SEQ ID NO:73, HCDR2 为 SEQ ID NO:74, HCDR3 为 SEQ ID NO:75, LCDR1 为 SEQ ID NO:78, LCDR2 为 SEQ ID NO:79 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:80;

HCDR1 为 SEQ ID NO:83, HCDR2 为 SEQ ID NO:84, HCDR3 为 SEQ ID NO:85, LCDR1 为 SEQ ID NO:88, LCDR2 为 SEQ ID NO:89 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:90;

HCDR1 为 SEQ ID NO:93, HCDR2 为 SEQ ID NO:94, HCDR3 为 SEQ ID NO:95, LCDR1 为 SEQ ID NO:98, LCDR2 为 SEQ ID NO:99 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:100;

HCDR1 为 SEQ ID NO:103, HCDR2 为 SEQ ID NO:104, HCDR3 为 SEQ ID NO:105, LCDR1 为 SEQ ID NO:108, LCDR2 为 SEQ ID NO:109 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:110;

HCDR1 为 SEQ ID NO:113, HCDR2 为 SEQ ID NO:114, HCDR3 为 SEQ ID NO:115, LCDR1 为 SEQ ID NO:118, LCDR2 为 SEQ ID NO:119 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:120;

HCDR1 为 SEQ ID NO:123, HCDR2 为 SEQ ID NO:124, HCDR3 为 SEQ ID NO:125, LCDR1 为 SEQ ID NO:128, LCDR2 为 SEQ ID NO:129 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:130;

HCDR1 为 SEQ ID NO:133, HCDR2 为 SEQ ID NO:134, HCDR3 为 SEQ ID NO:135, LCDR1 为 SEQ ID NO:138, LCDR2 为 SEQ ID NO:139 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:140;

HCDR1 为 SEQ ID NO:143, HCDR2 为 SEQ ID NO:144, HCDR3 为 SEQ ID NO:145, LCDR1 为 SEQ ID NO:148, LCDR2 为 SEQ ID NO:149 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:150;

HCDR1 为 SEQ ID NO:153, HCDR2 为 SEQ ID NO:154, HCDR3 为 SEQ ID NO:155, LCDR1 为 SEQ ID NO:158, LCDR2 为 SEQ ID NO:159 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:160;

HCDR1 为 SEQ ID NO:163, HCDR2 为 SEQ ID NO:164, HCDR3 为 SEQ ID NO:165, LCDR1 为 SEQ ID NO:168, LCDR2 为 SEQ ID NO:169 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:170;

HCDR1 为 SEQ ID NO:173, HCDR2 为 SEQ ID NO:174, HCDR3 为 SEQ ID NO:175, LCDR1 为 SEQ ID NO:178, LCDR2 为 SEQ ID NO:179 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:180;

HCDR1 为 SEQ ID NO:183, HCDR2 为 SEQ ID NO:184, HCDR3 为 SEQ ID NO:185, LCDR1

为 SEQ ID NO:188, LCDR2 为 SEQ ID NO:189 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:190;或者

HCDR1 为 SEQ ID NO:193, HCDR2 为 SEQ ID NO:194, HCDR3 为 SEQ ID NO:195, LCDR1 为 SEQ ID NO:198, LCDR2 为 SEQ ID NO:199 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:200。

2. 根据权利要求 1 的抗体分子,其中所述 VH 结构域和 VL 结构域氨基酸序列为:

VH 结构域 SEQ ID NO:2 和 VL 结构域 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:208;

VH 结构域 SEQ ID NO:12 和 VL 结构域 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:210;

VH 结构域 SEQ ID NO:32 和 VL 结构域 SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:214;

VH 结构域 SEQ ID NO:42 和 VL 结构域 SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:216;

VH 结构域 SEQ ID NO:52 和 VL 结构域 SEQ ID NO:57 或 SEQ ID NO:218;

VH 结构域 SEQ ID NO:62 和 VL 结构域 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:220;

VH 结构域 SEQ ID NO:72 和 VL 结构域 SEQ ID NO:77 或 SEQ ID NO:222;

VH 结构域 SEQ ID NO:82 和 VL 结构域 SEQ ID NO:87 或 SEQ ID NO:224;

VH 结构域 SEQ ID NO:92 和 VL 结构域 SEQ ID NO:97 或 SEQ ID NO:226;

VH 结构域 SEQ ID NO:102 和 VL 结构域 SEQ ID NO:107 或 SEQ ID NO:228;

VH 结构域 SEQ ID NO:112 和 VL 结构域 SEQ ID NO:117 或 SEQ ID NO:230;

VH 结构域 SEQ ID NO:122 和 VL 结构域 SEQ ID NO:127 或 SEQ ID NO:232;

VH 结构域 SEQ ID NO:132 和 VL 结构域 SEQ ID NO:137 或 SEQ ID NO:234;

VH 结构域 SEQ ID NO:142 和 VL 结构域 SEQ ID NO:147 或 SEQ ID NO:236;

VH 结构域 SEQ ID NO:152 和 VL 结构域 SEQ ID NO:157 或 SEQ ID NO:238;

VH 结构域 SEQ ID NO:162 和 VL 结构域 SEQ ID NO:167 或 SEQ ID NO:240;

VH 结构域 SEQ ID NO:172 和 VL 结构域 SEQ ID NO:177 或 SEQ ID NO:242;

VH 结构域 SEQ ID NO:182 和 VL 结构域 SEQ ID NO:187 或 SEQ ID NO:244;或

VH 结构域 SEQ ID NO:192 和 VL 结构域 SEQ ID NO:197 或 SEQ ID NO:246。

3. 一种包含抗体 VH 域和抗体 VL 域的分离的抗体分子,其中所述抗体 VH 域包含重链互补决定区 (CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,且所述 VL 域包含轻链 CDR LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,其中 CDR 的氨基酸序列为:

HCDR1 为 SEQ ID NO:53;

HCDR2 为 SEQ ID NO:54;

HCDR3 为 SEQ ID NO:55;

LCDR1 为 SEQ ID NO:58;

LCDR2 为 SEQ ID NO:59;和

LCDR3 为 SEQ ID NO:60。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的抗体分子,其中所述抗体分子为人或人源化抗体分子。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体分子,其中 VH 域框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的序列为:

FR1 为 SEQ ID NO:251;

FR2 为 SEQ ID NO:252;

FR3 为 SEQ ID NO:253;和

FR4 为 SEQ ID NO:254。

6. 根据权利要求 3 所述的抗体分子,其中 VL 域框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的序列为:

FR1 为 SEQ ID NO :255 ;
FR2 为 SEQ ID NO :256 ;
FR3 为 SEQ ID NO :257 ;和
FR4 为 SEQ ID NO :258。

7. 根据权利要求 4 所述的抗体分子,其中所述抗体分子为人 IgG4 抗体分子,且 VH 域氨基酸序列为 SEQ ID NO :52 和 VL 域氨基酸序列为 SEQ ID NO :218。

8. 一种分离的人 GM-CSFR α 抗体分子,其抑制 GM-CSF 与 GM-CSFR α 的结合,其中所述抗体分子在表面等离子共振试验中以低于 5nM 的亲和性 (K_D) 结合到人 GM-CSFR α 的细胞外域并且所述抗体分子包括:

具有如 SEQ ID NO :52 所示 VH 域氨基酸序列的 VH 域,和
具有如 SEQ ID NO :57 所示 VL 域氨基酸序列的 VL 域。

9. 根据权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,其中所述抗体分子为 IgG4。

10. 根据权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,其在表面等离子共振试验中,以 1nM 或更低的亲和性 (KD) 结合人 GM-CSFR α 细胞外域。

11. 根据权利要求 10 的抗体分子,其在表面等离子共振试验中,以 0.5nM 或更低的亲和性 (KD) 结合人 GM-CSFR α 细胞外域。

12. 根据权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,其在使用 7pM 人 GM-CSF 的 TF-1 细胞增殖试验中具有 60pM 或更低的 IC50 中和效力。

13. 根据权利要求 12 的抗体分子,在使用 7pM 人 GM-CSF 的 TF-1 细胞增殖试验中具有 10pM 或更低的 IC50 中和效力。

14. 根据权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,其在使用 7pM 人 GM-CSF 的人粒细胞形态改变试验中具有 50pM 或更低的 IC50 中和效力。

15. 根据权利要求 14 的抗体分子,其在使用 7pM 人 GM-CSF 的人粒细胞形态改变试验中具有 25pM 或更低的 IC50 中和效力。

16. 根据权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,其在使用 1nM 人 GM-CSF 的单核细胞 TNF α 释放试验中具有 100pM 或更低的 IC50 中和效力。

17. 包含权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子和药物可接受的赋形剂的组合物。

18. 一种包含编码权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子的核酸序列的分离的核酸分子。

19. 一种含权利要求 18 的核酸分子的体外宿主细胞。

20. 一种制备权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子的方法,包括培养权利要求 19 的宿主细胞。

21. 根据权利要求 20 的方法,进一步包括纯化所述抗体分子。

22. 一种制备抗体分子组合物的方法,包括提供权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子,和将所述抗体分子配制为包含至少一种额外组分的组合物。

23. 权利要求 1、2、3 或 8 中任一项的抗体分子在制备用于治疗炎性、呼吸或自体免疫疾病或治疗髓系白血病的药物中的用途。

24. 根据权利要求 23 的用途,其中所述疾病为风湿性关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、过敏反应、多发性硬化或动脉硬化。

GM-CSF 受体结合元件

技术领域

[0001] 本发明涉及粒细胞 / 巨噬细胞集落刺激因子受体 α 链 (GM-CSFR α) 的结合元件、尤其涉及抗 -GMCSFR α 抗体分子。本发明还涉及这些结合元件在治疗 GMCSFR α 介导的包括风湿性关节炎、慢性阻塞性肺疾病和多发性硬化的炎性、呼吸和自体免疫疾病中的应用。

背景技术

[0002] GM-CSF 为 I 型促炎细胞因子,其增强包括嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、巨噬细胞及其祖细胞的大范围造血细胞类型的存活、增殖和 / 或分化。GM-CSF 受体为造血因子 (haematopoietin) 受体超家族的成员。它是异二聚体,由 α 和 β 亚基组成。 α 亚基为 GM-CSF 高度特异性的,而 β 亚基为包括 IL3 和 IL5 的其它细胞因子受体所共有。 β 受体亚基的较广泛的组织分布反映了这点。 α 亚基 (GM-CSFR α) 主要在骨髓细胞和非造血细胞 (如嗜中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性细胞、树突细胞、内皮细胞和呼吸上皮细胞) 上表达。全长 GM-CSFR α 为 400 氨基酸的 I 型膜糖蛋白,其属于 I 型细胞因子受体家族,并且包括 22 个氨基酸的信号肽 (1-22 位置)、298 个氨基酸的细胞外域 (23-320 位置)、321-345 位的跨膜域和 55 个氨基酸的短的细胞内域。信号肽被切除以产生作为 378 个氨基酸蛋白的 GM-CSFR α 的成熟形式。人和鼠的 GM-CSFR α 的 cDNA 克隆是可获得的,并且在蛋白质水平上其受体亚基具有 36% 一致性。GM-CSFR 能够以相对低的亲和力结合单独的 α 亚基 ($K_{d1} \sim 5nM$),但完全不与单独的 β 亚基结合。然而, α 和 β 亚基的同时存在产生高亲和性配体 - 受体复合物 ($K_d \approx 100pM$)。通过 GM-CSF 最初结合 GM-CSFR α 链、然后交联较大亚基 (共用 β 链) 以产生高亲和相互作用而产生 GM-CSF 信号发生,其磷酸化 JAK-STAT 途径。在参考文献 [1] 中论述了 GM-CSFR 与 GMCSF 的结合。这种相互作用也能够通过酪氨酸磷酸化和 MAP 激酶途径的激活而发生信号。

[0003] 从病理学来说,GM-CSF 已显示在加重炎性、呼吸和自体免疫疾病方面起作用。因而,对 GM-CSF 与 GM-CSFR α 结合的中和作用成为治疗 GM-CSFR 介导的疾病和状态的治疗途径。

[0004] Nicola 等 [2] 描述了抗人 GM-CSFR α 的鼠抗体,命名为 2B7-17-A 或“2B7”,据报道其具有相对高的对人 GM-CSFR α 的亲合性、并且在多个不同的生物试验中是人 GM-CSF 生物活性的有效抑制因子。抗体 2B7 可从 Chemicon 以 MAB1037 的名称购得,且 MAB1037 的产品数据页注明其为 GM-CSF 生物活性的有效抑制因子。2B7 也在 W094/09149 中公开。

发明内容

[0005] 通过利用天然 scFv 噬菌体库的选择、无规突变诱变和适当设计的生化和生物分析 (参见以下试验部分) 的组合,我们已鉴定了结合人 GM-CSFR α 、并且抑制人 GM-CSF 在其受体上的作用的高效抗体分子。此处给出的结果说明与已知抗 -GM-CSFR α 抗体 2B7 相比,我们的抗体结合 GM-CSFR α 的不同区或表位,并且令人惊奇的是,在各种生物试验中证明甚至比 2B7 更有效。

[0006] 因此,本发明涉及结合人 GM-CSFR α 、并且抑制人 GM-CSF 与 GM-CSFR α 的结合的结合元件。本发明的结合元件可能为 GM-CSFR 的拮抗剂。所述结合元件可能是通过 GM-CSFR 的 GM-CSF 信号转导的竞争性可逆抑制剂。

[0007] 本发明的抗体和其它结合元件在结合和中和 GM-CSFR α 方面是特别有意义的,因此,如此处包含的实验研究和其它支持技术文献所表明的,其治疗 GM-CSFR α 介导的包括炎症和自体免疫疾病的疾病方面是有用的。例如,我们已在基于细胞的试验中证实,本发明的抗体能够抑制由天然 GM-CSF 结合其受体所诱导的细胞因子(如 IL-6 和 TNF α)的释放。如以下更详细地解释的,通过阻断与 GM-CSFR α 的结合抑制 GM-CSF 活性是一种治疗如风湿性关节炎(RA)、哮喘、吸烟诱导的气道炎症、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、过敏反应、多发性硬化(MS)、髓系白血病或动脉硬化的疾病的治疗途径。

[0008] 根据本发明的结合元件通常结合 GM-CSFR α 的细胞外域。优选地,本发明的结合元件结合位于成熟人 GM-CSFR α (SEQ ID No:206) 的 226 ~ 230 位的 Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln(YLDFQ) (SEQ ID NO:201) 中至少一个残基。所述结合元件可以结合人 GM-CSFR α 的 YLDFQ 序列中的至少一个残基,例如其可以结合 YLDFQ 序列中的一个、两个、三个或四个残基。因此,所述结合元件可以识别该序列中的一个或多个残基,并且任选地,其也可以结合 GM-CSFR α 细胞外域中的附加侧翼残基或结构相邻的残基。

[0009] 可以通过任何适当的方法确定结合,例如,可以使用如本发明其它部分所详细描述肽结合扫描,如基于 PEPSCAN 的酶链免疫试验(ELISA)。在如 PEPSCAN 系统提供的种类的肽结合扫描中,源自抗原的短重叠肽被系统地针对其与结合元件的结合进行筛选。所述肽可以共价地连接于载体表面,以形成肽阵列。简言之,肽结合扫描(如“PEPSCAN”)包括鉴定(如使用 ELISA)结合元件与其结合的一组肽,其中所述肽具有 SEQ ID NO:206 的片段(如约 15 个 SEQ ID NO:206 的连续残基的肽)所相应的氨基酸序列,以及定位(aligining)所述肽以确定结合元件结合的残基的足迹,其中所述足迹包括与重叠肽共用的残基。根据本发明,通过肽结合扫描或 PEPSCAN 鉴定的足迹可能包括相应于 SEQ ID NO:206 的 226 ~ 230 位的 YLDFQ 的至少一个残基。所述足迹可以包括 YLDFQ 的一个、两个、三个、四个或所有残基。如通过此处描述的肽结合扫描或 PEPSCAN 方法所确定的,根据本发明的结合元件可以结合包括一个或多个、优选全部相应于 SEQ ID NO:206 的 226 ~ 230 位的 YLDFQ 残基的 SEQ ID NO:206 的肽片段(如 15 个残基)。因此本发明的结合元件可以结合具有 SEQ ID NO:206 的 15 个连续残基的氨基酸序列的肽,其中所述 15 个残基序列包括 SEQ ID NO:206 的 226 ~ 230 位的 YLDFQ 中的至少一个残基、或者至少与 YLDFQ 部分重叠。在本说明书的其它部分详细描述了用于确定结合的肽结合扫描方法的细节。本领域中公知的、并且可以用于确定抗体结合的残基和/或确认肽结合扫描(如 PEPSCAN)结果的其它方法包括定点突变、氘氘交换、质谱、NMR 和 X 射线结晶学。

[0010] 因此,本发明的结合元件优选地中和 GM-CSFR α 。中和意味着降低或抑制 GM-CSFR α 的生物活性,如通过 GM-CSFR α 介导的反应进行测量显示 GM-CSF 与 GM-CSFR α 的结合、或者通过 GM-CSFR α 的信号转导的减少或抑制。生物学活性的降低或抑制可以是部分的或者全部的。抗体中和 GM-CSFR α 的程度被称作其中和效力。所述效力可以使用一种或多种本领域普通技术人员已知的、和/或如此处所描述或引用的试验进行判断或测量。例如,结合元件可以在一个或多个以下试验中具有中和活性:

- [0011] ●生化配体结合试验
- [0012] ● TF-1 增殖试验
- [0013] ●人粒细胞形态改变试验
- [0014] ●猕猴非人灵长类粒细胞形态改变试验
- [0015] ●单核细胞 TNF α 释放试验
- [0016] ●粒细胞存活试验
- [0017] ●集落形成试验 (GM-CSF 介导的血细胞祖细胞体外分化的抑制)
- [0018] ●体内 (如具有表达人 GM-CSFR 的转基因骨髓的嵌合小鼠) GM-CSF 生物活性的抑制
- [0019] ●外周血单核细胞细胞因子释放试验

[0020] 除非另有说明,所述效力通常表示为以 pM 为单位的 IC₅₀ 值。在功能试验中,IC₅₀ 为生物反应降低其最大值的 50% 的浓度。在配体结合研究中,IC₅₀ 为受体结合降低最大特异结合水平的 50% 的浓度。通过绘制 % 最大生物反应 (如在增殖试验中以细胞增殖表示,细胞增殖可以通过以 cpm 计的 3H 胸腺嘧啶掺入量测量;在形态改变试验中以形态变化表示;在 TNF α 释放试验中以 TNF α 释放表示;在存活试验中以存活率表示;在集落形成试验中以集落的数目表示;或者在生物活性测试中以具有表达人 GM-CSFR 的转基因骨髓的嵌合小鼠的脾重量增加或循环单核细胞的减少表示) 或作为结合元件浓度的对数函数的 % 特异性受体结合图,并且使用如 Prism (GraphPad) 的软件程序将 Σ 函数与产生 IC₅₀ 值的数据匹配,从而可以计算 IC₅₀。

[0021] IC₅₀ 值可以表示多个测量的平均数。因此,例如,可以由三重试验的结果获得 IC₅₀ 值,并且然后可以计算平均 IC₅₀ 值。

[0022] 在 TF-1 增殖试验中,本发明的结合元件通常具有不到 1500pM 的 IC₅₀。例如,IC₅₀ 可以 <300、<60、<10 或 <1.5pM,如约 1.0pM。通常地,IC₅₀ 为至少 0.5 或 1.0nM。已知的鼠抗体 2B7 在该试验中具有约 1600pM 的 IC₅₀。此处使用的 TF-1 增殖试验使用 7pM 的人 GM-CSF 终浓度。因此,TF-1 增殖试验中的 IC₅₀ 中和效力代表结合元件抑制由 7pM 人 GM-CSF 诱导的 TF-1 细胞增殖的能力。更详细的内容参见试验方法和材料部分。

[0023] 本发明的结合元件在 TF-1 增殖试验中具有比 -6、-7、-8、-9、-10、-10.5 或 -11 更低的 pA₂。例如,pA₂ 可以为约 -10.5 或 -11。在试验方法和材料的试验部分详细讨论 pA₂ 值的计算和含义。

[0024] 在人粒细胞形态改变试验中,本发明的结合元件通常具有不到 100pM 的 IC₅₀,如不到 50pM 或不到 30、25、20、15 或 10pM 的 IC₅₀。通常地,IC₅₀ 至少为 5、6 或 7pM。作为对照的已知鼠抗体 2B7 在该试验中具有 477pM 的 IC₅₀ 测量值的较低效力。此处使用的人粒细胞形态改变试验使用 7pM 人 GM-CSF 的终浓度。因此,人粒细胞形态改变试验中的 IC₅₀ 中和效力代表结合元件抑制由 7pM 人 GM-CSF 诱导的人粒细胞形态改变的能力。更多的细节参见试验方法和材料部分。

[0025] 在猕猴粒细胞形态改变试验中,本发明的结合元件通常具有不到 20pM 的 IC₅₀,典型地不到 10、5 或 2.5pM 的 IC₅₀。IC₅₀ 可以至少为 0.5、1 或 1.5pM。已知的鼠抗体 2B7 在该试验中测试时具有 26pM 的 IC₅₀。此处使用的猕猴粒细胞形态改变试验具有 7pM 人 GM-CSF 终浓度。因此,猕猴粒细胞形态改变试验中的 IC₅₀ 中和效力代表结合元件抑制由 7pM 人

GM-CSF 诱导的猕猴粒细胞形态改变的能力。更详细的内容参见试验方法和材料部分。

[0026] 本发明的结合元件在人和 / 或猕猴形态改变试验中具有比 -6、-7、-8、-9、-10、-10.5 或 -11 更低的 pA_2 。优选地, pA_2 为约 -10 或 -11。

[0027] 在单核细胞 TNF α 释放试验中, 本发明的结合元件通常具有不到 150pM 的 IC50, 典型地不到 110pM, 如不到 100pM。IC50 可以至少为 30 或 40pM。此处使用的单核细胞 TNF α 释放试验具有 1nM 人 GM-CSF 终浓度。因此, 单核细胞 TNF α 释放试验中的 IC50 中和效力代表结合元件抑制由 1nM 人 GM-CSF 刺激的人单核细胞 TNF α 释放的能力。更详细的内容参见试验方法和材料部分。

[0028] 在粒细胞存活试验中, 本发明的结合元件通常具有不到 1000pM 的 IC50, 典型地不到 850pM 的 IC50。IC50 可以小于 500、250、150、100、50、30、20 或 10pM。IC50 可以至少为 5pM。在该试验中, 已知的鼠抗体 2B7 直到 83nM 浓度仍为无活性的。此处使用的粒细胞存活试验具有 7pM 人 GM-CSF 终浓度。因此, 粒细胞存活试验中的 IC50 中和效力代表结合元件抑制由 7pM 人 GM-CSF 诱导的粒细胞存活的能力。更详细的内容参见试验方法和材料部分。

[0029] 在集落形成试验中, 本发明的结合元件可能具有不到 5、不到 2.5、不到 1 或不到 0.3 μ g/ml 的 IC50。优选地, IC50 为 0.25 μ g/ml 或更低, 如不到 0.1 μ g/ml。IC50 可以至少为 0.05 μ g/ml。在该试验中, 已知鼠抗体 2B7 直到 10 μ g/ml (67nM) 仍具有很低的活性 (如果有的话)。此处使用的集落形成试验使用 10ng/ml 人 GM-CSF 终浓度。因此, 集落形成试验中的 IC50 中和效力代表结合元件抑制由 10ng/ml 人 GM-CSF 诱导的集落形成的能力。更详细的内容参见试验方法和材料部分。

[0030] 本发明的结合元件可以显示出剂量依赖性地抑制具有表达人 GM-CSFR 的转基因骨髓的嵌合鼠用人 GM-CSF 处理后的脾重量增加和 / 或抑制 GM-CSF 诱导的循环单核细胞降低的能力。抑制脾重量增加的 IC50 可以不到 5、不到 2.5、不到 2、不到 1 或不到 0.75mg/kg。在一些实施方式中 IC50 可以至少为 0.5mg/kg。

[0031] 此外, 结合元件对人 GM-CSFR α 的结合动力学和亲和性可以通过表面等离子共振 (如使用 BIAcore) 测定。本发明的结合元件通常具有不到 5nM、更优选地不到 4、3、2 或 1nM 的 KD。优选地, KD 为不到 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2 或 0.15nM。

[0032] 除人 GM-CSFR α 外, 本发明的结合元件通常结合如猕猴 GM-CSFR α 的非人灵长类 GM-CSFR α 。因为人和鼠 GM-CSF 受体之间具有低同源性 (约 36%), 因此, 本发明的结合元件一般不与鼠受体结合或发生交叉反应。

[0033] 如以下更详细说明的, 通常地, 本发明的结合元件包括如完整抗体或抗体片段的抗体分子。优选地, 本发明的抗体分子为人抗体分子。

[0034] 本发明的结合元件通常包括抗体 VH 和 VL 域。结合元件的 VH 域和 VL 域也作为本发明的一部分被提供。互补决定区 (“CDR”) 和框架区 (“FR”) 在各个 VH 和 VL 域内。VH 域包括一组 HCDR, 且 VL 域包括一组 LCDR。抗体分子典型地包括包含 VH CDR1、CDR2 和 CDR3 及框架的抗体 VH 域。其可以替代地或同时包括含 VL CDR1、CDR2 和 CDR3 及框架的抗体 VL 域。VH 或 VL 域框架包括以下结构的用 CDR 间隔的四个框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4:

[0035] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0036] 根据本发明的抗体 VH 和 VL 域、FR 和 CDR 的例子列于形成本公开内容的一部分的

附加序列表中。所有此处公开的 VH 和 VL 序列、CDR 序列、CDR 组和 HCDR 组及 LCDR 组代表本发明的多个方面和实施方式。因此,本发明的一方面为根据本发明的结合元件的 VH 域。“CDR 组”包括 CDR1、CDR2 和 CDR3。因此,HCDR 组意味着 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,LCDR 组意味着 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。除非另有说明,“CDR 组”包括 HCDR 和 LCDR。本发明的结合元件典型地为单克隆抗体 (mAb)。

[0037] 如试验部分更详细地描述的,我们鉴定了结合 GM-CSFR α 的抗体分子的组 (panel)。我们也鉴定了 VH 和 VL 域的互补决定区 (CDR) 中对于受体结合和中和效力尤其重要的特定残基。因为 CDR 主要负责决定结合元件的结合和特异性,所以如本发明其它处详细内容所述,一个或多个具有此处限定的适当残基的 CDR 可以用于或引入任何适当框架 (如抗体 VH 和 / 或 VL 域框架) 或非抗体蛋白质支架 (scaffold) 内。例如,一个或多个 CDR 或抗体的 CDR 组可以被接合到框架 (如人框架) 内以提供抗体分子或不同的抗体分子。例如,抗体分子可以包括此处所公开的 CDR 和人胚系基因片段序列的框架区。抗体在可被胚系化 (germlining) 的框架内具有 CDR 组,其中,改变该框架内一个或多个残基以匹配最相似的人胚系框架内的相应位置处的残基。因此,优选抗体框架区为胚系的和 / 或人的。

