(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115151309 A
(43)申请公布日 2022.10.04

(21)申请号 202080095475.7
(22)申请日 2020.12.04
(30)优先权数据
19306583.6 2019.12.05 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/084770 2020.12.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/110990 EN 2021.06.10
(71)申请人 OSE免疫疗法
地址 法国南特市
申请人 南特大学 国立卫生和医学研究所
(72)发明人 E·希福洛 N·普瓦里耶 A·德塞勒 V·特普尼尔 C·马里 V·高铁尔 S·庞甘
(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300
专利代理师 杜娟
(51)Int.Cl.
*A61P 35/00*(2006.01)
*C07K 16/28*(2006.01)

权利要求书5页 说明书40页
序列表60页 附图14页

(54)发明名称

抗CLEC-1A抗体及其抗原结合片段

(57)摘要

本发明涉及免疫治疗领域。本发明提供了新型特异性抗CLEC-1A化合物、特别是抗体。本发明的化合物能够特异性结合CLEC-1A受体并拮抗CLEC-1A与其内源性配体的结合。本发明化合物的用途可用于治疗有害病况。

CN 115151309 A

1.抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段包含:

•抗体重链可变结构域,所述抗体重链可变结构域包含三个VHCDR,其中,VHCDR的氨基酸序列分别选自:

-SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:97的VHCDR1,特别是SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97的VHCDR1;

-SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:91的VHCDR2,特别是SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83的VHCDR2;和

-SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:93的VHCDR3,特别是SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85的VHCDR3;以及

•抗体轻链可变结构域,所述抗体轻链可变结构域包含三个VLCDR,其中,VLCDR的氨基酸序列选自:

-SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:36的VLCDR1,特别是SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28的VLCDR1;

-SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:38的VLCDR2,特别是SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30的VLCDR2;和

-SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:40的VLCDR3,特别是SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32的VLCDR3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个CDR结构域、特别是6个CDR结构域,所述CDR结构域选自:

-VHCDR1,所述VHCDR1包含或由SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列组成;

-VHCDR2,所述VHCDR2包含或由SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列组成;和

-VHCDR3,所述VHCDR3包含或由SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列组成;以及

-VLCDR1,所述VLCDR1包含或由SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成;

-VLCDR2,所述VLCDR2包含或由SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成;和

-VLCDR3,所述VLCDR3包含或由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成。

3.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段拮抗人CLEC-1A的胞外域与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞的结合和/或与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞的细胞内容物的结合,特别地拮抗融合蛋白与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞的结合和/或与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞的细胞内容物的结合,所述融合蛋白包含与人免疫球蛋白、特别是人IgG的Fc片段融合的人CLEC-1A受体的胞外域。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体重链可变结构域包含序列如下的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3:

-分别为SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:61;或

-分别为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:69;或

-分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77;或

-分别为SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:85;或

-分别为SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:93;或

-分别为SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体轻链可变结构域包含序列如下的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3:

-分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8;或

-分别为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16;或

-分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24;或

-分别为SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32;或

-分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(a)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:61的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3;或

(b)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:69的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3;或

(c)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3;或

(d)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:85的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3;或

(e)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:93的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3;或

(f)所述抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,所述抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗

原结合片段包含或由如下组成：

-包含或由SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

-包含或由SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

-包含或由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

-包含或由SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

-包含或由SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

-包含或由SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;

-更特别地,所述重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成;或者,所述重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成;或者,所述重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体为重组抗体、嵌合抗体或人源化抗体,特别是包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区的抗体。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段以至少1E-07M、特别是至少1E-08M的亲和力常数(KD)结合人CLEC-1A。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关,特别是与阴性对照相比对肿瘤细胞的吞噬作用增加至少10％。

13.核酸分子或核酸分子组合,所述核酸分子或核酸分子组合编码包含或由权利要求1至11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段组成的多肽,所述核酸分子或核酸分子组合包含选自如下的至少一种核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90、SEQ ID DNo:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98和/或SEQ ID NO:99,所述核酸分子或核酸分子组合编码权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的至少6个CDR结构域。

14.化合物组合,所述化合物组合包含第一治疗剂和至少一种第二治疗剂,其中：

i)第一治疗剂是权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;或

第一治疗剂是如下的抗体或其抗原结合片段:

所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:71组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:18组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:121组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:128组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂;或

所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:63组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:10组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:120组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:127组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂;或

所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关,特别是与阴性对照相比增加至少10%;以及

ii)至少一种第二治疗剂选自如下:肿瘤靶向抗体或其抗原结合片段,特别是肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是活化和/或增强巨噬细胞吞噬能力的肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,进一步更特别是选自阿仑妥珠单抗、阿特利珠单抗、贝伐赛珠单抗、西妥昔单抗、赫赛汀、帕尼妥木单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、抗PDL-1抗体和抗CD47抗体的单克隆抗体,和/或选自抗PD1抗体和抗SIRPa抗体的另一种抗体或单克隆抗体;和/或化疗剂,特别是具有抗增殖、促凋亡、细胞周期阻滞和/或分化诱导作用的细胞毒剂,更特别是选自细胞毒抗体、烷基化药物、蒽环类、抗代谢药、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、生物碱、博来霉素、抗肿瘤药、环磷酰胺的细胞毒剂;

所述第一治疗剂和所述第二治疗剂特别是用于同时、分开或顺序施用。

15.权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求13所述的核酸分子或核酸分子组合、或权利要求14所述的组合、或权利要求14所定义的第一治疗剂的用途,用于预防和/或治疗疾病或病症、特别是人类疾病或人类病症,其中,骨髓细胞、特别是树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力的增加改善或预防疾病或病症。

16.权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求13所述的核酸分子或核酸分子组合、或权利要求14所述的组合、或权利要求14所定义的第一治疗剂的用途,用于治疗疾病或病况,其中,诱导患者体内的吞噬作用改善或预防所述疾病或病况。

17.权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求13所述的核酸分子或核酸分子组合、或权利要求14所述的组合、或权利要求14所定义的第一治疗剂的用途,用于治疗患有癌症的患者,所述癌症特别是液体癌或实体癌,所述癌症更特别是淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌、炎性疾病、慢性感染或败血症。

18.权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求13所述的核酸

分子或核酸分子组合、或权利要求14所述的组合、或权利要求14所定义的第一治疗剂的用途，用于联合治疗，特别是用于同时、分开或顺序施用，其中，将第一药物施用于有需要的患者，所述第一药物包括化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂(例如靶向肿瘤的单克隆抗体)、细胞治疗剂(例如CAR-T细胞)、免疫抑制剂、促凋亡剂、抗生素、靶向癌症治疗剂和/或益生菌。

# 抗CLEC-1A抗体及其抗原结合片段

## 技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗领域。本发明提供了新型特异性抗CLEC-1A化合物(特别是抗体)。本发明的化合物能够特异性结合CLEC-1A并且是人CLEC-1A的拮抗剂,特别是能够拮抗CLEC-1A与其配体中的至少一种(特别是其内源性配体)的结合。本发明化合物的用途可用于治疗有害病况,包括但不限于癌症。

## 背景技术

[0002] 利用患者免疫系统的免疫治疗预示着个性化医疗的新时代,为患有严重疾病的患者提供治愈反应的希望。细胞介导的免疫可以消除或预防疾病,例如但不限于癌症、自身免疫性疾病和过敏性疾病。治疗的最新发展包括细胞工程、疾病靶向和患者免疫系统调节,以提供对疾病的更集中有效的反应。在这些策略中,采用免疫检查点抑制剂或活化剂的免疫治疗已成为对抗这些疾病、特别是用于治疗癌症的重要武器。这些分子通常由免疫系统细胞(例如T细胞或树突状细胞)表达,但也由几种癌细胞表达,可增强对患者的免疫反应,并保持或启动针对病原细胞的免疫细胞反应。免疫检查点指大量固定在免疫系统中的抑制途径,这些途径对维持自我耐受性和最大限度地减少附带组织损伤至关重要。

[0003] C型凝集素受体(CLR)是一种跨膜和可溶性受体的大家族。这些受体包含一个以上能够识别病原体或自身蛋白上的多种聚糖的碳水化合物识别结构域。对于这些受体,聚糖识别依赖于$Ca^{2+}$。许多相关CLR不依赖于$Ca^{2+}$但仍能识别碳水化合物,这些受体被称为C型凝集素样受体(CTLR)。这些受体因其在联结先天免疫和适应性免疫中的作用而受到特别关注。CTLR主要由髓系细胞表达,例如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)和中性粒细胞。CTLR不仅作为内化和呈递至T细胞的抗原摄取受体,而且还触发导致NF-κB、I型干扰素(IFN)和/或炎症小体活化的多种信号传导途径。凭借其呈递抗原并确保细胞活化和抑制之间平衡的能力,CTLR已成为治疗多种疾病(包括癌症、自身免疫性疾病或过敏)的具有挑战性的药理学靶标。CTLR调节看起来代表了一种具有前景的疾病管理策略,尽管仍有必要尝试识别内源性配体以及阐明它们在免疫中的作用。

[0004] 在这些CTLR中,特别关注一种名为CLEC-1的特定成员(也被称为首字母缩略词CLEC1、CLEC1A、CLEC-1A、CLEC1受体、CLEC1A受体和CLEC-1A受体)。尽管C型凝集素样受体-1(CLEC-1)已被识别出多年,但下游信号传导和配体仍未得到表征。在人和啮齿动物中,CLEC1由骨髓细胞(例如单核细胞、DC和巨噬细胞)表达,但也由内皮细胞表达。CLEC-1表达因促炎性刺激而降低,并因TGFβ而增强。有趣的是,发现CLEC-1主要在细胞内、特别是在人内皮细胞和中性粒细胞中表达,这表明细胞表面表达需要特定条件。

[0005] 最近,本发明人首次揭示CLEC-1A由常规DC(cDC)和人血液中的单核细胞和DC的小亚群在细胞表面处表达,并被免疫抑制性细胞因子TGFβ增强(参见国际申请号WO 2018073440)。本发明人揭示,人CLEC-1A由M2型的促肿瘤巨噬细胞、来自胸腔积液间皮瘤的骨髓细胞和来自卵巢肿瘤腹水的骨髓细胞表达。本发明人在啮齿动物和人类中均证明了CLEC-1在骨髓细胞中充当抑制性受体并阻止IL12p40表达和下游Th1和Th17体内反应。

[0006] 本发明人还揭示,使用抗hCLEC-1A抗体作为CLEC-1A的拮抗剂可以增加人T细胞增殖和人IFN-γ。本发明人还证明,缺乏CLEC-1的小鼠对肿瘤生长有更好的抵抗力,在肝癌小鼠模型中表现出更高的存活率。因此,作为细胞表面受体的CLEC-1A可代表一种在临床环境中增强抗肿瘤免疫力的有用治疗工具。

[0007] 在本文中,本发明人首次提供了抗CLEC-1A化合物、特别是抗CLEC-1A抗体,其识别并特异性结合人CLEC-1A的胞外域,其为人CLEC-1A的拮抗剂,特别是适用于拮抗CLEC-1A与其配体中的至少一种(特别是其内源性配体)的结合,并且其在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关。

[0008] 如本发明的实施例中所示,首次提供了抗CLEC-1A化合物、特别是抗CLEC-1A抗体,其在体内和/或体外使用时具有与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用相关的能力。与现有技术(WO 2018/073440 A1和Robles等的文章(Blood Advances 2017)中公开的抗CLEC-1A抗体(其用于发明的一些工作实施例中结合CLEC-1A并且是人CLEC-1A的拮抗剂)相比,本说明书中显示:根据本发明任何实施方式的抗体在体外使用时与调节(特别是增加)免疫系统细胞对肿瘤细胞的吞噬作用有关。与CLEC-1A相互作用的肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞可逃脱表达CLEC-1A的骨髓细胞的吞噬作用。本发明的抗体以阻止CLEC-1A与肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞(通常与表达CLEC-1A的细胞相互作用)之间的功能性相互作用的方式与CLEC-1A相互作用,此种功能性相互作用可阻止肿瘤细胞逃避吞噬作用。如本发明中所述,本发明的一些实施例中使用的现有技术(WO 2018/073440 A1和Robles等的文章(Blood Advances 2017)中公开的拮抗性抗CLEC-1A抗体与调节骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞的吞噬作用无关。仅当根据本发明的化合物存在于实施例中时才显示出对肿瘤细胞的吞噬作用的调节。当根据本发明的拮抗剂化合物存在时,不会阻止表达CLEC-1A的骨髓细胞(特别是表达CLEC-1A的树突状细胞和/或巨噬细胞)发挥它们对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬能力。当施用本发明的拮抗剂化合物时,实现了一些非常有益的生物学效果,特别是与骨髓细胞(包括树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力有关。本发明的抗体(其是合适的CLEC-1A拮抗剂)与调节(特别是增加)树突状细胞和/或巨噬细胞(例如活化的巨噬细胞)的吞噬能力有关。通过拮抗CLEC-1A与肿瘤细胞表达的其靶标(至少一种其配体)的结合,本发明的抗CLEC1A化合物(特别是抗CLEC-1A抗体)的施用与增强树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或癌细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关。在表达CLEC-1A的巨噬细胞或树突状细胞与表达CLEC-1A的一种配体的细胞相互作用时,这些巨噬细胞或树突状细胞的吞噬能力被抑制或降低。表达CLEC-1A的配体的肿瘤细胞可逃避巨噬细胞和树突状细胞的吞噬作用。如本发明实施例中所示,当施用本文公开的抗CLEC1A抗体时,通过拮抗CLEC-1A与肿瘤细胞的相互作用来消除对巨噬细胞和树突状细胞吞噬能力的抑制,从而导致巨噬细胞和树突状细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。

[0009] 除了本发明的抗体对骨髓细胞吞噬肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的作用之外,本发明的抗体还可以调节(特别是增强或增加)T细胞的增殖和/或T细胞的活化。

[0010] 本文所述抗体可以在重组生产系统中有效生产,允许提供足够量的表现出上文公开功能特征的嵌合或(完全)人源化抗体以供进一步开发。

[0011] 此外,与其小鼠同源物相比,本发明的抗体对人CLEC-1A具有特异性亲和力,因为本发明的抗体在体外不与小鼠CLEC-1A蛋白交叉反应。此外,如本发明实施例中所示,本发明的抗CLEC-1A化合物(特别是抗CLEC-1A抗体)在体外特异性结合在人类细胞的细胞膜上表达的CLEC-1A的胞外域。

[0012] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗体破坏由骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)表达的CLEC-1A与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞(如存在于患有癌症或正在发展癌症的宿主中的肿瘤细胞)之间的相互作用和/或与继发性坏死细胞和/肿瘤细胞的细胞内容物的相互作用。本发明人确定CLEC-1A的配体可以被受损细胞或肿瘤细胞表达或过表达(但不一定在这些细胞的膜上),因此可以参与抗肿瘤免疫和改善免疫细胞诱导的肿瘤细胞死亡。

[0013] 因此,提供了抗体,本发明人证明,所述抗体:

[0014] -特异性结合人CLEC-1A,特别是人类细胞的细胞膜上表达的CLEC-1A;

[0015] -是人CLEC-1A的拮抗剂,特别适用于拮抗CLEC-1A与其至少一种配体(特别是其内源性配体之一)的结合;

[0016] -可以以显著产率回收,允许提供足够量的表现出上文公开功能特征的抗体以供进一步开发;以及

[0017] -在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关。

[0018] 此类化合物特别适用于它们在预防和/或治疗几种疾病或有害病况中的用途,特别是其中需要改善由树突状细胞和/或巨噬细胞发挥的吞噬作用,更特别是用于调节骨髓细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用、优选吞噬活性,特别是用于改善树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力,以通过增加骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞的吞噬作用来改善疾病的结果。

[0019] 此类化合物还可以特别适用于它们在预防和/或治疗几种疾病中的用途,特别是用于调节T细胞反应,特别是通过增强T细胞的活化和/或增殖。

[0020] 在本发明的一个具体实施方式中,抗CLEC-1A化合物适用于减少骨髓来源的抑制性细胞的总数,从而导致免疫抑制性细胞(例如但不限于免疫抑制性骨髓细胞)减少。

## 发明内容

[0021] 因此,在本发明的第一方面,公开了一种抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0022] • 抗体重链可变结构域,所述抗体重链可变结构域包含三个VHCDR,其中,VHCDR的氨基酸序列分别选自:

[0023] -SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:97的VHCDR1,特别是SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97的VHCDR1;

[0024] -SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:91的VHCDR2,特别是SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83的VHCDR2;和

[0025] -SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:93的VHCDR3,特别是SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85的VHCDR3;以及

[0026] •抗体轻链可变结构域,所述抗体轻链可变结构域包含三个VLCDR,其中,VLCDR的氨基酸序列选自:

[0027] -SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:36的VLCDR1,特别是SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28的VLCDR1;

[0028] -SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:38的VLCDR2,特别是SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30的VLCDR2;和

[0029] -SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:40的VLCDR3,特别是SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32的VLCDR3。

[0030] 根据此实施方式的抗体或其抗原结合片段适用于拮抗人CLEC-1A,同时其对此受体的结合特性是特异性的。此外,实现了在不同细胞系(包括但不限于哺乳动物细胞系)中生产,其产率适用于开发候选药物的目的。

[0031] 本发明人合成了几种抗CLEC-1A抗体,每种抗体包含重链可变结构域CDR和轻链可变结构域CDR的组合。因此,在本发明的第二方面,提供了抗体或其抗原结合片段,其中:

[0032] •抗体重链可变结构域包含序列如下的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3:

[0033] -分别为SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:61;或

[0034] -分别为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:69;或

[0035] -分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77;或

[0036] -分别为SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:85;或

[0037] -分别为SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:93;或

[0038] -分别为SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77;和/或

[0039] •抗体轻链可变结构域包含序列如下的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3:

[0040] -分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8;或

[0041] -分别为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16;或

[0042] -分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24;或

[0043] -分别为SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32;或

[0044] -分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

[0045] 在另一方面,本发明涉及抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关,特别是与阴性对照相比增加至少10%、更特别是至少20%。

[0046] 在另一方面,本发明涉及本文公开的抗CLEC-1A抗体或CLEC-1A拮抗剂化合物,其用于治疗疾病或有害病况,特别是由树突状细胞和/或巨噬细胞发挥的吞噬作用需要改进的疾病或有害病况,和/或其中树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力的改进可以治疗疾病或有害病况。

[0047] 在另一方面,本发明涉及如上所述的特异性抗CLEC-1A化合物,其用于预防和/或治疗疾病或病症,在所述疾病或病症中,调节骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力、特别是通过调节对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬,可以改善疾病或病症的结果,所述抗CLEC-1A化合物是人CLEC-1A和表达CLEC-1A配体的细胞(特别是表达

CLEC-1A配体的肿瘤细胞或癌细胞和/或继发性坏死细胞)之间的相互作用的拮抗剂。此类抗体可以使用例如本发明实施例中所述的吞噬试验来鉴定,包括通过流式细胞术或显微镜。在本发明的一个更具体实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比能够增强骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对癌细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是与阴性对照相比增强至少10%、更特别是至少20%。在一个具体实施方式中,吞噬作用可以根据以下实验来评估:

[0048] 使用M-CSF(100ng/mL)持续5天,由单核细胞产生巨噬细胞(MΦ)。

[0049] 然后巨噬细胞(MΦ)与抗CLEC1化合物预孵育2小时,然后与浓度分别为10ng/mL的非霍奇金淋巴瘤(Raji;CD20+)和抗CD20 mAb(利妥昔单抗(rituximab))一起培养以提供"吃我"的信号,持续4小时。

[0050] 吞噬分析通过显微镜进行,吞噬百分比通过总巨噬细胞中pHrodo(pHrodo-SE:Thermofisher)阳性Raji细胞的百分比来计算。

[0051] 在另一方面,本发明涉及如上所述的特异性抗CLEC-1A化合物,其用于预防和/或治疗T细胞具有有害作用的疾病或病症,其中,所述抗CLEC-1A化合物是人CLEC-1A与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞和/或存在于患有癌症或发展为癌症的宿主中的肿瘤细胞和/或透化继发性坏死细胞的细胞内容物和/或透化肿瘤细胞的细胞内容物之间相互作用的拮抗剂。

[0052] 在另一方面,本发明涉及增加骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的特异性的抗CLEC-1A化合物,特别是根据本文公开的任何实施方式的抗CLEC1A抗体或其抗原结合片段;特别地,所述抗CLEC-1A化合物与常规治疗或与本文定义的至少一种第二治疗剂同时、分开或顺序施用。

[0053] 在另一方面,本发明涉及如上所述的特异性抗CLEC-1A化合物,其用于治疗癌症,特别是治疗液体癌或实体癌,更特别是治疗淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0054] 在另一方面,本发明涉及治疗性化合物的组合,所述组合包含作为第一治疗性化合物的CLEC-1A-拮抗剂化合物(特别是本文定义的抗CLEC-1A抗体或抗原结合片段)和至少一种第二治疗性化合物或化疗剂,所述第二治疗性化合物选自:抗肿瘤靶向抗体,特别是适合活化和/或增强巨噬细胞(特别是M1巨噬细胞)的吞噬能力的抗肿瘤靶向抗体。本发明人已显示,此类组合特别适用于治疗癌症。如本发明实施例中所示,这些组合在癌症治疗中发挥协同作用,导致肿瘤生长、肿瘤体积的急剧减少和/或存活率提高。

## 附图说明

[0055] 图1显示了与现有技术的抗CLEC-1A抗体(αCLEC-1对照mAb)(对应于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017)中公开的抗CLEC-1A抗体)和同种型对照抗体(hIG4)相比,在本发明嵌合抗体(5D1、6C5、11H11、14H8和15E3)存在下,(A)肿瘤细胞(非霍奇金淋巴瘤细胞(Raji细胞))和(B)非小细胞肺癌(NSCLC)的吞噬试验。根据所用mAb的同种型,通过将Clec-1阻断TGFb-DC(已吞噬肿瘤细胞)的频率相对于PBS或hIgG4对照进行归一化来确定吞噬比率。A:Raji细胞测定;B:非小细胞肺癌细胞测定。

[0056] 图2显示了在现有技术的抗CLEC-1A抗体(αCLEC-1对照mAb)(对应于WO 2018/

073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017)中公开的抗CLEC-1A抗体)和本发明的抗CLEC-1A抗体(鼠抗体5D1A5和嵌合抗体14H9和6C5)存在下,TGFb-DC阻断的UV处理的肝癌模型的肿瘤细胞的吞噬试验。使用hIgG4同种型对照抗体。通过根据所用mAb的同种型,通过将Clec-1阻断TGFb-DC(已吞噬肿瘤细胞)的频率相对于PBS或hIgG4对照进行归一化来确定吞噬比率。

[0057] 图3显示了在本发明嵌合抗CLEC-1A抗体(6C5、14H9)存在下,巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬试验,并与现有技术的抗CLEC-1A抗体(αCLEC-1对照mAb)(对应于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017)中公开的抗CLEC-1A抗体)获得的结果进行了比较,与不同的靶向肿瘤抗体(利妥昔单抗、西妥昔单抗(cetuximab)或曲妥珠单抗(trastuzuma))相关。使用hIgG4同种型对照抗体。通过将吞噬细胞的频率相对于用同种型抗体对照观察到的结果进行归一化来确定吞噬比率。A:Raji细胞(一种非霍奇金淋巴瘤模型)测定。B:结直肠癌模型。C:乳腺癌模型。

[0058] 图4是显示了来自图7和9的IC50测定的表格。IC50指此测定中每种鼠抗hCLEC1抗体抑制50%信号所需的浓度。

[0059] 图5显示了抗CLEC1抗体对Fc-CLEC1透化Raji相互作用的拮抗活性研究(通过FACS):测试了不同抗CLEC1抗体与剂量反应的关系:15E3、5D1、6C5、14H9、11H11(本发明的嵌合抗CLEC-1A抗体)和同种型IgG1以及阴性对照中的内部(in-house)阳性对照嵌合抗CLEC1(非拮抗剂)。曲线表示与抗CLEC1抗体竞争后10nM Fc-CLEC1-A488对Raji细胞的结合百分比。

[0060] 图6显示了由图5所示实验得出的IC50测定值。IC值指此测定中每种嵌合抗hCLEC1抗体抑制50%信号所需的浓度。阳性对照为内部嵌合抗CLEC1抗体。

[0061] 图7显示了抗CLEC1抗体(包括本发明的嵌合抗CLEC-1A抗体15E3、5D1、6C5、14H9)对Fc-CLEC1-透化PBMC相互作用的拮抗活性研究(通过FACS)。曲线显示了与抗hCLEC1抗体竞争后10nM Fc-CLEC1-A488对PBMC的结合百分比。

[0062] 图8显示了来自图7的实验的IC50测定。IC值指此测定中每种嵌合抗hCLEC1抗体抑制50%信号所需的浓度。

[0063] 图9显示了选定的抗CLEC-1A抗体(包括本发明的嵌合抗CLEC-1A抗体15E3、5D1、6C5、14H9、11H11)在HEK细胞中的生产力。抗体对应于本发明实施例中公开的特定重链可变结构域和轻链可变结构域的组合。

[0064] 图10显示了选定的抗CLEC-1A抗体(包括本发明的嵌合抗CLEC-1A抗体15E3、5D1、6C5、14H9、11H11)在HEK和CHO细胞中的生产力。抗体对应于本发明实施例中公开的特定重链可变结构域和轻链可变结构域的组合。“nd”对应于指定细胞系中指定抗体的生产力数据的缺失。

[0065] 图11显示了由每种鼠抗hCLEC1抗体和人CLEC-A-his之间的结合测定确定的ED50。如本发明说明书中所公开,克隆ID对应于重链可变结构域和轻链可变结构域的特定组合。ED50指此测定中每种抗CLEC1A抗体达到最大OD信号的50%所需的浓度。

[0066] 图12显示了嵌合CLEC1A抗体(15E3、5D1、6C5、14H9)的结合研究(通过ELISA)。曲线表示不同浓度(ng/mL)的嵌合抗CLEC1A抗体与His-CLEC1的结合:阳性对照嵌合抗CLEC1A(非拮抗剂对照)、15E3嵌合抗体、5D1嵌合抗体、6C5嵌合抗体、14H9嵌合抗体。

[0067] 图13显示了图12中的ED50测定值;ED50指此测定中每种嵌合抗hCLEC1A抗体达到最大信号的50％所需的浓度。

[0068] 图14显示了嵌合CLEC1抗体11H11的结合研究(通过ELISA)。曲线表示不同浓度(ng/mL)的嵌合抗CLEC1抗体11H11与His-CLEC1的结合;阳性对照为内部嵌合抗CLEC1抗体。

[0069] 图15显示了图14中的ED50测定值;ED50指此测定中每种嵌合抗hCLEC1抗体达到最大信号的50％所需的浓度。

[0070] 图16显示了通过Blitz测量的本发明的抗CLEC1鼠抗体对人CLEC-A-his重组蛋白的结合亲和力(KD)、亲和力常数(ka)和解离常数(kd)。

[0071] 图17显示了通过Blitz测量的本发明的抗CLEC1嵌合抗体对人CLEC-A-his重组蛋白的结合亲和力(KD)、亲和力常数(ka)和解离常数(kd)。

[0072] 图18显示了通过流式细胞术(FACS)进行的本发明的鼠CLEC1抗体对人U266细胞系的结合研究的ED50测定(通过ELISA)。EC50指此测定中每种抗CLEC1抗体达到50％信号所需的浓度。

[0073] 图19显示了通过流式细胞术(FACS)进行的本发明的嵌合CLEC1抗体对人U266细胞系的结合研究(通过ELISA):A:显示了染色U266的百分比;B:显示了不同抗体的平均荧光强度(MFI)与剂量反应的关系。

[0074] 图20显示了通过流式细胞术(FACS)进行的本发明的嵌合CLEC1抗体对人U266细胞系的结合研究(A)(通过ELISA)。结果显示了根据本发明的嵌合抗体对U266细胞的EC50结合。B是显示了由曲线确定的EC50的表格;EC50指此测定中每种嵌合抗hCLEC1抗体达到50％信号所需的浓度。

[0075] 图21显示了本发明的嵌合抗CLEC-1A抗体对CHO细胞的结合(通过FACS细胞仪进行分析):A:显示了染色CHO细胞百分比与剂量反应的关系;B:显示了不同抗体的平均荧光强度(MFI)与剂量反应的关系。

[0076] 图22是显示了由图21得出的EC50值的表格。EC50指此测定中每种抗CLEC1抗体达到50％信号所需的浓度。

[0077] 图23显示了抗CLEC1抗体对His-CLEC1相互作用的竞争活性研究(通过ELISA)。对不同的抗CLEC1抗体进行测试,竞争者为1μg/mL,挑战抗体为10ng/mL至2μg/mL:15E3、5D1、6C5、14H9、11H11(本发明的嵌合抗CLEC1A抗体)和同种型IgG1以及阴性对照中的阳性对照嵌合抗CLEC1(非拮抗剂)。直方图显示了与抗CLEC1抗体竞争后结合至His-CLEC1。

[0078] 图24显示了使用根据本发明的选定抗体(11H11),抗CLEC1抗体对His-CLEC-1A相互作用的竞争活性研究(通过ELISA)。11H11抗CLEC1抗体以1μg/mL进行测试,被挑战抗体以10ng/mL至2μg/mL的浓度添加:11H11(A)、5D1(B)、15E3(C)、14H9(D)、6C5(E)(本发明的嵌合抗CLEC1A抗体)。

## 具体实施方式

[0079] 因此,表述“继发性坏死细胞”或“继发性坏死下的细胞”定义了已向细胞变化阶段发展的细胞(包括本文公开的细胞系),其特征在于超浓缩染色质(核固缩)和核碎裂(核碎裂),还可能具有其他特征:细胞质膜破裂、活化的胱天蛋白酶3的释放、进一步可能的细胞质肿胀和溶酶体膜透化。继发性坏死下的细胞是凋亡过程进行到自溶性坏死结果(即细胞

解体的自溶过程)的细胞。表述“继发性坏死细胞”或“继发性坏死下的细胞”可以类似地通过参考凋亡细胞中此特定阶段的标志物来适当定义,其中标志物是已知和使用的,也可以区分继发性坏死细胞与早期凋亡细胞或原代坏死细胞。此类标志物包括标记缀合的Annexin V和碘化丙啶(PI):已知早期凋亡细胞为Annexin V阳性和PI阴性(Annexin+/PI-),而已知晚期凋亡细胞为Annexin V阳性和PI阳性,即Annexin/PI双阳性(Annexin+/PI+)。这些标志物有时在本领域中用于标示晚期凋亡细胞。如本文所用,透化细胞是提供接近细胞内或细胞器内抗原的细胞。透化处理允许抗体通过细胞膜进入,从而允许本发明的抗CLEC1A化合物与在细胞的细胞内区室中但不在细胞膜上表达的CLEC-1A结合到这些细胞的细胞内容物中。

[0080] “内源性配体”应理解为与CLEC-1A受体源自相同物种或相同生物体内的配体;例如,内源性人CLEC-1A配体是人CLEC-1A受体的人配体,内源性小鼠CLEC-1A配体是小鼠CLEC-1A受体的小鼠配体。

[0081] 如本文所用,术语“抗体”指多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体。

[0082] 如本文所用,“单克隆抗体”意指抗体分子制剂,与含有不同氨基酸序列抗体混合物的“多克隆”抗体制剂相比,这些抗体具有共同的重链氨基酸序列和共同的轻链氨基酸序列。单克隆抗体可通过几种已知技术(例如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示)以及经典方法(例如杂交瘤衍生抗体)产生。因此,术语“单克隆”用于指源自一种核酸克隆的所有抗体。

[0083] 本发明的抗体包括重组抗体。如本文所用,术语“重组抗体”指通过重组方式产生、表达、生成或分离的抗体,例如:使用转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体;从重组组合抗体库中分离的抗体;从因人免疫球蛋白基因而转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体;或以任何其他方式产生、表达、生成或分离的抗体,其中特定免疫球蛋白基因序列(例如人免疫球蛋白基因序列)与其他DNA序列组装在一起。重组抗体包括例如嵌合抗体和人源化抗体。

[0084] 如本文所用,“嵌合抗体”指来自一种哺乳动物种系(例如小鼠)的可变结构域的序列移植到来自另一种哺乳动物种系(例如人类)的恒定区的序列上的抗体。

[0085] 如本文所用,“人源化抗体”指来自另一种哺乳动物种系(例如小鼠)的CDR序列移植到人类骨架序列上的抗体。

[0086] 在一个实施方式中,本发明的抗体是人源化抗体。在一个实施方式中,本发明的抗体是重组抗体。在一个实施方式中,本发明的抗体是嵌合抗体。在一个实施方式中,本发明的抗体是重组嵌合抗体。在一个实施方式中,本发明的抗体是重组人源化抗体。本发明的抗体可以去免疫。“去免疫”应理解为抗体与本发明的抗体具有相似的结构,但该抗体的结构被修饰以通过去除抗体结构中T细胞识别的已知表位来降低不需要的T细胞反应的可能性。

[0087] 如本文所用,“抗体的抗原结合片段”指表现出对CLEC-1A的抗原结合能力的抗体的一部分(即对应于本发明抗体结构的一部分的分子),可能是其天然形式;与相应的四链抗体的抗原结合特异性相比,此种片段特别表现出相同或基本相同的对CLEC-1A的抗原结合特异性。有利地,抗原结合片段具有与相应的四链抗体相似的结合亲和力。然而,本发明也涵盖对相应的四链抗体具有降低的抗原结合亲和力的抗原结合片段。抗原结合能力可通过测量抗体与靶片段之间的亲和力来确定。这些抗原结合片段也可以称为抗体的“功能片段”。

[0088] 如本文所用,术语“CLEC-1”在本领域中具有其一般含义并且指C型凝集素样受体-1,特别是来自哺乳动物物种,更特别是人CLEC-1。CLEC-1属于C型凝集素样受体(CTLR)的DECTIN-1簇,包括CLEC-2、DECTIN-1、CLEC-9A、MICL、MAH和LOX-1。

[0089] 如本文所用,术语“CLEC-1A”涉及来自哺乳动物物种的CLEC-1A,优选为人CLEC-1A。人CLEC-1A的参考序列对应于与登录号Q8NC01 Uniprot相关的序列。优选地,术语“人CLEC-1”或“人CLEC-1A”或“人CLEC-1受体”或“人CLEC-1A受体”指由Q8NC01 Uniprot登录号引用和由51267NCBI登录号引用的CLEC1A基因编码的氨基酸序列的蛋白质。在本说明书中,术语CLEC-1A、CLEC1A、CLEC1、CLEC-1、Clec1、Clec-1、Clec1A和Clec-1A可互换使用,均指对应于人CLEC-1A受体的哺乳动物的CLEC1受体,对应于与登录号Q8NC01 Uniprot、其直系同源蛋白或其同源蛋白相关的序列。特别地,CLEC-1A是具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列的蛋白质。特别地,CLEC-1A的胞外域是具有SEQ ID NO:108的氨基酸序列的蛋白质。

[0090] 如本文所用,术语“CLEC-1拮抗剂”在本领域中具有其一般含义,并且指阻断、抑制或降低CLEC-1的生物活性的任何天然或合成化合物。特别地,CLEC-1拮抗剂抑制CLEC-1与其至少一种配体之间的相互作用。特别地,CLEC-1拮抗剂可增强T细胞反应,特别是增加T细胞增殖和/或细胞因子(例如IFNγ)合成。它还可以指阻断、抑制或降低CLEC-1的生物活性的任何天然或合成化合物。特别地,CLEC-1拮抗剂抑制受体CLEC-1与其至少一种配体(更特别是其所有配体)之间的相互作用。更特别地,CLEC-1拮抗剂可结合受体CLEC-1或其任何一种配体。

[0091] 如本文所用,“CLEC-1拮抗剂”或“CLEC-1的拮抗剂”可对应于:与CLEC-1A结合的化合物,其选自抗体、抗体的抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、包含抗体的抗原结合片段或完整抗体的大分子、小有机化合物、蛋白质,例如但不限于CLEC-1A的胞外域的至少一个片段;或CLEC-1A的功能等价物,此种片段可以与另一种分子(例如肽或诸如抗体的另一种蛋白质的片段)结合,其稳定了CLEC-1A的胞外域的片段的结构,导致提供包含CLEC-1A胞外域的至少一个片段的融合蛋白。例如,此种融合蛋白可以包含CLEC-1A的胞外域的片段和接头肽、标签、抗体的Fc部分。

[0092] 可以根据本发明实施例(特别是实施例1)中公开的合适实验来评估抗体的拮抗剂能力,根据本发明的CLEC-1A的拮抗剂具有调节(即增加)骨髓细胞对肿瘤细胞的吞噬作用的能力。特别地,在如下情况下,抗体或其抗原结合片段可被认为是CLEC-1A(特别是人CLEC-1A)的拮抗剂:(i)与不存在拮抗剂抗体候选物的相同结合实验相比,它降低CLEC-1A胞外域的结合,特别是它降低融合蛋白(包含与人免疫球蛋白、特别是人IgG的Fc片段融合的人CLEC-1A受体的胞外域)与继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的细胞内容物的结合、特别是与透化的RAJI细胞和/或凋亡的PBMC的结合;以及(ii)与没有拮抗剂化合物的相同实验相比,它增加骨髓细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。当与阴性实验相比结合减少至少1-log、更特别是至少2-log、最优选至少3-log时,认为结合减少。当吞噬作用提高至少10%、优选至少20%、最优选至少30%时,认为对肿瘤细胞的吞噬作用增加。

[0093] 本发明的抗体和抗原结合片段可以根据结构特征来定义。抗体的抗原结合片段是包含其高变区的片段,其被称为CDR(互补决定区),或其包含抗原识别位点的部分,即CLEC-1A的胞外域。

[0094] 四链免疫球蛋白的每个轻链可变结构域和重链可变结构域(分别为VL和VH)具有

三个CDR,称为VL-CDR1(或LCDR1)、VL-CDR2(或LCDR2)和VL-CDR3(或LCDR3)以及VH-CDR1(或HCDR1)、VH-CDR2(或HCDR2)和VH-CDR3(或HCDR3)。

[0095] 本领域技术人员能够通过参考在此方面阐述的标准定义(包括参考编号系统)、参考KABAT编号系统或应用IMGT“collier de perle”算法来确定抗体的各个区域/结构域的位置。在此方面,对于本发明的序列的定义,应注意区域/结构域的划分可能因参考系统而异。因此,本发明中定义的区域/结构域涵盖在抗体可变结构域的全长序列内显示相关序列的长度或定位变化约+/-10%的序列。

[0096] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体的CDR结构域根据Kabat命名法来命名。在本发明的另一个具体实施方式中,抗体的CDR结构域根据IMGT命名法来命名。换言之,本发明的抗体或其抗原结合片段的任意或所有CDR结构域可由Kabat命名法来定义;本发明的抗体或其抗原结合片段的任意或所有CDR结构域可由IMGT命名法来定义。更特别地,本发明的抗体或其抗原结合片段的所有CDR结构域均由Kabat命名法来定义。

[0097] 基于四链免疫球蛋白的结构,抗原结合片段因此能通过与可用数据库和现有技术中的抗体序列进行比较(特别是通过比较这些序列中功能结构域的位置)来定义,注意:对于各种类型的抗体、特别是IgG、特别是哺乳动物IgG,骨架区和恒定区的位置是明确定义的。此种比较还涉及与抗体的三维结构有关的数据。

[0098] 为了说明本发明的具体实施方式的目的,包含抗体的可变结构域(包含CDR)的抗原结合片段包括Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab'和F(ab')2。Fv片段由通过疏水相互作用结合在一起的抗体的VL和VH结构域组成;在dsFv片段中,VH:VL异二聚体通过二硫键来稳定;在scFv片段中,VL和VH结构域通过柔性肽接头相互连接,从而形成单链蛋白。Fab片段是可通过木瓜蛋白酶对抗体进行消化而获得的单体片段;它们包含整个L链和H链的VH-CH1片段,通过二硫键结合在一起。F(ab')2片段可通过对抗体的铰链二硫键下方进行胃蛋白酶消化产生;它包含两个Fab'片段以及免疫球蛋白分子铰链区的一部分。Fab'片段可通过切割铰链区中的二硫键由F(ab')2片段获得。F(ab')2片段是二价的,即它们包含两个抗原结合位点,例如天然免疫球蛋白分子;在另一方面,Fv(构成Fab可变部分的VH:VL二聚体)、dsFv、scFv、Fab和Fab'片段是单价的,即它们包含单个抗原结合位点。本发明的这些基本抗原结合片段可以组合在一起以获得多价抗原结合片段,例如双体、三体或四体。这些多价抗原结合片段也是本发明的一部分。

[0099] 如本文所用,术语“双特异性”抗体指通过具有对第一抗原特异的至少一个区域(例如来自第一抗体的可变区)和对第二抗原特异的至少一个第二区域(例如来自第二抗体的可变区)而识别两种不同抗原的抗体。双特异性抗体特异性结合两种靶抗原,因此是一种多特异性抗体。识别两种以上不同抗原的多特异性抗体可通过重组DNA方法产生或包括但不限于通过任何便利方法化学产生的抗体。双特异性抗体包括能够识别两种不同抗原的所有抗体或抗体的缀合物,或抗体的聚合形式。双特异性抗体包括已被还原和重组以保持其二价特性的抗体以及已被化学偶联的抗体,因此它们可以对每种抗原具有多个抗原识别位点,例如BiME(双特异性巨噬细胞增强抗体)、BiTE(双特异性T细胞衔接器(engager))、DART(双亲和力重定向)、DNL(对接-锁定(dock-and-lock))、DVD-Ig(双可变结构域免疫球蛋白)。

[0100] 本文公开的关于抗体的所有实施方式经过必要修改后可转换到根据本发明的任

何化合物,特别是抗原结合抗体片段、人源化抗体和嵌合抗体和重组抗体。

[0101] 在本发明的以下描述中,术语“抗CLEC-1A化合物”指抗体、抗原结合片段(无论是否人源化,无论是否嵌合,无论是否重组)或包含此种抗体或其抗原结合片段的大分子。当使用术语“抗CLEC-1A抗体”时,该术语涵盖相同的化合物,除非在与本发明的特定实施方式有关的情况下另有说明。

[0102] “特异性抗CLEC-1A抗体”是对CLEC-1A表现出特异性结合但对另一种化合物不表现出特异性结合的化合物,每种情况下的结合可通过本领域已知的方法来检测,例如但不限于Biacore分析、Blitz分析、ELISA分析或Scatchard图。尽管如此,特异性“抗CLEC-1A化合物”可能与除CLEC-1A之外的另一种化合物发生交叉反应,特异性的概念并不排除抗体可能与除CLEC-1A之外的其他多肽发生交叉反应,但亲和力较低。因此,特异性抗CLEC-1A化合物也可以被定义为对CLEC-1A表现出高的结合亲和力但对另一种化合物表现出低的结合亲和力的抗体。