[0038] 按照试验部分阐述的方法,我们进行了对于抗原识别重要的候选抗体残基的研究,然后对在生物试验中显示出比亲本抗体至少高 5 倍的效力的 160 个克隆进行了序列分析。结果表明以下位置有助于抗原结合:VL 域中的 Kabat 残基 27A、27B、27C、32、51、52、53、90、92 和 96,以及 VH 域中的 Kabat 残基 17、34、54、57、95、97、99 和 100B。在本发明的优选实施方式中,这些 Kabat 残基中的一个或多个为其序列在附加序列表中公开的编码 1、2 和 4 ~ 20 的一个或多个抗体克隆在该位置出现的 Kabat 残基。在各个不同实施方式中,该残基可以与抗体 3 中该位置出现的残基相同或不同。

[0039] 我们的分析显示在 CDR 中对受体结合有特别强的影响的 4 个残基位置:H97、H100B、L90 和 L92 (Kabat 编号)。优选地,VH CDR3 的 H97 为 S。在所有 160 个克隆中都观察到了该位置的丝氨酸残基,因此其表现为抗原识别的重要残基。

[0040] 优选地,VH CDR3 包括一个或多个以下残基:

[0041] 在 Kabat 残基 H95 处的 V、N、A 或 L,最优选 V;

[0042] 在 Kabat 残基 H99 处的 S、F、H、P、T 或 W,最优选 S;

[0043] 在 Kabat 残基 H100B 处的 A、T、P、S、V 或 H,最优选 A 或 T。

[0044] 优选地,VH CDR1 中的 Kabat 残基 H34 为 I。优选地 VH CDR2 包括 Kabat 残基 H54 处的 E 和 / 或 Kabat 残基 H57 处的 I。

[0045] 当结合元件包括抗体 VH 域时,在 VH 域框架中的 Kabat 残基 H17 优选为 S。Kabat 残基 H94 优选地为 I 或其保守置换 (如 L、V、A 或 M)。通常 H94 为 I。

[0046] 优选地,VL CDR3 包括一个或多个以下残基:

[0047] 在 Kabat 残基 L90 处的 S、T 或 M,最优选 S 或 T;

[0048] 在 Kabat 残基 L92 处的 D、E、Q、S、M 或 T,最优选 D 或 E;

[0049] 在 Kabat 残基 L96 处的 A、P、S、T、I、L、M 或 V,最优选 S、P、I 或 V,尤其是 S。

[0050] 在 VL CDR3 中的 Kabat 残基 L95A 优选为 S。

[0051] 优选地,VL CDR1 包括一个或多个以下残基:

[0052] 在 Kabat 残基 27A 处的 S;

[0053] 在 Kabat 残基 27B 处的 N；

[0054] 在 Kabat 残基 27C 处的 I；

[0055] 在 Kabat 残基 32 处的 D。

[0056] 优选地，VL CDR2 包括一个或多个以下残基：

[0057] 在 Kabat 残基 51 处的 N；

[0058] 在 Kabat 残基 52 处的 N；

[0059] 在 Kabat 残基 53 处的 K。

[0060] 在优选实施方式中，本发明的结合元件包含一个或多个选自 VH 和 VL CDR 的 CDR，即，序列表所示抗体 1、2 或 4～20 中任一个、或亲本抗体 3 的 VH CDR1、2 和 / 或 3 和 / 或 VL CDR1、2 和 / 或 3。在优选实施方式中，本发明的结合元件包含以下抗体分子中任一的 VHCDR3：抗体 1 (SEQ ID NO5)；抗体 2 (SEQ ID NO15)；抗体 3 (SEQ ID NO25)；抗体 4 (SEQ ID NO35)；抗体 5 (SEQ ID NO45)；抗体 6 (SEQ ID NO55)；抗体 7 (SEQ ID NO65)；抗体 8 (SEQ ID NO75)；抗体 9 (SEQ ID NO85)；抗体 10 (SEQ ID NO95)；抗体 11 (SEQ ID NO105)；抗体 12 (SEQ ID NO115)；抗体 13 (SEQ ID NO125)；抗体 14 (SEQ ID NO135)；抗体 15 (SEQ ID NO145)；抗体 16 (SEQ ID NO155)；抗体 17 (SEQ ID NO165)；抗体 18 (SEQ ID NO175)；抗体 19 (SEQ ID NO185)；抗体 20 (SEQ ID NO195)。优选地，所述结合元件另外包含 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：173 的 VH CDR1 和 / 或 SEQ ID NO：4 的 VH CDR2。优选地，包含 SEQ ID NO：175 的 VH CDR3 的结合元件包含 SEQ ID NO：173 的 VH CDR1，但可以替代地包含 SEQ ID NO：3 的 VH CDR1。

[0061] 优选地，所述结合元件包括以下抗体之一的一组 VH CDR：抗体 1 (SEQ ID 3～5)；抗体 2 (SEQ ID 13～15)；抗体 3 (SEQ ID 23～25)；抗体 4 (SEQ ID 33～35)；抗体 5 (SEQ ID 43～45)；抗体 6 (SEQ ID 53～55)；抗体 7 (SEQ ID 63～65)；抗体 8 (SEQ ID 73～75)；抗体 9 (SEQ ID 83～85)；抗体 10 (SEQ ID 93～95)；抗体 11 (SEQ ID 103～105)；抗体 12 (SEQ ID 113～115)；抗体 13 (SEQ ID 123～125)；抗体 14 (SEQ ID 133～135)；抗体 15 (SEQ ID 143～145)；抗体 16 (SEQ ID 153～155)；抗体 17 (SEQ ID 163～165)；抗体 18 (SEQ ID 173～175)；抗体 19 (SEQ ID 183～185)；抗体 20 (SEQ ID 193～195)。任选地，其也可以包括这些抗体之一的一组 VL CDR，并且所述 VL CDR 可以来自与 VH CDR 相同或不同的抗体。尽管在一些实施方式中，单独的 VH 或 VL 域可以被用于结合抗体，但是一般地，VH 域与 VL 域配对以提供抗体抗原结合位点。在本领域中轻链广宿 (promiscuity) 已被很好确立，因此 VH 和 VL 域不必源自如此处所公开的相同的克隆。

[0062] 结合元件可以包含在公开的 H 和 / 或 L CDR 组内具有一个或多个、例如 10 个或更少、如 1、2、3、4 或 5 个取代的抗体 1～20 任一的一组 H 和 / 或 L CDR。优选的取代在 VL 域中的 Kabat 残基 27A、27B、27C、32、51、52、53、90、92 和 96 以及 VH 域中的 Kabat 残基 34、54、57、95、97、99 和 100B 以外的 Kabat 残基处。当在这些位置进行取代时，取代优选为在此处表明为该位置的优选残基的残基取代。

[0063] 在优选实施方式中，本发明的结合元件为具有包含人源胚系框架（如来自重链 VH1 或 VH3 家族的人胚系框架）中的一组 HCDR 的 VH 域的分离的人抗体分子。在优选实施方式中，该分离的人抗体分子具有包含人胚系框架 VH1DP5 或 VH3DP47 中的一组 HCDR 的 VH 域。因此，VH 域框架区可以包括人胚系基因片段 VH1DP5 或 VH3DP47 的框架区。VH FR1 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO：251。VH FR2 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO：252。VH FR3

的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :253。VH FR4 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :254。

[0064] 通常地,该结合元件也具有包含优选人胚系框架(如来自轻链 V λ 1 或 V λ 6 家族的人胚系框架)中的一组 LCDR 的 VL 域。在优选实施方式中,该分离的人抗体分子具有包含人胚系框架 V λ 1DPL8 或 V λ 1DPL3 或 V λ 6_{6a} 中的一组 LCDR 的 VL 域。因此,VL 域框架可以包含人胚系基因片段 V λ 1DPL8、V λ 1DPL3 或 V λ 6_{6a} 的框架区。VL 域 FR4 可以包括人胚系基因片段 JL2 的框架区。VL FR1 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :255。VL FR2 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :256。VL FR3 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :257。VL FR4 的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO :258。

[0065] 与胚系化(germlined)抗体相比,非胚系化抗体具有相同的 CDR,但具有不同的框架。

[0066] 本发明的结合元件可以与任何此处公开的任一结合元件(如抗体 3 或抗体 1、2 或 4 ~ 20 中任一种)竞争结合 GM-CSFR α 。因此,结合元件可以与包含抗体 1、2 或 4 ~ 20 中任一的 VH 域和 VL 域的抗体分子竞争结合 GM-CSFR α 。结合元件之间的竞争可以在体外方便地分析,例如通过将可以在一种或多种其它未标记结合元件存在时被检测的示踪分子(reporter molecular)标记到一种结合元件上,从而使能够鉴别与相同表位或重叠表位结合的结合元件。

[0067] 可以例如使用 ELISA 测定竞争,其中如 GM-CSFR α 的细胞外域或该细胞外域的肽被固定于板上、并且第一标记的结合元件与一种或多种未标记的结合元件一起被加入到板中。通过标记的结合元件发射的信号降低观察与标记的结合元件竞争的未标记结合元件的存在。类似地,表面等离子共振试验可以被用于测定结合元件之间的竞争。

[0068] 在竞争检测中,可以使用抗原的肽片段,尤其是包括或主要由表位或目标结合区组成的肽。可以使用具有在任一端加上一个或多个氨基酸的表位或靶序列的肽。可以使得根据本发明的结合元件与抗原的结合被具有或包括给定序列的肽抑制。

[0069] 例如,结合肽的结合元件可以通过用所述肽筛选(panning)从噬菌体呈现文库中分离。

[0070] 本发明也提供了上述结合元件在竞争试验中测量抗原水平的应用,也就是说,通过在竞争试验中使用本发明提供的结合元件测量样品中的抗原水平的方法。这可以是不需要对结合的和未结合的抗原进行物理分离的情况。示踪分子与结合元件连接使得结合时发生物理或光学变化,这是一种可能性。示踪分子可以直接或间接产生可检测的、优选可测量的信号。示踪分子的连接可以为直接或间接的、共价(如通过肽键的)或非共价的。通过肽键的连接可以是编码抗体和示踪分子的基因融合进行重组表达的结果。

[0071] 本发明也提供通过在例如生物传感器系统中使用根据本发明的结合元件直接测量抗原水平的方法。

[0072] 本发明提供一种包括引起或使得此处提供的结合元件与 GM-CSFR α 结合的方法。这种结合可以在体内发生,例如在施用结合元件或编码结合元件的核酸后,或者其可以在体外发生,例如在 ELISA、蛋白质印迹、免疫细胞化学、免疫沉淀、亲和层析或如 TF-1 试验的基于细胞的试验中。

[0073] 可以测定结合元件与 GM-CSFR α 结合的量。定量可能与测试样品中的抗原的量相关,其可能具有诊断或预后的意义。

[0074] 包含根据本发明的任何方面或实施方式的结合元件或抗体分子的试剂盒也作为本发明的一个方面。在本发明的试剂盒中,结合元件或抗体分子可以被标记以使其在样品中的反应性能够被测定,如下面进一步所述的。试剂盒的组分通常是无菌的,并置于密封小瓶或其它容器内。可以在诊断分析或抗体分子可以使用的其它方法中使用试剂盒。试剂盒可以含有在某一方法(如根据本发明的方法)中使用该组分的说明书。本发明的试剂盒中可以包括参与该方法或使得该方法能够进行的辅助物质。

[0075] 可以通过任何适当的手段测定样品中抗体的反应性。放射免疫试验(RIA)为一种可能。放射标记的抗原与未标记抗原(测试样品)混合,并且使其结合抗体。结合的抗原与未结合的抗原被物理分离,并且测定与抗体结合的放射抗原的量。测试样品中抗原越多,则越少的放射抗原结合到抗体上。通过使用与示踪分子连接的抗原或类似物,竞争结合试验也可以利用非放射抗原进行。示踪分子可以为具有光谱分离的吸收或发射特征的荧光染料、磷光体或激光染料。适合的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白、和德克萨斯红(Texas Red)。适合的显色染料包括二氨基联苯胺。其它示踪物包括大分子胶体颗粒或如有色、磁性或顺磁性的乳胶珠的颗粒物质、以及可以直接或间接产生可以视觉观察、电检测或以其它方式记录的可检测信号的生物或化学活性物质。例如,这些分子可以为催化生色或变色或引起电学性质变化的反应的酶。它们可以是可分子激发的,从而能态之间的电子跃迁导致特征光谱吸收或发射。它们可以包括与生物传感器联合使用的化学体。可以使用生物素/亲和素或生物素/抗生蛋白链菌素和碱性磷酸酶检测系统。

[0076] 由个别的抗体-示踪物偶联物产生的信号可以用于得出样品(正常和测试)中相关抗体结合的可计量的绝对或相对数据。

[0077] 在本发明的另一方面中,本发明提供了包括编码根据本发明的结合元件、VH域和/或VL域的序列的分离的核酸。该核酸可以包括DNA和/或RNA,并且可以全部或部分合成。如此处所述的核苷酸序列所指包括具有特定序列的DNA分子,并且包括具有其中,除非上下文特别要求外,以U代替T的特定序列的RNA分子。在优选的方面中,本发明提供了编码如此处限定的本发明的CDR或CDR组或VH域或VL域或抗体抗原结合位点或抗体分子(如scFv或IgG1或IgG4)的核酸。本发明也提供包括至少一种上述多核苷酸的质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体。

[0078] 本发明的再一方面为用本发明的核酸转化的或含有本发明的核酸的宿主细胞。该宿主细胞可以为体外的、并且可以为培养中的。该宿主细胞可以为体内的。所述宿主细胞在体内的存在可以使得本发明的结合元件作为“内抗体”(intrabodies)或细胞内抗体进行细胞内表达。内抗体可以被用于基因治疗。

[0079] 本发明的再另一方面提供包括将所述核酸引入宿主细胞的方法。引入可以使用任何可用的技术。对于真核细胞,适合的技术可能包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录酶病毒或其它病毒(如牛痘病毒或对于昆虫细胞的杆状病毒)的转导。在宿主细胞、尤其真核细胞中引入核酸可以使用基于病毒或质粒的系统。质粒系统可以保持为游离基因,或者可以整合到宿主细胞或人工染色体。整合可以是在单个或多个位点随机或靶向整合一个或多个复本。对于细菌细胞,适合的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。

[0080] 引入后可以引发或使得核酸进行表达,例如通过在该基因表达的条件下培养宿主

细胞。

[0081] 在一个实施方式中,本发明的核酸被整合到宿主细胞的基因组(如染色体)中。可以根据标准技术通过包含促进基因组重组的序列来促进整合。

[0082] 本发明也提供在表达系统中使用上述构建体以表达上述结合元件或多肽的方法。因此,制备本发明的结合元件、VH 域和 / 或 VL 域的方法为本发明的再一方面。方法可以包括在导致所述结合元件、VH 域和 / 或 VL 域产生的条件下表达所述核酸、并进行回收。该方法可以包括在产生所述结合元件或抗体域的条件下培养宿主细胞。

[0083] 制备方法可以包括分离和 / 或纯化产物的步骤。制备方法可以包括将产品配制为包括如药学可接受的赋形剂的至少一种附加组分的组合物。

[0084] 在各种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适合的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统以及转基因植物和动物。抗体和抗体片段在原核细胞中的表达已在本领域中被很好地建立 [3]。通用的优选细菌宿主为大肠杆菌 (*E. coli*)。

[0085] 在培养的真核细胞进行表达也可被本领域普通技术人员用作产生结合元件的可选方案 [4、5、6]。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、HeLa 细胞、幼地鼠肾细胞、NS0 小鼠黑色素瘤细胞、YB2/0 大鼠骨髓瘤细胞、人胚肾细胞、人胚视网膜细胞以及许多其它细胞。

[0086] 适合的载体可以经选择或构建为包含适当的调控序列,包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸序列、增强子序列、标记基因和其它适当的序列。载体可以为适当的质粒(如噬粒)或病毒(如噬菌体) [7]。例如, Ausubel 等 [8] 详细描述了在例如核酸构建体制备、基因诱变、测序、DNA 引入细胞和基因表达、以及蛋白质分析中的许多核酸操作的已知技术和方案。

[0087] 本发明提供了获得一个或多个能够结合抗原的结合元件的方法,该方法包括使根据本发明的结合元件的库与所述抗原接触,以及选择所述库中一个或多个能够结合所述抗原的结合元件。

[0088] 所述库可以在颗粒或分子复合物,例如可复制的遗传包 (genetic package) (如酵母、细菌或如 T7 噬菌体颗粒) 上呈现,或在共价的、核糖体或其它体外呈现系统上呈现,各个颗粒或分子复合物包含编码在其上呈现的抗体 VH 可变域的核酸,并且任选地也包含呈现的 VL 域(如果存在)。在选择能够结合抗原并且在噬菌体或其它文库颗粒或者分子复合物上呈现的结合元件后,可以从呈现所述挑选的结合元件的噬菌体或其它颗粒或分子复合物获取核酸。这种核酸可以通过表达具有从呈现所述挑选的结合元件的噬菌体或其它颗粒或分子复合物获取的核酸序列的核酸而被用于随后的结合元件或抗体 VH 或 VL 可变域的制备。

[0089] 具有所述选择的结合元件的抗体 VH 可变域氨基酸序列的抗体 VH 可变域可以以独立形式产生,也可以是包含该 VH 域的结合元件的形式。

[0090] 具有所述选择的结合元件的抗体 VL 可变域氨基酸序列的抗体 VL 可变域可以以独立形式产生,也可以是包含该 VL 域的结合元件的形式。

[0091] 结合 GM-CSFR α 的能力可以进一步测试,与抗体 1 ~ 20 (如 scFv 形式和 / 或 IgG 形式,如 IgG1 或 IgG4) 中任一竞争结合 GM-CSFR α 的能力也可以被进一步测试。中和

GM-CSFR α 的能力可以被测试。

[0092] 包括具有此处所列氨基酸序列的本发明的 VH 和 VL 域以及 CDR 的突变体可以通过序列变换或突变以及筛选的方法获得,且可以用于 GM-CSFR α 的结合元件中。随着在多变量数据分析技术应用于结构 / 特性 - 活性关系中计算机化学的引导 [9], 可以使用如统计回归、模式识别和分类的公知数学技术推导抗体的定量活性 - 性质关系 [10、11、12、13、14、15]。可以从抗体序列、功能和三维结构的经验和理论模型 (例如, 可能的接触残基或计算的理化性质的分析) 推知抗体的性质, 并且这些性质可以被单独或组合地考虑。

[0093] 包括 VH 域和 VL 域的抗体抗原结合位点由六个多肽环形成: 三个来自轻链可变域 (VL)、三个来自重链可变域 (VH)。已知原子结构的抗体的分析已经阐明了序列和抗体结合部位的三维结构之间的关系 [16、17]。这些关系暗示, 除了 VH 域的第三区 (环) 之外, 结合位点环具有少数主链构象之一: 正则结构。在特定环内形成的正则结构已表明是通过其大小和特定残基在环和框架区两者内的关键位点处的存在来确定 [16、17]。

[0094] 该序列 - 结构关系的研究可以被用于预测已知序列、但未知三维结构的抗体中那些对于维持其 CDR 环的三维结构重要的、进而维持结合的残基。这些预测可以得到所述预测与先导物优化试验的结果之间的对比的支持。在结构方法中, 可以使用任何免费获得或者市售的包 (如 WAM) [19] 建立抗体分子模型 [18]。然后, 可以使用如 Insight II (Accelrys, Inc.) 或 Deep View [20] 的蛋白可视化和分析软件包估计 CDR 中各个位置可能的取代。然后, 该信息可以被用于进行很可能对活性有最小或有益影响的取代。

[0095] 进行 CDR、抗体 VH 或 VL 域以及结合元件的氨基酸序列中的取代所需的技术通常是在本领域获得的。变异体序列可以利用可能或不能被预测对活性有最小的或有益的影响的取代产生, 并且可以对其结合和 / 或中和 GM-CSFR α 的能力和 / 或任何其它所需性质进行测试。

[0096] 如上所述, 根据本发明, 可以使用其序列在此处特别公开的任何 VH 和 VL 域的可变域氨基酸序列变异体。特定变异体可以包括一个或多个氨基酸序列变换 (氨基酸残基的添加、缺失、取代和 / 或插入), 可以为少于约 20 个变换、少于约 15 个变换、少于约 10 个变换或少于约 5 个变换, 可能是 5、4、3、2 或 1 个。可以在各个或多个框架区和 / 或一个或多个 CDR 中进行变换。

[0097] 优选地, 变换不导致功能丧失, 从而包含这样变换的氨基酸序列的结合元件优选地保留结合和 / 或中和 GM-CSFR α 的能力。更优选地, 例如, 如此处所述试验中所测得的, 其保留与其中未进行变换的结合元件一样的定量结合和 / 或中和能力。最优选地, 例如, 如此处所述试验中所测得的, 与其中未进行变换的结合元件相比, 包含这样变换的氨基酸序列的结合元件具有改善的结合或中和 GM-CSFR α 的能力。

[0098] 变换可以包括用非天然形成的或非标准的氨基酸替代一个或多个氨基酸残基、将一个或多个氨基酸残基修饰为非天然形成或非标准的形式、或者在序列中插入一个或多个非天然形成或非标准的氨基酸。本发明的序列中变换的优选数目和位置在其它处进行描述。天然形成的氨基酸包括由其标准单字母编码标明为 G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E 的 20 种“标准”L 氨基酸。非标准氨基酸包括可以被整合到多肽骨架之中或由修饰已存在的氨基酸残基所得的任何其它残基。非标准氨基酸可为天然形成的或非天然形成的。几种天然形成的非标准氨基酸在本领域中是已知的, 如 4- 羟基脯氨酸、5- 羟基

赖氨酸、3-甲基组氨酸、N-乙基丝氨酸等 [21]。那些在其 N- α 位置处衍生的氨基酸残基仅位于氨基酸序列的 N 末端。一般地,在本发明中,氨基酸为 L 氨基酸,但是在一些实施方式中,其可以为 D-氨基酸。因而,变换可以包括将 L-氨基酸改变为 D-氨基酸、或用 D-氨基酸取代 L-氨基酸。氨基酸的甲基化、乙酰化和 / 或磷酸化形式也是已知的,并且在本发明中的氨基酸可以进行这样的修饰。

[0099] 本发明的抗体域和结合元件中的氨基酸序列可以包括上述非天然或非标准氨基酸。在一些实施方式中,非标准氨基酸(如 D-氨基酸)可以在合成过程中并入氨基酸序列中,而在其它实施方式中,可以在氨基酸序列合成后通过修饰或取代“原始”标准氨基酸引入非标准氨基酸。

[0100] 非标准和 / 或非天然形成的氨基酸的使用增加结构和功能多样性,并且,因此能够增加实现本发明的结合元件所需的 GM-CSFR α 结合和中和性质的可能。此外,由于在给予动物后具 L-氨基酸的多肽的体内降解,与标准 L-氨基酸相比, D-氨基酸和类似物已显示具有更好的药物动力学性质。

[0101] 如上所述,基本如此处所述的 CDR 氨基酸序列优选地作为 CDR 被负载在人抗体可变域或其部分中。基本如此处所述的 HCDR3 序列代表本发明的优选实施方式,并且优选其中各个作为 HCDR3 被负载在人重链可变域或其部分中。

[0102] 本发明中使用的可变域可以从任何胚系或重排的人可变域获得或来源于此,或者可以为基于已知人可变域的通用或真实序列的合成可变域。使用重组 DNA 技术,本发明的 CDR 序列(如 CDR3)可以被引入缺少 CDR(如 CDR3)的可变域的组成集合(repertoire)中。

[0103] 例如, Marks 等 (1992) [22] 描述了产生抗体可变域组成集合的方法,其中定位于可变域区的 5' 末端处或与其邻近的通用引物与人 VH 基因的第三框架区的通用引物联合使用,从而提供缺少 CDR3 的 VH 可变域的组成集合。Marks 等进一步描述了该组成集合如何能与特定抗体的 CDR3 组合。使用类似技术,本发明的 CDR3 源序列可以与缺少 CDR3 的 VH 或 VL 域组成集合混合,并且该混合的完整 VH 或 VL 域与同源 VL 或 VH 域组合,从而提供本发明的结合元件。然后,该组成集合可以在如 W092/01047 中的噬菌体呈现系统或后面的参考文献的大部分(包括参考文献 [23])中的任一种的合适的宿主系统中呈现,从而可以选择适当的结合元件。组成集合可以由来自 10^4 以上个体成员(例如 10^6 至 10^8 或 10^{10} 中成员)的任何部分组成。其它适合的宿主系统包括酵母呈现、细菌呈现、T7 呈现、病毒呈现、细胞呈现、核糖体呈现和共价呈现。类似的混合或组合技术也被 Stemmer (1994) [24] 公开,其除观察该技术可以被用于抗体的产生外,还描述了与 β -内酰胺酶基因相关的技术。

[0104] 进一步的替代方式为利用一个或多个选择的 VH 和 / 或 VL 基因的随机突变以在全可变域中产生突变,从而产生携带本发明的 CDR 源序列的新 VH 或 VL 区域。Gram 等 (1992) [25] 描述了这种技术,其使用了易错 PCR(error-prone PCR)。在优选实施方式中,在一组 HCDR 和 / 或 LCDR 内进行一个或两个氨基酸取代。另一可使用的方法是对 VH 或 VL 基因的 CDR 区域的引导基因突变。

[0105] 本发明的再一方面提供了获得 GM-CSFR α 抗原的抗体抗原结合位点的方法,该方法包括通过在此处所述的 VH 域氨基酸序列中一个或多个氨基酸的添加、缺失、取代或插入从而提供作为 VH 域的氨基酸序列变异体的 VH 域,任选地将如此获得的 VH 域与一种或多种 VL 域结合,以及测试 VH 域或 VH/VL 的组合或多个组合以鉴别任选地具有一种或多种优选

性质（优选中和 GM-CSFR α 活性的能力）的 GM-CSFR α 抗原的结合元件或抗体抗原结合位点。所述 VL 域可具有基本为如此处所述的氨基酸序列。

[0106] 可以使用其中一个或多个此处公开的 VL 域的序列变异体与一个或多个 VH 域组合的类似方法。

[0107] 本发明的再一方面提供了制备 GM-CSFR α 抗原结合元件的方法，该方法包括：

[0108] (a) 提供对包括待取代的 CDR3 或缺少 CDR3 编码区的 VH 域进行编码的核酸的起始组成集合；

[0109] (b) 组合所述组成集合和编码基本如此处所述的 VH CDR3 氨基酸序列的供体核酸，从而所述供体核酸被插入所述组成集合的 CDR3 区以提供编码 VH 域的核酸的产物组成集合；