[0103] • 抗体及其抗原结合片段

[0104] 在第一方面,公开了一种抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0105] -SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:97的VHCDR1,特别是SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97的VHCDR1;

[0106] -SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:91的VHCDR2,特别是SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83的VHCDR2;和

[0107] -SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:93的VHCDR3,特别是SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85的VHCDR3;以及

[0108] • 抗体轻链可变结构域,所述抗体轻链可变结构域包含三个VLCDR,其中,VLCDR的氨基酸序列选自:

[0109] -SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:36的VLCDR1,特别是SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28的VLCDR1;

[0110] -SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:38的VLCDR2,特别是SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30的VLCDR2;和

[0111] -SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:40的VLCDR3,特别是SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32的VLCDR3。

[0112] 在本发明的另一个实施方式中,公开了一种抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0113] • 抗体重链可变结构域,所述抗体重链可变结构域包含三个VHCDR,其中,VHCDR的氨基酸序列分别选自:

[0114] -SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:103的VHCDR1,特别是SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97的VHCDR1;

[0115] -SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:105的VHCDR2,特别是SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83的VHCDR2;和

[0116] -SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:107的VHCDR3,特别是SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85的VHCDR3;以及

[0117] •抗体轻链可变结构域,所述抗体轻链可变结构域包含三个VLCDR,其中,VLCDR的氨基酸序列选自:

[0118] -SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:49的VLCDR1,特别是SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28的VLCDR1;

[0119] -SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:51的VLCDR2,特别是SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30的VLCDR2;和

[0120] -SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:53的VLCDR3,特别是SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32的VLCDR3。

[0121] 在本发明的一个具体实施方式中,该抗体或其抗原结合片段包含以下CDR结构域:

[0122] -VHCDR1,所述VHCDR1包含或由SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列组成;

[0123] -VHCDR2,所述VHCDR2包含或由SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列组成;和

[0124] -VHCDR3,所述VHCDR3包含或由SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列组成;以及

[0125] -VLCDR1,所述VLCDR1包含或由SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成;

[0126] -VLCDR2,所述VLCDR2包含或由SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成;和

[0127] -VLCDR3,所述VLCDR3包含或由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成。

[0128] 在本发明的一个具体实施方式中,该抗体或其抗原结合片段包含以下CDR结构域:

[0129] -VHCDR1,所述VHCDR1包含或由SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列组成;

[0130] -VHCDR2,所述VHCDR2包含或由SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列组成;和

[0131] -VHCDR3,所述VHCDR3包含或由SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列组成;以及

[0132] -VLCDR1,所述VLCDR1包含或由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成;

[0133] -VLCDR2,所述VLCDR2包含或由SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成;和

[0134] -VLCDR3,所述VLCDR3包含或由SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成。

[0135] 根据此实施方式的抗体特别适用于增强树突状细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。根据此特定定义的抗体对适用于治疗的人CLEC-1A具有亲和力,同时与其他的抗CLEC-1A抗体相比(特别是与本发明实施例中使用的对照抗CLEC-1A抗体相比)在相同浓度下对树突状细胞

吞噬肿瘤细胞的能力具有更好的效果(参见图1至图3)。

[0136] 在一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列如下的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3:

[0137] 分别为SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:61;或

[0138] 分别为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:69;或

[0139] 分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77;或

[0140] 分别为SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:85;或

[0141] 分别为SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:93;或

[0142] 分别为SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77。

[0143] CDR结构域的这些组合分别对应于示例性抗体15E3、11H11、5D1、6C5、10F4和14H9的重链上存在的CDR结构域。

[0144] 在一个具体实施方式中,抗体轻链可变结构域包含序列如下的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3:

[0145] 分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8;或

[0146] 分别为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16;或

[0147] 分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24;或

[0148] 分别为SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30;和SEQ ID NO:32;或

[0149] 分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

[0150] CDR结构域的这些组合分别对应于示例性抗体15E3、11H11、5D1和14H9(两者共享相同的CDR VLCDR)、6C5和10F4的轻链上存在的CDR结构域。

[0151] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0152] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:85的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30;和SEQ ID NO:32的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0153] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:69的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0154] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:93的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细

胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0155] 在本发明的一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:77的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,抗体轻链可变结构域包含序列分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0156] 在另一个具体实施方式中,抗体重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成。这些重链可变结构域各自对应于示例性抗体15E3、11H11、5D1、6C5、10F4和14H9的重链可变结构域。

[0157] 在另一个具体实施方式中,抗体轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成。这些轻链可变结构域各自对应于示例性抗体15E3、11H11、5D1、6C5、10F4和14H9的轻链可变结构域。

[0158] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

[0159] -包含或由SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

[0160] -包含或由SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

[0161] -包含或由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

[0162] -包含或由SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

[0163] -包含或由SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域;或

[0164] -包含或由SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成的重链可变结构域和包含或由SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成的轻链可变结构域。

[0165] 重链可变结构域和轻链可变结构域的这些组合分别对应于示例性抗体15E3、11H11、5D1、6C5、10F4、14H9和21B1的重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0166] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列组成,轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列组成,它们分别对应于示例性抗体14H9的重链可变结构域和轻链可变结构域。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0167] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列组成,轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成,它们分别对应于示例性抗体6C5的重链可变结构域和轻链可变结构域。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是

增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0168] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列组成,轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成,它们分别对应于示例性抗体11H11的重链可变结构域和轻链可变结构域。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0169] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列组成,轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成,它们分别对应于示例性抗体10F4的重链可变结构域和轻链可变结构域。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0170] 在另一个具体实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,重链可变结构域包含或由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成,轻链可变结构域包含或由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成,它们分别对应于示例性抗体5D1的重链可变结构域和轻链可变结构域。根据此定义的抗体可能特别适用于调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是在体外和/或体内。

[0171] 各种抗体分子和片段可以来自任何通常已知的免疫球蛋白类别(同种型),包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgE、IgG和IgM。IgG亚类也为本领域技术人员熟知,包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在本发明的一个具体实施方式中,抗体的可变区可与抗体恒定区缔合,例如IGg1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区。这些恒定区可通过本领域已知的方法进一步突变或修饰,以修饰它们对Fc受体的结合能力。在一个具体实施方式中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是人源化单克隆抗体,特别是抗体轻链恒定区源自人κ轻链恒定区,特别是轻链恒定区包含或由SEQ ID NO:112的序列组成,例如由SEQ ID NO:111的核苷酸序列编码;抗体重链恒定区源自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区,特别是抗体重链恒定区包含或由SEQ ID NO:113(人Fc IgG1)、SEQ ID NO:114(人Fc IgG2)、SEQ ID NO:115(人Fc IgG4)、SEQ ID NO:116(小鼠FcG1)或SEQ ID NO:117(小鼠FcG4,例如由SEQ ID NO:118的核苷酸序列编码)组成。

[0172] 在另一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段以至少约$1\times10^{-6}$M、$1\times10^{-7}$M、$1\times10^{-8}$M、$1\times10^{-9}$M、$1\times10^{-10}$M、$1\times10^{-11}$M或$1\times10^{-12}$M以上的亲和力结合人CLEC-1A,和/或结合靶标,其中与靶标结合的亲和力是对另一种化合物(非人CLEC-1A受体)的亲和力的至少2倍。在一个具体实施方式中,本发明的抗体或抗原结合片段以至少大于1E-07M、更特别是至少1E-08M的亲和力常数(KD)结合人CLEC-1A。在一个具体实施方式中,与在相同结合条件下的对照抗CLEC-1A抗体与CLEC-1A的结合相比,该抗体或其抗原结合片段以超过1-log、更特别是超过2-log、最优选超过3-log的亲和力结合人CLEC-1A。结合实验可以根据本发明实施例中公开的任何一个结合实验来进行。

[0173] 在一个具体实施方式中，当根据本发明的化合物达到最大信号的50％(ED50)的有效剂量对人CLEC-1A的ED50值低于1500ng/mL时，抗CLEC-1A化合物是CLEC-1A特异性的。ED50可根据本领域已知的方法或通过本发明实施例中公开的方法(例如图4所示的细胞计数法)来测定。当化合物在结合测定中达到最大信号的50％(EC50)的有效剂量低于1200ng/mL、特别是低于800ng/mL、更特别是低于400ng/mL时，可以认为上文定义的抗CLEC-1A抗体和人CLEC-1A之间的结合是特异性的。例如，此种能力可以根据本发明实施例中所示的方法来评估。

[0174] 在另一个具体实施方式中，根据本发明的特异性抗CLEC-1A化合物对人CLEC-1A的ED50值(也称为EC50值)为1ng/mL至1000ng/mL、特别是5ng/mL至1500ng/mL、更特别是800ng/mL。EC50可以根据本领域已知的方法或本发明实施例中公开的方法(例如根据关于图4所示和实施例2发布的数据的所公开的方法)来确定。

[0175] 如本文所用，术语“ED50”指化合物(例如抗CLEC-1A化合物)在引发50％的生物学或生化功能(例如CLEC-1A的功能或活性)方面的有效性的量度。例如，EC50显示需要多少抗CLEC-1A化合物来使CLEC-1A的活性减半。换言之，它是抗CLEC-1A化合物的最大有效浓度的一半(50％)(50％ED或ED50)。ED50表示在体外达到50％有效性所需的药物浓度。ED50可通过本领域已知的技术来确定，例如通过构建剂量-反应曲线并检查不同浓度的抗CLEC-1A化合物对CLEC-1A与Fc-CLEC结合的影响。例如，本发明实施例中公开了一种方法。

[0176] 在本发明中，如果抗CLEC-1A化合物在存在拮抗剂抗体的竞争性结合测定中引起Fc-CLEC-1A蛋白对CLEC-1A的KD值增加高于1log、优选高于2log、更优选高于3log、最优选高于4log，也可以认为所述化合物是CLEC-1A的拮抗剂。此实验可以根据Blitz法或ELISA例如在本发明实施例中所示的实验条件下进行。

[0177] 为人源化抗体的抗体或其抗原结合片段也可通过将存在于可变链(VH和/或VL)的恒定区中的氨基酸残基替换为人抗体中相应位置(根据标准定义和编号)的人氨基酸残基而得到，其中，替换程度为所述骨架区中残基的1％至80％、更优选1％至50％、进一步更优选1％至20％、特别是1％至18％。所述恒定区包括在四链抗体中定义的骨架区(FR)的那些，特别是通过参考KABAT编号来确定。

[0178] 抗CLEC-1A抗体可以根据已知方法进行人源化。例如，本文公开的CDR的不同组合可以移植到人重链可变结构域和/或轻链可变结构域上。本发明的嵌合抗体、人源化抗体和/或去免疫的抗体可以属于任何类别的免疫球蛋白，例如未修饰的抗体。优选地，它们属于IgG类的亚类，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0179] 通过将抗体的可变区与适当的接头或与另一种抗体的恒定区进行组合来制备重组抗体(或其抗原结合片段)或嵌合抗体的方法是本领域熟知的。

[0180] 本发明还包括抗体或其抗原结合片段(特别是嵌合或人源化抗体或其抗原结合片段)，其与包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列作为其重链可变结构域和SEQ ID NO:18的氨基酸序列作为其轻链可变结构域的抗体竞争，特别是其为本发明实施例中所示的嵌合抗体5D1(用于结合CLEC-1A受体)并且其拮抗CLEC-1A与其靶标的结合。

[0181] 特别地，本发明的抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域，并且进一步与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:71组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:18组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A

受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:121组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:128组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,并且是人CLEC-1A的拮抗剂、特别是拮抗人CLEC-1A(特别是人CLEC-1A的胞外域)与至少一种其配体(特别是其靶标)的结合,所述配体特别是由继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞表达的配体。

[0182] 特别地,本发明的抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,并且进一步与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:63组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:10组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:120组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:127组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,并且是人CLEC-1A的拮抗剂、特别是拮抗人CLEC-1A(特别是人CLEC-1A的胞外域)与至少一种其配体(特别是其靶标)的结合,所述配体特别是由继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞表达的配体。

[0183] 在本发明的一个更具体实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比还能够增强骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对癌细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是与阴性对照相比增强至少10%、更特别是至少20%。特别地,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关,特别是与阴性对照相比对肿瘤细胞或继发性坏死细胞的吞噬作用增加至少10%、更特别是至少20%。

[0184] 交叉竞争性抗体(或化合物)和识别CLEC-1A受体的抗体(或化合物)可以使用常规技术(例如免疫测定)来鉴定,例如通过显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力(例如竞争性结合测定)。竞争性结合可以使用例如本发明实施例中描述的测定来确定。特别地,可以使用实施例10中所示的方法来确定竞争性结合,其中通过ELISA研究抗体对His-CLEC1的相互作用和竞争。如果与缺乏一种所述抗体(或化合物)的阳性对照相比,测试的抗CLEC-1A化合物使其他抗体的结合降低至少50%、至少60%、特别是至少70%和更特别是至少80%,则存在交叉竞争,反之亦然。

[0185] • 拮抗剂化合物表现出功能特征并与CLEC-1A特异性结合或包含CLEC-1A的特定部分。

[0186] 本发明还涉及CLEC-1A的拮抗剂化合物,所述化合物:

[0187] (i)与调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞,更特别是人树突状细胞和/或人巨噬细胞)对肿瘤细胞的吞噬作用有关;

[0188] (ii)与调节(特别是增强)T细胞(特别是人T细胞)的增殖有关;和/或

[0189] (iii)与调节(特别是增强)T细胞(特别是人T细胞)的活化有关;

[0190] 其中,拮抗剂化合物选自多肽、肽、抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、CLEC-1A(特别是人CLEC-1A)的功能等价物或有机分子;

[0191] 其中,拮抗剂化合物与人C型凝集素样受体-1成员A受体(“CLEC-1A”或“CLEC-1A受体”)的胞外域结合,并且与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:63组成)和轻链可变结构域组成(包含或由SEQ ID NO:10组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:120组成)和轻链可变结构域组成(包含或由SEQ ID NO:127组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,并且是人CLEC-1

的拮抗剂、特别是拮抗人CLEC-1A(特别是人CLEC-1A的胞外域)与至少一种其配体(特别是其靶标)的结合,所述配体特特别是由继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞表达的配体。

[0192] 拮抗剂化合物特别是抗体或抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物。

[0193] 在一个具体实施方式中,CLEC-1A的拮抗剂化合物:

[0194] (i)与调节(特别是增强)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞,更特别是人树突状细胞和/或人巨噬细胞)对肿瘤细胞的吞噬作用有关;

[0195] (ii)与调节(特别是增强)T细胞(特别是人T细胞)的增殖有关;和/或

[0196] (iii)与调节(特别是增强)T细胞(特别是人T细胞)的活化有关;

[0197] 其中,拮抗剂化合物选自多肽、肽、抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、CLEC-1A(特别是人CLEC-1A)的功能等价物或有机分子;

[0198] 其中,拮抗剂化合物与人C型凝集素样受体-1成员A受体("CLEC-1A"或"CLEC-1A受体")的胞外域结合,并且与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:71组成)和轻链可变结构域组成(包含或由SEQ ID NO:18组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:121组成)和轻链可变结构域组成(包含或由SEQ ID NO:128组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,并且是人CLEC-1的拮抗剂、特别是拮抗人CLEC-1A(特别是人CLEC-1A的胞外域)与至少一种其配体(特别是其靶标)的结合,所述配体特别是由继发性坏死细胞和/或肿瘤细胞表达的配体。

[0199] 拮抗剂化合物特别是抗体或抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物。

[0200] 特别地,拮抗剂化合物选自:抗体,抗体的抗原结合片段,包括嵌合、人源化、完全人源化的抗体及其片段,包括去免疫的抗体及其抗原结合片段,抗原结合抗体模拟物,包含抗体的抗原结合片段或完整抗体的大分子,小分子有机化合物,蛋白质,例如但不限于包含CLEC-1A的至少一个胞外域片段的蛋白质或肽;或CLEC-1A的功能等价物,此种片段可与另一种分子结合,例如肽或另一种蛋白质(例如抗体)的片段,其稳定了CLEC-1A受体的胞外域片段的结构,导致提供包含至少一个CLEC-1A胞外域片段的融合蛋白。例如,此种融合蛋白可以包含CLEC-1A受体的胞外域的片段和接头肽、标签、抗体的Fc部分。在一个具体实施方式中,融合蛋白可以包含SEQ ID NO:108的CLEC-1A的胞外域的至少10个连续氨基酸残基的片段,特别是融合蛋白可以包含CLEC蛋白片段,所述片段包含至少70%、优选至少80%、更优选至少90%的CLEC-1的胞外域;特别是CLEC1蛋白片段,所述片段包含或由SEQ ID NO:108(EC-CLEC1)所示序列中的至少70%、优选至少80%、更优选至少90%的连续氨基酸组成,特别是所述片段包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列。在本发明的一个具体实施方式中,融合蛋白可以包含与SEQ ID NO:108的至少10个连续氨基酸残基的部分具有至少90%同一性的部分。在一个具体实施方式中,CLEC-1A的功能等价物是本说明书中举例说明的Fc-CLEC-1A、更特别是SEQ ID NO:110的FC-CLEC-1A。在一个具体实施方式中,拮抗剂化合物是如上文公开的任何拮抗性抗CLEC-1A抗体。在一个具体实施方式中,拮抗剂化合物是包含重链可变结构域和轻链可变结构域的抗CLEC-1A抗体,重链可变结构域选自SEQ ID NO:95或SEQ ID NO:79或SEQ ID NO:63的氨基酸序列,轻链可变结构域选自SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0201] 本发明还涉及编码本文描述的特异性抗CLEC-1A受体化合物的至少一部分的基因构建体。

[0202] 为此，本发明还涉及编码根据本文公开的化合物的任何定义的化合物的核酸分子。换言之，核酸分子编码抗体或其抗原结合片段的至少6个CDR结构域。因此，根据本发明的核酸分子可以选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104和/或SEQ ID NO:106;条件是核酸分子编码根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段的至少6个CDR结构域;

[0203] 更特别是选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98和/或SEQ ID NO:99;条件是核酸分子编码根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段的至少6个CDR结构域。

[0204] 本发明还可以涉及第一核酸分子和第二核酸分子的组合。编码可变重链结构域的第一核酸分子可以选自:SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:104和/或SEQ ID NO:106;更特别是选自:SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98和/或SEQ ID NO:99。

[0205] 编码可变轻链结构域的第二核酸分子可以选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID

NO:50和SEQ ID NO:52;更特别是选自:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44和/或SEQ ID NO:45。

[0206] 第一核酸分子和第二核酸分子的组合编码根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段的至少6个CDR结构域。

[0207] 此类核酸分子可插入表达载体(例如质粒)内,适用于在宿主细胞内表达编码序列。

[0208] •化合物组合

[0209] 本发明还涉及包含第一治疗剂和至少一种第二治疗剂的化合物组合。

[0210] 在一个优选实施方式中,第一治疗剂是根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方式中,第一治疗性化合物也可以为本文定义的CLEC-1A拮抗剂,例如但不限于结合CLEC-1A的化合物,其选自抗体、抗体的抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、包含抗体的抗原结合片段或完整抗体的大分子、小分子有机化合物、蛋白质,例如但不限于CLEC-1A的至少一种胞外域片段,特别是CLEC-1A的胞外域,或本文定义并且对应于SEQ ID NO:110的氨基酸序列的Fc-CLEC-1蛋白。至少一种第二治疗剂选自:化疗剂、肿瘤靶向抗体(包括抗hCD20-hIgG1、抗hEGFR-hIgG1、抗hHER2-hIgG1)或其抗原结合片段,特别是肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是活化和/或增强巨噬细胞吞噬能力的肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是选自如下的单克隆抗体:阿仑妥珠单抗(alemtuzumab)、阿特利珠单抗(atezolizumab)、贝伐赛珠单抗(bevacizumab)、抗hEGFR-hIgG1单克隆肿瘤靶向抗体(例如西妥昔单抗)、赫赛汀(herceptin)、帕尼妥木单抗(panitumumab)、抗hCD20-hIgG1单克隆肿瘤靶向抗体(例如利妥昔单抗)、抗hHER2-hIgG1单克隆肿瘤靶向曲妥珠单抗、抗PDL-1抗体和抗CD47抗体,或选自抗PD1抗体和抗SIRPa抗体的另一种抗体或单克隆抗体;和/或化疗剂,特别是具有抗增殖、促凋亡、细胞周期阻滞和/或分化诱导作用的细胞毒剂,更特别是选自细胞毒抗体、烷基化药物、蒽环类(anthracycline)、抗代谢药、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、生物碱、博来霉素(bleomycin)、抗肿瘤药、环磷酰胺的细胞毒剂。

[0211] 肿瘤靶向抗体可被定义为识别肿瘤特异性膜蛋白、阻断细胞信号传导并通过Fc驱动的先天免疫应答诱导肿瘤杀伤的治疗性单克隆抗体。

[0212] 在本发明的一个具体实施方式中,第一治疗剂是由本文公开的其CDR结构域定义的抗体,第二治疗剂是利妥昔单抗或另一种抗体或单克隆抗体(选自抗PD1抗体、抗PDL-1抗体、抗CD47抗体和抗SIRPa抗体)。在一个具体实施方式中,第一治疗剂是选自下组的拮抗剂化合物:

[0213] -抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:71组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:18组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:121组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:128组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受

体的结合,所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂;

[0214] -抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:63组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:10组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:120组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:127组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合,所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂;

[0215] -抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域,所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关,特别是与阴性对照相比增加至少10%;以及

[0216] 第二治疗剂选自上文或下文定义的列表。

[0217] 化疗剂可以为常规的细胞毒剂,即在暴露后通过干扰DNA复制、有丝分裂等来诱导不可逆致死损伤的化合物。这些药剂可能具有抗增殖、促凋亡、细胞周期阻滞和分化诱导作用。优选地,这些药剂选自烷基化药物(顺铂、苯丁酸氮芥、丙卡巴肼、卡莫司汀)、蒽环类和其他细胞毒性抗生素、抗代谢药(即甲氨蝶呤、阿糖胞苷、吉西他滨)、抗微管剂(即长春碱、紫杉醇、多西他赛)、拓扑异构酶抑制剂(即依托泊苷、多柔比星)、生物碱(即长春新碱、长春碱、长春瑞滨、喜树碱)或博来霉素(抑制胸苷掺入DNA链)。

[0218] 本发明人显示,CLEC-1A的拮抗剂(特别是CLEC-1A的抗体拮抗剂)与另一种治疗剂(特别是利妥昔单抗)组合使用可增强巨噬细胞(特别是M1巨噬细胞)的吞噬能力,因此抗CLEC-1A拮抗剂化合物适用于增强同时、分开或顺序施用的第二治疗剂的治疗效果。

[0219] 在本发明的另一个实施方式中,提供了化合物组合,所述化合物组合包含第一治疗剂(包含CLEC-1A蛋白的至少一个片段或CLEC1的功能等价物)和至少一种第二治疗剂,其中:

[0220] 第一种治疗剂可以为本文定义的CLEC-1A蛋白的片段,特别是包含至少70%、优选至少80%、更优选至少90%的CLEC-1A胞外域的CLEC-1A蛋白的片段,特别是包含或由SEQ ID NO:108(EC-CLEC1)所示序列中至少70%、优选至少80%、更优选至少90%的连续氨基酸组成的CLEC1A蛋白的片段,特别是包含SEQ ID NO:108(EC-CLEC1)的氨基酸序列的CLEC1A蛋白的片段,或包含本文定义的CLEC-1A蛋白片段的融合蛋白,或包含或由SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列组成的Fc-CLEC1蛋白,其可能由SEQ ID NO:133的核苷酸序列编码;或下文定义的CLEC-1A的功能等效物;以及

[0221] 第二治疗剂选自肿瘤靶向抗体或其抗原结合片段,特别是肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是活化和/或增强巨噬细胞的吞噬能力的肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是选自阿仑妥珠单抗、阿特利珠单抗、贝伐赛珠单抗、西妥昔单抗、赫赛汀、帕尼妥木单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、抗PDL-1抗体和抗CD47抗体的单克隆抗体,或选自抗PD1抗体和抗SIRPa抗体的另一种抗体或单克隆抗体。

[0222] CLEC-1的功能等价物包括但不限于与CLEC-1的配体结合并包含CLEC-1的全部或部分胞外域的分子,从而形成能够捕获CLEC-1配体的可溶性受体。因此,功能等价物包括

CLEC-1的可溶形式。这些蛋白质的合适的可溶形式或其功能等价物可以包括例如已通过化学、蛋白水解或重组方法从其中去除跨膜结构域的蛋白质的截短形式。特别地，功能等价物由在相应蛋白质的全长上与相应蛋白质具有至少80％、更特别是至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、甚至更特别是至少99％同一性的序列组成。如本文所用，术语“相应蛋白质”指本发明的功能等价物对其具有相似功能的蛋白质。本发明描述中提及的同一性百分比基于待比较序列的全局比对来确定，换言之，基于序列在其全长上的比对，例如使用Needleman和Wunsch 1970的算法。例如，可以使用Needle软件通过使用参数“Gap open(空位开放)”等于10.0、参数“Gap Extend(空位延长)”等于0.5和矩阵“BLOSUM 62”来完成此序列比较。软件(例如Needle)可以在全球网站ebi.ac.uk上以“Needle”的名称获得。如本文所用，术语“功能等价片段”还可以表示与CLEC-1的配体结合的CLEC-1的任何片段或片段组装。因此，本发明提供了能够抑制CLEC-1与CLEC-1的至少一种配体结合的多肽、特别是功能等价物，所述多肽包含具有与CLEC-1胞外域的至少一部分序列相对应的序列的连续氨基酸，所述部分与CLEC-1的配体结合。在一些实施方式中，多肽(特别是功能等价物)对应于CLEC-1的胞外域。

[0223] 在一些实施方式中，CLEC-1的功能等价物与异源多肽融合以形成融合蛋白。如本文所用，“融合蛋白”包含与异源多肽(即，除了相同多肽之外的多肽)可操作地连接的本发明的功能等价物的全部或部分(通常具有生物活性)。在融合蛋白中，术语“可操作地连接”意在表示本发明的功能等价物与异源多肽彼此框内融合。异源多肽可以融合至本发明功能等价物的N端或C端。

[0224] 在一些实施方式中，CLEC-1的功能等价物与免疫球蛋白恒定区(Fc区)融合以形成免疫粘附素。免疫粘附素可拥有人类抗体的许多有价值的化学和生物学特性。由于免疫粘附素可以由与适当的人免疫球蛋白铰链和恒定区(Fc)序列连接的具有所需特异性的人蛋白质序列构建，因此可以使用完全人成分来实现关注的结合特异性。此种免疫粘附素对患者的免疫原性最低，对于长期或重复使用是安全的。在一些实施方式中，Fc区是天然序列Fc区。在一些实施方式中，Fc区是变体Fc区。在又一个实施方式中，Fc区是功能性Fc区。如本文所用，术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区，包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能会有所不同，但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230位置的氨基酸残基延伸到其羧基末端。免疫粘附素的粘附部分和免疫球蛋白序列部分可通过最小接头连接。免疫球蛋白序列通常但不一定是免疫球蛋白恒定区。本发明嵌合体中的免疫球蛋白部分可获自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD或IgM，但通常获自IgG1或IgG4。在一些实施方式中，CLEC-1的功能等价物和免疫粘附素的免疫球蛋白序列部分通过最小接头连接。如本文所用，术语“接头”指连接本发明的多肽和免疫球蛋白序列部分的至少一个氨基酸的序列。此种接头可用于防止空间位阻。在一些实施方式中，接头具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个氨基酸残基。然而，上限不是关键，但出于方便原因(例如此类多肽的生物制药生产)选择了上限。接头序列可以为天然存在的序列或非天然存在的序列。如果用于治疗目的，接头通常在施用免疫粘附素的受试者中是非免疫原性的。一组有用的接头序列为来源于WO 96/34103和WO 94/04678中描

述的重链抗体铰链区的接头。其他实例为聚丙氨酸接头序列。

[0225] 本发明的多肽可通过任何合适的方式产生，这对于本领域技术人员而言是显而易见的。为了产生足够量的用于本发明使用的多肽，可通过在适当条件下培养含有本发明多肽的重组宿主细胞来方便地实现表达。特别地，多肽通过重组方式通过编码核酸分子的表达来产生。用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。当以重组形式表达时，多肽特别是通过在宿主细胞中由编码核酸表达来产生。取决于特定系统的个别要求，可以使用任何宿主细胞。合适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。本领域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、HeLa细胞、小仓鼠肾细胞和许多其他细胞。细菌也是生产重组蛋白的优选宿主，因为细菌易于操作和生长。常见优选的细菌宿主是大肠杆菌。

[0226] 本发明的多肽、其片段和本发明的融合蛋白可以表现出翻译后修饰，包括但不限于糖基化(例如，N-连接或O-连接糖基化)、十四烷基化、棕榈酰化、乙酰化和磷酸化(例如，丝氨酸/苏氨酸或酪氨酸)

[0227] 在一个具体实施方式中，包含第一治疗剂和至少一种第二治疗剂的化合物组合包括：

[0228] Fc-CLEC1蛋白，所述Fc-CLEC1蛋白包含或由SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列组成，可能由SEQ ID NO:133的核苷酸序列或其功能等价物编码；以及

[0229] 单克隆抗体，所述单克隆抗体选自阿仑妥珠单抗、阿特利珠单抗、贝伐赛珠单抗、西妥昔单抗、赫赛汀、帕尼妥木单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗，特别是利妥昔单抗。

[0230] 在一个具体实施方式中，治疗剂可以在疾病治疗中同时、分开或顺序施用。

[0231] 本发明还涉及药物组合物，所述药物组合物包含本文定义的第一治疗剂、特别是CLEC-1A拮抗剂(其为根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段)，其单独或与第二治疗剂、药学上合适的载体进行组合，其对于能够施用于有需要的患者的制剂而言是药学上可接受的。特别地，这些可以为等渗、无菌盐溶液(磷酸二氢钠或磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物)或干燥(特别是冷冻干燥)组合物(视情况添加无菌水或生理盐水后可制成可注射溶液)。

[0232] 本发明还涉及药物组合物，所述药物组合物包含本文定义的第一治疗剂、特别是CLEC-1A拮抗剂(其为根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段)，其单独或与第二种治疗剂和/或本文定义的药学上合适的载体进行组合，用于与另一种治疗的联合治疗，包括使用包含化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂(例如靶向肿瘤的单克隆抗体)、细胞治疗剂(例如CAR-T细胞)、免疫抑制剂、促凋亡剂、抗生素、靶向癌症治疗剂和/或益生菌的药物，特别是用于对有需要的患者同时、分开或顺序施用。

[0233] 本发明还涉及在有需要的人类受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文定义的第一治疗剂、特别是CLEC-1A拮抗剂(其为根据本文公开的任何实施方式的抗体或其抗原结合片段)，所述第一治疗剂与常规治疗组合使用。

[0234] 如本文所用，术语“标准或常规治疗”指通常施用于患有癌症的受试者的任何癌症治疗(药物、放射疗法等)。

[0235] 特别地，第一治疗剂与化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂(例如靶向肿瘤的单克隆抗体)、细胞治疗剂(例如CAR-T细胞)、免疫抑制剂、促凋亡剂、抗生素、靶向癌症治疗剂和/或

益生菌组合使用。

[0236] 本发明还涉及本文公开的抗CLEC1A抗体和抗原结合片段以及本文公开的拮抗剂化合物用于治疗癌症的用途。术语“癌症”在本领域具有其一般含义，并且指一组涉及异常细胞生长并可能侵入或扩散到身体其他部位的疾病。术语“癌症”进一步包括原发性和转移性癌症。可通过本发明的方法和组合物治疗的癌症的实例包括但不限于来自膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳房、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫的癌症。此外，癌症可能具体具有但不限于以下组织学类型：恶性肿瘤；癌(carcinoma)；未分化癌；巨细胞和梭形细胞癌；小细胞癌；乳头状癌；鳞状细胞癌；淋巴上皮癌；基底细胞癌；毛基质癌；移行细胞癌；乳头状移行细胞癌；腺癌；恶性胃泌素瘤；胆管癌；肝细胞癌；合并肝细胞癌和胆管癌；小梁腺癌；腺样囊性癌；腺瘤性息肉中的腺癌；腺癌，家族性结肠息肉病；实体癌；恶性类癌瘤；细支气管肺泡腺癌；乳头状腺癌；嫌色细胞癌；嗜酸细胞癌；嗜酸腺癌；嗜碱性粒细胞癌；透明细胞腺癌；颗粒细胞癌；滤泡性腺癌；乳头状和滤泡状腺癌；非包膜硬化性癌；肾上腺皮质癌；子宫内膜癌；皮肤附件癌；大汗腺癌；皮脂腺癌；耵聍癌；腺癌；粘液表皮样癌；囊腺癌；乳头状囊腺癌；乳头状浆液性囊腺癌；粘液性囊腺癌；粘液性腺癌；印戒细胞癌；浸润性导管癌；髓样癌；小叶癌；炎性癌；乳腺佩吉特病；腺泡细胞癌；腺鳞癌；腺癌伴鳞状化生；恶性胸腺瘤；恶性卵巢间质瘤；恶性泡膜细胞瘤；恶性颗粒细胞瘤；恶性成纤维细胞瘤；支持细胞癌；恶性间质细胞瘤；恶性脂质细胞瘤；恶性副神经节瘤；恶性乳腺外副神经节瘤；嗜铬细胞瘤；血管肉瘤；恶性黑色素瘤；无色素性黑色素瘤；浅表扩散黑色素瘤；巨大色素痣中的恶性黑色素瘤；上皮样细胞黑色素瘤；恶性蓝色痣；肉瘤；纤维肉瘤；恶性纤维组织细胞瘤；粘液肉瘤；脂肪肉瘤；平滑肌肉瘤；横纹肌肉瘤；胚胎性横纹肌肉瘤；肺泡横纹肌肉瘤；间质肉瘤；恶性混合瘤；缪氏混合瘤；肾母细胞瘤；肝母细胞瘤；癌肉瘤；恶性间充质瘤；恶性布伦纳瘤；恶性叶状瘤；滑膜肉瘤；恶性间皮瘤；无性细胞瘤；胚胎癌；恶性畸胎瘤；恶性卵巢甲状腺肿；绒毛膜癌；恶性中肾瘤；血管肉瘤；恶性血管内皮瘤；卡波西肉瘤；恶性血管外皮细胞瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮质旁骨肉瘤；软骨肉瘤；恶性软骨母细胞瘤；间充质软骨肉瘤；骨巨细胞瘤；尤因肉瘤；恶性牙源性肿瘤；成釉细胞牙肉瘤；恶性成釉细胞瘤；成釉细胞纤维肉瘤；恶性松果体瘤；脊索瘤；恶性胶质瘤；室管膜瘤；星形细胞瘤；原生质星形细胞瘤；纤维星形细胞瘤；星形母细胞瘤；胶质母细胞瘤；少突胶质细胞瘤；少突胶质细胞瘤；原始神经外胚层；小脑肉瘤；神经节神经母细胞瘤；成神经细胞瘤；视网膜母细胞瘤；嗅觉神经源性肿瘤；恶性脑膜瘤；神经纤维肉瘤；恶性神经鞘瘤；恶性颗粒细胞瘤；恶性淋巴瘤；霍奇金病；霍奇金淋巴瘤；副肉芽肿；小淋巴细胞恶性淋巴瘤；弥漫性大细胞恶性淋巴瘤；滤泡性恶性淋巴瘤；蕈样肉芽肿；其他特定的非霍奇金淋巴瘤；恶性组织细胞增多症；多发性骨髓瘤；肥大细胞肉瘤；免疫增殖性小肠疾病；白血病；淋巴样白血病；浆细胞白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；髓性白血病；嗜碱性白血病；嗜酸性粒细胞白血病；单核细胞白血病；肥大细胞白血病；巨核细胞白血病；骨髓肉瘤；以及毛细胞白血病。

[0237] 在一些实施方式中，受试者患有选自如下的癌症：胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌、乳腺癌、卡斯特曼病宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胆囊癌、胃肠道类癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤、肾癌、喉和下咽癌、肝癌、肺癌、间皮瘤、浆细胞瘤、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔及口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体癌、

前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、阴道癌、外阴癌和子宫癌。

[0238] 本发明还涉及本文公开的抗CLEC1A抗体和抗原结合片段以及本文公开的拮抗剂化合物在治疗(包括预防性治疗)有害病况或疾病中的用途,特别是其中涉及骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力。在一个具体实施方式中,疾病或病况选自癌症,特别是上文所列的癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0239] 本发明还涉及本文公开的抗CLEC1A抗体和抗原结合片段以及本文公开的拮抗剂化合物用于治疗(包括预防性治疗)有害病况或疾病的用途,特别是刺激树突状细胞的吞噬能力可以改善或治疗病况或疾病。在一个具体实施方式中,病况或病症选自癌症,特别是上文所列的癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0240] 本发明还涉及本文所公开的抗CLEC1A抗体和抗原结合片段以及本文所公开的拮抗剂化合物用于治疗(包括预防性治疗)任何易于通过增加骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力来改善或预防的疾病或病况中的用途。特别地,疾病或病况选自癌症,特别是上文所列的癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0241] 本发明还涉及本文公开的抗CLEC1A抗体和抗原结合片段以及本文公开的拮抗剂化合物用于治疗(包括预防性治疗)有害病况或疾病的用途,特别是其中涉及T细胞,特别是涉及T细胞的增殖。在一个具体实施方式中,疾病或病况选自癌症,特别是上文所列的癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0242] 本发明还涉及增加骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本文定义的第一治疗剂,特别是根据本文公开的任何实施方式的抗CLEC1A抗体或其抗原结合片段;特别地,所述第一治疗剂与常规治疗或与本文定义的至少一种第二治疗剂同时、分开或顺序施用。

[0243] 本发明还涉及本文定义的第一治疗剂、特别是根据本文公开的任何定义的抗CLEC-1A拮抗剂化合物、更特别是根据本文公开的任何实施方案的抗CLEC1A抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途。特别地,本发明涉及此种抗CLEC-1A拮抗剂化合物在制备用于治疗和/或预防癌症(特别是如上文所列癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌)的药物中的用途。

[0244] 本发明还涉及治疗或预防疾病的方法,所述方法通过向有需要的患者施用治疗量的本文定义的第一治疗剂、特别是根据本文公开的任何定义的抗CLEC-1A拮抗剂化合物、更特别是根据本文公开的任何实施方式的抗CLEC1A抗体或其抗原结合片段来治疗或预防疾病。特别地,本发明涉及用于治疗或预防癌症(特别是上文所列的癌症,更特别是液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌)的方法。

[0245] 本发明还涉及本文定义的化合物、组合物和化合物组合的用途,特别是用于预防或治疗疾病或病症的用途。因此,提供了本发明的拮抗剂化合物(特别是本发明的抗体或其抗原结合片段)或根据本发明的核酸分子或核酸分子组合或根据本发明的化合物组合在预防和/或治疗疾病或病症(特别是人类疾病或人类病症)中的用途,其中,骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力增加改善或预防疾病或病症。

[0246] 还提供了本发明的拮抗剂化合物(特别是本发明的抗体或其抗原结合片段)或本

发明的核酸分子或核酸分子组合或本发明的化合物组合在治疗疾病或病况中的用途，其中，诱导患者中的吞噬作用改善或预防疾病或病况。

[0247] 还提供了本发明的拮抗剂化合物(特别是本发明的抗体或其抗原结合片段)或本发明的核酸分子或核酸分子的组合或本发明的化合物组合在治疗患有癌症(特别是液体癌或实体癌，更特别是淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌、炎性疾病、慢性感染或败血症)的患者中的用途。

[0248] 还提供了本发明的拮抗剂化合物(特别是本发明的抗体或其抗原结合片段)或本发明的核酸分子或核酸分子组合或本发明的化合物组合在联合治疗中的用途，其中，将第一药物施用于有需要的患者(特别是同时、分开或顺序施用)，所述第一药物包含化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂(例如靶向肿瘤的单克隆抗体)、细胞治疗剂(例如CAR-T细胞)、免疫抑制剂、促凋亡剂、抗生素、靶向癌症治疗剂和/或益生菌。

[0249] 在所述用途的一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂化合物可以选自：

[0250] -抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域，并且与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:71组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:18组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:121组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:128组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合，所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂；

[0251] -抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域，并且与包含或由重链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:63组成)和轻链可变结构域(包含或由SEQ ID NO:10组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合、特别是与包含或由重链结构域(包含或由SEQ ID NO:120组成)和轻链结构域(包含或由SEQ ID NO:127组成)组成的抗体竞争与人CLEC-1A受体的结合，所述抗体或其抗原结合片段是人CLEC-1的拮抗剂；以及

[0252] -抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人C型凝集素样受体-1成员A受体(CLEC-1A受体)的胞外域，所述抗体或其抗原结合片段与阴性对照相比在体内和/或体外使用时与调节(特别是增加)骨髓细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用有关，特别是与阴性对照相比增加至少10％。

[0253] 表1:本发明抗体的重链可变结构域的特异性CDR结构域的序列(根据Kabat系统)

[0254]

| CDR | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 15E3chim_VH wt_CDR1 | DYVIA | 57 |
| 15E3chim_VH wt_CDR2 | EIYPGSGSIYYNEKFKG | 59 |
| 15E3chim_VH wt_CDR3 | STVVAFDY | 61 |
| 11H11chim_VH wt_CDR1 | NFGMN | 65 |
| 11H11chim_VH wt_CDR2 | WINTNTGEPTYADDFKG | 67 |
| 11H11chim_VH wt_CDR3 | GAPAWFTY | 69 |
| 5D1chim_VH wt_CDR1 | SYGVH | 73 |
| 5D1chim_VH wt_CDR2 | VIWSDGSTIYNSALKS | 75 |
| 14H9chim_VH wt_CDR2 | VIWSDGSTIYNSALKS | 75 |

| | | |
|---|---|---|
| 5D1chim_VH wt_CDR3 | HGGYYNYFDY | 77 |
| 14H9chim_VH wt_CDR3 | HGGYYNYFDY | 77 |
| 6C5chim_VH wt_CDR1 | DYVIS | 81 |
| 6C5chim_VH wt_CDR2 | EIYPGSGNTYYNEKFKG | 83 |
| 6C5chim_VH wt_CDR3 | GGSSHFDY | 85 |
| 10F4chim_VH wt_CDR1 | DYTIH | 89 |
| 10F4chim_VH wt_CDR2 | YINPSSGYTNYNQKFKA | 91 |
| 10F4chim_VH wt_CDR3 | MFRRSYFDY | 93 |
| 14H9chim_VH wt_CDR1 | TYGIH | 97 |
| 21B1chim_VH wt_CDR1 | TYGIH | 103 |
| 21B1chim_VH wt_CDR2 | VIWSDGSTIYNSALKS | 105 |
| 21B1chim_VH wt_CDR3 | HGGYYNYFDY | 107 |