[0110] (c) 表达具有所述产物组成集合的核酸；

[0111] (d) 选择 GM-CSFR α 结合元件；以及

[0112] (e) 回收所述结合元件或编码所述结合元件的核酸。

[0113] 同样，可以使用其中本发明的 VL CDR3 与编码包括待取代 CDR3 或缺少 CDR3 编码区的 VL 域的核酸组合的类似方法。

[0114] 类似地，一种或多种、或者所有三种 CDR 可以被接合到随后被用于筛选 GM-CSFR α 的结合元件或多种结合元件的 VH 或 VL 域的组成集合中。

[0115] 在优选实施方式中，可以使用一种或多种 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，如抗体 1 (SEQ ID NOS :3 ~ 5)；抗体 2 (SEQ ID NOS :13 ~ 15)；抗体 4 (SEQ ID NOS :33 ~ 35)；抗体 5 (SEQ ID NOS :43 ~ 45)；抗体 6 (SEQ ID NOS :53 ~ 55)；抗体 7 (SEQ ID NOS :63 ~ 65)；抗体 8 (SEQ ID NOS :73 ~ 75)；抗体 9 (SEQ ID NOS :83 ~ 85)；抗体 10 (SEQ ID NOS :93 ~ 95)；抗体 11 (SEQ ID NOS :103 ~ 105)；抗体 12 (SEQ ID NOS :113 ~ 115)；抗体 13 (SEQ ID NOS :123 ~ 125)；抗体 14 (SEQ ID NOS :133 ~ 135)；抗体 15 (SEQ ID NOS :143 ~ 145)；抗体 16 (SEQ ID NOS :153 ~ 155)；抗体 17 (SEQ ID NOS :163 ~ 165)；抗体 18 (SEQ ID NOS :173 ~ 175)；抗体 19 (SEQ ID NOS :183 ~ 185) 或抗体 20 (SEQ ID NOS :193 ~ 195)；或者任选地抗体 3 (SEQ ID NOS :23 ~ 25) 的一组 HCDR，和 / 或可以使用一种或多种 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，如抗体 1 (SEQ ID NOS :8 ~ 10)；抗体 2 (SEQ ID NOS :18 ~ 20)；抗体 4 (SEQ ID NOS :38 ~ 40)；抗体 5 (SEQ ID NOS :48 ~ 50)；抗体 6 (SEQ ID NOS :58 ~ 60)；抗体 7 (SEQ ID NOS :68 ~ 70)；抗体 8 (SEQ ID NOS :78 ~ 80)；抗体 9 (SEQ ID NOS :88 ~ 90)；抗体 10 (SEQ ID NOS :98 ~ 100)；抗体 11 (SEQ ID NOS :108 ~ 110)；抗体 12 (SEQ ID NOS :118 ~ 120)；抗体 13 (SEQ ID NOS :128 ~ 130)；抗体 14 (SEQ ID NOS :138 ~ 140)；抗体 15 (SEQ ID NOS :148 ~ 150)；抗体 16 (SEQ ID NOS :158 ~ 160)；抗体 17 (SEQ ID NOS :168 ~ 170)；抗体 18 (SEQ ID NOS :178 ~ 180)；抗体 19 (SEQ ID NOS :188 ~ 190) 或抗体 20 (SEQ ID NOS :198 ~ 200)；或者任选地抗体 3 (SEQ ID NOS :28 ~ 30) 的一组 LCDR。

[0116] 免疫球蛋白可变域的主要部分包括至少三个 CDR 区以及其居间框架区。优选地，所述部分也包括至少约 50% 的第一和第四框架区之一或两者，该 50% 为第一框架区的 C- 末端 50% 和第四框架区的 N- 末端 50%。可变域主要部分的 N- 末端或 C- 末端的附加残基可以为那些通常不与天然形成的可变域区相关的残基。例如，通过重组 DNA 技术进行本发明结合元件的构建可以导致引入由促进克隆或其它操作步骤的连接子所编码的 N- 或

C-末端残基。其它操控步骤包括引入连接子以连接本发明的可变域和另外的蛋白序列,其包括抗体恒定区、其它可变域(例如在双体(diabody)的制备中)或如本发明的其它处的更详细内容所述的可检测的/功能性的标记。

[0117] 尽管在本发明的优选方面中,优选的是包括一对 VH 和 VL 域的结合元件,但是基于 VH 或 VL 域序列的单结合域形成本发明的另一方面。已知单免疫球蛋白域、尤其 VH 域能够结合靶抗原。例如,参见本发明其它处的关于 dAb 的讨论。

[0118] 当为单结合域之一时,这些域可以被用于筛选能够形成可结合 GM-CSFR α 的双域结合元件的互补域。这可以通过使用如 W092/01047 中所公开的所谓等级双重组合方法(hierarchical dualcombinatorial approach)的噬菌体呈现筛选方法实现,其中含 H 或 L 链克隆的单独集落被用于感染编码另一链(L 或 H)的克隆的完整库,并且根据噬菌体呈现技术(如该参考文献和参考文献 [22] 所描述的噬菌体呈现技术)对所得双链结合元件进行选择。

[0119] 本发明的再一方面提供了含本发明的结合元件和至少一种额外组分的组合物,例如包括结合元件和药物上可接受的赋形剂的组合物。该组合物可以在抑制或中和 GM-CSFR α 的方法(包括通过治疗处理人或动物体的方法)中使用。

[0120] 本发明提供包括抗 GM-CSFR α 抗体分子的异质制剂。例如,该制剂可以为具有全长重链和缺少 C 末端赖氨酸的重链、具有不同程度糖基化和/或具有衍生氨基酸(如 N-末端谷氨酸环化以形成焦谷氨酸残基)的抗体的混合物。

[0121] 本发明的多个方面包括治疗方法(该方法包括给予所提供的结合元件)、包含该结合元件的药物组合物、和该结合元件在制备药物中的应用,如在包括将所述几何元件和药物可接受的赋形剂进行配制的制备药物或药物组合物的方法中的应用。

[0122] 抗 -GM-CSFR α 治疗可以口服(如纳米抗体(nanobody))、通过注射(例如,皮下、静脉内、动脉内、关节内、腹膜内或肌肉内)、通过吸入、通过泡内途径(如膀胱内的灌输)、或局部(如眼内、鼻内、直肠、伤口内或皮肤上)进行。该治疗可以通过脉冲输入(pulse infusion)实施,特别是以结合元件的递减剂量。给药途径可以根据治疗的理化特性、对疾病的特殊考虑、或者使功效最优或使副作用最小的需要决定。可以设想抗 GM-CSFR α 治疗将不限于临床应用。因此,使用无针设备的皮下注射也是优选的。

[0123] 根据需要治疗的状态,组合物可以单独或者与其它治疗组合(同时或顺序地)给予。组合治疗、尤其抗 -GM-CSFR α 结合元件与一种或多种其它药物的组合可以用于提供显著的协同效应。根据本发明的结合元件可以与以下物质中的一种或多种进行组合或作为它们的附加被提供: NSAID(例如,如塞来昔布的环氧合酶抑制剂和其它类似的 cox2 抑制剂)、皮质甾醇(如强的松)和缓解疾病的抗风湿药(DMARD)如修美乐(Humira)(阿达木单抗(adalimumab))、氨甲蝶呤、来氟米特(Arava)、依那西普(Enbrel)(依坦西普(Etanercept))、类克(Remicade)(英利昔单抗(Infliximab))、Kineret(阿那白滞素(Anakinra))、美罗华(Rituxan)(利妥昔单抗(Rituximab))、Orencia(阿巴他塞(abatacept))、氯金酸钠(gold salt)、抗疟药、柳氮磺胺吡啶(Ssulfasalazine)、D-青霉胺、环孢菌素 A、双氯芬酸、环磷酸胺和咪唑硫嘌呤。

[0124] 根据本发明,提供的组合物可以施用于个体。优选以“治疗有效量”施用,该量足以对病人显示有利效果。这种有利效果可以为至少一种症状的至少改善。给药的量

给药的速度和时间过程取决于治疗对象的状态和严重程度。治疗的处方,如决定剂量等,为一般执业医师和其它医生的责任范围,并且可能取决于症状的严重性和/或被治疗疾病的进展。抗体的适当剂量为本领域公知的 [28、29]。可以使用此处表明的或如“Physician’s Desk Reference”(2003) 所示的对于被给予药物的类型所适合的特定剂量。本发明的结合元件的治疗有效量或适当量可以通过对比其体外活性和在动物模型中的体内活性确定。将小鼠和其它测试动物中的有效剂量外推到人的方法是已知的。精准剂量取决于多个因素,包括抗体是用于诊断还是用于治疗、治疗部位的大小和位置、抗体的精确性质(如全抗体、片段或双体)、以及任何可检测标记或其它与抗体连接的分子的性质。典型的抗体剂量对于全身施用在 $100\ \mu\text{g} \sim 1\text{g}$ 的范围内、对于局部施用在 $1\ \mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ 的范围内。典型地,抗体为全抗体,优选 IgG1、IgG2 或更优选 IgG4。这是对成年患者单次治疗的剂量,其对于儿童和婴儿可以适当调整,并且对于其它抗体形式也可以按分子量成比例地调整。治疗可以按照医生的判断以每日、一周两次、每周或每月的间隔重复。在本发明的优选实施方式中,治疗为周期性的,并且给药之间的期间约为两周或更长、优选约 3 周或更长、更优选约 4 周或更长、或约每月一次。在本发明的其它优选实施方式中,可以在手术之前和/或之后给予治疗,并且更优选地,可以在手术治疗的切开位置直接给予或施用。

[0125] 本发明的结合元件通常以药物组合物的形式被给予,该药物组合物可以包括至少一种结合元件以外的组分。因此,根据本发明的药物组合物以及用于本发明的应用的药物组合物除活性组分外还可以包括药物可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其它本领域普通技术人员公知的物质。该物质应为无毒的,并且不应干扰活性组分的效力。载体或其它物质的准确性质取决于给药途径,其可以为口服、或者通过如静脉内的注射。口服给药的药物组合物可以为片剂、胶囊、粉末、液体或半固体形式。片剂可以包括如凝胶或佐剂的固体载体。液体药物组合物通常包括如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油的液体载体。可以包括生理盐水、葡萄糖或其它糖类溶液或如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇的二醇类。对于静脉注射或病痛处的注射,活性组分为无热原并具有适当 pH 值、等渗性和稳定性的肠道外可接受的水溶液形式。例如,本领域相关技术人员能够使用如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸化林格氏注射液的等渗载体制备适当的溶液。可以根据需要包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。本发明的结合元件可以根据分子的理化性质和递送途径配制成液体、半固体或固体形式。制剂可以包括赋形剂或赋形剂的组合,例如:糖、氨基酸和表面活性剂。液体制剂可以包括宽范围的抗体浓度和 pH。例如,固体制剂可以通过冷冻干燥、喷雾干燥或通过超临界流体技术的干燥进行制备。抗-GM-CSFR α 的制剂取决于预定的递送途径:例如,用于肺部递送的制剂可以由具有确保在吸入时渗透到深肺部的物理性质的颗粒组成;局部制剂可以包括延长药物在作用部位滞留的时间的粘性改性剂。在特定实施方式中,结合元件可以采用防止结合元件快速释放的载体进行制备,例如包括植入物、透皮贴片和微胶囊化递送系统的控释制剂。如乙烯醋酸乙烯酯、多聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸的生物可降解、生物相容的聚合物可以被使用。制备该制剂的许多方法对于本领域普通技术人员是已知的。例如参见 Robinson, 1978[30]。

[0126] 根据本发明的结合元件可以在人或动物体的治疗或诊断方法中使用,如在治疗人类患者的疾病或病症(其可以包括预防治疗)的方法中,包括给予所述患者有效剂量的本发明的结合元件。根据本发明的可治疗的状态包括其中 GM-CSFR α 起作用的任何疾病。公

开的技术文件显示了 GM-CSF 在总结如下的许多疾病中的作用。由于 GM-CSF 特异性结合 GM-CSFR α ,因此 GM-CSF 的病理和 / 或症状效应可以通过抑制 GM-CSF 与 GM-CSFR α 的结合被抵消。因此,除此处在试验部分所描述的抗体分子呈现的体内和体外药理学数据外,公开出版的证据显示本发明的结合元件可以在治疗如风湿性关节炎、哮喘、过敏反应、多发性硬化、髓系白血病和动脉硬化的自体免疫和 / 或炎性状态、疾病和病症中应用。关于这些状态的公开出版的证据总结如下:

[0127] 哮喘和过敏反应

[0128] 支气管哮喘是一种肺的常见的持久的炎性病症,特征为气道高反应性、粘液过量产生、纤维变性和升高的 IgE 水平。气道高反应性 (AHR) 为气道对非特异性刺激的过度收缩。AHR 和粘液过量产生两者被认为是造成导致哮喘发作 (恶化) 的呼吸短促特征的可变气道阻塞的原因,并且是造成与该疾病相关的死亡 (在英国每年约 2000 例死亡) 的原因。

[0129] 最近的研究已经证明在哮喘中 GM-CSF 及其受体在蛋白质和 mRNA 水平上都是上调的。此外,表达水平与疾病的严重程度相互关联。与非哮喘对象相比时,哮喘患者的支气管肺泡灌洗 (BAL) 液、BAL 细胞、唾液、支气管上皮细胞和抗原刺激的外周血单核细胞中已测到 GM-CSF 产生增加 [31、32]。此外,在过敏原激发后 GM-CSF 的气道表达水平显示出与组织嗜酸性细胞增多的水平和延期哮喘反应的严重程度相关 [33]。随后的研究将上调的 GM-CSFR 表达与内源性或非变应性哮喘关联,将表达水平与非功能数据关联 [34]。在小鼠卵清蛋白致敏和激发模型中,在卵清蛋白激发前通过鼻内给药产生的以羊多克隆抗体对 GM-CSF 活性的中和防止了气道高反应性并同时减少了气道内嗜酸性细胞的浸润和粘液分泌 [35]。类似地,在通过鼻内给予柴油机废气颗粒引发的小鼠过敏性鼻炎疾病模型中,再次通过鼻内给予羊多克隆抗体中和 GM-CSF 防止了对乙酰甲胆碱的气道高反应性、降低了 BAL 嗜酸性细胞计数并且也减少粘液产生杯形细胞在气道上皮上的表达 [36]。

[0130] GM-CSF 在过敏反应中的作用进一步在鼠诱导耐受模型中研究。暴露于每日反复剂量的雾状卵清蛋白而不进行预先致敏的小鼠形成对卵清蛋白的耐受并且不会引起气道的嗜酸性细胞炎症。GM-CSF 通过腺病毒构建体在肺中表达改变了这些动物的反应,并且促进嗜酸性细胞流入 BAL 中、表型过敏组织学的产生和相关杯状细胞增生。该典型 Th2 反应的产生通过 IL-5 的血清和 BAL 浓度的增加和血清 IL-4 的增加进一步得到证实。在采用 MHC II KO 小鼠的该模型中进行进一步研究显示 GM-CSF 调节气道中抗原呈递细胞和 T 细胞之间的相互作用,从而促进 T 细胞介导的对卵清蛋白的反应 [37]。值得注意的是,GM-CSF 作为 Th2 反应的有效活化剂的活性也可以在缺少 IL-3 和 / 或 IL-4 的小鼠中被证实,说明 GM-CSF 活性的中和提供了完全不同于这些细胞因子的活性的可选择的治疗途径。

[0131] 在另一鼠模型中已进行了类似的观察,其中鼻内反复暴露于豚草导致再暴露于抗原时的 Th2 型致敏和轻微气道炎症 [38]。抗 GM-CSF 抗体与豚草联合给予减少了 Th2 相关的细胞因子产生,大概是通过内源 GM-CSF 的抑制。相反,向通过多次共同施用重组 GM-CSF 或单次递送携带 GM-CSF 转基因的腺病毒载体向富有 GM-CSF 的气道微环境递送豚草导致显著增强的嗜酸性细胞气道炎症和豚草特异性的 Th2 记忆性反应。

[0132] 风湿性关节炎 (RA)

[0133] RA 为影响到工业化世界中约 1% 人口的慢性炎症和破坏性关节疾病。RA 的特征为滑膜的增生和炎症、滑液内炎症、以及通常导致显著失能的周围骨骼和软骨的渐进破坏。

[0134] 尽管 RA 的原因仍未知,但是有 GM-CSF 在 RA 的发展中起作用的累积证据。RA 被认为通过 T 细胞介导的抗原特异性过程被引发和驱动。简言之,在易感宿主中的未鉴定抗原的存在被认为引发导致 T 细胞细胞因子产生的 T 细胞反应,结果增加了包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞和 B 细胞的炎症细胞。

[0135] 许多促炎症和抗炎症细胞因子在风湿性关节中产生。而且,疾病发展、复发和静息都由关节内细胞因子产生的动态变化介导。特别地,TNF- α 和 IL-1 被认为在 RA 的发病过程中起关键作用,并且许多更新的已研究完成的或正在研制过程中的对该病的治疗方法注意到抑制这两种促炎症细胞因子的活性。

[0136] 最近在啮齿类动物模型中的研究已显示 GM-CSF 在 RA 的发生和进展中发挥着中心的和非多余的作用。外源重组 GM-CSF 的使用在胶原诱导关节炎 (CIA) [39] 和单关节炎模型 [40] 的两种不同小鼠 RA 模型中增强了病理症状。除此之外,另外已证实 GM-CSF 敲除 (GM-CSF^{-/-}) 小鼠对 CIA 发生具有抗性,并且与野生型小鼠相比,在滑膜关节液中发现的 IL-1 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平降低 [41、42]。类似地,与野生型小鼠相比,在 GM-CSF^{-/-} 小鼠中利用关节内注射甲基化牛血清白蛋白和 IL-1 诱导单关节炎产生的疾病严重程度降低 [43]。

[0137] 此外,给予鼠抗 GM-CSF mAb 显著改善 CIA 和单关节炎模型中的疾病严重程度。在 CIA 模型中,mAb 治疗在处理已确立疾病的发展、组织病理学和显著降低关节 IL-1 和 TNF- α 水平方面是有效的。此外,在关节炎发作之前的 mAb 治疗减轻 CIA 疾病严重程度 [44、43]。

[0138] 许多研究已经分析了来自人体组织的关节滑液和膜活体组织样品中存在的细胞因子和受体的水平。通过使用 PE 标记的 GM-CSF,对 27 位 RA 患者、13 位健康志愿者和 14 位骨质疏松患者的循环系统单核细胞的 GM-CSFR 水平进行了测定 [45]。在该研究中证实与健康对照 (20%) 和经调查有骨质疏松的患者 (25%) 相比,在 RA 患者 (53%) 中检测到两倍之多的受体阳性细胞,因此说明单核细胞可能很容易对局部产生的 GM-CSF 作出反应。利用 SF 细胞的原位杂交,RA 患者的细胞因子基因表达证明 GM-CSF、IL-1、TNF- α 和 IL-6 水平的提高。此外,分离和培养的源自正常志愿者的纤维原细胞的滑膜细胞显示出响应于 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 和 TNF- β 的 GM-CSF 蛋白水平的升高 [47]。RA 患者中 GM-CSF 血清水平的定量 [48] 显示,严重 (366pg/ml, n = 26) 和中度 (376pg/ml, n = 58) RA 患者的蛋白质水平与对照组 (174pg/ml, n = 43) 相比增加,此外,也显示在患 RA 患者的 SF 中 GM-CSF 显著提高 (1300pg/ml)。

[0139] 以前已观察到在治疗嗜中性白血球减少症的患者中给予重组 GM-CSF 可能导致 RA 加重 [49]。对费尔蒂综合征 (Felty's syndrome) 治疗后的患者施用重组 GM-CSF 也观察类似的现象 [50]。

[0140] 慢性阻塞性肺疾病 (COPD)

[0141] 慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 被定义为以不可完全恢复的气流限制为特征的疾病状态。慢性气流限制通常为渐进性的并且与肺对毒性颗粒或气体的异常炎症反应相关。该气流限制由小的气道疾病 (闭塞性支气管炎) 和薄壁组织破坏 (肺气肿) 的混合导致,其对于 COPD 的相对影响因人而异。COPD 的最终特征症状为咳嗽、生痰、以及用力时呼吸困难。COPD 为重要的公众健康问题并且在美国为导致慢性病和死亡的第四位的原因。目前使用最

初研制用于哮喘病的药物治疗该病,如带有或不带有支气管扩张剂(包括 β 拮抗剂)的皮质类甾醇。然而,这些药物中无一显示出减缓 COPD 的发展的功效[51]。例如,显著抑制哮喘中嗜酸性细胞炎症的皮质类甾醇未显示出对主要为中性粒细胞介导的 COPD 中所见炎症有任何作用[52]。因此,需要以该病的病理学为基础研制特异性以炎症过程为目标的新的 COPD 治疗药物。GM-CSF 通过其在中性粒细胞和巨噬细胞功能方面的作用可能在 COPD 病理发生方面起重要作用。

[0142] 在使用定量 PCR 的研究中,已显示出相对于非阻碍吸烟者的痰,在年龄匹配的 COPD 患者的痰中 GM-CSF 复本数显著提高[53]。此外,在吸烟诱导的肺炎症的啮齿类模型中,在烟雾暴露前 2 天、4 小时和 1 小时用 GM-CSF 抗体鼻内处理的动物与同种型对照抗体对比,在激发后 5 天 BAL 的中性粒细胞、巨噬细胞和 MMP-9 水平显示出显著下降[54]。我们自己在大的 COPD 严重程度范围内的患者的诱导痰中 GM-CSF 水平的研究中观察的结果也支持这些研究。在这些研究中,我们表明,无论疾病的严重程度,在约 40% 测试的 COPD 患者的痰中 GM-CSF 增加,在某些情况下 GM-CSF 水平接近 500pg/ml。在不吸烟或吸烟的匹配对照患者中 GMCSF 不表现出增加。这些数据暗示 GM-CSF 可能为吸烟诱导的气道炎症和 COPD 中的关键介体之一。

[0143] 多发性硬化 (MS)

[0144] GM-CSF 参与到自体免疫疾病多发性硬化中。通过向啮齿类动物给予髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 抗原,可以诱导人多发性硬化模型,其显示了如中枢神经系统炎症和能够导致 MS 样麻痹的髓鞘脱失的许多 MS 表型。在 GM-CSF 空白小鼠中,MOG 不能诱导 EAE 表型[55]。此外,这些小鼠显示具有对 MOG 抗原的 T 细胞增殖反应降低和 Th1 细胞因子 IL-6 和 IFN- γ 的产生下降。在抗原激发的同时施用 GM-CSF 中和抗体在治疗后的 10 天内防止了疾病发作,同时具有明显的损伤减少。如果在疾病发作之后给药,小鼠在治疗后的 20 天内完全康复[55]。

[0145] 白血病

[0146] GM-CSF 也与髓系白血病、幼年慢性髓系白血病 (JCML) 相关。该状态为主要侵袭不到四岁的患者的骨髓增生性疾病。在体外,JCML 外周血粒细胞-巨噬细胞祖细胞 (CFU-GM) 显示了在低细胞密度下的自发增殖,这是先前对于其它骨髓增生性疾病未描述过的现象。此外,从这些培养物中耗竭单核细胞消除了该增殖。随后,已证实这种自发增殖由 JCML 祖细胞对单核细胞源的细胞因子 GM-CSF 的超敏性介导[56、57、58、59、60、61]。JCML 祖细胞的超敏性表现为通过下调的 GM-CSF 诱导的 Ras 信号转导途径,而非在 JCML 患者中 GM-CSF 过量产生或水平升高[62]。最近利用 GM-CSF 类似物 (E21R) (其拮抗 GM-CSF 在结合研究和功能分析两个方面中的作用) 的研究已显示出通过抑制 GM-CSF 的作用可以在重度复合免疫缺陷 / 非肥胖糖尿病 (SCID/NOD) 小鼠的 JCML 异种移植模型中显著降低 JCML 细胞负载[63]。在移植时的 E21R 的预防性系统给药防止在骨髓中建立 JCML 祖细胞、并且在移植后 4 周给予 E21R 导致 JCML 的缓解,同时细胞负载减少。此外,向以正常人骨髓和 JCML 骨髓共同移植的 SCID/NOD 小鼠给予 E21R 导致 JCML 负载下降,然而正常骨髓细胞保持未受影响。

[0147] 动脉硬化症

[0148] 缺血性心脏病为世界范围内最常见的死亡原因。近些年来,炎症在动脉硬化的病

理形成中起重要作用的观点已得到加强,因为随着动脉壁的脂类积累同时发生炎症细胞积累。

[0149] 一旦驻留于动脉壁中,炎症细胞(如单核细胞和巨噬细胞)就参与和保持局部炎症反应。这些巨噬细胞也表达各种脂蛋白的清道夫受体,因而有助于细胞分化为“泡沫细胞(foamy cell)”。正是这些“泡沫细胞”的死亡有助于形成脂质核,这是这些损伤的典型特征。由于炎症在这些动脉硬化样斑块内持续,因此,这些活化的炎症细胞释放促进平滑肌细胞(SMC)增殖和斑块纤维化的纤维发生介体和生长因子。除了促进纤维化外,这些细胞也释放有助于弱化纤维变性斑块的蛋白水解酶,如基质金属蛋白酶(MMPs),从而使其易于破裂。一旦这些斑块破裂,其释放细胞碎片和如组织因子的凝血因子到血管内,刺激凝血连锁和血栓块的形成。然后,所导致的动脉血栓能够导致心肌缺血或梗死。

[0150] 最近发现,在动脉硬化的疾病发展的许多方面涉及 GM-CSF。在胆固醇饲喂的兔的动脉硬化损伤中,GM-CSF 被发现与巨噬细胞共同定位并且达到更低水平的内皮细胞和 SMC[64]。此外,已显示在巨噬细胞积累处的人动脉硬化血管内及在中间 SMC 和内皮细胞内 GM-CSF 表达增加[65]。这种 GM-CSF 水平的增加部分由于在动脉硬化损伤形成和病理发生过程中单核细胞/巨噬细胞与内皮细胞的直接细胞-细胞接触[66]。动脉损伤(atherotic lesion)中另一关键因素为“泡沫细胞”,即已通过表面上的清道夫受体摄取氧化的低密度脂蛋白(LDL)的巨噬细胞。在体外,该 Ox-LDL 的摄取可以通过 GM-CSF 依赖的机制进一步刺激巨噬细胞增殖[67]。