[0255] 表2:本发明抗体的轻链可变结构域的特异性CDR结构域的序列(根据Kabat系统)

[0256]

| CDR | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 15E3chim_VL wt_CDR1 | SDSSSISSNYLH | 4 |
| 15E3chim_VL wt_CDR2 | GTSNLAS | 6 |
| 15E3chim_VL wt_CDR3 | QQGSSIPRT | 8 |
| 11H11chim_VL wt_CDR1 | RATENIYSYLA | 12 |
| 11H11chim_VL wt_CDR2 | NAKTLAE | 14 |
| 11H11chim_VL wt_CDR3 | QHHFGTPLT | 16 |
| 5D1chim_VL wt_CDR1 | HASQNINVWLS | 20 |
| 14H9chim_VL wt_CDR1 | HASQNINVWLS | 20 |
| 5D1chim_VL wt_CDR2 | KASNLHT | 22 |
| 14H9chim_VL wt_CDR2 | KASNLHT | 22 |
| 5D1chim_VL wt_CDR3 | QQGQSYWT | 24 |
| 14H9chim_VL wt_CDR3 | QQGQSYWT | 24 |
| 6C5chim_VL wt_CDR1 | RASESVDNHGFSFMN | 28 |
| 6C5chim_VL wt_CDR2 | AASNQGS | 30 |
| 6C5chim_VL wt_CDR3 | QQSKEVPWT | 32 |
| 10F4chim_VL wt_CDR1 | RSSQSLENSNGNTYLN | 36 |
| 10F4chim_VL wt_CDR2 | RVSNRFS | 38 |
| 10F4chim_VL wt_CDR3 | LQVTHVPYT | 40 |
| 21B1chim_VL wt_CDR1 | KSTQNLFYSTNQKNYLA | 49 |
| 21B1chim_VL wt_CDR2 | WASTRES | 51 |
| 21B1chim_VL wt_CDR3 | QQYYTYPWT | 53 |

[0257] 本发明涵盖HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的任何组合。

[0258] 表3:本发明抗体的重链可变结构域的序列

[0259]

| 可变重链 | 序列 | SEQ ID NO： |
|---|---|---|
| 15E3chim_VH wt | QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGFTFTDYVIAWVKVR TGQGLEWIGEIYPGSGSIYYNEKFKGKATLTADKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYFCASSTVVAFDYWGQGTTLTVSS | 55 |
| 11H11chim_VH wt | QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQA PGKGLKWMGWINTNTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLKNEDTATYFCARGAPAWFTYWGQGTLVTVSA | 63 |
| 5D1chim_VH wt | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTSYGVHWVRQPPG KGLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAMYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSS | 71 |
| 6C5chim_VH wt | QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVISWVKQK TGQGLEWIGEIYPGSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYIH LSSLTSEDSAVYFCAGGGSSHFDYWGQGTTLTVSS | 79 |
| 10F4chim_VH wt | QVQLQQSGTELARPGASVKMSCKASGYIFTDYTIHWVKQR PGQGLEWVGYINPSSGYTNYNQKFKAKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCTPMFRRSYFDYWGQGTTLTVSS | 87 |
| 14H9chim_VH wt | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTTYGIHWVRQPPGK GLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAIYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSS | 95 |
| 21B1chim_VH wt | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTTYGIHWVRQPPGK GLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAIYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSS | 101 |

[0260] 表4:本发明抗体的轻链可变结构域的序列

[0261]

| 可变轻链 | 序列 | SEQ ID NO： |
|---|---|---|
| 15E3chim_VL wt | EIVLTQSPTTLAASPGEKIIITCSDSSSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTTYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPRTFGGGTKLEIK | 2 |
| 11H11chim_VL wt | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRATENIYSYLAWYQQKQGKSPQFLVYNAKTLAEGMPSRFSGSGSGTQFSLKINILQPEDFGTYYCQHHFGTPLTFGAGTKLELK | 10 |
| 5D1chim_VL wt | DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYWTFGGGTKLEIK | 18 |
| 6C5chim_VL wt | DIVLTQSPASLAVSLGQGATISCRASESVDNHGFSFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK | 26 |
| 10F4chim_VL wt | DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGTKLEIK | 34 |
| 14H9chim_VL wt | DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTTFTLTIDSLQPEDIATYYCQQGQSYWTFGGGTKLEIK | 42 |
| 21B1chim_VL wt | DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTLTCKSTQNLFYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDPAVYYCQQYYTYPWTFGGGTKLEIK | 47 |

[0262] 本发明涵盖选自表3的一个重链可变结构域和选自表4的一个轻链可变结构域的任何组合。

[0263] 表5:本发明抗体的全链的序列

[0264]

| 全链 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 15E3-VH wt-FcG4m | QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGFTFTDYVIAWVKVR TGQGLEWIGEIYPGSGSIYYNEKFKGKATLTADKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYFCASSTVVAFDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 119 |
| 11H11-VH wt-FcG4m | QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQA PGKGLKWMGWINTNTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLKNEDTATYFCARGAPAWFTYWGQGTLVTVSAAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 120 |
| 5D1-VHwt-FcG4m | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTSYGVHWVRQPPG KGLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAMYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 121 |
| 6C5-VHwt-FcG4m | QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVISWVKQ KTGQGLEWIGEIYPGSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYI HLSSLTSEDSAVYFCAGGGSSHFDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF | 122 |

[0265]

| | | |
|---|---|---|
| | YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | |
| 10F4-VH wt-FcG4m | QVQLQQSGTELARPGASVKMSCKASGYIFTDYTIHWVKQR PGQGLEWVGYINPSSGYTNYNQKFKAKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCTPMFRRSYFDYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 123 |
| 14H9-VH wt-FcG4m | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTTYGIHWVRQPPG KGLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 124 |
| 21B1-VH wt-FcG4m | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTTYGIHWVRQPPG KGLEWLVVIWSDGSTIYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCARHGGYYNYFDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* | 125 |
| 15E3-VL wt-CLhk | EIVLTQSPTTLAASPGEKIIITCSDSSSISSNYLHWYQQKPGFS PKLLIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTTYSLTIGTMEAEDVAT YYCQQGSSIPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC* | 126 |
| 11H11-VL wt-CLhk | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRATENIYSYLAWYQQKQG KSPQFLVYNAKTLAEGMPSRFSGSGSGTQFSLKINILQPEDF GTYYCQHHFGTPLTFGAGTKLELK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW | 127 |

[0266]

| | | |
|---|---|---|
| | KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | |
| 5D1-VLwt -CLhk | DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPG NIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIAT YYCQQGQSYWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | 128 |
| 6C5-VLwt -CLhk | DIVLTQSPASLAVSLGQGATISCRASESVDNHGFSFMNWFQ QKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPME EDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | 129 |
| 10F4-VLwt-CLhk | DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWY LQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | 130 |
| 14H9-VL wt-CLhk | DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPG NIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTTFTLTIDSLQPEDIAT YYCQQGQSYWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | 131 |
| 21B1-VL wt-CLhk | DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTLTCKSTQNLFYSTNQKNYLAW YQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VKAEDPAVYYCQQYYTYPWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* | 132 |

[0267] 本发明涵盖选自表5的一个重链和选自表5的一个轻链的任何组合。在一个具体实施方式中，本发明涵盖具有相同参考名称的重链和轻链的组合。

[0268] 提出以下附图和实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的完整公开和描述，而不意在限制本发明人认为的发明范围，也不意在表示以下实验是全部或唯一进行的实验。尽管已参照其特定实施方式描述了本发明，但本领域技术人员应理解，在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下，可以进行各种改变和等效物替换。此外，可以进行许多修改以使特定情况、材料、物质组成、工艺、工艺步骤或工序适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改均意在落入所附权利要求的范围内。

[0269] 材料与方法

[0270] 新型抗人CLEC单克隆抗体的制备、选择和表征

[0271] 用His Clec-1(带有His标签的重组人CLEC-1蛋白，#1704-CL，R&D Systems，美国明尼阿波利斯)或Fc-Clec(与人免疫球蛋白IgG1恒定片段在N末端结构域融合的重组人CLEC-1蛋白，Osé免疫疗法，法国南特)对小鼠进行免疫，根据常规技术来获得单克隆抗体。免疫方案由Diaclone SAS(法国贝桑松)来进行：使用重组His-Clec蛋白或重组Fc-Clec来

免疫3只BALB/c品系小鼠。在足垫中施用1微克蛋白质，前3次注射每周1天，最后2次注射每两周1天。在收集神经节细胞之前，第42天的第五次注射被认为是加强(boost)。通过将神经节细胞与小鼠骨髓瘤X63/AG.8653融合来获得杂交瘤。首先根据分泌的单克隆抗体特异性结合重组His-Clec-1蛋白(#1704-CL,R&D System)和Clec-Fc(与人IgG1在C末端结构域融合的重组人CLEC-1蛋白)的能力以及特异性结合人骨髓瘤U266细胞表面Clec蛋白的能力来筛选杂交瘤。在选择之后，克隆杂交瘤，在DMEM完全培养基中培养。上清液通过蛋白A色谱仪(DiaClone,法国贝桑松)用甘氨酸0.1M pH 2.8洗脱缓冲液来进行亲和纯化。在针对Clec-1人类蛋白质的ELISA和针对U266细胞的流式细胞术测定中测量经纯化的纯化抗体的活性。

[0272] 通过ELISA测定人His-Clec、人Clec-Fc和小鼠Fc-Clec结合

[0273] 对于活性ELISA测定，将重组His-Clec(#1704-CL,R&D Systems,美国明尼阿波利斯)或重组人Clec-Fc(Ose免疫疗法,法国南特)在碳酸盐缓冲液(pH 9.2)中以2μg/mL固定在塑料上，添加纯化抗体以测量结合。在孵育和洗涤后，添加过氧化物酶标记的驴-抗-小鼠IgG(#715-036-151,Jackson Immunoresearch,美国)，通过常规方法进行显示。

[0274] 对于小鼠的交叉特异性，将重组小鼠Clec-Fc(与小鼠IgG1恒定片段在N端融合的重组小鼠Clec,Osé免疫疗法,法国南特)在碳酸盐缓冲液(pH 9.2)中以2μg/mL固定在塑料上，然后添加纯化抗体以测量结合。在孵育和洗涤后，添加山羊-抗-小鼠IgGκ链(#115-005-174,Jackson Immunoresearch,美国)，然后添加过氧化物酶标记的驴-抗-山羊IgG(#705-035-147,Jackson Immunoresearch,美国)，通过常规方法进行显示。

[0275] 通过BLITZ进行Clec-1的生物传感器亲和力测量

[0276] 使用BLItz系统(Forté bio,#C22-2号61010-1:Molecular Devices,美国圣荷西)进行分析。在2分钟内以10μg/mL浓度将重组His-Clec(#1704-CL,R&D Systems,美国明尼阿波利斯)固定在Ni-NTA生物传感器(Forté bio,#18-0029)上。在20μg/mL纯化抗体的3分120秒的结合期(ka)、然后10分120秒的解离期(kd)后测量值，以确定亲和力常数(KD)。

[0277] 通过细胞荧光法对人U266骨髓瘤进行Clec-1结合试验

[0278] 为了测量抗Clec-1对人U266骨髓瘤的结合，首先在冷PSE(含2％热灭活牛血清、2mM EDTA的磷酸盐缓冲液盐水)中洗涤细胞，在冰上孵育30分钟以减缓细胞代谢。然后将浓度范围内的抗体在冰上孵育30分钟，用冷PSE洗涤细胞，然后在冰上用5μg/mL的Alexa647标记的山羊-抗-小鼠IgG(#A21236;飞世尔科技,法国伊尔基希)染色30分钟。用CytoFlex细胞荧光计(贝克曼库尔特,法国维勒班特)对样品进行分析。

[0279] 通过FACS(流式细胞术)测定拮抗活性

[0280] 对于竞争性测定，将Fc-Clec-1(Ose免疫疗法,法国南特)与Alexa Fluor 488(Alexa Fluor®488微量蛋白质标记试剂盒#A30006,飞世尔科技,法国伊尔基希)偶联。

[0281] 经透化(#554714 CytoFix/Cytoperm试剂盒,BD Biosciences,法国勒庞德克莱克斯)和Fc阻断(#564220,BD Biosciences)的伯基特淋巴瘤Raji细胞表达Clec-1配体，其可在用10nM或20nM的Alexa488-Fc-Clec-1孵育后检测到。对于透化(#554714 CytoFix/Cytoperm试剂盒,BD Biosciences,法国勒庞德克莱克斯)，先在冷PSE中洗涤细胞，在冰上的冷Cytofix试剂中孵育20分钟，然后在透化洗涤缓冲液(1/10,在水中)中进行洗涤。对于Fc阻断，然后将细胞与用透化洗涤缓冲液稀释50倍的人Fc阻断剂(#564220,BD Biosciences)一起室温孵育30分钟。

[0282] 为了测量竞争,在室温下在透化洗涤缓冲液中将不同浓度的纯化抗Clec抗体与Alexa488-Fc-Clec-1一起预孵育15分钟。然后将预孵育的混合物在经透化和Fc阻断的Raji细胞上在冰上孵育30分钟。然后在冰上通过PFA 2%在冷PBS中固定10分钟,在CytoFlex细胞荧光计(贝克曼库尔特,法国维勒班特)上分析细胞的结合。

[0283] 还在紫外线预处理的促凋亡人PBMC上测量竞争,它也可以在紫外线辐射下处理18小时后表达配体。紫外线处理后,细胞先在冷PSE中洗涤,然后在室温下用PSE稀释50倍的人Fc阻断剂阻断30分钟,然后在冰上更换。在室温下在PSE中将不同浓度的纯化抗Clec抗体与不同浓度的Alexa488-Fc-Clec-1预孵育15分钟。然后将预孵育混合物在Fc阻断/SAB(#34005-100,Invitrogen,法国伊尔基希)促凋亡PBMC上在冰上孵育30分钟。然后在冰上通过PFA 2%在冷PBS中固定10分钟,在CytoFlex细胞荧光计(贝克曼库尔特,法国维勒班特)上分析细胞的结合。

[0284] 抗人抗clec Mab的核苷酸和氨基酸序列的RACE PCR

[0285] 使用5'RACE PCR技术(Sigma;货号3353621001)对抗clec克隆的VH和VL区进行测序。简言之,通过Trizol法提取总RNA,逆转录,使用dATP和末端转移酶在分子的5'末端对所得cDNA进行多腺苷酸化。使用寡dT锚定引物和恒定区结合引物与Herculase酶(安捷伦;货号600679)进行第一个35个循环PCR反应。使用嵌套PCR锚引物和恒定区嵌套引物进行第二次35个循环PCR。然后将得到的PCR产物TA克隆到大肠杆菌中,在氨苄青霉素和X-gal上选择后,使用嵌套PCR锚定引物和恒定区嵌套引物通过PCR筛选得到的白色菌落,对插入的cDNA进行测序。核苷酸序列和推断的氨基酸序列显示在图x和序列表中。

[0286] 嵌合抗clec抗体的制备和表征

[0287] 对于嵌合抗clec,通过EcoRV将小鼠抗clec抗体的重链可变序列(VH)克隆到含有hIgG4的CH1-铰链-CH2-CH3结构域的pcDNA3.4人G4m表达质粒(OSE免疫治疗质粒)中,在S228P处突变以稳定铰链区。通过BsiWI将小鼠抗clec抗体轻链(VL)的可变序列克隆到含有人CLκ的pcDNA3.4 CLIg-hκ表达质粒(OSE免疫治疗质粒)中。

[0288] 首先在COS细胞中,我们通过Lipofectamine法共转染了含有VH-hFcG4m的质粒和含有VL-CLk的质粒。孵育48至72小时后,回收上清液。对于第一次筛选,通过夹心ELISA对其进行量化,在针对Clec-his ELISA的活性测定中对其进行测试。

[0289] 然后在HEK自由式细胞中,我们通过Lipofectamine法共转染含有VH-hFcG4m和VL-CLhk的相同质粒。孵育6天后,回收上清液,通过蛋白A色谱法(HiTrap,GeHealthcare),用柠檬酸0.1M pH 3洗脱缓冲液进行亲和纯化。纯化的抗体在PBS中进行透析和浓缩。通过UV nanodrop对它们进行量化,在多个测试中进行测试:通过ELISA和Blitz(ForteBio)进行针对Clec-his的活性测定、针对U266细胞的活性测定(Clec存在于细胞表面)、用透化的PBMC和Raji细胞进行拮抗剂测定。

[0290] 嵌合抗CLEC1抗体的制备、表征和生产

[0291] 方法:使用重组蛋白人CLEC1-His(R&D Systems;货号1704-CL)或Fc-hCLEC1(OSE免疫疗法)对小鼠进行免疫,产生针对该抗原的鼠单克隆抗体。在5只麻醉的BALB/c成年小鼠的食垫中进行肌肉注射。所有小鼠实验均按照国家指南进行。根据免疫方案对小鼠进行免疫,在不同时间进行至少5次1μg注射,直至初次注射后42天。这些小鼠在与骨髓瘤融合以产生杂交瘤之前接受了增强预融。如下所述,在用于生产mAb之前,使用结合测定和拮抗剂

测定筛选目标杂交瘤。该免疫运动已导致6种拮抗鼠抗体的选择。使用5'RACE PCR技术对6个克隆(14H9-F3、5D1-A5、11H11-G11、10F4-H2、6C5-A4、15E3-G3)的VH和VL区进行测序。氨基酸序列和CDR描述公开于序列表中。

[0292] 为了构建抗CLEC1 Ab的重链,通过EcoRV在pcDNA3.4-hIgG4m表达质粒(OSE免疫疗法)中合成和克隆可变结构域VH序列,所述表达质粒含有人IgG4突变S228P的人Fc以防止fab臂交换。为了构建抗CLEC1 Ab的轻链,可变结构域VL被合成并通过BsiWI克隆到含有人CLκ(OSE免疫疗法)的pcDNA3.4-CLIghk表达质粒中。在哺乳动物HEK细胞中,我们通过Lipofectamine法共转染了含有VH-hFcG4m的质粒和含有VL-CLκ的质粒。孵育5至6天后,回收上清液,通过夹心ELISA测定进行定量。上清液可通过蛋白A层析(HiTrap:GeHealthcare)与柠檬酸0.1M pH 3洗脱缓冲液进行亲和纯化。在PBS中透析和浓缩纯化的抗体。通过UV(A280 nM)对其进行量化,在ELISA测定中针对His-CLEC1进行活性测定。

[0293] 夹心ELISA用于定量上清液中的抗体

[0294] 对于定量ELISA测定,将在硼酸盐缓冲液(pH 9)中的Fc特异性驴-抗-人IgG(Jackson Immunoresearch,美国;货号709-005-098)以1.3μg/mL固定在塑料上,添加含有抗体的上清液以测量结合,将其与标准抗体进行比较。在孵育和洗涤后,加入小鼠抗人κ抗体(OSE免疫疗法;货号NaM76-5F3),通过过氧化物酶标记的驴-抗-小鼠IgG抗体(Jackson Immunoresearch,美国;货号715-036-151)进行检测。通过常规方法来显示ELISA。

[0295] 通过ELISA进行人抗CLEC-1A活性测定

[0296] 对于活性ELISA测定,将重组hCLEC-His(R&D System;货号1704-CL)以2μg/mL固定在塑料上,添加含有抗体或纯化抗体的上清液以测量结合。在孵育和洗涤后,添加过氧化物酶标记的驴-抗-人IgG(Jackson Immunoresearch;货号709-035-149),通过常规方法进行显示。

[0297] 通过细胞荧光法对U266细胞进行Clec-his结合试验

[0298] 为了测量抗clec对U266细胞的结合,首先加入以1/200稀释的人Fc受体结合抑制剂(BD pharmingen,美国;货号564220),在室温下保持30分钟以阻断U266细胞上的人Fc受体以降低背景。然后,将抗体在4℃下孵育30分钟,洗涤,然后用PE标记的抗人IgG Fc(Biolegend,美国;货号409303)在4℃下染色15分钟。在citoflex(贝克曼库尔特)上分析样品。

[0299] 通过细胞荧光法对CHO-Clec-1细胞(用表达Clec-1的慢病毒转导的细胞)进行Clec结合测定

[0300] 为了测量抗clec对CHO-Clec-1细胞的结合,首先加入以1/200稀释的人Fc受体结合抑制剂(BD Pharmingen,美国;货号564220),在室温下保持30分钟以阻断CHO上的人Fc受体-Clec-1细胞以减少背景。然后,将抗体在4℃下孵育30分钟,洗涤,然后用PE标记的抗人IgG Fc(Biolegend,美国;货号409303)在4℃下染色15分钟。在citoflex(贝克曼库尔特)上分析样品。

[0301] 通过Blitz对人CLEC-His重组蛋白的抗clec抗体进行亲和力分析

[0302] 将Clec-His重组蛋白(R&D System;货号1704-CL)固定在NINTA生物传感器上,以20μg/mL的浓度添加所示抗体。在120秒的结合期(ka)和120秒的解离期(kd)后,推导出值,确定亲和力常数(KD)。

[0303] 吞噬试验

[0304] 使用由Miltenyi提供的经典单核细胞分离试剂盒,通过磁性分选从健康志愿者的单核细胞分离中分离单核细胞。然后,将单核细胞与50ng/mL人重组GM-CSF(CellGenix)和20ng/mL人重组IL-4(CellGenix)一起培养6至7天,产生未成熟的树突状细胞(iDC)。用50ng/mL人重组TGFb(PeproTech)将iDC极化为免疫耐受DC持续2天,这使得这些TGFb-DC过度表达Clec-1。在极化期间以10μg/mL添加抗体。TGFβ-DC与非霍奇金淋巴瘤(Raji)以1:1的比率培养,10ng/mL的抗CD20 mAb(利妥昔单抗)提供"吃我"信号;裸NSCLC细胞(A549)与TGFβ-DC一起培养5小时。对于每个供体,通过流式细胞术分析吞噬作用,并相对于对照抗体条件进行归一化。

[0305] 用M-CSF(100ng/mL)由单核细胞产生巨噬细胞(MΦ)5天。MΦ与分别为10ng/mL的非霍奇金淋巴瘤(Raji;CD20+)或结肠癌(DLD-1;EGFR2+)或乳腺癌(SK-BR3;Her2+)以1:2比率+/-抗CD20 mAb(利妥昔单抗)、抗EGFR mAb(西妥昔单抗)或抗Her2 mAb(曲妥珠单抗)一起孵育2小时,提供"吃我"信号。通过流式细胞仪进行吞噬分析,通过总CPDe450+细胞中CPDe670+细胞的百分比来计算吞噬百分比。通过将吞噬Raji细胞的M1百分比乘以吞噬细胞的中值荧光强度来表示结果,根据利妥昔单抗浓度来表示。

[0306] 对于肉眼观察测定,如上所述地产生巨噬细胞。MΦ与抗CLEC1嵌合mAb预孵育2小时,然后与分别为10ng/mL的非霍奇金淋巴瘤(Raji;CD20+)+抗CD20 mAb(利妥昔单抗)一起培养4小时,提供"吃我"信号。通过显微镜进行吞噬分析,通过总巨噬细胞中pHrodo(pHrodo-SE,Thermofisher)阳性Raji的百分比来计算吞噬百分比。

[0307] 用荧光染料对肿瘤细胞系、Raji(B淋巴瘤)CSCLC细胞、结直肠癌细胞和乳腺癌细胞Huh7(肝癌)进行染色以在吞噬试验中表征细胞。简言之,根据制造商的说明(Life Technologies),将肿瘤细胞与细胞增殖染料eFluor 670一起孵育15分钟,清洗,然后紫外线处理。然后,用150mJ/$cm^2$的紫外线处理细胞,孵育过夜,以触发导致Clec-1配体表达的凋亡诱导程序。

[0308] 收集TGFb-DC和肿瘤细胞系,编号,以2个DC/1个肿瘤细胞的比率孵育5小时,在此过程中以10μg/mL添加抗体。通过对CPD-eFluor 670阳性TGFb-DC进行流式细胞术来评估吞噬作用。

[0309] 在本发明的实施例中,除非特别指出,抗CLEC-1A对照抗体是不具有拮抗特性的内部抗体。

[0310] 实施例

[0311] 实施例1:本发明的鼠和嵌合抗hCLEC1A拮抗抗体和现有技术中公开的抗hCLEC1A拮抗抗体对树突状细胞肿瘤吞噬作用的生物学活性(图1-图2)

[0312] 方法:a)用TGFb重组蛋白极化的单核细胞衍生的树突状细胞(DC)的产生

[0313] 使用由Miltenyi提供的经典单核细胞分离试剂盒,通过磁性分选从健康志愿者的单核细胞分离中分离单核细胞。然后,将单核细胞与50ng/mL人重组GM-CSF(CellGenix)和20ng/mL人重组IL-4(CellGenix)一起培养6至7天,产生未成熟的树突状细胞(iDC)。用50ng/mL人重组TGFb(PeproTech)将iDC极化为免疫耐受DC持续2天,导致这些TGFb-DC过度表达Clec-1。在极化期间以10μg/mL添加抗体。

[0314] b)经紫外线处理的凋亡肿瘤细胞系的产生

[0315] 用荧光染料对肿瘤细胞系、Raji(B淋巴瘤)NSCLC细胞、结直肠癌细胞、乳腺癌细胞或Huh7(肝癌)进行染色以表征吞噬试验中的细胞。简言之,根据制造商的说明(Life Technologies),将肿瘤细胞与细胞增殖染料eFluor 670一起孵育15分钟,清洗,然后紫外线处理。然后,用150mJ/$cm^2$的紫外线处理细胞并孵育过夜,以触发导致Clec-1配体表达的凋亡诱导程序。

[0316] c)吞噬试验

[0317] 收集TGFb-DC和肿瘤细胞系,编号,以2个DC/1个肿瘤细胞的比率孵育5小时,在此过程中以10μg/mL添加抗体。通过对CPD-eFluor 670阳性TGFb-DC进行流式细胞术来评估吞噬作用。

[0318] 结果:图1显示了TGFb-DC对经UV处理的肿瘤细胞的吞噬作用(相对于对照条件归一化)。在两种不同的癌症模型,淋巴瘤(图1A)和非小细胞肺癌(图1B)中,本发明的拮抗性嵌合5D1、14H9、6C5、11H11和15E3抗体增加了对肿瘤细胞的吞噬作用,而现有技术的对照抗体(公开于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017))没有引起DC吞噬肿瘤细胞的能力的任何显著变化。图2显示了在癌症的肝癌模型中,TGFb-DC对经UV处理的肿瘤细胞的吞噬作用(相对于对照条件归一化)。与现有技术的抗体不同,本发明的3种抗体(鼠抗体5D1-A5、嵌合抗体14H9和6C5)增加了DC对肿瘤细胞的吞噬作用。

[0319] 本实施例证明了与现有技术的抗体(公开于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017))相比,本发明的抗体增加树突状细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

[0320] 实施例2:本发明的抗hCLEC-1A拮抗抗体或现有技术的抗hCLEC1A拮抗抗体与肿瘤靶向抗体(利妥昔单抗、西妥昔单抗或曲妥珠单抗)的组合的生物学活性(图3)

[0321] 方法:用M-CSF(100ng/mL)由单核细胞产生巨噬细胞(MΦ)5天。MΦ与分别10ng/mL的非霍奇金淋巴瘤(Raji;CD20+)或结肠癌(DLD-1;EGFR2+)或乳腺癌(SK-BR3;Her2+)以1:1比率+/-抗CD20 mAb(利妥昔单抗)、抗EGFR mAb(西妥昔单抗)或抗Her2 mAb(曲妥珠单抗)一起孵育2小时,提供"吃我"信号。通过流式细胞术分析吞噬作用,对Raji细胞进行显微观察,根据分析对每个供体相对于对照抗体条件进行归一化或描绘为吞噬细胞的百分比。*p<0.05

[0322] 通过流式细胞仪进行吞噬分析,通过总CPDe450+细胞中CPDe670+细胞的百分比来计算吞噬百分比。通过将吞噬Raji细胞的M1百分比乘以吞噬细胞的中值荧光强度来表示结果,根据利妥昔单抗浓度来表示。

[0323] 结果:吞噬试验显示,与现有技术的抗体(公开于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017))相比,在利妥昔单抗和本发明的抗CLEC-1A抗体的组合存在下,M1巨噬细胞能够吞噬Raji细胞。其他两种癌症模型也显示出相同结果;当施用西妥昔单抗和本发明的抗CLEC-1A抗体的组合时,巨噬细胞对结直肠癌肿瘤细胞的吞噬作用增加;当施用曲妥珠单抗和本发明的抗CLEC-1A抗体的组合时,巨噬细胞对乳腺癌肿瘤细胞的吞噬作用增加。本发明的抗CLEC-1A抗体与第二种抗肿瘤抗体的组合增强了巨噬细胞M1的吞噬能力。因此,说明使用本发明的抗CLEC-1A拮抗剂抗体增强了肿瘤靶向抗体的治疗效果。

[0324] 本实施例证明了与现有技术的抗体(公开于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017))不同,本发明的抗体与肿瘤靶向抗体的组合具有增加巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

[0325] 实施例3:使用拮抗剂测定的CLEC1配体与鼠或嵌合抗hCLEC1抗体之间的竞争性研究(图4-图8)

[0326] 方法:为了测量表达CLEC1配体的透化Raji(CytoFix/cytoperm试剂盒,BD Biosciences)的竞争,使用与透化Raji特异性结合的Fc-CLEC1标记的A488。为了测量竞争,将10nM或20nM的Fc-CLEC1标记的A488与不同浓度的小鼠抗hCLEC1在室温下混合15分钟,然后在4℃下添加到这些细胞上30分钟。在孵育和洗涤后,将PFA 2%添加到孔中以在4℃下固定细胞10分钟,在CytoFlex(贝克曼)细胞荧光计上进行分析以检测Fc-CLEC1标记的抑制作用。为了测量对PMBC的竞争,我们使用UV预处理18小时的人PBMC以获得表达CLEC1配体的凋亡PBMC。Fc-CLEC1标记的A488特异性结合凋亡的UV处理的PBMC。为了测量竞争,将10nM的Fc-CLEC1标记的A488与不同浓度的小鼠抗hCLEC1在室温下混合15分钟,然后在4℃下添加到这些细胞上30分钟。在孵育和洗涤后,将PFA 2%添加到孔中以在4℃下固定细胞10分钟,在CytoFlex(贝克曼)细胞荧光计上进行分析以检测Fc-CLEC1标记的抑制作用。

[0327] 结果:图4-图8显示了与同种型对照或内部非拮抗的抗CLEC1对照(对照+抗Clec1)相比,本发明的鼠和嵌合抗hCLEC1抗体具有拮抗活性。与Fc同种型A488对照相比,10nM的Fc-CLEC1能够特异性结合透化的Raji或凋亡的PBMC(参见图4和图5)。实际上,与同种型对照或非拮抗剂抗体(其不抑制Fc-CLEC与细胞的结合)相比,11种测试抗体(包括鼠和嵌合抗体)能够以剂量依赖性方式阻断Fc-CLEC与其在透化Raji或凋亡PBMC上的配体的相互作用。在11种抗体中,所有抗体的IC50相似(参见图6和图8),抑制曲线相似(参见图7)。

[0328] 因此,本发明的所有测试的鼠和嵌合抗体均能够阻止CLEC-11与通常结合至CLEC-1A的细胞之间的结合,从而说明这些抗体能够拮抗CLEC-1A与一种其配体之间的结合。因此,本实施例显示,本发明的抗体是人CLEC-1的拮抗剂。

[0329] 实施例4:嵌合抗CLEC1抗体的生产(图9-图10)

[0330] 在哺乳动物HEK细胞和CHO细胞中,我们分别通过Lipofectamine法或通过聚乙烯亚胺(PEI)共转染了含有VH-hFcG4m的质粒和含有VL-CLκ的质粒。在孵育5至6天后,回收上清液,通过夹心ELISA测定进行定量。上清液可通过蛋白A层析(HiTrap:GeHealthcare)与柠檬酸0.1M pH 3洗脱缓冲液进行亲和纯化。纯化的抗体在PBS中透析并浓缩。通过UV(A280nM)对它们进行量化。

[0331] 如图9和图10所示,本发明的抗体以不同的生产力很好地表达(所用信号肽:IgKleader)。如图9和图10所示,6C5和15E3嵌合抗体在HEK细胞中的产量很高,6C5在CHO细胞中的产量很高。ND对应于未对几种抗体进行生产测定。

[0332] 本实施例显示,本发明的抗体可以在重组生产系统中有效生产。

[0333] 实施例5:通过ELISA对单克隆抗hCLEC1抗体进行CLEC1结合测定(图11-图15)

[0334] 方法:通过ELISA(酶联免疫吸附试验)评估抗hCLEC1抗体的结合活性。对于ELISA测定,将重组hCLEC1-His(R&D Systems;货号1704-CL)在碳酸盐缓冲液(pH 9.2)中以2μg/mL固定在塑料上,添加不同浓度的纯化抗体以测量结合。在孵育和洗涤后,添加过氧化物酶标记的驴-抗-小鼠IgG链(Jackson Immunoresearch;货号715-036-151),通过常规方法进行显示。如上所述,进行第二次ELISA测定,其中CLEC1-Fc(OSE免疫疗法)以2μg/mL进行固定。进行第三次ELISA测定以观察与小鼠CLEC1的交叉反应性。如上所述,在碳酸盐缓冲液而不是His-Clec中以2μg/mL的浓度固定小鼠Fc-CLEC1(OSE免疫疗法)来进行ELISA。添加不同

浓度的纯化抗体以测量结合。在孵育和洗涤后，加入山羊-抗-小鼠IgGκ链(Jackson Immunoresearch;货号115-005-174)，然后加入过氧化物酶标记的驴-抗-山羊IgG(Jackson Immunoresearch;货号705-035-147)，通过常规方法进行显示。对照抗体是商业化的抗CLEC-1A抗体。

[0335] 结果:如图11-图15所示，通过ELISA测量的不同的鼠和嵌合抗CLEC1抗体对CLEC1-His的结合活性显示出对所有抗体的结合活性(具有不同ED50或EC50)。本发明的所有鼠和嵌合抗CLEC-1A抗体引发对CLEC-His的特异性结合活性。通过ELISA测量的嵌合抗CLEC1抗体对CLEC1-His的结合活性显示出对所有抗体的结合活性(具有不同EC50)。本发明的嵌合抗体15E3、5D1、14H9和6C5对CLEC-His具有良好的结合活性(参见图13和图15)。

[0336] 本实施例证明，本发明的抗体对人CLEC-1A具有特异性亲和力。

[0337] 实施例6:抗hCLEC1抗体的亲和力研究(图16-图17)

[0338] 方法:用Blitz系统(Forté bio，C22-2号61010-1)测量抗hCLEC1抗体的亲和力。通过组氨酸尾部将CLEC1-His重组蛋白(R&D Systems;货号1704-CL)以10μg/mL固定在Ni-NTA生物传感器(Forté bio;货号18-0029)中30秒。

[0339] 小鼠抗CLEC1抗体(图16)和嵌合抗CLEC-1A抗体(图17)以20μg/mL(饱和浓度)结合120秒。抗体的解离在动力学缓冲液中进行120秒。使用Blitz pro 1.2软件进行分析，该软件计算结合常数(ka)和解离常数(kd)，并确定亲和力常数KD(ka/kd)。

[0340] 结果:抗CLEC1抗体(鼠和嵌合)在Blitz中具有良好的亲和力常数(范围2至10nM)，通常比biacore亲和力分析低1-log。一些抗体(例如21B1-E10或11H11-G11)在His Clec蛋白上具有接近1nM的良好KD常数、具有高结合常数和低解离常数。本发明的鼠抗体均具有低于对照抗体的KD值(参见图16)。抗CLEC1嵌合抗体在Blitz中具有10至100nM范围内的亲和力常数，这通常比biacore亲和力分析低1-log。一些抗体(例如5D1或14H9)保留了接近10nM的KD亲和力常数，与鼠克隆一样，具有良好的结合常数和低解离常数(参见图17)。

[0341] 实施例7:通过流式细胞术对人U266细胞系进行CLEC1结合测定以比较不同的抗hCLEC1抗体(包括本发明的鼠抗体)(图18)

[0342] 方法:为测量抗CLEC1对人U266细胞系的结合(用Fc阻断剂进行预阻断以阻断FcR)，将不同浓度的抗体在4℃下孵育30分钟，洗涤，然后在4℃下用PE标记的抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch;货号715-116-151)染色30分钟。在Cytoflex细胞荧光计(贝克曼库尔特)上分析样品。在所有抗CLEC1抗体之间比较抗CLEC1的MFI，分析所有条件下的染色细胞的百分比。

[0343] 结果:结果表明，克隆14H9-F3和5D1-A5具有强结合(高MFI)。克隆11H11-G11、10F4-H2、6C5-A4和15E3-G3结合良好的U266 CLEC1。与内部对照抗体相比，本发明抗体的ED50比此种内部对照抗CLEC-1A抗体低得多。

[0344] 本发明的鼠抗体对于它们的靶标的亲和力更高。

[0345] 本实施例显示，与内部对照抗CLEC-1A抗体不同，本发明的鼠抗体与在人细胞的细胞膜上表达的人CLEC-1A特异性结合。

[0346] 实施例8:通过流式细胞术对人U266细胞系进行Clec1结合测定以比较嵌合抗hCLEC1抗体(图19-图20)

[0347] 方法:为测量抗CLEC1对人U266细胞系的结合(用Fc阻断剂进行预阻断以阻断

FcR)，将不同浓度的抗体在4℃下孵育30分钟，洗涤，然后在4℃下用PE标记的抗人IgG(Biolegend;货号409304)染色30分钟。在Cytoflex细胞荧光计(贝克曼库尔特)上分析样品。在所有抗CLEC1抗体之间比较抗CLEC1的MFI，分析所有条件下的染色细胞的百分比。

[0348] 结果:结果表明，所有测试的本发明嵌合抗体均具有强结合(高MFI和高百分比的阳性细胞)，与用小鼠抗CLEC1克隆(14H9/5D1)获得的结果类似。

[0349] 本实施例显示，与内部对照抗CLEC-1A抗体不同，本发明的嵌合抗体与在人细胞的细胞膜上表达的人CLEC-1A特异性结合。

[0350] 实施例9:通过流式细胞术对人CHO细胞系进行CLEC-1A结合测定以比较嵌合抗hCLEC1抗体(图21-图22)

[0351] 方法:通过细胞荧光法对CHO-Clec-1细胞(用表达Clec-1的慢病毒转导的细胞)进行CLEC-1A结合测定。

[0352] 为了测量抗clec对CHO-Clec-1细胞的结合，首先加入以1/200稀释的人Fc受体结合抑制剂(BD Pharmingen，美国;货号564220)，在室温下保持30分钟，以阻断CHO上的人Fc受体-Clec-1细胞以减少背景。然后，将抗体在4℃下孵育30分钟，洗涤，然后用PE标记的抗人IgG Fc(Biolegend，美国;货号409303)在4℃下染色15分钟。在citoflex(贝克曼库尔特)上分析样品。

[0353] 结果:结果表明，所有测试的本发明嵌合抗体均具有强结合(高MFI和高百分比的阳性细胞)。

[0354] 本实施例显示，与内部对照抗CLEC-1A抗体不同，本发明的嵌合抗体与在人细胞的细胞膜上表达的人CLEC-1A特异性结合。

[0355] 实施例10:不同抗CLEC-1A抗体之间与His-CLEC-1A结合的交叉竞争(图23-图24)

[0356] 方法:对于竞争性ELISA测定，将重组His-CLEC1(#1704-CL，R&D Systems，美国明尼阿波利斯)在碳酸盐缓冲液(pH 9.2)中以2μg/mL固定在塑料上，根据生物素化mAb的EC50，分别以1μg/mL或10ng/mL至2μg/mL添加纯化的竞争抗体或生物素化的被挑战抗体，测量与CLEC1的结合。在孵育和洗涤后，加入过氧化物酶标记的链霉亲和素，通过常规方法进行显示。对照抗CLEC1抗体对应于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017)中公开的抗CLEC-1A抗体。

[0357] 结果:如图23所示，现有技术的抗体不与本发明的任何抗体交叉竞争与His-CLEC-1A的结合。事实上，5D1、6C5、11H11、14H9和15E3与His-CLEC-1A的结合不受现有技术抗体存在的影响，特别是不与5D1或11H11交叉竞争。因此，与现有技术的抗CLEC-1A抗体(公开于WO 2018/073440 A1和Robles等(Blood Advances 2017))相比，本发明的抗体不结合至CLEC-1A上的相同位置。

[0358] 如图24所示，在本发明的选定抗体(11H11)和本发明的5种抗体(15E3、5D1、6C5、14H9、11H11)之间进行与His-CLEC-1A的交叉竞争性结合。据显示，5种测试抗体与11H11交叉竞争与His-CLEC-1A的结合，这说明它们共享相似的结合位置。

序列表

<110> OSE免疫疗法(OSE IMMUNOTHERAPEUTICS)

南特大学(NANTES UNIVERSITÉ)

国立卫生和医学研究所(INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)

<120> 抗CLEC-1A抗体及其抗原结合片段

<130> B14179WO - AD/HLQ/CG

<140> PCT/EP2020/084770

<141> 2020-12-04

<150> EP19306583.6

<151> 2019-12-05

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

gagatcgtgc tgacccagtc cccaaccaca ctggctgcta gcccaggaga gaagatcatc 60

atcacatgct ctgactccag ctctatctcc agcaactacc tgcactggta tcagcagaag 120

cccggcttct cccctaagct gctgatctac ggcaccagca atctggcctc tggcgtgcct 180

gctaggttta gcggctctgg ctccggcacc acatattccc tgaccatcgg cacaatggag 240

gccgaggatg tggctacata ctattgtcag cagggctctt ccatcccacg gaccttcggc 300

ggcggcacaa agctggagat caag 324

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Lys Ile Ile Ile Thr Cys Ser Asp Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Thr Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 3
tctgactcca gctctatctc cagcaactac ctgcac 36
<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 4
Ser Asp Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 5
ggcaccagca atctggcctc t 21
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 6
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 7
cagcagggct cttccatccc acggacc 27
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 8
Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Arg Thr
1 5
<210> 9
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 9
gacatccaga tgacccagtc cccagcttcc ctgtccgcct ctgtgggaga gaccgtgaca 60
atcacctgca gggccacaga gaacatctac tcctatctgg cttggtacca gcagaagcag 120
ggcaagagcc cccagttcct ggtgtataat gccaagacac tggctgaggg catgccttct 180
cggttctccg gaagcggatc tggaacccag ttttccctga agatcaacat cctgcagcca 240
gaggattttg gcacatacta ttgtcagcac catttcggaa caccactgac ctttggcgct 300
ggaaccaagc tggagctgaa g 321
<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 10