[0151] 由于动脉硬化为慢性炎症过程,已对如糖皮质激素的抗炎剂进行了研究。地塞米松(一种抗炎症糖皮质激素)在各种试验动物模型中抑制动脉硬化的形成[68、69、70、71]。其功效归因于抑制 SMC 迁移[72]和增殖[73]及循环单核细胞和白细胞的趋化性[74]。最近的研究显示 ox-LDL 可以诱导鼠腹膜巨噬细胞释放 GM-CSF[75]。此外,在使用地塞米松治疗后,这种 GM-CSF 释放受到剂量依赖性的抑制,暗示地塞米松的抗炎症作用是通过抑制 ox-LDL 诱导的 GM-CSF 合成介导的。由于 GM-CSF 在动脉硬化中显示出具有核心作用,因此根据这一启示,替代糖皮质激素的方式可以抑制 GM-CSF 活性。

[0152] 术语

[0153] 此处使用的“和/或”被理解为明确公开两种特定特征或组分中的任一种而同时具有或不具有另一种。例如“A和/或B”理解为明确地公开了(i)A、(ii)B和(iii)A和B中的各个情形,正如它们在此处单独给出。

[0154] GM-CSFR α 和 GM-CSF

[0155] GM-CSFR α 为粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体的 α 链。人 GM-CSFR α 的全长序列以登录号 S06945(gi:106355)进行保藏[76],并且此处作为 SEQ ID NO:202 列出。人 GM-CSFR α 的成熟形式,即剪去信号肽的形式在此处作为 SEQ ID NO:206 列出。除非上下文另有说明,此处对 GM-CSFR α 的引用指人或非人灵长类(如猕猴)的 GM-CSFR α ,通常指人的 GM-CSFR α 。GM-CSFR α 可以为天然形成的 GM-CSFR α 或重组的 GM-CSFR α 。

[0156] 人 GM-CSF 受体 α 的 298 个氨基酸的细胞外域具有 SEQ ID NO:205 所示氨基酸序列。

[0157] 除非上下文另有说明,此处对 GM-CSF 的引用指人或非人灵长类(如猕猴)的 GM-CSF,通常指人的 GM-CSF。

[0158] GM-CSF 通常结合成熟 GM-CSF 受体 α 链 (SEQ ID NO:206) 的细胞外域 (SEQ ID NO:205)。如本发明其它内容所述,该结合被本发明的结合元件抑制。

[0159] 天然形成的 GM-CSFR α 剪接变异体已被鉴定—参见例如参考文献 [77 和 78]。在这些剪接变异体中细胞外域是高度保守的。本发明的结合元件可以结合或不结合一种或多种 GM-CSFR α 的剪接变异体,并且可以抑制或不抑制 GM-CSF 与一种或多种 GM-CSFR α 的结合变异体的结合。

[0160] 结合元件

[0161] 此处描述了一对互相结合的分子的一个成员。该结合对的成员可以天然形成或全部或部分合成产生。该分子对的一个成员其表面上具有与分子对的另一成员的特定空间和极性组织结合并因而互补的区域或孔穴。结合对的类型的例子为抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物。本发明涉及抗原-抗体型反应。

[0162] 结合元件通常包括具有抗原结合位点的分子。例如,结合元件可以是抗体分子或包括抗原结合位点的非抗体蛋白。可以通过 CDR 在如人纤连蛋白或细胞色素 B 等的非抗体蛋白支架上的排列 [80、81、82],或者通过使蛋白支架内的环的氨基酸残基随机化或发生突变而赋予与期望目标结合的能力来提供抗原结合位点。对蛋白质中新结合位点进行工程化的支架已被详细评述 [82]。在 WO/0034784 中公开了用于抗体模拟物的蛋白支架,其中发明人描述了包括具有至少一个随机环的 III 型纤连蛋白域的蛋白质(抗体模拟物)。可以通过免疫球蛋白基因超家族的任何域成员提供其中接合一个或多个 CDR(如一组 HCDR)的合适支架。

[0163] 非抗体蛋白支架的优点为其可以在比至少某些抗体分子更小和/或更易操作的支架分子中提供抗原结合位点。结合元件的小尺寸可以赋予其有利的生理特性,如进入细胞、渗透到组织内深处或到达其它结构内的目标的能力、或者结合到靶抗原的蛋白孔穴内的能力。

[0164] 在参考文献 [79] 中综述了抗原结合位点在非抗体蛋白支架中的应用。典型的为具有稳定的骨架和一个或多个可变环的蛋白质,其中一个或多个环的氨基酸序列被特意地或随机地突变以产生结合靶抗原的抗原结合位点。这种蛋白质包括来自金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的蛋白 A 的 IgG 结合域、转铁蛋白、四连接素 (tetranectin)、纤连蛋白(如第 10III 型纤连蛋白域)和脂蛋白 (lipocalin)。其它的途径包括合成的“微体”(Selecore GmbH),其基于植物大环寡肽 (cyclotide)-具有分子内二硫键的小蛋白质。

[0165] 除抗体序列和/或抗原结合位点外,根据本发明的结合元件可以包括如形成肽或多肽(如折叠域)的、或者赋予分子除结合抗原能力外的另一功能特性的其它氨基酸。本发明的结合元件可以携带可检测标记,或者可以与毒素或者靶向结构或酶偶联(如经肽键或连接物)。例如,结合元件可以包括催化位点(如在酶域内)以及抗原结合位点,其中抗原结合位点结合抗原,而因此将催化位点指向抗原。催化位点可以通过例如切割来抑制抗原的生物功能。

[0166] 尽管如所述的,CDR 可以由如纤连蛋白或细胞色素 B 的支架携带 [80、81、82],但是携带本发明的 CDR 或 CDR 组的结构通常为抗体重或轻链序列或其基本部分,其中 CDR 或 CDR 组位于相应于由重排的免疫球蛋白基因所编码的天然形成 VH 和 VL 抗体可变域的 CDR 或 CDR 组的位置。免疫球蛋白可变域的结构和位置可以参照现在在互联网上可获

得的 (<http://immuno.bme.nwu.edu> 或用任何搜索引擎寻找 " Kabat ") 文献 kabat 等, 1987[98] 及其更新来确定。

[0167] 本发明的结合元件可以包括抗体恒定区或其部分、优选人抗体恒定区或其部分。例如, VL 域可以在其 C 末端与包括人 C κ 或 C λ 链 (优选 C λ 链) 的抗体轻链恒定域连接。类似地, 基于 VH 域的结合元件可以在其 C 末端与源自如 IgG、IgA、IgE 和 IgM 的任何抗体同种型和任何同种型亚类 (特别是 IgG1、IgG2 和 IgG4) 的免疫球蛋白重链的全部或部分 (如 CH1 域) 连接。优选为 IgG1、IgG2 或 IgG4。因为 IgG4 不结合补体且不产生效应子功能, 所以 IgG4 是优选的。具有这些特性且使可变区稳定的任何合成的或其它恒定区变异体在本发明的实施方式中的应用中也是优选的。

[0168] 本发明的结合元件可以用可检测的或功能性的标记物标记。可检测的标记物包括如 ^{131}I 或 ^{99}Tc 的放射性标记物, 其可以使用抗体成像领域中已知的常规化学方法连接于本发明的抗体。标记物也包括如辣根过氧化物酶的酶标记物。标记物进一步包括可以通过结合特定同源可检测结构 (如标记的抗生物素蛋白) 进行检测的化学结构 (如生物素)。因此, 本发明的结合元件或抗体分子可以为包括任选地经连接物 (如肽) 联接的结合元件和标记物的缀合物的形式。例如, 结合元件可以与酶 (如过氧化物酶、碱性磷酸酶) 或包括, 但不限于生物素、荧光色素、绿色荧光蛋白的荧光标记物偶联。此外, 标记物可以包括毒素结构, 如选自假单胞菌外毒素 (PE 或其细胞毒性片段或突变体)、白喉毒素 (其细胞毒性片段或突变体)、肉毒杆菌毒素 A ~ F、蓖麻毒素或其细胞毒性片段、相思豆毒素或其细胞毒性片段、皂草毒蛋白 (saporin) 或其细胞毒性片段、美洲商陆抗病毒毒素或其细胞毒性片段以及异株泻根毒蛋白 1 (bryodin 1) 或其细胞毒性片段的组的毒素结构。当结合元件包括抗体分子时, 标记的结合元件可被称作免疫缀合物 (immunoconjugate)。

[0169] 抗体分子

[0170] 这描述了天然产生的或者部分或全部合成产生的免疫球蛋白。该术语也涵盖任何包括抗体抗原结合位点的多肽或蛋白。包括抗体抗原结合位点的抗体片段为如 Fab、F(ab')₂、Fab'、Fab'-SH、scFV、Fv、dAb、Fd 和双体的分子。

[0171] 取得单克隆和其它抗体分子并且利用重组 DNA 技术制备其它抗体或保留原始抗体的特异性的嵌合分子是可能的。这种技术可以涉及向不同免疫球蛋白的恒定区 (或恒定区加框架区) 引入编码抗体的免疫球蛋白可变区 (或 CDR) 的 DNA。例如, 参见 EP-A-184187、GB2188638A 或 EP-A-239400 以及大量的后续文献。杂交瘤或其它产生抗体的细胞可以发生遗传突变或其它改变, 这可能改变或不改变产生的抗体的靶结合。

[0172] 因为抗体可以以许多方式被修饰, 因此, 术语 "抗体分子" 应理解为涵盖任何具有抗体抗原结合位点的结合元件或物质。因此, 该术语涵盖抗体片段和衍生物, 包括任何含抗体抗原结合位点的多肽, 而无论是天然的或全部或部分合成的。因而包括与另一多肽融合的包含抗体结合位点的嵌合分子、或者其等价物。在 EP-A-0120694 和 EP-A-0125023 以及大量的后续文献中描述了嵌合抗体的克隆和表达。

[0173] 抗体工程领域中可获得的进一步的技术使得分离人和人源抗体成为可能。人和人源抗体为本发明的优选实施方式, 并且可以使用任何适当的方法制备。例如, 可以制备人杂交瘤 [83]。噬菌体呈现 (用于制备结合元件的另一种已建立技术) 已在如参考文献 [83] 和 W092/01047 (以下进一步讨论) 的许多公开文献中进行了详细描述。其中小鼠抗体

基因被灭活并且用人抗体基因功能性取代、而同时小鼠免疫系统的其它组分保持完整的转基因小鼠可以被用于分离人抗体 [84]。可以利用如在 W091/09967、US5585089、EP592106、US565332 和 W093/17105 中公开的本领域中的已知技术制备人源抗体。此外 W02004/006955 描述了基于通过对比非人抗体的可变区 CDR 序列的正则 CDR 结构类型和来自人抗体序列库（如胚系抗体基因片段）的相应 CDR 的正则 CDR 结构类型从人抗体基因选择可变区框架序列的用于抗体人源化的方法。具有与非人 CDR 类似的正则 CDR 结构类型的人抗体可变区构成从其中选择人框架序列的人抗体序列成员子集。可以通过人和非人 CDR 序列之间的氨基酸类似性进一步对子集成员分级。在 W02004/006955 的方法中，顶级的人序列被选择来提供用于利用选择的子集成员人框架构建以非人 CDR 对应部分功能性取代人 CDR 序列的嵌合抗体的框架序列，从而提供高亲和性和低免疫原性的人源化抗体而无需在非人和人抗体之间对比框架序列。根据本发明的方法制备的嵌合抗体也被公开。

[0174] 通过表达由在适当的表达载体内合成和组装的寡核苷酸产生的基因可以制备合成抗体分子 [85、86]。

[0175] 已表明完整抗体的片段可以实行结合抗原的功能。结合片段的例子为 (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成的 Fab 片段；(ii) 由 VH 和 CH1 域组成的 Fd 片段；(iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 域组成的 Fv 片段；(iv) 由 VH 或 VL 域组成的 dAb 片段 [87,88,89]；(v) 分离的 CDR 区；(vi) F(ab')₂ 片段，为包括两个连接的 Fab 片段的双价片段；(vii) 单链 Fv 分子 (scFv)，其中 VH 域和 VL 域通过使得两个域联合的肽连接物连接以形成抗原结合位点 [90、91]；(viii) 双特异性的单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965) 和 (ix) “双体”，通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (W094/13804；[92])。可以通过引入连接 VH 和 VL 域的二硫桥稳定 Fv、scFv 或双体分子 [93]。包括与 CH3 域联接的 scFv 的微体也可以被制备 [94]。

[0176] dAb(域抗体)为抗体的小型单体抗原结合片段，即抗体重或轻链的可变区 [89]。VH dAb 在驼类（如骆驼、美洲驼）中自然形成，并且可以通过用特定抗原免疫骆驼、分离抗原特异性 B 细胞并直接克隆来自个体 B 细胞的 dAb 基因而被制备。dAb 也在细胞培养中产生。其较小的尺寸、良好的溶解性和温度稳定性使其在生理上尤其有用，且适于选择和亲和力成熟。本发明的结合元件可以为包括基本如此处所示的 VH 或 VL 域或者包括包含基本如此处所示的一组 CDR 的 VH 或 VL 域的 dAb。“基本如所示”意味着本发明的相关 CDR 或者 VH 或 VL 域与序列在此被给出的特定区域相同或高度相似。“高度相似”意味着在 CDR 和 / 或 VH 或 VL 域内可以进行 1 ~ 5 个、优选 1 ~ 4 个（如 1 ~ 3 个，或 1 个、或 2 个、或 3 个或 4 个）氨基酸的取代。

[0177] 当使用双特异性抗体时，其可以为通过多种方法 [95] 制备的（如化学或杂交瘤制备的）常规双特异性抗体，或者可以为任何上述双特异性抗体片段。双特异性抗体的例子包括 BiTE™ 技术的双特异性抗体，其中具有不同特异性的两种抗体的结合域可以被使用和经短的柔性肽直接连接。这将两种抗体组合在短的单个多肽链上。通过仅使用可变域可构建双体和 scFv 而无 Fc 域，从而潜在地降低了抗个体型反应的效应。

[0178] 因为其可以在大肠杆菌中容易地构建和表达，所以与双特异性全抗体相比，双特异性双体也可能是特别有利的。利用文库的噬菌体呈现 (W094/13804) 可以容易地选择具有适当结合特异性的双体（和如抗体片段的许多其它多肽）。如果双体的一个臂保持恒定，例如对准 GM-CSFR α ，则可以形成其中另一臂被改变且选择具有适当目标结合的抗体的库。

可以通过杵臼 (knob-into-hole) 工程产生双特异全抗体 [96]。

[0179] 抗原结合位点

[0180] 这描述了与靶抗原的全部或部分结合并互补的分子的部分。在抗体分子中,其被称作抗体抗原结合位点,并且包括与靶抗原的全部或部分结合并互补的抗体部分。当抗原较大时,抗体可以仅结合抗原的特定部分,该部分被称为表位。抗体抗原结合位点可以由一个或多个抗体可变域提供。优选地,抗体抗原结合位点包括抗体轻链可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

[0181] Kabat 编号

[0182] 此处的抗体序列的残基通常利用如 Kabat 等,1971[97] 中所定义的 Kabat 编号指称。也参见参考文献 [98、99]。

[0183] 分离的

[0184] 这指其中本发明的结合元件或编码该结合元件的核酸按照本发明一般所处的状态。分离的元件和分离的核酸没有或基本没有其天然相关的物质,如在其自然环境或当通过体外或体内实施的重组 DNA 技术制备时在其被制备的环境(如细胞培养)中被发现的其它多肽或核酸。元件和核酸可以利用稀释液或辅剂进行配制,并且出于实际目的可以仍然是分离的一例如,如果在免疫试验中用于涂覆微滴定板,元件通常与凝胶或者其它载体混合,或者当用于诊断或治疗时与药物可接受的载体或稀释液混合。结合元件可以天然地或通过异源真核细胞系统(如 CHO 或 NS0??? (ECACC85110503)) 被糖基化,或者其可以是未糖基化的(例如,如果通过原核细胞中表达产生)。

[0185] 附图简要说明

[0186] 图 1、在 TF-1 增殖试验中两种抗 GM-CSFR α 抗体的 pA_2 分析。当存在浓度增加的两种优化 IgG4(分别为抗体 6(图 1A) 和抗体 1(图 1B)) 时,利用浓度增加的 GM-CSF 诱导 TF-1 细胞增殖。对于曲线图 1A 和曲线图 1B 所显示的数据,氟标记的胸腺嘧啶的掺入被测量,并且各抗体浓度下 GM-CSF 的 EC50 被计算。然后对于曲线图 1C 和曲线图 1D 中所显示的数据,通过 schild 回归对剂量比进行计算和分析以获得 pA_2 值。

[0187] 图 2、在粒细胞形态变化试验中抗 GM-CSFR α 抗体,即抗体 6 的 pA_2 分析。当存在浓度增加的 IgG4 时,用浓度增加的 GM-CSF 处理人(曲线图 2A 或 2C) 或猕猴(2B 和 2D) 粒细胞。利用流式细胞仪测量粒细胞形态改变,并且各抗体浓度下 GM-CSF 的 EC50 被计算(曲线图 2A 和曲线图 2B)。然后通过 schild 回归对剂量比进行计算和分析以获得 pA_2 值。

[0188] 图 3、在测量由 7pM 人 GM-CSF 诱导的 TF-1 细胞增殖的试验中,两种作为 IgG4 的抗体(即分别为抗体 1 和抗体 6) 的拮抗效力。也显示了阳性对照 IgG42B7 和同种型对照 IgG4 的数据。数据代表在同一试验内三次测定的平均值加标准差条。

[0189] 图 4、在测量由 7pM 人 GM-CSF 诱导的人粒细胞形态变化的试验中,两种作为 IgG4 的抗体(即分别为抗体 1 和抗体 6) 的拮抗效力。也显示了对照 IgG42B7 和同种型对照 IgG4 的数据。数据代表在同一试验内三次测定的平均值加标准差条。

[0190] 图 5、在测量由 1nM 人 GM-CSF 刺激的人单核细胞 TNF α 释放的试验中,两种作为 IgG4 的抗体(即分别为抗体 1 和抗体 6) 的拮抗效力。也显示了对照抗体 2B7 和同种型对照 IgG4 的数据。数据代表在同一试验内三次测定的平均值加标准差条。

[0191] 图 6、在测量由 7pM 人 GM-CSF 诱导的人粒细胞存活的试验中,两种作为 IgG4 的抗

体（即分别为抗体 1 和抗体 6）的拮抗剂力。也显示了对照抗体 2B7 和同种型对照 IgG4 的数据。数据代表在同一试验内三次测定的平均值加标准差条。

[0192] 图 7、亲合力成熟的人 mAb 抗体 1 和抗体 6, 而不是亲本人 mAb28G5 (抗体 3) 或已知的鼠抗体 2B7, 抑制人的造血祖细胞的 GM-CSF 驱动分化。来自脱落 (apheresis) 样品的 5×10^4 个解冻单核细胞在存在 10ng/ml GM-CSF 和所示浓度的 mAb 的情况下在半固体琼脂中培养。在第 14 天进行集落计数。曲线图显示了对抗 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的 mAb 的集落数。

[0193] 图 8、在 huGM-CSFR Tg 嵌合小鼠中亲合力成熟的 mAb 的效力的剂量 - 反应分析。用 500ng huGM-CSF (或 PBS) 处理 5Tg 嵌合小鼠的组 (皮下注射, 每天两次, 共 4 天 (D. 1-D. 4)), 并在 D. 0 施用对照 (CAT001) 或所示浓度的测试 mAb (抗体 6)。在 D. 5 时测定脾重量。

[0194] 图 9、抗体 6 在人外周血单核细胞内源细胞因子释放试验中的效力的剂量 - 反应分析。 1×10^6 个细胞在存在和无抗体条件下培养 72 小时, 并且对上清液进行 IL-6 和 TNF α ELISA 分析。数据代表在同一试验中两次测定的平均抑制加标准差条。

具体实施方式

[0195] 试验部分

[0196] 背景

[0197] 人抗体片段可以在体外从在丝状噬菌体的表面上呈现的组成集合中选择。该过程称作噬菌体呈现并且提供了获得人抗体片段的方法。该过程可以用于分离人抗人特异性并且可以进行特别修饰以得到具有特定亲合特征的抗体。

[0198] 仅由通过短肽连接物联合在一起的重链可变 (VH) 和轻链可变 (VL) 域组成的抗体片段包含确定抗原结合所需的全部信息。该片段已知为单链 Fv (scFv)。当在噬菌体表面呈现时, scFv 显示正确的折叠和与抗原的结合。通过该方法已经构建了大的人 scFv 组成集合, 并且其提供了从其中分离用于开发为候选药物的单个克隆的来源。然后, 候选的 scFv 被重组为用于治疗用途的全 IgG (典型地人 IgG) 分子。

[0199] 摘要

[0200] 为了富集与人 GM-CSFR α 结合的噬菌体群, 对源自人脾淋巴细胞的 scFv 噬菌体呈现库进行选择。我们分离了具有选择的特征的 scFv 抗体, 并且将这些 scFv 转化为 IgG4。利用各种试验, 抗体组 (panel) 被分离、优化和胚系化以产生具有治疗抗体的适当规格的 IgG4。

[0201] 其序列在序列表中显示为抗体 1、2 和 4 ~ 20 的 19 个抗体克隆得自亲本抗体。该亲本在序列表中显示为抗体 3, 且在此也称为 28G5。该 19 个克隆由于在如试验部分所描述的多种生物试验中显示出特别优良的性状而被选择, 并且被赋予抗体号码 1、2 以及 4 ~ 20。

[0202] 生物试验设计为反映如风湿性关节炎的疾病的炎症性质。例如, 将中性粒细胞募集到作用位点所必须的中性粒细胞的形态变化、单核细胞的促炎症因子释放和响应于特定信号的炎症细胞类型的存活增加。抗体在这些试验中显示有效的中和活性。

[0203] 所用的试验方法的详细方案在下面名为“试验材料和方法”的部分中提供。

[0204] 抗体引导分离

[0205] 大的单链 Fv (scFv) 人抗体库被用于进行选择。这源自 20 位健康供体的脾淋巴细胞并且被克隆至噬粒载体内。识别 GM-CSFR α 的 ScFv 在对由 HEK293T 细胞中的受体的纯

化标记、可溶、细胞外域的超表达得到的纯化 GM-CSFR α 进行的系列重复选择循环中从噬菌体呈现库中分离。这基本按照 Vaughan 等所述实行 [102]。简言之,在生物素化的受体暴露于噬菌体库之后,在抗生蛋白链菌素包被的磁珠上捕获具有结合的噬菌体的蛋白。未结合的噬菌体被洗去。然后,如 Vaughan 等所述得到结合的噬菌体,并且重复选择过程。在降低抗原浓度的情况下进行三轮选择。对来自选择循环输出的 scFv 的代表性部分进行 DNA 测序。

[0206] 在这些对噬菌体呈现库的最初选择后,在被设计为确认能够抑制 GM-CSF 与纯化的 GM-CSFR α 细胞外域结合的噬菌体表达 scFv 抗体的配体结合试验中鉴定了独特的 scFv 组。在配体结合试验中这些 scFv 的中和效力为 0.65 ~ 3.3nM。

[0207] 在生化配体结合试验中有活性的抗体在 TF-1 增殖试验中测定其生物活性,F-1 增殖试验通过测试抗体抑制 GM-CSF 刺激的 TF-1 细胞增殖的能力测量中和效力。TF-1 为从红白血病细胞建立的人前骨髓 (premyeloid) 细胞系。该细胞系的存活和增殖是因子依赖的,并且常规地在人 GM-CSF 中维持。通过测量在分裂细胞的新合成 DNA 中氘标记的胸腺嘧啶的掺入量的降低确定 GM-CSF 依赖的增殖的抑制。在该试验中,所有 scFv 都具有可测量的效力,IC₅₀ 值范围为约 180 ~ 1200nM。

[0208] 最有效的 scFv 克隆被重排 (reformat) 为具人 γ 4 重链恒定域和人 λ 轻链恒定域的人 IgG4 抗体分子。为了使抗体能够表达为经过一些修饰的 Persic 等描述的全 IgG4 抗体 [100],对于最有效的 scFv 克隆构建载体。所述载体中包括 oriP 片段,以有利于与 HEK-EBNA293 细胞一起应用并允许游离型复制。VH 可变域被克隆至表达载体 pEU8.1 (+) 的分泌前导序列和人 γ 4 恒定域之间的多接头内。VL 可变域被克隆至表达载体 pEU4.1 (-) 的分泌前导序列和人 λ 恒定域之间的多接头内。HEK-EBNA293 细胞用表达重和轻链的构建体共转染,并且全抗体使用蛋白 A 亲和层析从条件培养基中纯化。纯化的抗体制剂被无菌过滤、并且在测试前在 4°C 下保存于磷酸缓冲盐水 (PBS) 中。通过使用 BCA 方法 (Pierce) 测量在 280nm 处的吸收值确定蛋白浓度。

[0209] 在 TF-1 增殖试验中,重排的 IgG 与已知鼠抗体 2B7 进行比较。IgG4 在该试验中保留或增加了活性,IC₅₀ 值范围为 6 ~ 约 1600nM。

[0210] 在炎症性疾病中,中性粒细胞的形态变化对于其募集到作用位点是必须的。人粒细胞形态变化试验被设计为利用荧光活化细胞分选 (FACS) 测量从血液中分离的粒细胞在暴露于 GM-CSF 后的形态改变而模拟该生物反应。测定了抗 GM-CSFR α IgG4 抗体抑制中性粒细胞对 GM-CSF 的形态改变反应的能力,并且确定克隆的 IC₅₀ 值范围为约 15 ~ 350nM。代表性抗体 28G5 在猕猴粒细胞形态改变试验中以约 5nM 的 IC₅₀ 中和猕猴 GM-CSFR。已知的鼠抗体 2B7 也能够中和由 GM-CSF 结合猕猴受体所导致的生物反应。

[0211] 然后,使用 BIAcore 测量抗体的受体结合亲和力。计算的 K_d 值范围为 32 ~ 377nM。

[0212] 优化

[0213] 为了提高 28G5 的效力,启动了优化程序。在完成 V_H 或 V_L CDR3 的随机诱变的情况下产生了抗体库。各个 CDR3 在两个 6 氨基酸的块中被随机化以覆盖整个 CDR,从而产生 H1 (VH CDR3 中的 6aa 的 N 末端块)、H2 (VH CDR3 中的 6aa 的 C 末端块)、L1 (VL CDR3 中的 6aa 的 N 末端块) 和 L2 (VL CDR3 中的 6aa 的 C 末端块) 库。所获得的库进行人 GM-CSFR α 结合的重复选择循环。然后,由该选择过程分离的克隆被用于构建包含具有变异重链 CDR3

和变异轻链 CDR3 的 scFv 的组合噬菌体库。这些库也被进行相同的选择过程。

[0214] 在优化过程的各个阶段,利用 28G5 和受体的表位竞争试验鉴定能够抑制 28G5IgG4 结合 GM-CSF 受体的 scFv,并且然后在如下所述的 TF-1 增殖试验中进行测试。

[0215] 在 28G5 的重链 CDR3 序列的随机诱变后,scFv 的组利用在 TF-1 试验中可测量的中和效力进行鉴定。当 V_H CDR3 的 3' 末端被随机化时,获得了大多数效力改善。

[0216] 在 28G5 的轻链 CDR3 序列的随机诱变后,scFv 的组利用在 TF-1 试验中可测量的中和效力进行鉴定。当 V_L CDR3 的 3' 末端被随机化时,获得了所有的效力改善。

[0217] 在重和轻链 CDR3 随机突变库组合后,scFv 的组利用在 TF-1 增殖试验中具有超过亲本 scFv28G5 的较高效力进行确认。分离具有超过亲本 >60000 倍的效力提高的 scFv。所有库组合产生改进的 scFv,即 H1/L1、H1/L2、H2/L1、H2/L2。因为没有从 L1 库分离出改进的 scFv,所以这是特别有趣的现象。

[0218] 使用上述方法,在 28G5 的优化过程中被鉴定的 19 个 scFv 的组被重排并表达为 IgG4。所述组包括抗体克隆 1、2 和 4 ~ 20。在该组中某些最有效的克隆从组合的 H 和 L CDR3 突变库获得。在 TF-1 增殖试验中测试该组中的 IgG4 抗体的活性,并且与已知鼠抗体 2B7 对比。在该试验中,所有优化的 IgG4 比 2B7 更有效。此时,2B7 具有约 1.6nM 的计算 IC₅₀,而这些克隆具有约 1pM ~ 约 1100pM 的 IC₅₀ 计算值范围。数据列于以下表 1 中,并总结如下:

[0219] IC₅₀<1500pM 抗体 1、2 和 4 ~ 20

[0220] IC₅₀<300pM 抗体 1、2、4-12 和 14-20

[0221] IC₅₀<60pM 抗体 1、2、4-6、8-11、14 和 16-20

[0222] IC₅₀<10pM 抗体 1、5、6、11 和 20。

[0223] 图 3 说明在 TF-1 增殖试验中,与已知的抗体 2B7 相比,本发明的两种代表性抗体,抗体 1 和抗体 6 的拮抗效力。

[0224] BIAcore2000 系统 (Pharmacia Biosenser) 被用于测定某些先导优化的 IgG4 与重组纯化标记的 GM-CSF 受体细胞外域的相互作用的动力学参数。抗体的亲和性被极大改进,具有 0.127nM ~ 约 5nM 的 K_D 计算值。数据列于表 2 中。结合速率 (on-rate) 和解离速率 (off-rate) 都获得改进。IgG4 对 GM-CSFR α 可溶性细胞外域的亲和性与其在 TF-1 试验中的性能之间的相关性是极好的,具有 0.85 (p<0.0001) 的皮尔逊系数。通过对比,2B7 的 K_D 被单独计算并且显示为约 7nM。

[0225] 在 28G5 的优化过程中鉴定的 IgG4 抗体在人粒细胞形态改变试验中进行测试,并且与已知鼠抗体 2B7 比较。所有在该试验中测试的抗体 (抗体 1、2、5、6、9-11、16 和 20) 都是非常有效的,具有 7.8 ~ 90pM 的 IC₅₀ 值范围。其中,抗体 1、2、5、6、9、16 和 20 具有不到 50pM 的 IC₅₀,且抗体 1、2、6、16 和 20 具有不到 25pM 的 IC₅₀。我们的抗体比具有 477pM 的 IC₅₀ 的 2B7 更有效。数据显示在表 3 中。图 4 说明在人粒细胞形态改变试验中,与已知抗体 2B7 相比,本发明的两个代表性抗体,抗体 1 和抗体 6 的拮抗效力。

[0226] 在 28G5 的优化过程中鉴定的 IgG4 抗体在猕猴形态变化试验中进行测试。所有抗体能够中和 GM-CSF 对猕猴受体以及人受体的活性,并且所有抗体都比 2B7 更有效。2B7 具有 26pM 的 IC₅₀,而抗体组中的代表性抗体 (抗体 6、抗体 1 和抗体 2) 分别具有 1.73、2.03 和 3.2pM 的 IC₅₀ 值。

[0227] 在单核细胞 TNF α 释放试验中,对在 28G5 的优化过程中鉴定的 IgG4 组进行中和效力测试。该试验测试抑制人单核细胞在用 GM-CSF 处理时释放促炎症因子 TNF α 的能力。抗体 1、2、5、6、9 和 10 被测试,它们在该试验中都是有活性的,并且能够完全中和 GM-CSF 对受体的作用 (IC₅₀ 范围为约 43 ~ 139),而 333nM 浓度的 2B7 仅能够实现 GM-CSF 诱导的 TNF α 释放的 50%抑制,表明在该试验中该抗体仅为部分抑制因子。图 5 说明在单核细胞 TNF α 释放试验中,与已知抗体 2B7 相比,本发明的两个代表性抗体的拮抗效力。数据在表 4 中显示,并且总结如下:

[0228] <150pM 抗体 1、2、5、6、9 和 10 号

[0229] <110pM 抗体 1、2、5、6 和 9 号

[0230] <100pM 抗体 1、5、6 和 9 号

[0231] 炎症疾病的特点为炎症细胞类型响应于特定信号而增加存活。粒细胞在 GM-CSF 存在时能够存活更长,因此,在粒细胞存活试验中测试在 28G5 优化过程中分离的 IgG4 抗体抑制该反应的能力。所有来自先导物优化的抗 GM-CSFR α IgG4 在该试验中都是有活性的,代表性中和效力 (IC₅₀) 的范围为 7.0 ~ 843.7pM。这与已知鼠抗体 2B7 相反,其直到 83nM 浓度时还是完全无活性的。图 6 说明在粒细胞存活试验中,与已知抗体 2B7 相比,本发明的两个代表性抗体,抗体 1 和抗体 6 的拮抗效力。

[0232] 如图 3 ~ 6 所示的这些数据表明与已知鼠抗体 2B7 相比,我们的抗体具有显著不同的特性。例如,在粒细胞存活和 TF-1 增殖试验中,本发明的代表性抗体分别抑制用 7pM GM-CSF 刺激的粒细胞存活和 TF-1 增殖,而 2B7 不抑制粒细胞存活、但抑制 TF-1 增殖(虽然是比我们的抗体低的程度)。数据显示,与已知 GM-CSFR α 抗体相比,本发明的结合元件具有较高的亲和性和较高的抑制各种由 GM-CSF-R 介导的生物效应的能力。

[0233] 28G5 的衍生氨基酸序列及其衍生物与 VBASE 数据库中的已知人胚系序列比对,并且通过序列相似性鉴定最接近的胚系。28G5 及其衍生物的 VH 域的最接近胚系被鉴定为 VH1DP5。28G5VH 在框架区内具有与 VH1-24 (DP5) 胚系相比的 14 个改变。

[0234] VL 域的最接近胚系为 V λ VL1-e (DPL8),其在框架区内仅具有胚系的 5 个改变。28G5 及其衍生物的框架区通过定点突变返回胚系以同样地匹配天然的人抗体。除了一个氨基酸以外的所有这些氨基酸可以被转变为在抗体效力方面仅具有适当改变的胚系。重链的 94 位的氨基酸异亮氨酸(使用 Kabat 编号, Kabat 等 1971) 不能被改变为胚系苏氨酸而不完全丧失活性。因此,在抗体框架区内保持胚系的该单一改变。

[0235] 在 TF-1 增殖试验中进行抗 -GM-CSFR α 抗体中的两个,抗体 6 和抗体 1,的全 pA₂ 分析。数据证实在该系统中这些抗体是高度有效的拮抗剂,计算的 pA₂ 值分别为 -11.3 $\pm$ 0.2 和 -11.0 $\pm$ 0.2 (图 1)。

[0236] 在人和猕猴粒细胞形态改变试验中进行抗 -GM-CSFR α 抗体之一(抗体 6)的全 pA₂ 分析。数据证实在这些系统中该抗体是高度有效的拮抗剂,在人和猕猴试验中计算的 pA₂ 值分别为 -10.58 和 -10.78 (图 2)。

[0237] 在半固体琼脂试验中,GM-CSF 驱动造血祖细胞分化为粒细胞和巨噬细胞集落。因此,在集落形成试验中,使用源自外周血的祖细胞测试亲和力成熟抗体 6 和抗体 1、亲本 mAb 抗体 3 (28G5) 和阴性对照 (CAT001) 的拮抗该 GM-CSF 特异性活性的能力。图 7 中显示的数据表明两种亲和力成熟的代表性 mAb 都为人 GM-CSF 介导的体外造血集落形成的有效抑制

因子。

[0238] 对于亲和力成熟的 mAb, 大致的 IC₅₀ 值为 0.08 μ g/ml (抗体 6) 和 0.25 μ g/ml (抗体 1)。有趣的是已知的鼠抗体 2B7 在该试验中直到 66nM 浓度时仍表现出很少 (如果有的话) 的抑制活性。

[0239] 在对照试验中, 如所预想的, 亲和力成熟的 mAb 对 SCF + IL-3 + G-CSF 的组合所介导的集落形成没有影响, 并且当无细胞因子时, 集落形成可以忽略 (<4 个集落 / 培养物)。

[0240] 对于 huGM-CSFR α 特异性 mAb 拮抗活性的体内分析, 表达人 GM-CSFR 的 α 和 β 两条链的转基因 (Tg) 小鼠的骨髓移植至野生型小鼠中可以被用于产生嵌合动物, 从而转基因的 huGM-CSFR 表达限于骨髓源的造血细胞、并且因此更类似内源受体的表达特征 (expression profile)。在这些 Tg 嵌合小鼠中, 给予 huGM-CSF 导致脾重量增加和循环血液单核细胞的边缘化。对亲和力成熟的抗体 6 和阴性对照 mAb (CAT001) 测试其拮抗这些 GM-CSF 介导的体内反应的能力。对于剂量反应分析, 包括 5 只 Tg 嵌合鼠的 6 个组用 500ng 的 huGM-CSFR α 皮下注射, 每天处理 2 次, 共 4 天 (第 1-4 天), 则 5 只动物组成的第七对照组仅接受 PBS。6 组 huGM-CSF 处理的动物中的 4 组在 D. 0 时以 16mg/kg、5.3mg/kg、1.78mg/kg 或 0.59mg/kg 的量接受测试 mAb (抗体 6), 而第五组 huGM-CSF 处理的动物在 D. 0 时以 16mg/kg 的量接受对照 CAT001。图 8 中呈现的结果证明, 与对照 PBS 相比, 使用 huGM-CSF 处理诱导了脾重量的显著增加和循环血单核细胞的降低。如预想的, 使用 16mg/kg 对照 CAT001 进行处理对脾重量的增加或血液单核细胞的降低都没有影响。相反, 在以测试 mAb 抗体 6 处理后, 具有清晰的剂量 - 反应效应, 如在 16mg/kg 时, 该抗体消除了脾重量的增加, 尽管在使用 0.59mg/kg 的 mAb 时仍然有明显的反应, 但效应被显著降低。IC₅₀ 似乎在 0.59mg/kg 和 1.78mg/kg 之间的某处。对于 GM-CSF 诱导的循环单核细胞的减少观察到类似结果—使用 16mg/kg 的测试 mAb 抗体 6 的处理消除了降低, 而 0.59mg/kg 的 mAb 对该反应仅有很小影响。这些数据显示抗 -GM-CSFR α 抗体为人 GM-CSFR α 的体内拮抗剂。

[0241] 为了进一步研究这些抗 -GM-CSFR α 抗体的抗炎特性, 在外周血单核细胞细胞因子释放试验中测试抗体 6。在该试验中, TNF α 和 IL-6 可以内源释放, 这取决于供体。在该试验中, GM-CSF 也是由细胞内源产生的, 而非外源添加, 并且因此在该试验中观察到的结果代表天然的内源 GM-CSF 结合其受体的生物学效应的抑制。

[0242] 在给予抗体 6 后, 如图 9 所示, 这两种细胞因子都受到剂量依赖性的抑制。这些数据表明这些抗体可以抑制天然 GM-CSF 的活性, 以及通过抑制 GM-CSF 信号发生, 可以抑制如 IL-6 和 TNF α 的关键促炎症细胞因子, 两者都与多种如风湿性关节炎的炎症指征相关。

[0243] 此外, 基于抗体 6 的这一结果, 可以预计抗体 1 ~ 20 中每个在该试验中表现抑制作用, 因为所有抗体 1 ~ 20 被认为结合 GM-CSFR α 的相同区域。

[0244] 重要的抗原识别残基的定位、以及序列分析

[0245] 为了鉴定哪个位置对于配体结合通常是保守的、以及在仍保留配体结合活性的抗体中哪个位置是可变的, 我们确定了在胚系化抗体 6scFv 序列中多个位置的残基的可变性。

[0246] 对抗原结合有作用的位置显示为 VL 域中的 Kabat 残基 27A、27B、27C、32、51、52、53、90、92 和 96, 以及 VH 域中的 Kabat 残基 17、34、54、57、95、97、99 和 100B。

[0247] 确认了 7 个显示为对抗原结合重要的位置: H95、H97、H99、H100B、L90、L92 和 L96。

然后我们分析了在 28G5 抗体优化过程中分离的 160 个变异体的序列中这些位置处的残基,所有这些变异体在 TF-1 增殖试验中都显示出最少 5 倍的效力提高。

[0248] 以下表 5 中的数据总结了在这些位置中的各处和 L95A 处观察到的不同氨基酸(来自可能的 20 种当中)。28G5 和 / 或抗体 6 中这些位置的氨基酸是极保守的,这很好地证明了那些氨基酸对于结合抗原是关键的。例如,以下位置的氨基酸是极保守的: H97、H100B、L90、L92。

[0249] 方法

[0250] 基本如参考文献 [101] 所述,编码亲和力成熟的和胚系化抗体 6scFv 的 DNA 序列被转化为核糖体呈现形式。为了产生含随机点突变的变异体 574D04 序列的库,采用制造商的方案(BD Bioscience)中的高突变条件(7.2 个突变 / 1000bp) 对抗体 6 序列进行易错 PCR。该库在核糖体上表达,并且与纯化示踪的 GM-CSFR α 共培养以使得结合发生。能够结合标记的 GM-CSFR α 的变异体被捕获,并且利用蛋白 G(Dynal) 包被的顺磁珠移除。群体中残留的未结合变异体被加入到四种生物素化的抗 - 个体型抗体的池中,其预先得自如参考文件 [102] 所述的大的人抗体噬菌体呈现库并且已知与抗体 6scFv 结合。生物素化的抗 - 个体型抗体结合的变异体利用抗生蛋白链菌素珠捕获,而未结合的变异体被洗去。根据参考文件 [101] 中的一般方法,该过程重复进行核糖体呈现选择的另两个循环。

[0251] 使用与 Edwards BM 等 (2003) Journal of Molecular Biology Vol334:103 中所述相同的方法,来自选择结果的变异体的代表性部分被克隆至噬粒载体中,并且在噬菌体上表达 scFv 变异体以用于通过 ELISA 进行测试。那些不显示与纯化标记的 GM-C SFR α 结合的突变体被测试与在选择中使用的四种抗 - 个体型抗体池的结合。在抗 - 个体型结合试验中表现出等于或大于抗体 6scFv 的结合的变异体被测序,并且对序列进行分析以发现具有高频突变的位置。

[0252] 使用 486 个 V_H 链序列和 451 个 V_L 链序列,发现变异体群的平均突变率为每 V_H 或 V_L 链 3.05 个氨基酸。对他们分析突变热点,测绘与其沿 scFv 的位置相关的突变频率。该分析集中于每 V_H 或 V_L 具有至少一个 CDR 突变且每 V_H 或 V_L 具有不到 4 个突变的那些克隆。从该 123 个 V_H 和 148 个 V_L 序列的组中,热点被限定为具有 5% 或更高突变频率的位置。

[0253] 使用核糖体呈现负选择方法,抗体 6 的 V_H CDR3 和 V_L CDR3 中的七个位置作为抗原结合重要的推定位置而受到特别关注。然后对在 28G5 抗体优化过程中分离的、其中 V_H CDR3 和 V_L CDR3 的整个序列被随机化且选择较高亲和性的 160 个序列变异体进行分析。

[0254] 线性表位的确定

[0255] 利用 PEPSCAN 方法,我们对抗体 6 和已知抗体 2B7 抗各代表 GM-CSFR α 细胞外部分氨基酸序列的短区域的 2442 个肽的信号进行了筛选。各抗体抗所有肽的结合信号被平均以产生平均的背景信号,并且对于各个肽计算信号 / 背景比。对于抗体 6 和 2B7 两者,4 或更高的信号 / 背景比被记作特异性的阳性信号。分析产生特异性阳性信号的肽序列的保守结合基序,并且发现抗体 6 优先结合相应于成熟人 GM-CSFR α 的 226 ~ 230 残基的 YLDFQ 基序,且 2B7 优先结合相应于成熟的人 GM-CSFR α 的 278 ~ 281 残基的 DVRI 基序。对于成熟受体的氨基酸序列的编号如 SEQ ID NO:206 所示。

[0256] PEPSCAN 方法(肽结合扫描)

[0257] 如先前文献所述 [103],合成具有源自 GMCSF 的序列的大部分重叠的 15-mer 合成

肽,并且使用信用卡式(credit-card format)mini-PEPSCAN卡(具有3 μ l孔的455-孔板)进行筛选。在基于PEPSCAN的酶联免疫试验(ELISA)中测试抗体与各个肽的结合。含共价连接肽的455-孔信用卡式聚丙烯卡与样品(例如10 μ g/ml抗体,或以PBS溶液稀释1000倍的血清,其含5%马血清(v/v)和5%卵清蛋白(w/v))和1% Tween80,或者在PBS溶液中温和封闭的情况下,与4%马血清(v/v)和1% Tween80共孵育(40 $^{\circ}$ C,过夜)。清洗后,肽与抗-抗体过氧化物酶共孵育(1/1000稀释液,例如兔-抗-小鼠过氧化物酶,Dako)(1小时,25 $^{\circ}$ C),然后,在清洗后,加入过氧化物酶底物2,2'-连氨基-双-3-乙基苯并噻唑磺酸盐(ABTS)和2 μ l/ml的3% H₂O₂。一小时后,测量显色。用CCD相机和图像处理系统定量ELISA的显色。装置包括CCD-相机和55mm镜头(Sony CCD Video CamaraXC-77RR, Nikon micro-nikkor55mm f/2.8镜头)、相机适配器(Sony相机适配器DC-77RR)和图像处理软件包Optima6.5版(MediaCybernetics, Silver Spring, MD20910, U.S.A.)。Optima运行于奔腾计算机系统上。

[0258] 试验材料和方法

[0259] 生化配体结合试验

[0260] 如W001/66754[104]的实施例3所述制备纯化的scFv制剂。使用BAC方法[105]确定纯化的scFv制剂的蛋白质浓度。以50 μ l/孔用PBS稀释到2.5 μ g/ml的抗人IgG4在4 $^{\circ}$ C下涂覆FluoronicTM96孔微滴定板过夜。以300 μ l/孔的PBS/0.1% Tween-20清洗板3次,然后用300 μ l/孔的溶于PBS的3% BSA在室温下封闭一小时。该板用300 μ l/孔的PBS/0.1% Tween-20再清洗3次,然后向各个孔中加入50 μ l在1% BSA/PBS中稀释至62.5ng/ml的人GM-CSFR α ,并且板在室温下孵育1小时。如上所述清洗3次后,向各个孔中加入25 μ l样品材料,然后加入25 μ l在1% BSA/PBS中稀释至2nM的生物素化GM-CSF。为了确定全结合,仅缓冲液被用作样品材料。为了确定非特异性结合,在1% BSA中稀释至100nM的未标记GM-CSF被用作样品材料。在如上所述清洗3次前,板在室温下孵育1小时。向板的各个孔中加入50 μ l在DELFIATM分析缓冲液中稀释至100ng/ml的铕标记抗生蛋白链菌素(PerkinElmer),并且在用DELFIATM清洗缓冲液清洗7次之前,在室温下孵育30~60分钟。向板中加入50 μ l/孔的DELFIATM增强液,在读板器上于615nm处对样品进行读数。

[0261] TF-1增殖试验

[0262] 从R&D系统获得的、并且常规地保持在RPMI1640、10% FBS、1mM丙酮酸钠和4ng/ml GM-CSF中的TF-1细胞通过在分析培养基(RPMI1640、5% FBS、1mM丙酮酸钠)中清洗3次、在分析培养基中重悬、以及在37 $^{\circ}$ C下5% CO₂中孵育7~24小时而使细胞饥饿。然后将细胞以1 $\times$ 10⁵/ml的浓度重悬在分析培养基中,并且向96孔平底组织培养板的各个孔中加入100 μ l。在用分析培养基稀释之前,测试样品通过无菌过滤原液样品进行制备。然后,向各个细胞孔中加入50 μ l测试材料,并且将其在37 $^{\circ}$ C下5% CO₂中孵育45~60分钟。然后,向各个孔中加入50 μ l的以分析培养基稀释至EC₈₀值的GM-CSF(或者对于某些批次的GM-CSF为0.4ng/ml),将板在加湿室内在37 $^{\circ}$ C下5% CO₂中孵育16小时。这代表了7pM GM-CSF的终浓度。为了测量细胞的增殖,向板的各个孔中加入20 μ l在分析培养基中稀释到5.0 μ Ci/ml的³H-胸腺嘧啶,并将板在37 $^{\circ}$ C下5% CO₂中孵育4小时 $\pm$ 30分钟。然后使用板收集器在96孔GF/C UnifilterTM板上收获细胞,并且清洗。在向过滤板的各孔中加入

50 μ l MicroScint20™ 后,密封板,并且在 TopCount 读板器上计数。

[0263] 人粒细胞形态改变试验

[0264] 人的血沉棕黄层(来自输血服务的人血包装)与溶于 0.9% NaCl 的 3% Dextran T-500 等体积混合。然后将混合物以竖直位置孵育直至形成界面。收集上层,并且在 histopaque1.077 密度梯度顶上成层,然后以 400g 离心 40 分钟,并且使其无制动停止。去除该梯度的上层,留下粒细胞球。通过在 20ml 冰水中重悬细胞 30 秒、然后立即加入冰冷的 1.8% 氯化钠裂解该球粒中残留的任何红血球。然后以 1200rpm 使细胞重新成球,并且以 1×10^6 /ml 的浓度在分析培养基(RPMI1640、10% FBS、100u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、25mM HEPES)中重悬。然后向 96 孔平底组织培养板的各个孔中加入 100 μ l 细胞。测试样品通过无菌过滤原液样品、并且在分析培养基中适当稀释而制备。

[0265] 对于先导分离(lead isolation),50 μ l 的测试样品随后加入细胞中,且将板在 37℃ 下 5% CO₂ 中孵育 45 ~ 60 分钟。这代表了 7pM GM-CSF 的终浓度。然后向各个孔内加入 50 μ l 在分析培养基中稀释到 0.4ng/ml 的 GM-CSF,并且在加湿箱内、在 37℃ 下 5% CO₂ 中孵育 4 小时。

[0266] 对于先导物优化,在分析培养基中稀释的过滤 IgG4 与溶于分析培养基的 0.4ng/ml GM-CSF 等体积混合。这代表了 7pM GM-CSF 的终浓度。然后向各个孔内加入 100 μ l 抗体/GM-CSF 混合物。然后在加湿箱内、在 37℃ 下 5% CO₂ 中孵育 3 小时。

[0267] 加入冷甲醛达到 1.25% 的终浓度,并且细胞在 4℃ 固定过夜。每孔通过流式细胞仪分析 2000 ~ 5000 个事件。然后,使用 CellQuest 得出各个样品的前向散射(FSC)的几何平均值。当计算几何平均值时,细胞被屏蔽(gate)以排除不相关的群体(如死亡细胞/碎片)。

[0268] 猕猴粒细胞形态改变试验

[0269] 在测量用 GM-CSF 刺激后的猕猴粒细胞的形态改变的试验中对抗体进行测试。从猕猴全血中纯化粒细胞,并且基本如人粒细胞形态改变试验所述进行试验。

[0270] 使用生物传感器分析的结合亲和力数据

[0271] BIAcore200 系统(Pharmacia Biosensor)用于测定 scFv 和 IgG4 与重组受体之间相互作用的动力学参数。Biosensor 利用表面等离子共振的光学效应研究分析物分子与共价连接到右旋糖酐基质上的配体分子的相互作用所导致的表面浓度变化。典型地,在自由溶液中的分析物物质放过偶联的配体,并且随着局部 SPR 信号增加检测到任何结合。然后进入清洗期,在此期间,随着 SPR 信号降低观察到分析物物质的解离,其后,任何保留的分析物与配体剥离并以几个不同的分析物浓度重复该过程。在试验期间通常使用系列对照以确保绝对结合能力或偶联配体的动力学特征不发生显著改变。专有的 hepes 缓冲盐水(HBS-EP)通常被用作分析样品的主稀释液和解离相溶剂。试验数据相对于时间以共振单位(直接对应于 SPR 信号)记录。共振单位直接与结合的分析物的大小和量成正比。然后,BIA 评估软件包可以被用于指定解离相(解离速率单位 s⁻¹)和缔合相(缔合速率单位 M⁻¹s⁻¹)的速率常数。然后,这些数字使得能够计算缔合和解离亲和常数。

[0272] 使用其中 IgG4 通过氨基蛋白 A 表面非共价捕获的单个试验估计 IgG4 的亲合性。然后重组纯化-标记的 GM-CSF 受体细胞外域的系列稀释液(从 100 ~ 6.25nM)顺序经过 IgG4。利用浓度(Bradford)和预测的非翻译后修饰的成熟多肽质量(39.7kDa)计算受体的摩尔浓度。以相同的模式分析两个独立的数据集中的每一个。使用设置为对缔合和解离

速率进行同时整体计算的 1:1 朗缪尔模型对参考细胞校正数据进行拟合, $R_{\max}$ 值设定为全局的 (global)。测定在各个周期中捕获的 IgG4 的水平以确保捕获的量在整个试验过程中保持稳定。此外, IgG4 的解离速率被测定以判断是否需要对于基线漂移进行校正。然而, 两种蛋白 A 相互作用被证明是可充分再现的和足够稳定的。数据的有效性由计算出的 χ^2 和 T 值 (参数值 / 偏移量) 限制, 其分别必须为 <2 和 >100 。

[0273] 纯化标记的 GM-CSFR α 细胞外域的制备:

[0274] 整合编码人 GM-CSF 受体 α 细胞外域的序列 (SEQ ID NO:205, 代表成熟 GM-CSF R 的 1-298 氨基酸) 和鼠 IL-3 信号序列并且加入 N-末端纯化标记的 pEFBOS 表达载体 [106] 被用于产生重组的 N 末端标记的 GM-CSF 受体细胞外域 (ECD) 多肽。利用标准程序标记的 ECD 多肽在 CHO 细胞内使用 pEFBOS 载体表达。该多肽也可称作纯化的 GM-CSFR α 细胞外域、或称作 GM-CSFR α 的可溶性细胞外域。