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

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 11

```
agggccacag agaacatcta ctcctatctg gct 33
```

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 12

```
Arg Ala Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1               5                  10
```

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 13
aatgccaaga cactggctga g 21
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 14
Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5
<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 15
cagcaccatt tcggaacacc actgacc 27
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 16
Gln His His Phe Gly Thr Pro Leu Thr
1 5
<210> 17
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 17
gacatccaga tgaaccagag cccatccagc ctgagcgcct ctctgggcga taccatcaca 60
atcacctgcc acgcttccca gaacatcaac gtgtggctga gctggtacca gcagaagccc 120
ggcaacatcc ctaagctgct gatctataag gcctctaatc tgcatacagg agtgccatcc 180
aggttctccg gaagcggatc tggaaccggc tttacactga ccatctcttc cctgcagccc 240

gaggacatcg ctacatacta ttgtcagcag ggccagtctt actggacatt cggcggcggc 300
accaagctgg agatcaag 318
<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 18
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 19
cacgcttccc agaacatcaa cgtgtggctg agc 33
<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 20
His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

aaggcctcta atctgcatac a 21

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 23

cagcagggcc agtcttactg gaca 24

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 24

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 25
gacatcgtgc tgactcagag ccctgcttca ctggccgtct ccctgggaca gggtgctaca 60
atttcttgcc gcgcttcaga atccgtcgac aaccacggct tctcttttat gaattggttc 120
cagcagaagc ccggccagcc ccctaagctg ctgatctacg ctgcttccaa ccagggaagc 180
ggagtgccag ctaggttctc cggaagcgga tctggaaccg atttttccct gaatatccat 240
cccatggagg aggacgatac agctatgtat ttttgtcagc agagtaagga ggtgccctgg 300
acttttggcg gggggactaa actggaaatc aag 333
<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 26
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Gly Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn His
20 25 30
Gly Phe Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95
Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 27
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 27
cgcgcttcag aatccgtcga caaccacggc ttctctttta tgaat 45
<210> 28

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 28
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn His Gly Phe Ser Phe Met Asn
1 5 10 15
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 29
gctgcttcca accagggaag c 21
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 30
Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5
<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 31
cagcagagta aggaggtgcc ctggact 27
<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 32
Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5
<210> 33
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 33
gacgccgtga tgacccagac accactgagc ctgcccgtgt ccctgggcga tcaggcttct 60
atctcctgca ggtccagcca gtccctggag aacagcaatg gcaacacata cctgaattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gagcccccag ctgctgatct acagggtgtc taaccggttc 180
tccggcgtgc tggacaggtt ctccggctct ggctccggca ccgatttcac actgaagatc 240
tctagggtgg aggctgagga cctgggcgtg tacttctgtc tgcaggtgac ccacgtgccc 300
tatacatttg gcggcggcac caagctggag atcaag 336
<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 34
Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
85 90 95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 35
<211> 48

<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 35
aggtccagcc agtccctgga gaacagcaat ggcaacacat acctgaat 48
<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 36
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15
<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 37
agggtgtcta accggttctc c 21
<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 38
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 39

ctgcaggtga cccacgtgcc ctataca 27

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 40

Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 41

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 41

gacatccaga tgaaccagag cccatccagc ctgtctgcct ccctgggcga taccatcaca 60
atcacctgcc acgctagcca gaacatcaac gtgtggctgt cttggtacca gcagaagccc 120
ggcaacatcc ctaagctgct gatctataag gcctccaatc tgcatacagg cgtgccaagc 180
aggttcagcg gatctggatc cggaaccacc ttcaccctga ccatcgactc tctgcagccc 240
gaggacatcg ctacctacta ttgtcagcag ggccagtcct actggacatt cggcggcggc 300
accaagctgg agatcaag 318

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 42

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

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

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 43
cacgctagcc agaacatcaa cgtgtggctg tct 33

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 44
aaggcctcca atctgcatac a 21

<210> 45
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 45
cagcagggcc agtcctactg gaca 24

<210> 46
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 46
gacatcgtga tgagccagtc tccttccagc ctggccgtgt ccgtgggaga gaaggtgacc 60
ctgacatgca agagcaccca gaacctgttc tactctacaa accagaagaa ttacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagagccct aagctgctga tctattgggc ttctaccagg 180

gagtccggag tgccagaccg gttcaccgga tccggaagcg gaacagactt caccctgaca 240
atctcttccg tgaaggccga ggatccagcc gtgtactatt gtcagcagta ctatacctac 300
ccctggacat ttggcggcgg cacaaagctg gagatcaag 339

<210> 47
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 47

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

<210> 48
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 48

aagagcaccc agaacctgtt ctactctaca aaccagaaga attacctggc c 51

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 49
Lys Ser Thr Gln Asn Leu Phe Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala
<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 50
tgggcttcta ccagggagtc c 21
<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 51
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5
<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 52
cagcagtact atacctaccc ctggaca 27
<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 53
Gln Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Trp Thr
1 5
<210> 54

<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 54
caggtgcagc tgcagcagtc cggaccagag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagatg 60
agctgcaagg cttctggctt cacctttaca gactacgtga tcgcttgggt gaaggtgagg 120
accggacagg gactggagtg gatcggagag atctatccag gctctggctc catctactat 180
aacgagaagt tcaagggcaa ggccaccctg acagctgata agtccagcaa taccgcctac 240
atgcagctgt cttccctgac aagcgaggac tctgccgtgt acttctgtgc tagctctacc 300
gtggtggctt ttgattattg gggccagggc accacactga cagtgtccag c 351
<210> 55
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 55
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Val Ile Ala Trp Val Lys Val Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Ser Thr Val Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 56
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 56
gactacgtga tcgct 15
<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 57
Asp Tyr Val Ile Ala
1 5
<210> 58
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 58
gagatctatc caggctctgg ctccatctac tataacgaga agttcaaggg c 51
<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 59
Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 60
tctaccgtgg tggcttttga ttat 24

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 61
Ser Thr Val Val Ala Phe Asp Tyr
1 5
<210> 62
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 62
cagatccacc tggtgcagtc tggccccgag ctgaagaagc ctggcgagac cgtgaagatc 60
tcttgtaagg cctccggcta caccttcaca aactttggca tgaattgggt gaagcaggct 120
ccaggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacca atacaggcga gcccacatac 180
gccgacgatt tcaagggcag gttcgctttt tccctggaga cctccgccag cacagcttat 240
ctgcagatca acaatctgaa gaacgaggac accgctacat acttctgcgc taggggagct 300
ccagcttggt ttacctattg gggccagggc accctggtga cagtgagcgc c 351
<210> 63
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 63
Gln Ile His Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

<210> 64
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 64
aactttggca tgaat 15

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 65
Asn Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 66
tggatcaaca ccaatacagg cgagcccaca tacgccgacg atttcaaggg c 51

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 67
Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 68

ggagctccag cttggtttac ctat 24

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 69

Gly Ala Pro Ala Trp Phe Thr Tyr

1 5

<210> 70

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 70

caggtgcagc tgaaggagag cggaccagga ctggtggctc catctcagtc cctgagcatc 60

acctgcacaa tctccggctt cagcctgacc tcttacggcg tgcactgggt gaggcagcca 120

cctggcaagg gactggagtg gctggtggtc atctggtccg acggcagcac aatctataac 180

tctgctctga agtcccggct gtctatctcc aaggataaca gcaagtctca ggtgttcctg 240

aagatgaatt ctctgcagac cgacgataca gccatgtact attgtgctag gcatggcggc 300

tactataatt actttgacta ttggggccag ggcaccacac tgaccgtgtc cagc 354

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 71

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

<210> 72
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 72
tcttacggcg tgcac 15

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 73
Ser Tyr Gly Val His
1 5

<210> 74
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 74
gtcatctggt ccgacggcag cacaatctat aactctgctc tgaagtcc 48
<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 75
Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 76
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 76
catggcggct actataatta ctttgactat 30
<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 77
His Gly Gly Tyr Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 78
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 78
caggtgcagc tgcagcagtc cggaccagag ctggtgaagc ctggagcctc tgtgaagatg 60
tcctgcaagg ctagcggcta caccttcaca gactatgtga tctcttgggt gaagcagaag 120
accggacagg gactggagtg gatcggagag atctacccag gctccggcaa cacatactat 180
aatgagaagt ttaagggcaa ggccaccctg acagctgata agtccagctc taccgcctat 240

atccacctgt ccagcctgac atccgaggac agcgccgtgt acttctgtgc tggcggcggc 300
tcttcccatt ttgattattg gggccagggc accacactga ccgtgagctc t 351

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 79

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

<210> 80
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 80
gactatgtga tctct 15

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 81
Asp Tyr Val Ile Ser
1 5
<210> 82
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 82
gagatctacc caggctccgg caacacatac tataatgaga agtttaaggg c 51
<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 83
Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 84
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 84
ggcggctctt cccattttga ttat 24
<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 85
Gly Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr
1 5
<210> 86

<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 86
caggtgcagc tgcagcagtc tggaaccgag ctggctagac caggagcttc tgtgaagatg 60
tcctgcaagg ccagcggcta catcttcacc gactatacaa tccactgggt gaagcagagg 120
ccaggacagg gactggagtg ggtgggctac atcaaccctt ccagcggcta cacaaactat 180
aatcagaagt ttaaggccaa ggctaccctg acagccgata agtcttccag caccgcttat 240
atgcagctgt cttccctgac atccgaggac tccgccgtgt actattgtac ccccatgttc 300
aggcggtcct actttgatta ttggggccag ggcaccacac tgacagtgag ctct 354
<210> 87
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 87
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Pro Met Phe Arg Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 88
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 88
gactatacaa tccac 15
<210> 89
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 89
Asp Tyr Thr Ile His
1 5
<210> 90
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 90
tacatcaacc cttccagcgg ctacacaaac tataatcaga agtttaaggc c 51
<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 91
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Ala
<210> 92
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 92
atgttcaggc ggtcctactt tgattat 27

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 93
Met Phe Arg Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5
<210> 94
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 94
caggtgcagc tgaaggagtc cggaccagga ctggtggctc catctcagtc cctgagcatc 60
acctgcacaa tctccggctt cagcctgacc acatacggca tccactgggt gaggcagcca 120
cctggcaagg gactggagtg gctggtggtc atctggtctg acggctccac catctataac 180
tccgccctga agtctcggct gtctatctcc aaggataaca gcaagtctca ggtgttcctg 240
aagatgaatt ccctgcagac cgacgataca gccatctact attgtgctag gcatggcggc 300
tactataatt actttgacta ttggggccag ggcaccacac tgacagtgtc cagc 354
<210> 95
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 95
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

<210> 96
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 96
acatacggca tccac 15

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 97
Thr Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 98
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 98
gtcatctggt ctgacggctc caccatctat aactccgccc tgaagtct 48

<210> 99
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 99
catggcggct actataatta ctttgactat 30

<210> 100
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 100
caggtgcagc tgaaggagtc cggaccagga ctggtggctc catctcagtc cctgagcatc 60
acctgcacaa tctccggctt cagcctgacc acatacggca tccactgggt gaggcagcca 120
cctggcaagg gactggagtg gctggtggtc atctggtctg acggctccac catctataac 180
tccgccctga agtctcggct gtctatctcc aaggataaca gcaagtctca ggtgttcctg 240
aagatgaatt ccctgcagac cgacgataca gccatctact attgtgctag gcatggcggc 300
tactataatt actttgacta ttggggccag ggcaccacac tgacagtgtc cagc 354
<210> 101
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 101
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg His Gly Gly Tyr Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 102
<211> 15
<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 102
acatacggca tccac 15
<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 103
Thr Tyr Gly Ile His
1 5
<210> 104
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 104
gtcatctggt ctgacggctc caccatctat aactccgccc tgaagtct 48
<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 105
Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 106
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 106
catggcggct actataatta ctttgactat 30

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 107

His Gly Gly Tyr Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 108
<211> 206
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 108

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

180 185 190

Glu Ser Leu His Val Pro Pro Glu Thr Leu Gly Glu Gly Asp

195 200 205

<210> 109

<211> 280

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 109

Met Gln Ala Lys Tyr Ser Ser Thr Arg Asp Met Leu Asp Asp Asp Gly

1 5 10 15

Asp Thr Thr Met Ser Leu His Ser Gln Gly Ser Ala Thr Thr Arg His

20 25 30

Pro Glu Pro Arg Arg Thr Glu His Arg Ala Pro Ser Ser Thr Trp Arg

35 40 45

Pro Val Ala Leu Thr Leu Leu Thr Leu Cys Leu Val Leu Leu Ile Gly

50 55 60

Leu Ala Ala Leu Gly Leu Leu Phe Phe Gln Tyr Tyr Gln Leu Ser Asn

65 70 75 80

Thr Gly Gln Asp Thr Ile Ser Gln Met Glu Glu Arg Leu Gly Asn Thr

85 90 95

Ser Gln Glu Leu Gln Ser Leu Gln Val Gln Asn Ile Lys Leu Ala Gly

100 105 110

Ser Leu Gln His Val Ala Glu Lys Leu Cys Arg Glu Leu Tyr Asn Lys

115 120 125

Ala Gly Ala His Arg Cys Ser Pro Cys Thr Glu Gln Trp Lys Trp His

130 135 140

Gly Asp Asn Cys Tyr Gln Phe Tyr Lys Asp Ser Lys Ser Trp Glu Asp

145 150 155 160

Cys Lys Tyr Phe Cys Leu Ser Glu Asn Ser Thr Met Leu Lys Ile Asn

165 170 175

Lys Gln Glu Asp Leu Glu Phe Ala Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Glu Phe

180 185 190

Phe Tyr Ser Tyr Trp Thr Gly Leu Leu Arg Pro Asp Ser Gly Lys Ala

195 200 205

Trp Leu Trp Met Asp Gly Thr Pro Phe Thr Ser Glu Leu Phe His Ile

210 215 220

Ile Ile Asp Val Thr Ser Pro Arg Ser Arg Asp Cys Val Ala Ile Leu

225 230 235 240
Asn Gly Met Ile Phe Ser Lys Asp Cys Lys Glu Leu Lys Arg Cys Val
245 250 255
Cys Glu Arg Arg Ala Gly Met Val Lys Pro Glu Ser Leu His Val Pro
260 265 270
Pro Glu Thr Leu Gly Glu Gly Asp
275 280

<210> 110
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 110

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

195 200 205

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

210 215 220

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

225 230 235 240

Ser Pro Gly Lys Gln Tyr Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Gly Gln Asp Thr

245 250 255

Ile Ser Gln Met Glu Glu Arg Leu Gly Asn Thr Ser Gln Glu Leu Gln

260 265 270

Ser Leu Gln Val Gln Asn Ile Lys Leu Ala Gly Ser Leu Gln His Val

275 280 285

Ala Glu Lys Leu Cys Arg Glu Leu Tyr Asn Lys Ala Gly Ala His Arg

290 295 300

Cys Ser Pro Cys Thr Glu Gln Trp Lys Trp His Gly Asp Asn Cys Tyr

305 310 315 320

Gln Phe Tyr Lys Asp Ser Lys Ser Trp Glu Asp Cys Lys Tyr Phe Cys

325 330 335

Leu Ser Glu Asn Ser Thr Met Leu Lys Ile Asn Lys Gln Glu Asp Leu

340 345 350

Glu Phe Ala Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Glu Phe Phe Tyr Ser Tyr Trp

355 360 365

Thr Gly Leu Leu Arg Pro Asp Ser Gly Lys Ala Trp Leu Trp Met Asp

370 375 380

Gly Thr Pro Phe Thr Ser Glu Leu Phe His Ile Ile Ile Asp Val Thr

385 390 395 400

Ser Pro Arg Ser Arg Asp Cys Val Ala Ile Leu Asn Gly Met Ile Phe

405 410 415

Ser Lys Asp Cys Lys Glu Leu Lys Arg Cys Val Cys Glu Arg Arg Ala

420 425 430

Gly Met Val Lys Pro Glu Ser Leu His Val Pro Pro Glu Thr Leu Gly

435 440 445

Glu Gly Asp

450

<210> 111

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 111

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

<210> 112

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 112

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 113

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 113

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 114

<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 114

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

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 115
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 115

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 116
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 116
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

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

<210> 117
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 117
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 118
<211> 984
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 118
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctccgggtaa atga 984
<210> 119
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 119
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Val Ile Ala Trp Val Lys Val Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 120
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 120
Gln Ile His Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ala Pro Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 121

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 121

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 122
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 122

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

Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 123
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 123

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

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

<210> 124
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 124
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 125
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 125

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

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

<210> 126
<211> 215
<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 126

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

<210> 127
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 127

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

<210> 128
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 128

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

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

<210> 129
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 129

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

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

<210> 130
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 130

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 131
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 131

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 132
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 132

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 133
<211> 1374
<212> DNA
<213> 人工序列(artificial sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 133

ctcgaggcca ccatggaaac cgatacactg ctgctgtggg tcctgctgct gtgggtgcct 60
gggtcaactg gagacgtgga atgtcccccc tgtcccgcac cacctgtggc tggaccttcc 120
gtgttcctgt ttccacccaa gccaaaggac accctgatga tctctaggac ccctgaggtg 180
acatgcgtgg tggtggacgt gtcccacgag gatccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 240
gatggcgtgg aggtgcataa tgctaagaca aagcccaggg aggagcagta caactctacc 300
tatcgggtgg tgtccgtgct gacagtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtat 360
aagtgcaagg tgagcaataa gggcctgcct tccagcatcg agaagaccat ctctaaggct 420
aagggacagc caagggagcc acaggtgtac acactgcctc caagccggga ggagatgacc 480
aagaaccagg tgtctctgac atgtctggtg aagggcttct atccctccga catcgctgtg 540
gagtgggaga gcaatggcca gcctgagaac aattacaaga ccacaccccc tgtgctggac 600
tccgatggca gcttctttct gtatagcaag ctgaccgtgg ataagtccag gtggcagcag 660
ggcaacgtgt tttcttgttc cgtgatgcac gaggccctgc acaatcatta cacacagaag 720
agcctgtctc tgtccccagg caagcagtac tatcagctgt ctaataccgg ccaggataca 780
atctcccaga tggaggagcg cctgggcaac acctcccagg agctgcagag cctgcaggtg 840
cagaatatca agctggccgg ctccctgcag catgtggctg agaagctgtg cagagagctg 900
tacaacaagg ctggagctca caggtgcagc ccatgtacag agcagtggaa gtggcatggc 960
gacaattgtt accagttcta taaggacagc aagtcttggg aggattgcaa gtacttttgt 1020
ctgtctgaga actccaccat gctgaagatc aataagcagg aggatctgga gttcgccgct 1080
tcccagagct attctgagtt cttttactcc tattggacag gcctgctgag gccagacagc 1140
ggcaaggctt ggctgtggat ggatggcacc cccttcacat ctgagctgtt tcatatcatc 1200
atcgacgtga ccagccccag atctcgcgat tgcgtggcca tcctgaacgg catgatcttt 1260
tccaaggact gtaaggagct gaagaggtgc gtgtgcgaga ggcgggctgg tatggtgaag 1320
cccgagagcc tgcatgtgcc tcctgaaaca ctgggggaag gggactagtc taga 1374

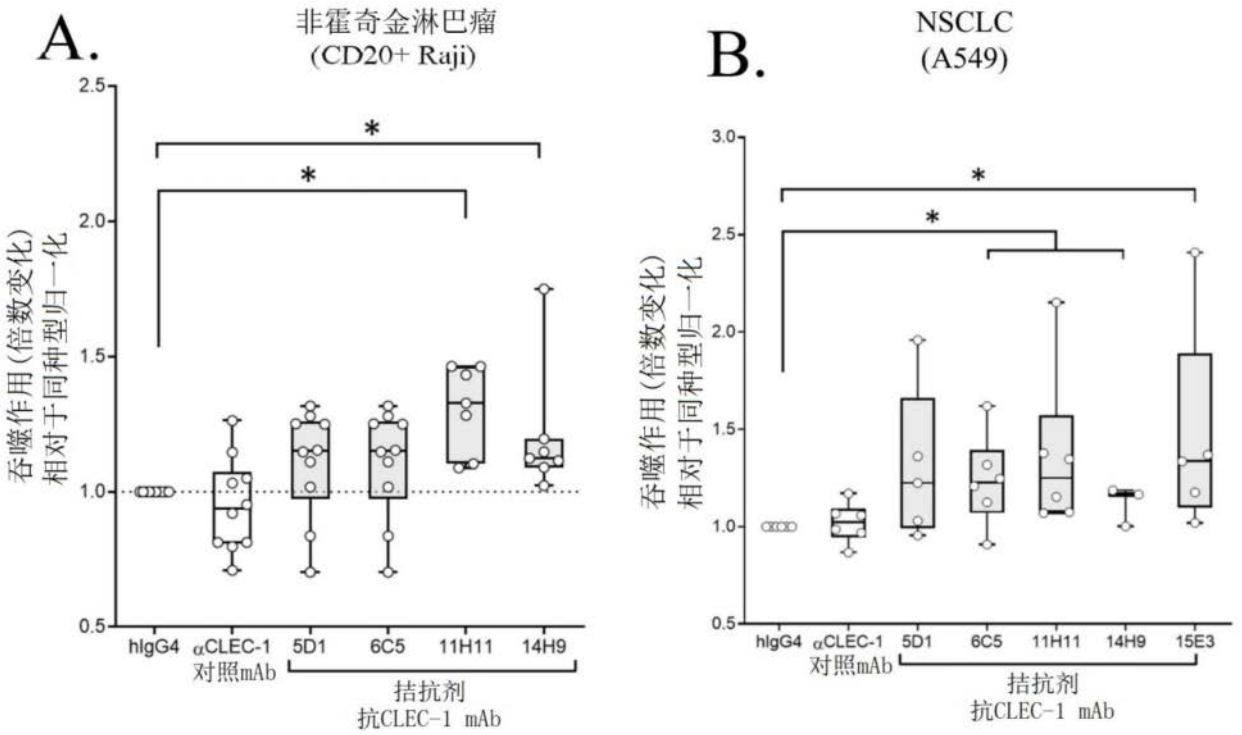

A.
非霍奇金淋巴瘤
(CD20+ Raji)
吞噬作用(倍数变化)
相对于同种型归一化
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
*
*
hIgG4
αCLEC-1
对照mAb
5D1
6C5
11H11
14H9
拮抗剂
抗CLEC-1 mAb
B.
NSCLC
(A549)
吞噬作用(倍数变化)
相对于同种型归一化
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
*
*
hIgG4
αCLEC-1
对照mAb
5D1
6C5
11H11
14H9
15E3
拮抗剂
抗CLEC-1 mAb