[0275] 如 Flag 肽 (DYKDDDE-SEQ ID NO:204)、Fc、生物素或 his 标签的任何适当的纯化标签都可以使用。可以使用任何适当的技术进行纯化, 例如, Flag 标记的 ECD 多肽 (SEQ ID NO:203) 可以在 M2 亲和层析柱上纯化, 并且用 FLAG 肽洗脱。

[0276] 单核细胞 TNF α 释放试验

[0277] 单核细胞的纯化 (单核细胞分离试剂盒—MiltenyiBiotec-130-053-301):

[0278] 人血沉棕黄层 (来自输血服务的人血包装) 在 histopaque1.077 密度梯度 (Sigma, 货号 1077-1) 顶上成层, 并且细胞以 $400 \times g$ 离心 40 分钟。在停止离心时不施加制动。然后, 由界面处收集 PBMC 细胞。细胞在 PBS 中清洗, 并以 $300 \times g$ 离心 10 分钟成球, 然后残留的红血球通过在 20ml 冰水中重悬 15 秒, 接着立即加入冰冷的 1.8% 氯化钠进行裂解。然后将细胞以 1200rpm 离心 5 分钟成球, 并且在 600μ l MACS 缓冲液 (PBS, 2mM EDTA) 中重悬。在加入 200μ l 半抗原-抗体混合体 (Hapten-antibody cocktail) (也是由试剂盒提供的) 并混合之前, 200μ l 由试剂盒提供的 Fc 封闭试剂被加入到细胞中并且混合。然后, 在 50ml MACS 缓冲液中清洗两次之前, 将细胞于 4°C 孵育 15 分钟。在加入 200μ l 半抗原-抗体混合体并混合之前, 将细胞球重悬在 600μ l MACS 缓冲液中, 然后加入 200μ l MACS 抗-半抗原微球并混合。细胞于 4°C 孵育 45 分钟, 然后在 50ml MACS 缓冲液中清洗并在 500μ l MACS 缓冲液中重悬。在将细胞悬浮液加到柱子上之前, 通过用 3ml MACS 缓冲液清洗准备单柱 (Miltenyi Biotec130-042-401)。收集的流出液为富集的单核细胞部分。用 2×3 ml MACS 缓冲液洗柱, 并且收集流出液。使用标准的流式细胞仪方法, 通过以抗-CD14-PE 染色检查单核细胞纯度。最终将细胞以 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度重悬在分析培养基中 (RPMI1640、10% FBS、100u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)。

[0279] 单核细胞的刺激:

[0280] 向 Costar96 孔平底组织培养板的各个孔内加入 50μ l 细胞。向所有孔内加入 25μ l 的 150μ g/ml rhIFN γ (R&D systyems)。在分析培养基中稀释的过滤 IgG4 与溶于分析培养基的 56ng/ml (4nM) GM-CSF 等体积混合。这代表 1nM 的 GM-CSF 终浓度。然后, 将 75μ l 的抗体/GM-CSF 混合物加入到各个孔内。对照为仅具有 GM-CSF 的孔、或无 GM-CSF 和无抗体的孔。然后, 将板在加湿室内、在 37°C 下以 5% CO_2 孵育 18 小时。然后收集上清液以通过 ELISA 测试 TNF α 水平。

[0281] TNF α ELISA (R&D Systems ELISA Development System DY210):

[0282] 用 100 μ l 溶于 PBS 中的 4 μ g/ml 捕获抗体室温下涂覆 Fluoromax Immunosorb ELISA 板过夜。然后,用 PBS/0.1% Tween 清洗板三次,并且用 300 μ l/孔的溶于 PBS 中的 3% Marvel 在室温封闭 1 小时。用 PBS/0.1% Tween 清洗板三次。100 μ l 来自测试板的上清液被移至 ELISA 板,并且在分析培养基中稀释的 TNF- α 被滴定液被加入到对照孔内。在以 PBS/0.1% Tween 清洗 4-5 次之前,将板在室温下孵育 2 小时。100 μ l 在 1% Marvel/PBS 中稀释至 300ng/ml 的检测抗体被加入到板的各个孔内,并在以 PBS/0.1% Tween 清洗 4-5 次之前,将板在室温下再孵育 2 小时。抗生蛋白链菌素-钼 (PerkinElmer1244-360) 于 DELFIA 分析缓冲液 (PerkinElmer4002-0010) 中以 1:1000 进行稀释,并且以 100 μ l/孔加入,然后在室温下孵育 45 分钟。然后,将板在 DELFIA 清洗缓冲液中洗 7 次,然后加入 100 μ l/孔增强液 (PerkinElmer4001-0010),并且使用读板器在 615nm 处读数。

[0283] 粒细胞存活试验

[0284] 如中性粒细胞活化试验(形态改变试验)所述,从人血沉棕黄层中纯化细胞、在分析培养基(RPMI1640、Glutamax、10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)中清洗,并且以 1×10^6 /ml 的浓度在分析培养基中重悬。100 μ l 细胞被加入到 Costar96 孔平底组织培养板的各个孔内。过滤的抗体原液在分析培养基中稀释,并且与 0.4ng/ml 的 GM-CSF 等体积混合。这代表 7pM GM-CSF 的终浓度。对照孔只含培养基或只含 GM-CSF。然后,100 μ l 测试样品/GM-CSF 混合物被加入板的各个孔内,并且将细胞在加湿箱内 37 $^{\circ}$ C /5% CO₂ 下孵育 68 小时。向各孔中加入 20 μ l 的 AlamarBlue,并且板在加湿箱内 37 $^{\circ}$ C /5% CO₂ 下再孵育 24 小时。然后,使用读板器在 560nm 和 590nm 处读数。

[0285] 抗 -GM-CSFR α 抗体在 TF-1 增殖试验中及在人和猕猴粒细胞形态改变试验中的 pA₂ 分析

[0286] 定量竞争性拮抗剂的亲和性的主要药学工具为 Schild 分析。使用该途径,可以确定在功能试验中估测拮抗剂亲和性的系统独立的手段。该方法基于拮抗剂浓度及其亲和性决定激动剂反应的对抗作用的概念。因为对抗作用可以被量化并且拮抗剂的浓度是已知的,所以,拮抗剂的亲和性可以被确定。通过测量(在有或无拮抗剂时测量)激动剂的等活性浓度比值(称作剂量比(DR))对该对抗作用进行量化。

[0287] 可以通过使用激动剂(典型地 GM-CSF)在无结合元件时的 EC₅₀ 与该激动剂在有单浓度的结合元件存在时的 EC₅₀ 的比值计算剂量比。然后,表达为 log(DR-1) 的剂量比可以在关于 log[结合元件] 的线性回归中使用以产生 Schild 回归。因此,对于结合元件的每个浓度存在相应的 DR 值;将这些值绘制为关于 log[结合元件] 上的 log(DR-1) 的回归。如果对抗作用是竞争性的,则根据方程式如下的 Schild 公式在 log(DR-1) 和 log[结合元件] 之间具有线性关系:

$$[0288] \quad \text{Log}(\text{DR}-1) = \log[A] - \log K_A$$

[0289] 在这些条件下,坐标的 0 值给出其中 $\log[a] = \log K_A$ 的 X 轴的截距。因此,给出 $\log(\text{DR}-1) = 0$ 的结合元件浓度等于 $\log K_A$, 结合元件-受体复合物的平衡分离常数。这是与系统无关的、对于每一个含该受体的细胞系统都精准的结合元件亲和性定量方法。

[0290] 因为 K_A 值由对数曲线获得,因此其为 log 标准分布。该特定浓度的负对数被经验地称作 pA₂, 产生激动剂剂量效应曲线的两倍移动的拮抗剂浓度。拮抗效力可以通过以下公式由产生单一剂量比值的单一拮抗剂浓度计算 pA₂ 进行量化,其中

[0291] $pA_2 = \log(DR-1) - \log[a]$

[0292] $[a]$ = 必须使拮抗剂浓度加倍以得到原始第二大反应的拮抗剂摩尔浓度。

[0293] DR = 通过测量在有和无拮抗剂时测量的激动剂的等活性浓度的比值而定量的剂量比。

[0294] pA_2 可以从剂量效应试验数据计算。

[0295] 在集落形成试验中 GM-CSF 介导的血细胞祖细胞体外分化的抑制

[0296] 造血祖细胞富集的外周血单核细胞从进行祖细胞动员和脱落作为其标准临床处理的部分的供者获得。样品进行去识别化 (de-identified), 并且细胞在使用前不进行冷冻保藏。 5×10^4 单核细胞在终浓度为 10ng/ml 的人 GM-CSF 存在下在半固体琼脂中培养 [107]。测试的亲和力成熟人 mAb 和已知的鼠抗体 2B7 以 10、5、1、0.5、0.1 或 0.05 μ g/ml 的终浓度被加到琼脂培养物内。亲本的人 mAb28G5 和同种型匹配的阴性对照人 mAb (CAT001) 以 10 μ g/ml 的单一浓度进行测定。出于对照目的, mAb 也测定其阻断由 SCF、IL-3 和 G-CSF 组合 (Croker 等 2004) 所激发的集落形成的能力以及有无细胞因子存在时其对集落形成的影响。在具有 10% CO₂ 的空气中孵育 14 天后评估集落形成 (>40 个细胞的聚集)。集落用戊二醛固定, 并且使用解剖显微镜以 35 倍放大率进行计数。

[0297] 人 GM-CSFR α β 转基因小鼠中的 GM-CSF 体内生物活性的抑制

[0298] 产生在 MHC I 类促进因子的调控下表达人 GM-CSFR 的 α 和 β 链两者的转基因 (Tg) 小鼠, 并且已有文献描述了对于给予 huGM-CSF 的体内脾和血细胞反应 [108]。为对 huGM-CSFR α 特异性 mAb 拮抗剂活性进行体内分析, 从 Tg 小鼠移植骨髓至野生型鼠体内可以产生嵌合型动物, 从而转基因 huGM-CSFR α β 表达被限于骨髓来源的造血细胞, 并且因此更类似于内源受体的表达特征。在这些 huGM-CSFR α β Tg 嵌合小鼠中, 给予 huGM-CSF 导致脾重量的增加和循环血单核细胞的边缘化。

[0299] Tg 嵌合小鼠的产生

[0300] 供体 Tg 鼠的股骨和胫骨被去除, 并且以无菌 PBS 加 3% 小牛血清 (FCS) 冲洗骨髓。然后通过 23G 针抽取骨髓塞以获得单细胞悬浮液, 然后用冷 PBS + 3% FCS 清洗细胞一次, 并且通过不锈钢丝网。然后通过 0.168M 氯化铵缓冲液中裂解去除红细胞, 之后用磷酸缓冲盐水 (PBS) + 3% FCS 再清洗细胞 2 次, 然后再次通过不锈钢丝网。为了进一步去除死细胞和细胞碎片, 悬浮液通过 FCS 垫离心。活细胞以球粒回收, 用 PBS 清洗一次, 并且以 2.5×10^7 /ml 在 PBS 中重悬。5-8 周龄的接受体 C57/BL6 小鼠以 3 小时间隔的 550Rad 两次致死剂量进行照射。接受体小鼠被静脉 (i. v.) 注射 0.2ml 细胞悬浮液 (即 5×10^6 细胞/小鼠), 并且随后其饮水中加入 0.02M 新霉素在带盖的盒中圈养 3 周。6 周后, 通过使用对 huGM-CSFR α 和 β 链特异性的 mAb 对外周血进行 FACS 分析以测定再造。

[0301] Tg 嵌合小鼠的 GM-CSF 处理和后续分析:

[0302] Tg 嵌合小鼠用 500ng huGM-CSF 经皮下途径 (s. c) 每日处理 2 次, 处理 4 天。对于抗体拮抗剂活性的分析, 在开始 GM-CSF 处理之前, 在第一天, 5 只小鼠构成的组经腹膜 (i. p) 途径给予选择剂量的 mAb (参见下文)。在第 5 天, 抽取 0.2ml 血液用于使用 ADVIA™ 血液学系统 (Bayer Diagnostics) 对循环白细胞群 (特别是血单核细胞) 进行分析。然后, 致死动物, 取出脾以进行重量测量。

[0303] 人外周血单核细胞内源表达人 TNF α 和 IL-6 的抑制

[0304] 人血沉棕黄层（来自输血服务的人血包装）在 histopaque1.077 密度梯度（Sigma, 货号 1077-1）顶上成层, 并且细胞以 $400 \times g$ 离心 40 分钟。当停止离心时不施加制动。然后, 由界面处收集 PBMC 细胞。细胞在 PBS 中清洗, 并以 $300 \times g$ 离心 10 分钟成球, 然后通过 20ml 冰水中重悬 15 秒, 接着立即加入冰的 1.6% 氯化钠裂解残留的红细胞。然后将细胞以 1200rpm 离心 5 分钟成球, 并且在 10ml 的 10% FBS/RPMI 和 1% 青霉素链霉素中重悬。然后将细胞稀释到 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度。每个孔分配 $110 \mu\text{l}$ 的细胞 ($5.5 \times 10^5/\text{孔}$), 并使细胞在 5% CO_2 中在 37°C 下放置 1 小时。以下试剂作为单一终浓度对照被加入: PHA ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)、LPS ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$)、GM-CSF ($10\text{ng}/\text{ml}$) 和同种型对照 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)。抗体 6 以最终起始浓度达到 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 5 倍稀释系列加入。然后, 将板在 5% CO_2 中、在 37°C 下孵育 72 小时。72 小时后收集上清液, 并且使用以下 R&D ELISA 试剂盒 (hTNF- α R&D DuoSet ELISA development system DY210 和 hIL-6 R&D DuoSet ELISA development system DY206) 计算 TNF α 和 IL-6 的水平。根据供货商的建议进行 ELISA。

[0305] 表 1: 从 28G5 的优化分离得到的 IgG4 非胚系抗体对 GM-CSF 诱导的 TF-1 细胞增殖的抑制。在存在浓度增加的 IgG4 抗体的情况下, 以单一浓度的 GM-CSF 诱导 TF-1 细胞的增殖。氚标记的胸腺嘧啶的掺入被测量, 并且计算抗体的 IC50 值。数据为 $n \geq 3$ 的代表数据。SEM (平均值的标准误) 被显示。

[0306]

IgG4	IC50 $\pm$ SEM (pM)
2B7	1575 $\pm$ 490.5
抗体 1	5.3 $\pm$ 0.33
抗体 2	15.0 $\pm$ 4.71
抗体 4	48.0 $\pm$ 8.33
抗体 5	9.3 $\pm$ 5.39
抗体 6	0.97 $\pm$ 0.033
抗体 7	93.8 $\pm$ 24.6
抗体 8	34.5 $\pm$ 2.63
抗体 9	40.8 $\pm$ 7.15
抗体 10	55.3 $\pm$ 3.73
抗体 11	9.0 $\pm$ 1.0
抗体 12	246.3 $\pm$ 19.8
抗体 13	1106.0 $\pm$ 174.9
抗体 14	16.3 $\pm$ 4.9
抗体 15	163.8 $\pm$ 7.3
抗体 16	12.8 $\pm$ 3.3
抗体 17	14.3 $\pm$ 2.8
抗体 18	13.3 $\pm$ 3.4
抗体 19	23.8 $\pm$ 4.3
抗体 20	9.8 $\pm$ 2.8

[0307] 表 2: 在 28G5 的优化过程中分离的抗 -GM-CSFR α IgG4 非胚系抗体的动力学分析。IgG4 抗体被固定于蛋白 -A 覆盖的芯片的表面, 并且一系列的纯化标记的 GM-CSFR α ECD 稀释液经过 IgG4。使用允许质量传递的 Langmuir 1:1 同时 $k_a k_d$ 对数据进行拟合。

[0308]

IgG4	KD(nM)
抗体 1	0.264
抗体 2	0.376
抗体 4	4.07
抗体 5	0.847
抗体 6	0.139
抗体 7	3.93
抗体 8	0.552
抗体 10	1.50
抗体 12	3.02
抗体 14	0.502
抗体 15	1.03
抗体 16	1.14
抗体 17	0.193
抗体 19	0.388
抗体 20	0.127

[0309] 抗体 9 和 11 的数据是双相的。

[0310] 表 3 :在 28G5 的优化过程中分离的 IgG4 非胚系抗体对 GM-CSF 诱导的人粒细胞形态改变的抑制。在存在浓度增加的 IgG4 抗体的情况下,以单一浓度的 GM-CSF 处理人粒细胞。使用流式细胞仪测量粒细胞的形态改变,并且计算抗体的 IC50 值。

[0311]

IgG4	IC50±SD (pM)
2B7	477±491
抗体 1	12.6±8.0
抗体 2	20.7±11.0
抗体 5	30.0
抗体 6	13.3±11.8
抗体 9	44.0
抗体 10	62.0
抗体 11	90.0
抗体 16	16.0
抗体 20	7.8

[0312] 表 4 :GM-CSF 诱导的单核细胞 TNF α 释放的抑制。在存在浓度增加的 IgG4 非胚系抗体的情况下,以单一浓度的 GM-CSF 处理人单核细胞。通过 ELISA 测量 TNF α 的释放,并且计算抗体的 IC50 值。

[0313]

IgG4	IC50±SD (pM)
抗体 1	78.8±54.6
抗体 2	103.3±63.1
抗体 5	67.0
抗体 6	43.0±19.7
抗体 9	74.0
抗体 10	139.0

[0314]

表 5

KABAT 残基	28G5		LEAD		残基的出现百分比																		
	V	S	V	S	A	N	L	V	H	F	W	D	Q	E	R	H	K	I	L	M	V	F	Y
H95					1.250	26.875	1.250	70.625															
H97	S	S			S																		
H99	S	S	S	P	1.250	70.625	0.625	0.625	0.625	26.250	0.625												
H100B	A	T		A	63.125	2.500	2.500	28.75	0.625	0.625	2.500												
L90	S	T		S	90.00	9.375	0.625																
L92	D	E		S	2.500	0.625	91.875	1.875	0.625	2.500	0.625												
L95A	S	S	S	G	9.375	1.250	45.000	3.125	6.250	6.250													
L96	S	S		A	1.250	26.250	43.750	1.250	17.500	0.625	0.625												

[0315] 序列表的索引

[0316] 在附加的序列表中, 列出包括亲本克隆和 19 个来自优化组的克隆的 20 个抗体克

隆的核酸和氨基酸 (“PRT”) 序列。抗体被编号为 Ab1 ~ Ab20。亲本克隆为抗体 3, 由 SEQ ID NOS :21 ~ 23 和 SEQ ID NOS :211 ~ 212 代表。

[0317] 以下列表通过 SEQ ID NOS 号码定位, 其中所示分子的序列显示如下:

[0318] (nt = 核苷酸序列; aa = 氨基酸序列)

[0319]	1	抗体	01	VH nt	22	抗体	03	VH aa
[0320]	2	抗体	01	VH aa	23	抗体	03	VH CDR1 aa
[0321]	3	抗体	01	VH CDR1 aa	24	抗体	03	VH CDR2 aa
[0322]	4	抗体	01	VH CDR2 aa	25	抗体	03	VH CDR3 aa
[0323]	5	抗体	01	VH CDR3 aa	26	抗体	03	VL nt
[0324]	6	抗体	01	VL nt	27	抗体	03	VL aa
[0325]	7	抗体	01	VL aa	28	抗体	03	VL CDR1 aa
[0326]	8	抗体	01	VL CDR1 aa	29	抗体	03	VL CDR2 aa
[0327]	9	抗体	01	VL CDR2 aa	30	抗体	03	VL CDR3 aa
[0328]	10	抗体	01	VL CDR3 aa	31	抗体	04	VH nt
[0329]	11	抗体	02	VH nt	32	抗体	04	VH aa
[0330]	12	抗体	02	VH aa	33	抗体	04	VH CDR1 aa
[0331]	13	抗体	02	VH CDR1 aa	34	抗体	04	VH CDR2 aa
[0332]	14	抗体	02	VH CDR2 aa	35	抗体	04	VH CDR3 aa
[0333]	15	抗体	02	VH CDR3 aa	36	抗体	04	VL nt
[0334]	16	抗体	02	VL nt	37	抗体	04	VL aa
[0335]	17	抗体	02	VL aa	38	抗体	04	VL CDR1 aa
[0336]	18	抗体	02	VL CDR1 aa	39	抗体	04	VL CDR2 aa
[0337]	19	抗体	02	VL CDR2 aa	40	抗体	04	VL CDR3 aa
[0338]	20	抗体	02	VL CDR3 aa	41	抗体	05	VH nt
[0339]	21	抗体	03	VH nt	42	抗体	05	VH aa
[0340]	43	抗体	05	VH CDR1 aa	72	抗体	08	VH aa
[0341]	44	抗体	05	VH CDR2 aa	73	抗体	08	VH CDR1 aa
[0342]	45	抗体	05	VH CDR3 aa	74	抗体	08	VH CDR2 aa
[0343]	46	抗体	05	VL nt	75	抗体	08	VH CDR3 aa
[0344]	47	抗体	05	VL aa	76	抗体	08	VL nt
[0345]	48	抗体	05	VL CDR1 aa	77	抗体	08	VL aa
[0346]	49	抗体	05	VL CDR2 aa	78	抗体	08	VL CDR1 aa
[0347]	50	抗体	05	VL CDR3 aa	79	抗体	08	VL CDR2 aa
[0348]	51	抗体	06	VH nt	80	抗体	08	VL CDR3 aa
[0349]	52	抗体	06	VH aa	81	抗体	09	VH nt
[0350]	53	抗体	06	VH CDR1 aa	82	抗体	09	VH aa
[0351]	54	抗体	06	VH CDR2 aa	83	抗体	09	VH CDR1 aa
[0352]	55	抗体	06	VH CDR3 aa	84	抗体	09	VH CDR2 aa
[0353]	56	抗体	06	VL nt	85	抗体	09	VH CDR3 aa

[0354]	57	抗体	06	VL aa	86	抗体	09	VL nt
[0355]	58	抗体	06	VL CDR1 aa	87	抗体	09	VL aa
[0356]	59	抗体	06	VL CDR2 aa	88	抗体	09	VL CDR1 aa
[0357]	60	抗体	06	VL CDR3 aa	89	抗体	09	VL CDR2 aa
[0358]	61	抗体	07	VH nt	90	抗体	09	VL CDR3 aa
[0359]	62	抗体	07	VH aa	91	抗体	10	VH nt
[0360]	63	抗体	07	VH CDR1 aa	92	抗体	10	VH aa
[0361]	64	抗体	07	VH CDR2 aa	93	抗体	10	VH CDR1 aa
[0362]	65	抗体	07	VH CDR3 aa	94	抗体	10	VH CDR2 aa
[0363]	66	抗体	07	VL nt	95	抗体	10	VH CDR3 aa
[0364]	67	抗体	07	VL aa	96	抗体	10	VL nt
[0365]	68	抗体	07	VL CDR1 aa	97	抗体	10	VL aa
[0366]	69	抗体	07	VL CDR2 aa	98	抗体	10	VL CDR1 aa
[0367]	70	抗体	07	VL CDR3 aa	99	抗体	10	VL CDR2 aa
[0368]	71	抗体	08	VH nt	100	抗体	10	VL CDR3 aa
[0369]	101	抗体	11	VH nt	130	抗体	13	VL CDR3 aa
[0370]	102	抗体	11	VH aa	131	抗体	14	VH nt
[0371]	103	抗体	11	VH CDR1 aa	132	抗体	14	VH aa
[0372]	104	抗体	11	VH CDR2 aa	133	抗体	14	VH CDR1 aa
[0373]	105	抗体	11	VH CDR3 aa	134	抗体	14	VH CDR2 aa
[0374]	106	抗体	11	VL nt	135	抗体	14	VH CDR3 aa
[0375]	107	抗体	11	VL aa	136	抗体	14	VL nt
[0376]	108	抗体	11	VL CDR1 aa	137	抗体	14	VL aa
[0377]	109	抗体	11	VL CDR2 aa	138	抗体	14	VL CDR1 aa
[0378]	110	抗体	11	VL CDR3 aa	139	抗体	14	VL CDR2 aa
[0379]	111	抗体	12	VH nt	140	抗体	14	VL CDR3 aa
[0380]	112	抗体	12	VH aa	141	抗体	15	VH nt
[0381]	113	抗体	12	VH CDR1 aa	142	抗体	15	VH aa
[0382]	114	抗体	12	VH CDR2 aa	143	抗体	15	VH CDR1 aa
[0383]	115	抗体	12	VH CDR3 aa	144	抗体	15	VH CDR2 aa
[0384]	116	抗体	12	VL nt	145	抗体	15	VH CDR3 aa
[0385]	117	抗体	12	VL aa	146	抗体	15	VL nt
[0386]	118	抗体	12	VL CDR1 aa	147	抗体	15	VL aa
[0387]	119	抗体	12	VL CDR2 aa	148	抗体	15	VL CDR1 aa
[0388]	120	抗体	12	VL CDR3 aa	149	抗体	15	VL CDR2 aa
[0389]	121	抗体	13	VH nt	150	抗体	15	VL CDR3 aa
[0390]	122	抗体	13	VH aa	151	抗体	16	VH nt
[0391]	123	抗体	13	VH CDR1 aa	152	抗体	16	VH aa
[0392]	124	抗体	13	VH CDR2 aa	153	抗体	16	VH CDR1 aa

[0393]	125	抗体	13	VH CDR3 aa	154	抗体	16	VH CDR2 aa
[0394]	126	抗体	13	VL nt	155	抗体	16	VH CDR3 aa
[0395]	127	抗体	13	VL aa	156	抗体	16	VL nt
[0396]	128	抗体	13	VL CDR1 aa	157	抗体	16	VL aa
[0397]	129	抗体	13	VL CDR2 aa	158	抗体	16	VL CDR1 aa
[0398]	159	抗体	16	VL CDR2 aa	188	抗体	19	VL CDR1 aa
[0399]	160	抗体	16	VL CDR3 aa	189	抗体	19	VL CDR2 aa
[0400]	161	抗体	17	VH nt	190	抗体	19	VL CDR3 aa
[0401]	162	抗体	17	VH aa	191	抗体	20	VH nt
[0402]	163	抗体	17	VH CDR1 aa	192	抗体	20	VH aa
[0403]	164	抗体	17	VH CDR2 aa	193	抗体	20	VH CDR1 aa
[0404]	165	抗体	17	VH CDR3 aa	194	抗体	20	VH CDR2 aa
[0405]	166	抗体	17	VL nt	195	抗体	20	VH CDR3 aa
[0406]	167	抗体	17	VL aa	196	抗体	20	VL nt
[0407]	168	抗体	17	VL CDR1 aa	197	抗体	20	VL aa
[0408]	169	抗体	17	VL CDR2 aa	198	抗体	20	VL CDR1 aa
[0409]	170	抗体	17	VL CDR3 aa	199	抗体	20	VL CDR2 aa
[0410]	171	抗体	18	VH nt	200	抗体	20	VL CDR3 aa
[0411]	172	抗体	18	VH aa	201	GM-C	SFR α	线性残基序列
[0412]	173	抗体	18	VH CDR1 aa	202	人 GM-CSFR α	全长氨基酸	序列
[0413]	174	抗体	18	VH CDR2 aa	203	FLAG-	示踪人 GM-CSFR α	
[0414]	175	抗体	18	VH CDR3 aa	204	FLAG	肽	
[0415]	176	抗体	18	VL nt	205	人 GM-CSFR α	细胞外域的	
[0416]	177	抗体	18	VL aa	206	成熟 GM-CSFR α	氨基酸序列	
[0417]	178	抗体	18	VL CDR1 aa	207	抗体	1	VL nt
[0418]	179	抗体	18	VL CDR2 aa	208	抗体	1	VL aa
[0419]	180	抗体	18	VL CDR3 aa	209	抗体	2	VL nt
[0420]	181	抗体	19	VH nt	210	抗体	2	VL aa
[0421]	182	抗体	19	VH aa	211	抗体	3	VL nt
[0422]	183	抗体	19	VH CDR1 aa	212	抗体	3	VL aa
[0423]	184	抗体	19	VH CDR2 aa	213	抗体	4	VL nt
[0424]	185	抗体	19	VH CDR3 aa	237	抗体	16	VL nt
[0425]	186	抗体	19	VL nt	238	抗体	16	VL aa
[0426]	187	抗体	19	VL aa	239	抗体	17	VL nt
[0427]	214	抗体	4	VL aa	240	抗体	17	VL aa
[0428]	215	抗体	5	VL nt	241	抗体	18	VL nt
[0429]	216	抗体	5	VL aa				
[0430]	217	抗体	6	VL nt				
[0431]	218	抗体	6	VL aa				

[0432]	219	抗体	7	VL nt	242	抗体	18	VL aa
[0433]	220	抗体	7	VL aa	243	抗体	19	VL nt
[0434]	221	抗体	8	VL nt	244	抗体	19	VL aa
[0435]	222	抗体	8	VL aa	245	抗体	20	VL nt
[0436]	223	抗体	9	VL nt	246	抗体	20	VL aa
[0437]	224	抗体	9	VL aa	247	抗体	6	VH nt
[0438]	225	抗体	10	VL nt	248	抗体	6	VH aa
[0439]	226	抗体	10	VL aa	249	抗体	6	VL nt
[0440]	227	抗体	11	VL nt	250	抗体	6	VL aa
[0441]	228	抗体	11	VL aa	251	VH FR1	aa	
[0442]	229	抗体	12	VL nt	252	VH FR2	aa	
[0443]	230	抗体	12	VL aa	253	VH FR3	aa	
[0444]	231	抗体	13	VL ntp	254	VH FR4	aa	
[0445]	232	抗体	13	VL aa	255	VL FR1	aa	
[0446]	233	抗体	14	VL nt	256	VL FR2	aa	
[0447]	234	抗体	14	VL aa	257	VL FR3	aa	
[0448]	235	抗体	15	VL nt	258	VL FR4	aa	
[0449]	236	抗体	15	VL aa				

[0450] 抗体 1 ~ 20 的 VL 域核苷酸序列不包括在 SEQ ID NOS :6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186 和 196 中的 3' 末端所示的 gcg 密码子。相应地, VL 域氨基酸序列各不包括 SEQ ID NOS :7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187 和 197 中的 C 末端 Ala 残基。Ala113 残基和相应的 gcg 密码子不在抗体 1 ~ 20 中表达。书面序列与胚系片段、尤其 JL2 的对比表明 Ala 残基和相应 gcg 密码子不形成 VL 域的部分。

[0451] 112 位置处的 Gly 残基在表达的 scFv 和 IgG 序列中出现。然而, 该残基并未在形成 VL 域的框架 4 区的人胚系 j 片段序列 (如 JL2) 中出现。Gly 残基不被认为是 VL 域的部分。

[0452] 为了表达 IgG 的轻链, 编码抗体轻链的核苷酸序列被提供, 包括编码 VL 域的第一外显子、编码 CL 域的第二外显子和分隔第一外显子和第二外显子的内含子。在正常条件下, 内含子通过细胞的 mRNA 加工机制剪切掉, 从而将第一外显子的 3' 端与第二外显子的 5' 端连接。因此, 当具有所述核苷酸序列的 DNA 表达为 RNA 时, 第一和第二外显子被剪接到一起。剪接的 RNA 的翻译产生包括 VL 和 CL 域的多肽。剪接后, 在 112 位的 Gly 由 VL 域框架 4 序列的最后一个碱基和 CL 域的前两个碱基编码。

[0453] 抗体 1 ~ 20 的 VL 域序列为如上所示的 SEQ ID NOS :186 ~ 246。VL 域核苷酸序列以作为最终密码子的 eta 结束, 并且 Leu 为相应的 VL 域氨基酸序列中的最终氨基酸残基。

[0454] 除以 SEQ ID NOS :51、52、56、57、216 和 217 表示的胚系 VH 和 VL 域序列外, 抗体 6 的非胚系 VH 和 VL 域序列在 SEQ ID NOS :247 ~ 250 中显示。

[0455] 参考文献

[0456] 在该公开内容中提及的所有文献都通过引用被包含于此。

- [0457] 1 Haman 等, Journal of Biological Chemistry 274(48) :34155-34163 1999
- [0458] 2 Nicola NA ;Wycherley A ;Boyd AW ;Layton JE ;Cary D ;Metcalf D Blood, 82(6)p1724-31(1993)
- [0459] 3 Plückthun, A. Bio/Technology 9 :545-551(1991)
- [0460] 4 Chadd HE 和 Chamow SM(2001)Current Opinion inBiotechnology 12 :188-194
- [0461] 5 Andersen DC 和 Krummen L(2002)Current Opinion inBiotechnology 13 :117
- [0462] 6 Larrick JW 和 Thomas DW(2001)Current Opinion inBiotechnology 12 : 411-418
- [0463] 7 Sambrook 和 Russell, Molecular Cloning :a Laboratory Manual :3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [0464] 8 Ausubel 等编辑, Short Protocols in Molecular Biology :ACompendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 第4版 1999
- [0465] 9Wold 等 Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry(编 辑 :B.Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN90-277-1846-6)
- [0466] 10 Norman 等 Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience ; 第3版 (April1998) ISBN :0471170828
- [0467] 11 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-AssistedReasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May11, 1995), ISBN :0133418847
- [0468] 12 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis :AUser ' s Perspective(Oxford Statistical Science Series, No22(Paper)). Oxford University Press ; (December 2000), ISBN :0198507089
- [0469] 13 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining :Practical MachineLearning Tools and Techniques with Java Implementations. MorganKaufmann ; (October11, 1999), ISBN :1558605525
- [0470] 14 Denison David G. T. (编者), Christopher C. Holmes, Bani K.
- [0471] 15 Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. CombinatorialLibrary Design and Evaluation Principles, Software, Tools, andApplications in Drug Discovery. ISBN :0-8247-0487-8
- [0472] 16 Chothia C. 等 Journal Molecular Biology(1992)227, 799-817
- [0473] 17 Al-Lazikani 等 Journal Molecular Biology(1997)273(4) , 927-948
- [0474] 18 Chothia 等 Science, 223, 755-758(1986)
- [0475] 19 Whitelegg, N. R. u. 和 Rees, A. R(2000). Prot. Eng. , 12, 815-824
- [0476] 20 Guex, N. 和 Peitsch, M. C. Electrophoresis(1997) 18, 2714-2723
- [0477] 21 Voet & Voet, Biochemistry, 第2版, (Wiley) 1995.
- [0478] 22 Marks 等 Bio/Technology, 1992, 10 :779-783
- [0479] 23 Kay, B. K. , Winter, J. , 和 McCafferty, J. (1996) Phage Displayof Peptides and Proteins :A Laboratory Manual, San Diego :AcademicPress.

- [0480] 24 Stemmer, Nature, 1994, 370 :389-391
- [0481] 25 Gram 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89 :3576-3580
- [0482] 26 Barbas 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91 :3809-3813
- [0483] 27 Schier 等, 1996, J. Mol. Biol. 263 :551-567
- [0484] 28 Ledermann J. A. 等 (1991) Int. J. Cancer 47 :659-664
- [0485] 29 Bagshawe K. D. 等 (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 :915-922
- [0486] 30 Robinson, J. R. 编辑, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- [0487] 31 Ritz, S. A., M. J. Cundall 等 (2002). Am J Respir Cell Mol Biol 27(4) : 428-35.
- [0488] 32 Ritz, S. A., M. R. Stampfli, 等 (2002). Trends Immunol 23(8) :396-402.
- [0489] 33 Woolley, K. L. 等 (1995). Am J Respir Crit Care Med, 151, 1915-24.
- [0490] 34 Kotsimbos, A. T., M. Humbert 等 (1997). J Allergy Clin Immunol 99(5) : 666-72.
- [0491] 35 Yamashita N. 等, Cell. Immunol 2002 oct ;219(2) ;92-97
- [0492] 36 Ohta K. 等 J Allergy Clin Immunol. 1999 Nov ;104(5) :1024-30
- [0493] 37 Stampfli, M. R., R. E. Wiley 等 (1998). J Clin Invest 102(9) :1704-14.
- [0494] 38 Gates, E. C, B. U. Gajewska 等 (2003). J Allergy Clin Immunol 111(5) : 1076-86.
- [0495] 39 Campbell, I. K. 等 (1997) Annal Res Dis, 56, 364-368.
- [0496] 40 BISCHOF, R. J., D. ZAFIROPOULOS, J. A. HAMILTON 和 I. K. CAMPBELL (2000) Clin Exp Immunol, 119, 361-367.
- [0497] 41 Campbell, I. K., M. J. Rich 等 (1998). J Immunol 161(7) :3639-44.
- [0498] 42 Hamilton, J. A. (2002). Trends Immunol 23(8) :403-8.
- [0499] 43 Yang, Y. H. 和 J. A. Hamilton (2001) Arthritis Rheumatol, 44, 111-119
- [0500] 44 Cook, A. D., E. L. Braine 等 (2001). Arthritis Res 3(5) :293-8.
- [0501] 45 Field, M. 和 L. Clinton (1993). The Lancet 342 :1244.
- [0502] 46 Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990 J. Immunol May 1 ;144(9) : 3347-53
- [0503] 47 Leizer T 等 1990 Blood 1990 Nov 15 ;76(10) :1989-96
- [0504] 48 Fiehn C 等, Z Rheumatol 1992 May-Jun ;51(3) :1221-126
- [0505] 49 de Vries, E. G. 等 (1991) Lancet, 338, 517-518.
- [0506] 50 Hazenberg BP 等 Blood 1989 Dec ;74(8) :2769-70
- [0507] 51 Barnes 和 Hansel (2004). Lancet, 364 :985-96.
- [0508] 52 Barnes, P. J. (2000). Chest, 117 :10S-14S
- [0509] 53 McManus, T. E. 等 (2005) American Thoracic Society Meeting, May 2005.
- [0510] 54 Vlahos, R. 等 (2005). " GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD. " European Respiratory Society Meeting, Sept 2005

- [0511] 55 McQualter JL 等 (2001) J Exp Med. 194 :873-82
- [0512] 56 Bagby GC Jr 等 1988 J Clin Invest. 4 :1430-6.
- [0513] 57 Estrov Z 等 (1986) Cancer Res. 46 :6456-61.
- [0514] 58 Barak Y 等 1981 Am J Hematol. 10 :269-75.
- [0515] 59 Gualtieri RJ 等 1988 Exp Hematol. 16 :613-9.
- [0516] 60 Suda T 等 1982 Leuk Res. 6 :43-53.
- [0517] 61 Gualtieri RJ 等 1989 Blood. 74 :2360-7
- [0518] 62 Largaespada DA 等 (1996) Nat. Genet. 12 :137-43
- [0519] 63 Iversen, P. O. 等 (1997). Blood 90(12) :4910-7.
- [0520] 64 Wang 等, 1994 Exp mol Pathol
- [0521] 65 Plenz 等, Art. Thrombosis and Vascular biology 1997
- [0522] 66 Takashi 等, 1996 Circulation 93, 1185-1193
- [0523] 67 Biwa T 等, JBC 1998 273 :28305-28313
- [0524] 68 Makheja 等, Atherosclerosis 1989, 76 155-661
- [0525] 69 Naito 等, 1992 J Nutri sci Vitamin 38 :255-264
- [0526] 70 Hayashi 等, Atherosclerosis 1991 91 :107-116
- [0527] 71 Villa 等 1994 J Clin Invest 93 :1243
- [0528] 72 Van Put DJ 等, 1995 Eur J Pharmacol 294 :753-761
- [0529] 73 Voisard 等, 1994 Int J Cardiol 43 :257-267
- [0530] 74 Yamada 等, 1993 :Artery 20 :253-267
- [0531] 75 Sakai 等, 1999 Arterioscler Thromb vase biol 19 :1726-1733
- [0532] 76 Gearing 等 EMBO J. 8(12) :3667-3676(1989)
- [0533] 77 Crosier, K. 等 PNAS 88 :7744-7748 1991
- [0534] 78 Raines, M. 等 PNAS 88 :8203-8207 1991
- [0535] 79 Wess, L. In : BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004
- [0536] 80 Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5) :A1-A6
- [0537] 81 Koide 等 (1998) Journal of Molecular Biology, 284 :1141-1151.
- [0538] 82 Nygren 等 (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7 :463-469
- [0539] 83 Kontermann, R & Dubel, S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC ; 2001, ISBN :3540413545
- [0540] 84 Mendez, M. 等 (1997) Nature Genet, 15(2) :146-156
- [0541] 85 Knappik 等 J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86
- [0542] 86 Krebs 等 Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84
- [0543] 87 Ward, E. S. 等, Nature 341, 544-546 (1989)
- [0544] 88 McCafferty 等 (1990) Nature, 348, 552-554
- [0545] 89 Holt 等 (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490
- [0546] 90 Bird 等, Science, 242, 423-426, 1988 ;
- [0547] 91 Huston 等, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988

- [0548] 92 Holliger, P. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993
- [0549] 93 Reiter, Y. 等, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996
- [0550] 94 Hu, S. 等, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996.
- [0551] 95 Holliger, P. 和 Winter G. Current Opinion Biotechnol 4, 446-449 1993
- [0552] 96 Ridgeway, J. B. B. 等, Protein Eng., 9, 616-621, 1996
- [0553] 97 Ann N Y Acad Sci. 1971 Dec 31, 190 :382-93.
- [0554] 98 Kabat, E. A. 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第4版
US Department of Health and Human Services. 1987
- [0555] 99 Kabat, E. A. 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,
第5版 US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
- [0556] 100 Persic 等 1997 Gene 187 :9-18
- [0557] 101 Hanes J 等 (2000) Methods in Enzymology, Vol 328 :24.
- [0558] 102 Vaughan TJ 等 (1996) Nature Biotechnology Vol 14 :309
- [0559] 103 Sloodstra-JW ; Puijk-WC ; Ligtoet-GJ ; Langeveld-JP ; Melen-RH (1996).
Mol-Divers. 1 :87-96
- [0560] 104 W001/66754 Cambridge Antibody Technology Limited ; Vaughan ; Wilton ;
Smith ; Main
- [0561] 105 P. K. Smith, 等, Anal. Biochem. 150 (1985), pp. 76-85
- [0562] 106 S. Mizushima 和 S. Nagata Nucleic Acids Research, Vol 18 ; No 17 1990 pp
5322
- [0563] 107 Clin Haematol. 1979 Jun ; 8(2) :263-85. Metcalf D.
- [0564] 108 Nishijima, I., T. Nakahata, 等 (1997). Blood 90 (3) :1031-8.

序列表

<110> 医学免疫有限公司 深思操作有限公司

E • S • 科汉

R • R • 明特

P • R • 哈里森

M • A • 斯利曼

A • D • 纳什

L • J • 法布里

<120>GM-CSF 受体结合元件

<130>HMK/CP6442578

<140>PCT/GB2007/001108

<141>2007-03-27

<150>US 60/786569

<151>2006-03-27

<160>258

<170>Cambridge Antibody Technology patent software version 1.0

<210>1

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>1

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaag ttcccgata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacagget	120
cccggaaaag gacttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac	240
atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg	300
tctttcagtg gcatcgccata tcgcccctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcctca	360

<210>2

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>2

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

<210>3

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>3

Glu	Leu	Ser	Ile	His
			5	

<210>4

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>4

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>5

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>5

Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro

5

10

<210>6

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>6

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cageccccaa actcctcattc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggtc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcacg	300
attttcggcg gagggaccaa gctcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>7

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>7

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

Ala

<210>8

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>8

Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Pro	Tyr	Asp	Val	Ser
			5										10

<210>9

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>9

Hi sAsn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>10

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>10

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Ile

5

10

<210>11

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>11

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tccttcagtg	gccccgccct	gcgccccctg	ggcaaaggga	caatgggtcac	cgtctcgagt	360

<210>12

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>12

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

<210>13

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>13

Glu	Leu	Ser	Ile	His
				5

<210>14

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>14

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>15

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>15

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro

5

10

<210>16

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>16

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggtc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcc 339

<210>17

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>17

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

<210>18

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>18

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>19

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>19

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>20

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>20

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>21

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>21

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tccttcagtg	gctgggcctt	tgactactgg	ggcaaaggga	caatgggtcac	cgtctcgagt	360

<210>22

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>22

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

<210>23

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>23

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>24

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>24

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>25

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210>26

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>26

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcacgctc ctaggtgcg	339

<210>27

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>27

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

<210>28

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>28

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>29

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>29

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>30

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>30

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>31

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>31

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa ttcccgga cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccccgacctt cgggtactgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210>32

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>32

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

<210>33

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>33

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>34

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>34

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>35

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>35

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr

5

10

<210>36

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>36

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcacctatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actctcctc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210>37

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>37

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

<210>38

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>38

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>39

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>39

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>40

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>40

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>41

<211>3b0

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>41

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtg	gctaccctta	ccgcccgtgg	ggccaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>42

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>42

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

<210>43

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>43

Glu Leu Ser Ile His

5

<210>44

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>44

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

	5	10	15
Gly			
<210>45			
<211>11			
<212>PRT			
<213>Homo sapiens			
<220>			
<223>Ab5			
<400>45			
Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro			
	5	10	
<210>46			
<211>339			
<212>DNA			
<213>Homo sapiens			
<220>			
<223>Ab5			
<400>46			
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc			60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcacctatg atgtaagctg gtaccagcag			120
cttcaggaa cagccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc			180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc			240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg			300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg			339
<210>47			
<211>113			
<212>PRT			
<213>Homo sapiens			
<220>			
<223>Ab5			
<400>47			

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

<210>48

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>48

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>49

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>49

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>50

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>50

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>51

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>51

caggtccagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaag	tttccggata	cacctcact	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacaggct	120
cccggaaaag	gacttgagtg	gatgggagga	tttgatcetg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctacaga	cacggcctac	240
atggaactga	gcagcctgag	atccgaggac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	ccttgacctt	gggcctctgg	ggccaaggga	caatggtcac	cgtctcctca	360

<210>52

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>52

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

5

10

15

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

<210>53

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>53

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>54

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>54

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly

<210>55

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>55

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

5

10

<210>56

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>56

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtgcg 339

<210>57

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>57

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro

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

Ala

<210>58

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>58

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser

5

10

<210>59

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>59

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>60

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>60

Ala Thr Val Glu Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>61

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>61

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg	300
tctttcagtg gccccgtgta cggcctctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt	360

<210>62

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>62

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35

40

45

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

<210>63

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>63

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>64

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>64

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly

<210>65

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>65

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu

5

10

<210>66

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>66

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>67

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>67

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro

20

25

30

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

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

<210>68

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>68

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>69

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>69

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>70

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>70

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>71

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>71

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	ccccggccta	ccgcccctgg	ggcaaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>72

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>72

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>73

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>73

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>74

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>74

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly

<210>75

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>75

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

5

10

<210>76

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>76

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcacct tatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cagccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtgga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtaaccgtc ctaggtgag	339

<210>77

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>77

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro

20

25

30

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50

55

60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110
Ala

<210>78

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>78

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>79

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>79

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>80

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>80

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
5 10

<210>81

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>81

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	cggtcacgta	cggcctctgg	ggccaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>82

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>82

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>83

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>83

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>84

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>84

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210>85

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>85

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
5 10

<210>86

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>86

caggetgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>87

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>87

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

<210>88

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>88

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser

5

10

<210>89

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>89

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>90

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>90

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>91

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>91

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtg	gcctcgcgta	caggccctgg	ggcaaaggga	caatggtcac	catctcgagt	360

<210>92

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>92

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

<210>93

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>93

Glu Leu Ser Ile His

5

<210>94

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>94

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>95

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>95

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro

5

10

<210>96

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>96

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cageccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>97

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>97

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

<210>98

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>98

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser

5

10

<210>99

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>99

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>100

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>100

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>101

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>103

Glu Leu Ser Ile His

5

<210>104

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>104

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>105

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>105

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

5

10

<210>106

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>106

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttcaggaa cageccccc aaactcctc tctcataaca acaagcggcc ctcaggggtc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg      300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg                                339

```

<210>107

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>107

```

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

```

Ala

<210>108

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>108

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser

5

10

<210>109

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>109

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>110

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>110

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>111

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>111

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc

60

tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tctttcagtg	gctgggcctt	tgactactgg	ggcaaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>112

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>112

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

<210>113

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>113

Glu Leu Ser Ile His

5

<210>114

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>114

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>115

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>115

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210>116

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>116

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

```

cttccaggaa cagcccccaa actctctate tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcttc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
cgcttcgggg gagggacca gctcaccgtc ctaggtgcg 339

```

<210>117

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>117

```

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

```

<210>118

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>118

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>119

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>119

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>120

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab12

<400>120

Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
5 10

<210>121

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>121

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa ttcccgga cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg	300

5

<210>124

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>124

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>125

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>125

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210>126

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>126

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggtg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cageccccaa actcctcatt tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc 300
gtcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210>127

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>127

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

<210>128

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>128

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>129

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>129

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>130

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>130

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Thr Gly Ile Ile Val

5

10

<210>131

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>131

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatattgggg	300
agcgtgaccg cctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt	360

<210>132

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>132

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

<210>133

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>133

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>134

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>134

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>135

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>135

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210>136

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>136

caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120
cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcadc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcaggggtc	180
cctgaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactgggctc	240
caggctgacg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagcgagga	caggatgacg	300
gagttcgggg	gagggaccaa	ggtcaccgtc	ctaggtgcg			339

<210>137

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>137

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

<210>138

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>138

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210>139

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>139

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>140

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>140

Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Asp Arg Met Thr Glu

5

10

<210>141

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>141

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagccggg	300
agcatccccc	gctgggcctt	tgactactgg	ggcaaaggga	caatgggtcac	cgtctcgagt	360

<210>142

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>142

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

<210>143

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>143

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>144

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>144

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>145

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>145

Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210>146

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>146

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cagccccaa actcctcattc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggtc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc	300
gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>147

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>147

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

<210>148

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>148

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>149

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>149

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>150

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>150

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Leu Ile Ser Ala Ala

5

10

<210>151

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>151

caggtgcagc tgggtcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagt gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg	300
tccttcagtc cgttgacat gggcctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt	360

<210>152

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>152

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

<210>153

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>153

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>154

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>154

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>155

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>155

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

5

10

<210>156

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>156

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggtg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggtga ttattactgc ggcacctccg acgagatcct gagtggttcg 300

gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210>157

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>157

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

Ala

<210>158

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>158

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>159

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>159

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>160

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>160

Ala Thr Ser Asp Glu Ile Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>161

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>161

cagggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	ccctgacgat	ggggttgtgg	ggcaaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>162

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>162

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

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

<210>163

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>163

Glu Leu Ser Ile His

5

<210>164

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>164

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>165

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>165

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

5

10

<210>166

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>166

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc ggcaccgtcg aggacggcct gagggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>167

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>167

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro

20

25

30

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

<210>168

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>168

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>169

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>169

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>170

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab17

<400>170

Ala Thr Val Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>171

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>171

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgttca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aacagtgggg	300
tctttcagtg ggcccgcct tcacctctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt	360

<210>172

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>172

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20

25

30

Phe Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe

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

<210>173

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<100>173

Glu Leu Phe Ile His

5

<210>174

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>174

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210>175

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>175

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu

5

10

<210>176

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>176

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcacctatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagccagtg gaaccagccc	300
ctcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg	339

<210>177

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>177

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

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

<210>178

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>178

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>179

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>179

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>180

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab18

<400>180

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Trp Asn Gln Pro Leu

5

10

<210>181

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>181

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggttccagggcag	agtcaccat	g	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctgtcagtc	gcatacagta	cggcttctgg	ggcaaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210>182

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>182

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>183

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>183

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>184

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>184

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210>185

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>185

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe
5 10

<210>186

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>186

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccggaa cccccacgtc	300
atcttcgggg gagggaccaa gctcacgctc ctaagtgcg	339

<210>187

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>187

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

Asn Pro His Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
100 105 110

Ala

<210>188

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>188

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210>189

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>189

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210>190

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab19

<400>190

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Asn Pro His Val Ile
5 10

<210>191

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<4400>191

caggtgcagc tgggtcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg	300
tctttcagtc ccctgacgct gggcctctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt	360

<210>192

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>192

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>193

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>193

Glu Leu Ser Ile His
5

<210>194

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>194

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly

<210>195

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>195

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
5 10

<210>196

<211>339

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>196

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgaggccct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaagtgcg	339

<210>197

<211>113

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>197

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

<210>198

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>198

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser

5

10

<210>199

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>199

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210>200

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>200

Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210>201

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>201

Tyr Leu Asp Phe Gln

5

<210>202

<211>385

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>202

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro

20 25 30

Ala Ser Ser Leu Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser

35 40 45

Trp Asp Cys Gln Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp

50 55 60

Lys Lys Asn Arg Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser

65 70 75 80

Cys Thr Phe Arg Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val

85 90 95

His Val Asn Thr Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro

100 105 110

Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile

115 120 125

Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala

130 135 140

Pro Arg Asp Val Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg

145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val

165 170 175

Gly Cys His Leu Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe

180 185 190

Leu Val Asn Gly Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser

195 200 205

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

<210>203

<211>316

<212>PRT

<213>Homo Sapiens

<220>

<223>Human sequence with FLAG tag

<400>203

Ala Ser Ile Ser Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
 1 5 10 15
 Arg Gln Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu
 20 25 30
 Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln

35	40	45
Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg		
50	55	60
Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg		
65	70	75
Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr		
85	90	95
Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg		
100	105	110
Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp		
115	120	125
Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val		
130	135	140
Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg		
145	150	155
Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu		
165	170	175
Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly		
180	185	190
Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr		
195	200	205
Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys		
210	215	220
Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln		
225	230	235
Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys		
245	250	255
Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp		
260	265	270
Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His		
275	280	285
Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser		
290	295	300
Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly		
305	310	315

<210>204

<211>8

<212>PRT

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic FLAG peptide

<400>204

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210>205

<211>298

<211>PRT

<213>Homo sapiens

<400>205

Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val

1

5

10

15

Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn

20

25

30

Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val

35

40

45

Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile

50

55

60

Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln

65

70

75

80

Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg Glu Gly

85

90

95

Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met

100

105

110

Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val Gln Tyr

115

120

125

Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg Cys Pro

130

135

140

Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu Asp Asn

145

150

155

160

Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly Thr Ser

165

170

175

Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr Lys Lys

180

185

190

Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys Asn Thr

195	200	205
Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln Lys Leu		
210	215	220
Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys Asn Thr		
225	230	235
Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp Leu Glu		
245	250	255
Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His Ser Val		
260	265	270
Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser Trp Ser		
275	280	285
Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly		
290	295	

<210>206

<211>378

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>206

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

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

<210>207

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>207

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cageccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgagg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcacg	300
attttcggcg gagggaccaa gctcaccgtc cta	333

<210>208

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab1

<400>208

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

<210>209

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>209

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cageccccaa actcctcctc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggetga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg      300
gttttcggcg gagggacca ggtcaccgtc cta                                     333

```

<210>210

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab2

<400>210

```

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

```

<210>211

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>211

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cageccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggtc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>212

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab3

<400>212

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

<210>213

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>213

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cageccccaa actcctcctc tctcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>214

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab4

<400>214

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

<210>215

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>215

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cageccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>216

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab5

<400>216

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

<210>217

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>217

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cageccccaa actctcctc ttcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgacegat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtgggtcg	300
gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta	333

<210>218

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab6

<400>218

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

<210>219

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>219

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cageccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>220

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab7

<400>220

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

<210>221

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>221

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cagccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgct cta	333

<210>222

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab8

<400>222

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

<210>223

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>223

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>224

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab9

<400>224

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

<210>225

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>225

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttcaggaa cagccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcacgctc cta	333

<210>226

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab10

<400>226

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

<210>227

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>227

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>228

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab11

<400>228

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

100	105	110
<210>229 <211>333 <212>DNA <213>Homo sapiens <220> <223>Ab12 <400>229 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60 tcctgtactg ggagcggctc caacatcgga gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300 cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333		
<210>230 <211>111 <212>PRT <213>Homo sapiens <220> <223>Ab12 <400>230 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln 5 10 15 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro 20 25 30 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu 35 40 45 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe 50 55 60 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu 65 70 75 80 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu 85 90 95		

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

<210>231

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>231

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc 300
 gtcttcgggg gagggaccaa ggtcacctgc cta 333

<210>232

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab13

<400>232

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

	85	90	95
Thr Gly Ile Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu			
	100	105	110

<210>233

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>233

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg	300
gagttcgggg gagggaccaa ggtcacgctc cta	333

<210>234

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab14

<400>234

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

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95
 Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210>235

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>235

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc 300
 gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210>236

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab15

<400>236

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

65	70	75	80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln			
	85	90	95
Leu Ile Ser Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu			
100	105	110	

<210>237

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>237

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgacctccg acgagatcct gagtgggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcacctgc cta	333

<210>238

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab16

<400>238

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

150

151

152

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

<210>245

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>245

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggetgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgaggccct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta	333

<210>246

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab20

<400>246

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
5	10
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
20	30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
35	45

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

<210>247

<211>360

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6 Non Germlined

<400>247

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttcccggaaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtc cgctaacgtt gggcctctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>248

<211>120

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6 Non Germlined

<400>248

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

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

<210>249

<211>333

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6 Non Germlined

<400>249

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc ggcacggctg aggccggcct gactgggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa gtcaccgtc cta	333

<210>250

<211>111

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6 Non Germlined

<400>250

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

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

<210>251

<211>30

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>251

Gln Val Gln Leu Val Gln Set Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
5 10 15
Set Val Lys Val Set Cys Lys Val Set Gly Tyr Thr Leu Thr
20 25 30

<210>252

<211>14

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>252

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210>253

<211>32

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>253

Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile

20

25

30

<210>254

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>254

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

5

10

<210>255

<211>22

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>255

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210>256

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>256

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
5 10 15

<210>257

<211>32

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>257

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
5 10 15
Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210>258

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Ab 6

<400>258

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
5 10

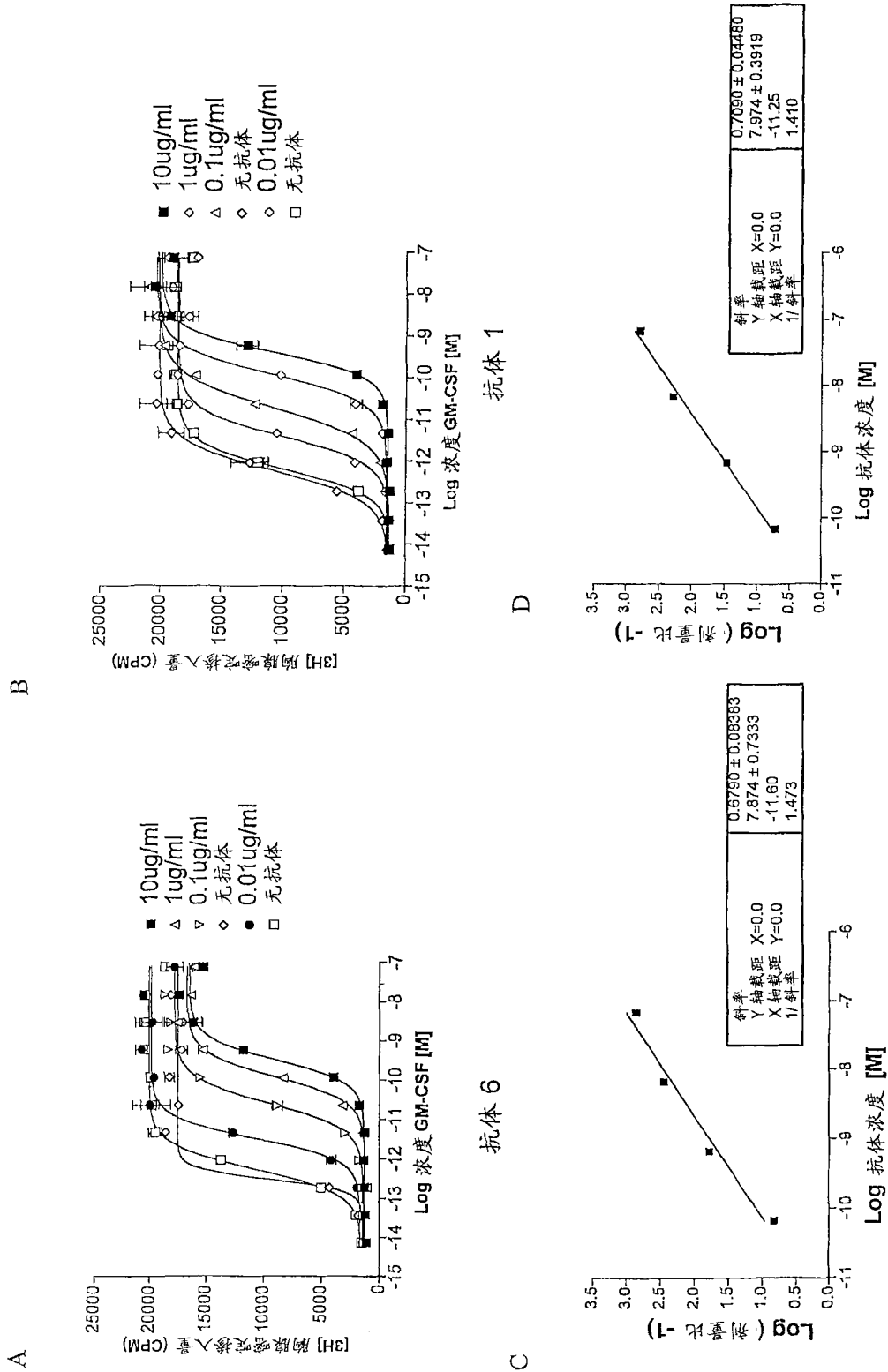


图 1

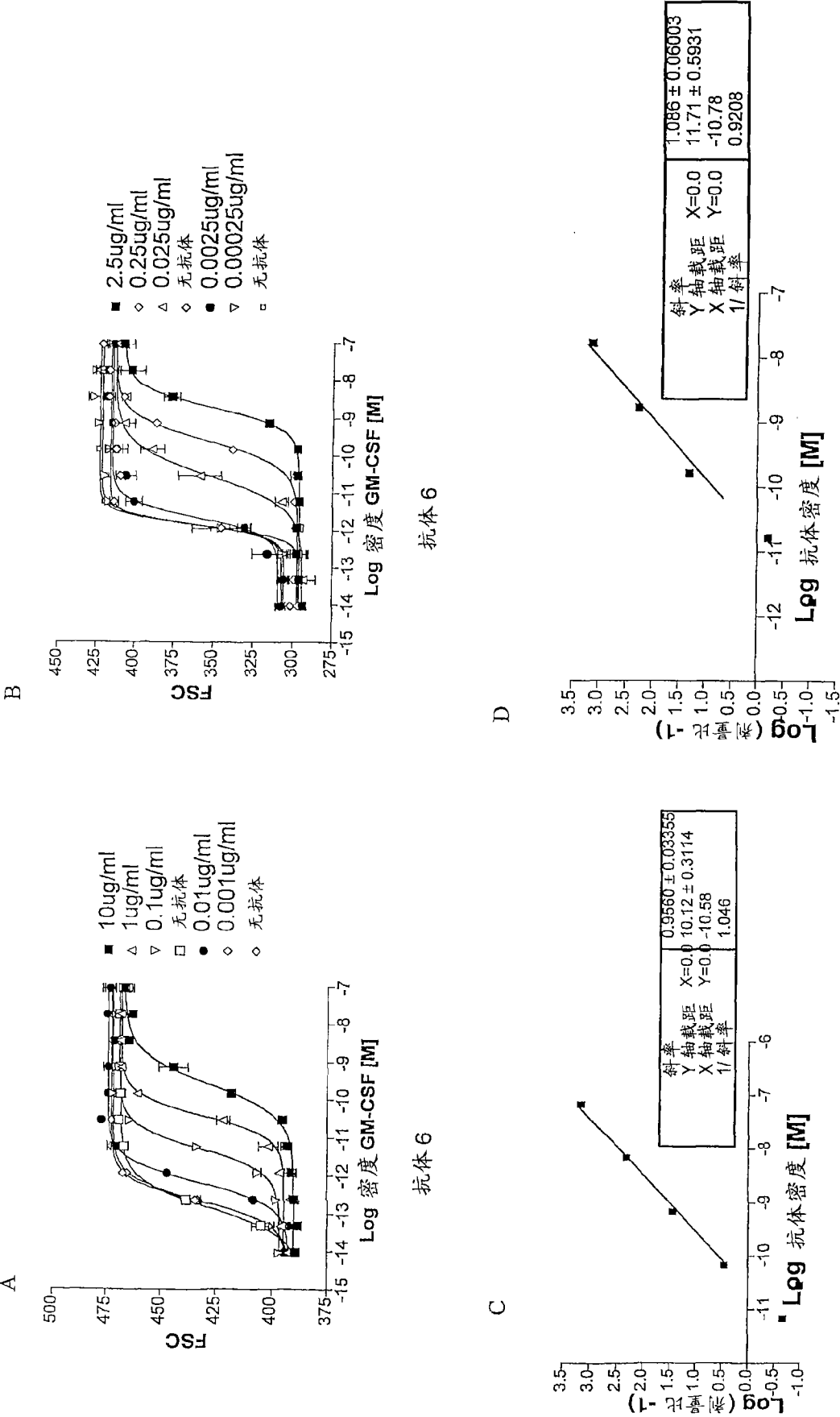


图 2

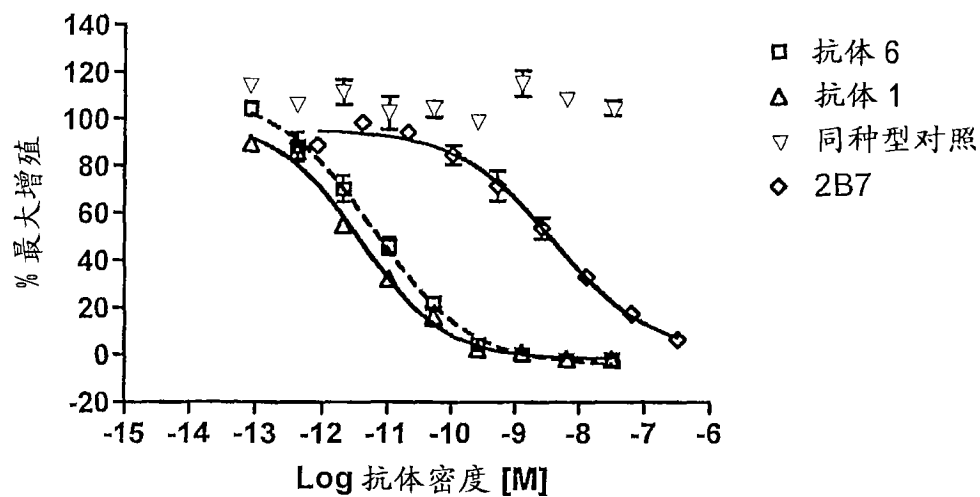


图 3

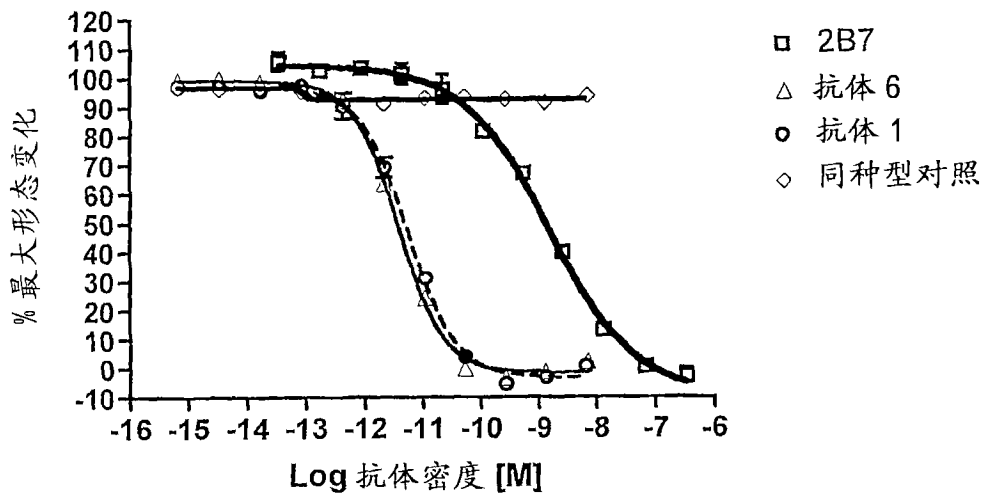


图 4

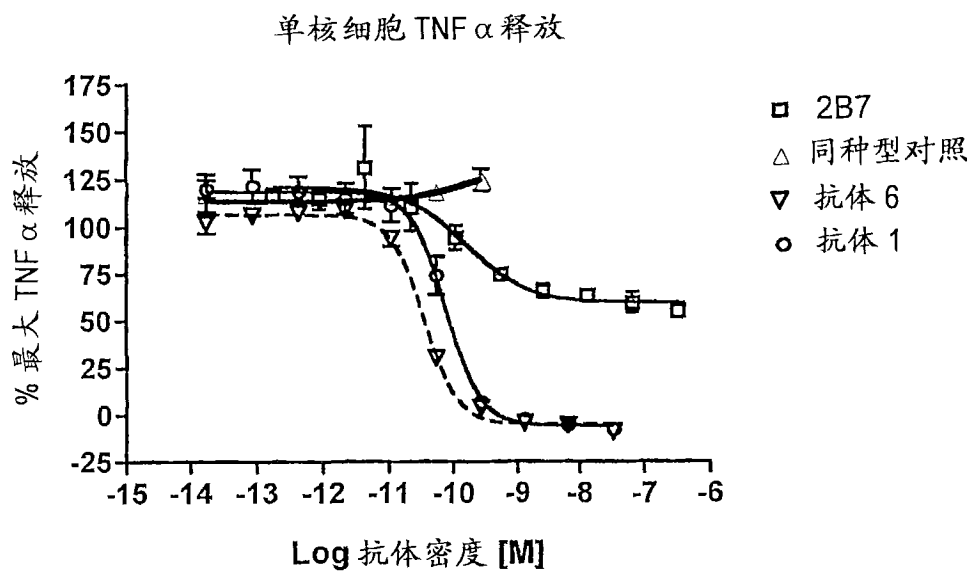


图 5

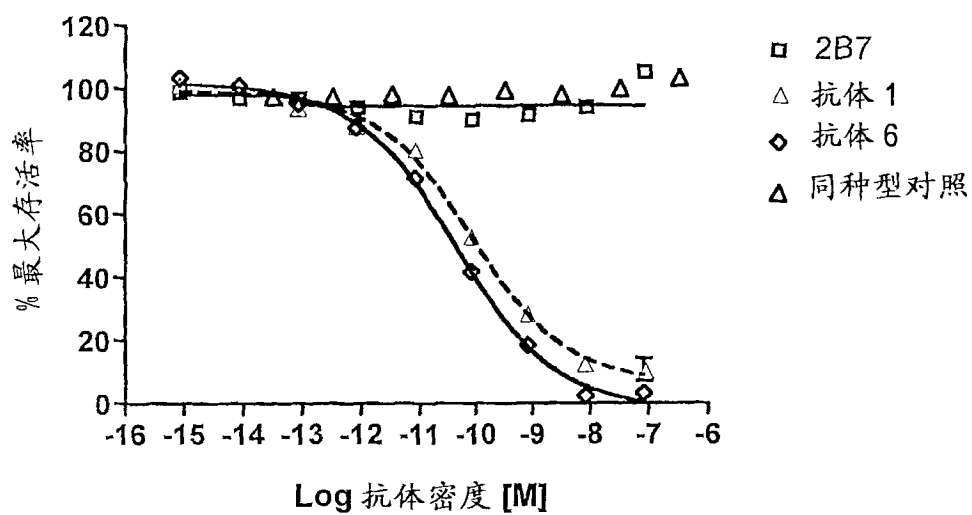


图 6

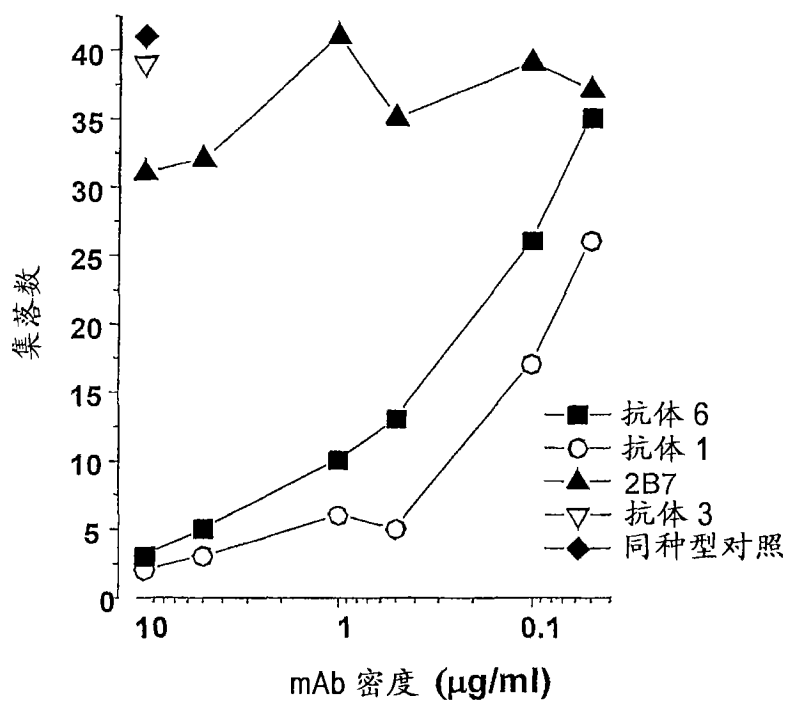


图 7

作为体重百分比的脾重量
2 x 500 ng hGMCSF, 测试 mAb 的滴定 (1 次注射)

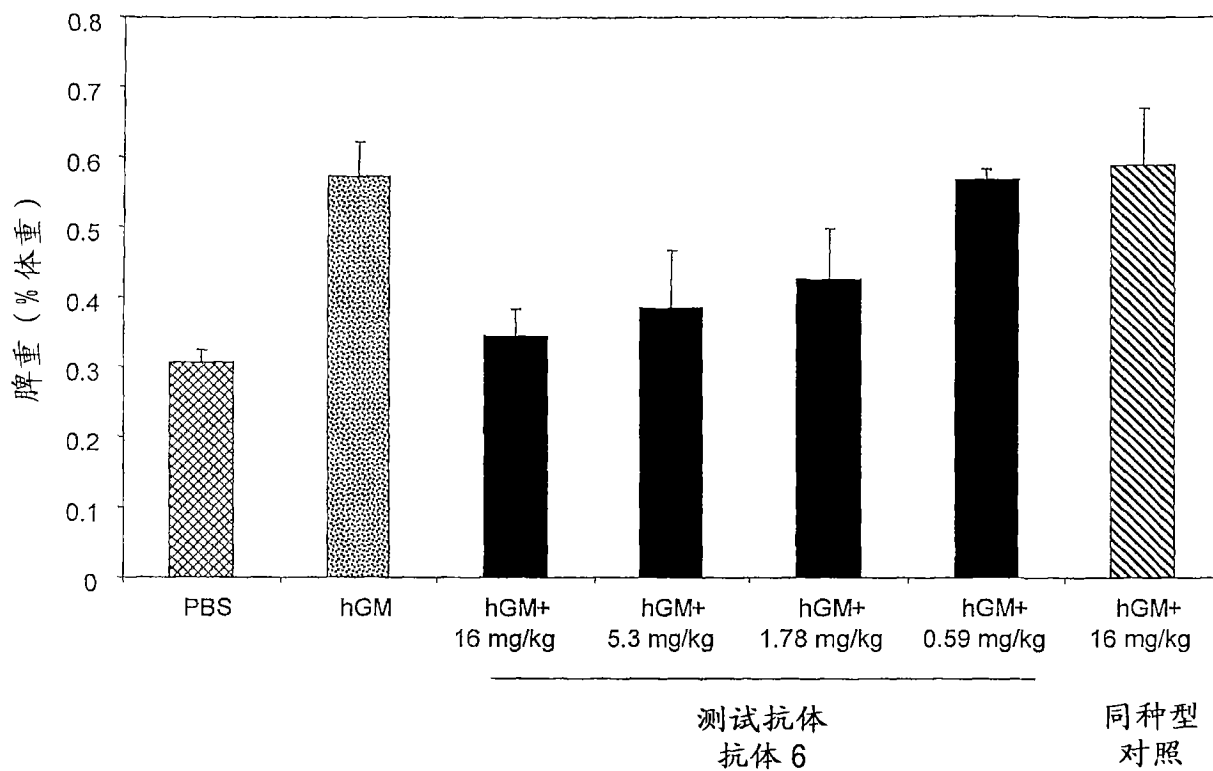
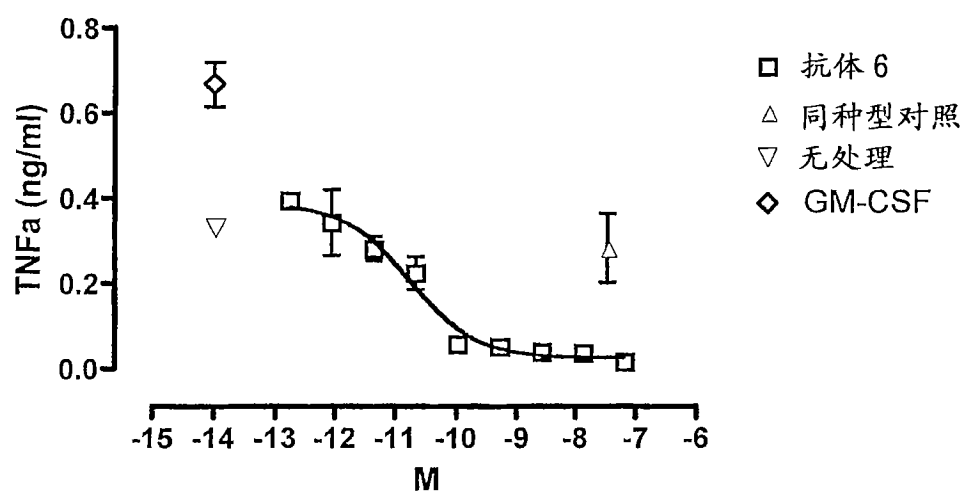


图 8

A



B

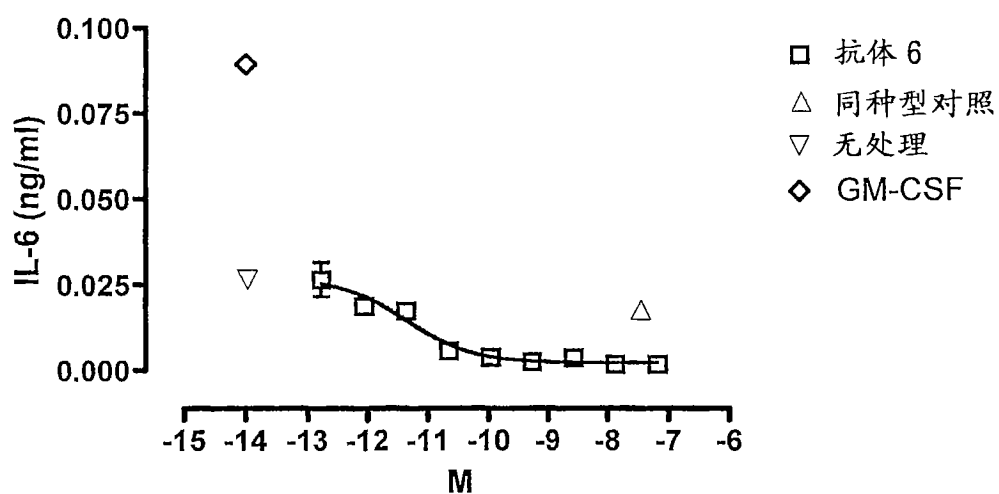


图 9