图1

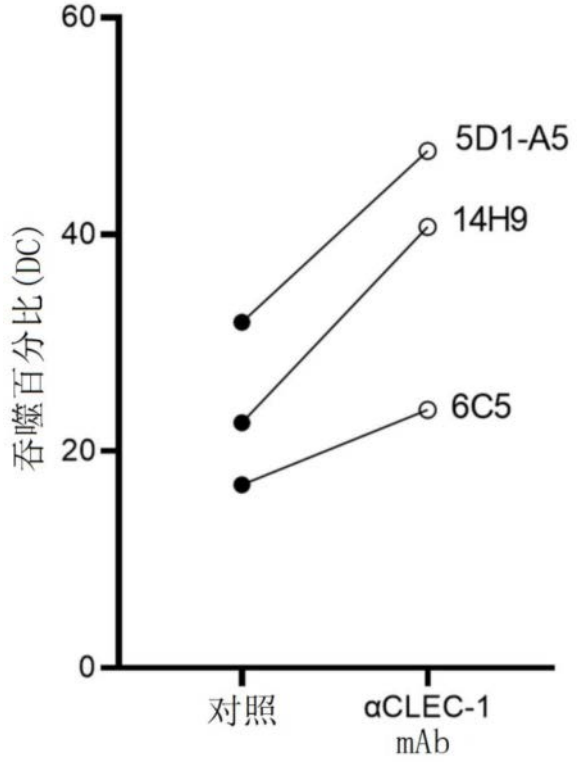

60
40
20
0
吞噬百分比(DC)
5D1-A5
14H9
6C5
对照
αCLEC-1
mAb

图2

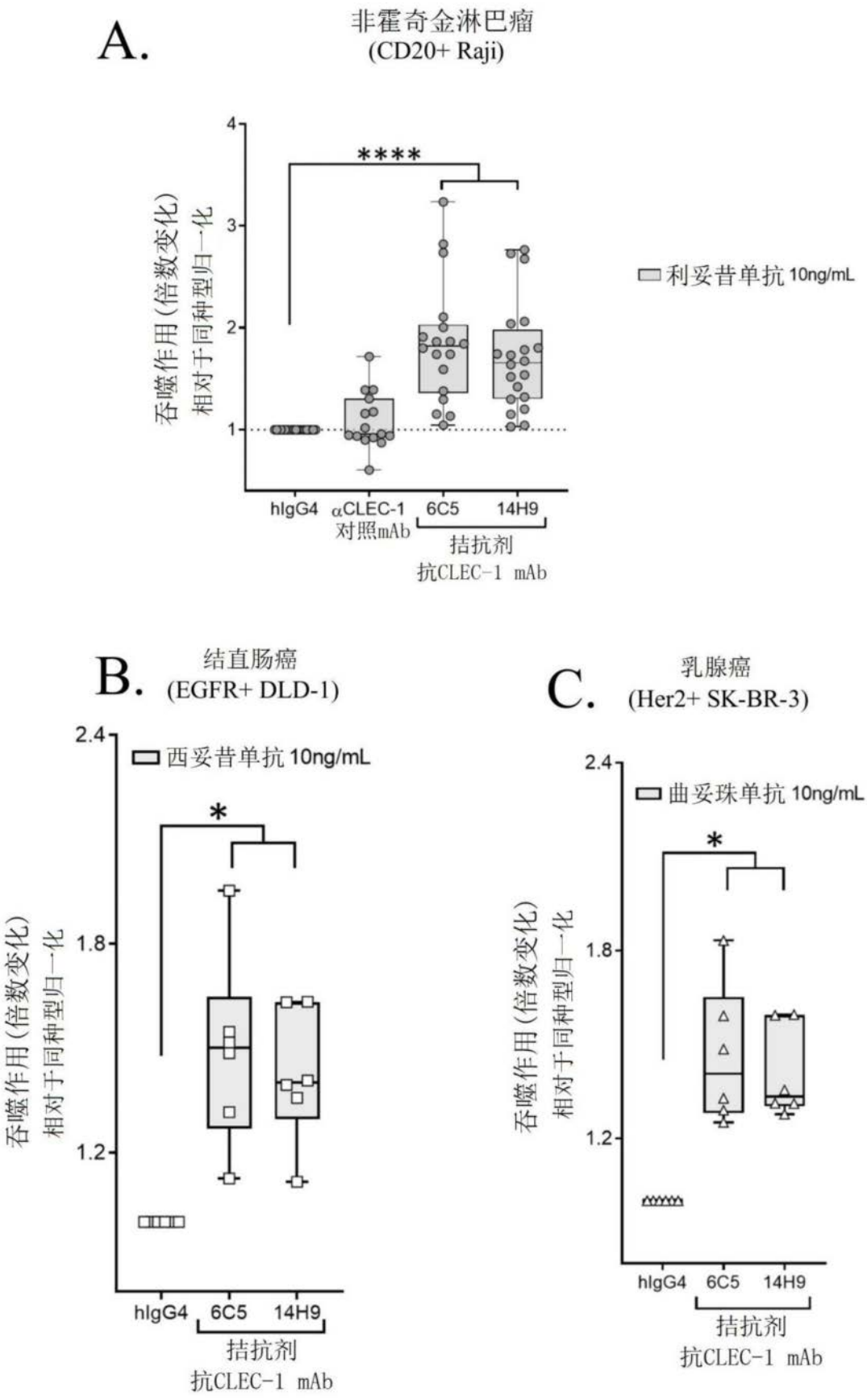

A.
非霍奇金淋巴瘤
(CD20+ Raji)
吞噬作用(倍数变化)
相对于同种型归一化
****
利妥昔单抗 10ng/mL
hIgG4
αCLEC-1
对照mAb
6C5
14H9
拮抗剂
抗CLEC-1 mAb
B.
结直肠癌
(EGFR+ DLD-1)
西妥昔单抗 10ng/mL
*
C.
乳腺癌
(Her2+ SK-BR-3)
曲妥珠单抗 10ng/mL

图3

| | 竞争 IC50 细胞计数 [ng/mL] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Raji Fc-Clec 20nM | | Raji Fc-Clec 10nM | | PBMC Fc-Clec 10nM | |
| 克隆ID | 平均值 | %+细胞 | 平均值 | %+细胞 | 平均值 | %+细胞 |
| C+抗CLEC | 未测定 | 未测定 | 未测定 | 未测定 | 未测定 | 未测定 |
| **11H11-G11** | 7,2E+02 | 7,0E+05 | 1,5E+03 | 8,0E+03 | 2,7E+03 | 3,6E+05 |
| **10F4-H2** | 2,5E+03 | 8,2E+05 | 2,1E+03 | 1,1E+04 | 2,8E+03 | 7,9E+05 |
| **15E3-G3** | 3,0E+03 | 1,4E+07 | 1,3E+03 | 7,7E+03 | 4,5E+03 | 6,9E+05 |
| **14H9-F3** | 2,5E+03 | 2,2E+07 | 8,4E+02 | 3,2E+03 | 3,1E+03 | 3,1E+04 |
| **5D1-A5** | 3,1E+03 | 2,1E+05 | 4,4E+03 | 1,2E+04 | 3,8E+03 | 1,3E+05 |
| **6C5-A4** | 1,7E+03 | 1,5E+06 | 1,7E+03 | 1,9E+04 | 2,2E+03 | 2,0E+06 |

图4

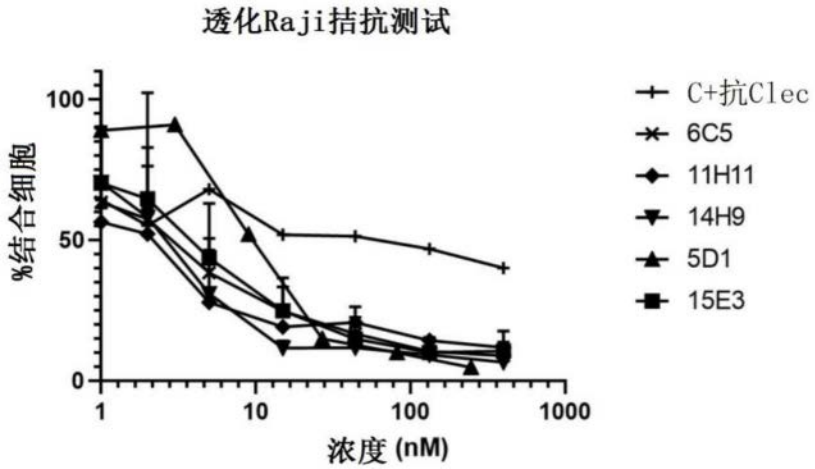



图5

| | IC50中值 (nM) |
|---|---|
| **15E3** | 8,67 |
| **5D1** | 13,73 |
| **14H9** | 3,90 |
| **11H11** | 5,84 |
| **6C5** | 7,71 |
| C+抗Clec | 未测定 |

图6

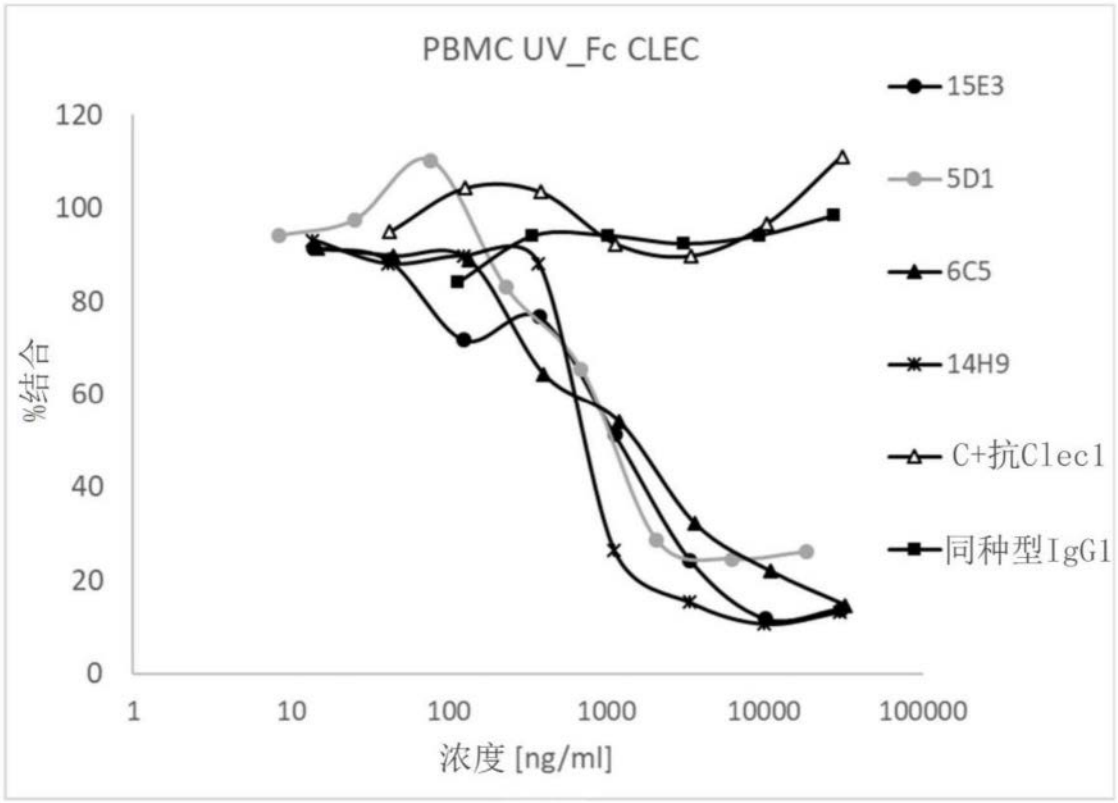



图7

| 抗体 | IC50 (ng/ml) |
|---|---|
| 15E3 | 779,23 |
| 5D1 | 1185,49 |
| 6C5 | 626,05 |
| 14H9 | 872,69 |
| C+抗Clec1 | 未测定 |
| 同种型IgG1 | 未测定 |

图8

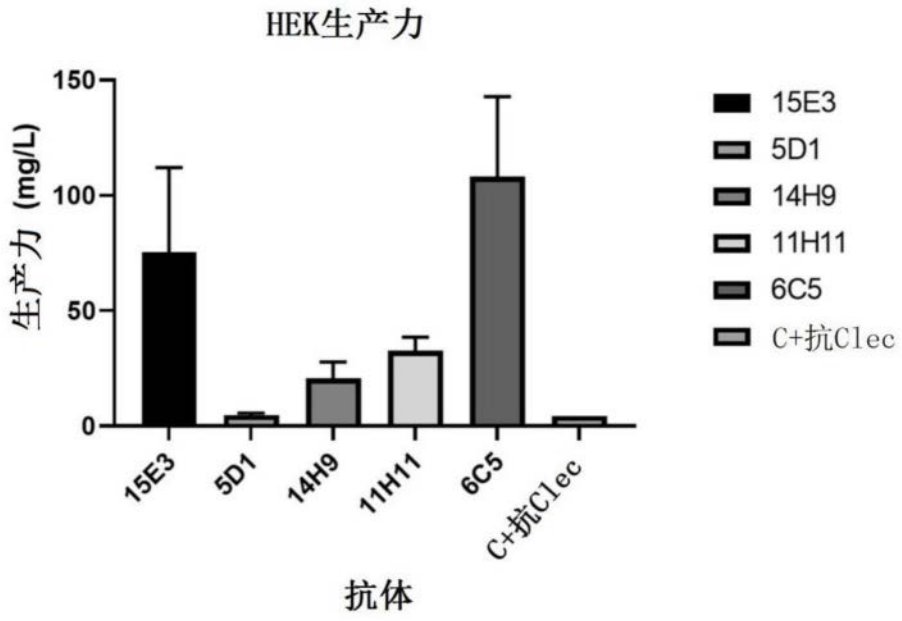



图9

| | 产量 (mg/L) | |
|---|---|---|
| | 在HEK细胞中 | 在CHO细胞中 |
| **15E3** | 75,67 | nd |
| **5D1** | 4,82 | nd |
| **14H9** | 20,67 | 110 |
| **11H11** | 32,56 | 78,5 |
| **6C5** | 108 | 111,25 |
| C+抗CLEC | 4,4 | 29,3 |

图10

| 克隆ID | 同种型 | ED50 ELISA [ng/ml] hm His Clec |
|---|---|---|
| **11H11-G11** | mIgG1 | 7,48E+00 |
| **10F4-H2** | mIgG1 | 1,28E+01 |
| **15E3-G3** | mIgG1 | 4,66E+01 |
| **14H9-F3** | mIgG2a | 1,57E+02 |
| **5D1-A5** | mIgG2b | 1,31E+03 |
| **6C5-A4** | mIgG1 | 1,2E+01 |

图11

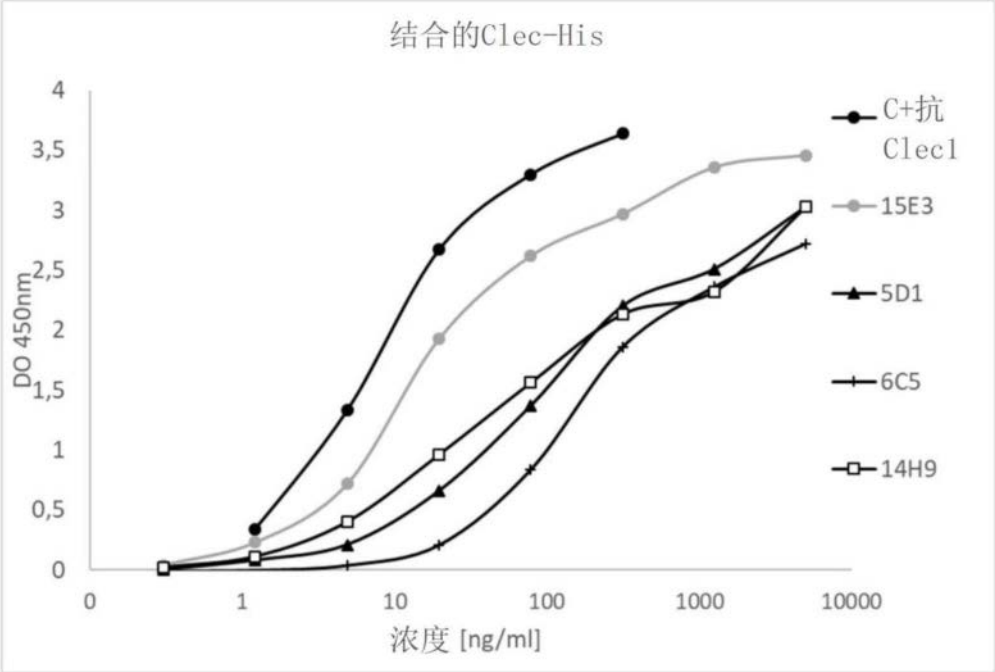



图12

| 抗体 | EC50 (ng/ml) |
|---|---|
| C+抗Clec1 | 7,62 |
| **15E3** | 21,45 |
| **5D1** | 163,87 |
| **6C5** | 325,89 |
| **14H9** | 148,06 |

图13

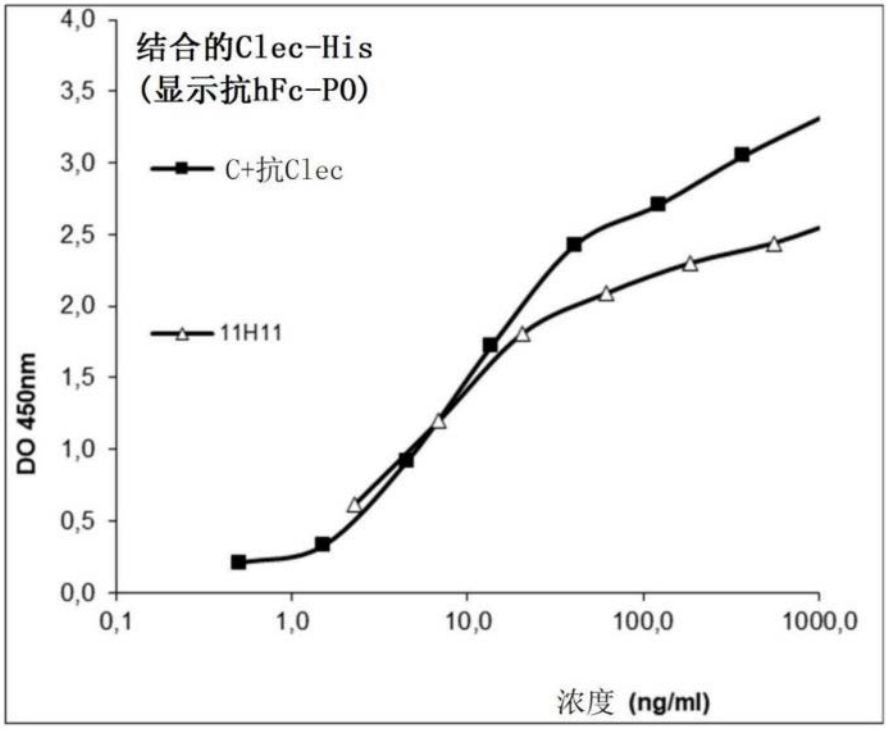



图14

| 抗体 | EC50 (ng/ml) |
|---|---|
| C+抗Clec | 8,09 |
| **11H11** | 8,46 |

图15

| 样品ID | KD (M) | ka (1/Ms) | kd (1/s) |
|---|---|---|---|
| mIgG1同种型 | 2,28E-03 | 9,49E+00 | 2,16E-02 |
| mIgG2a同种型 | 3,97E-04 | 1,33E+02 | 5,28E-02 |
| mIgG2b同种型 | 1,90E-05 | 1,40E+03 | 2,67E-02 |
| C+抗Clec1 | 2,42E-08 | 9,48E+04 | 2,30E-03 |
| 5D1-A5 | 1,61E-08 | 7,66E+04 | 1,24E-03 |
| 6C5-A4 | 1,47E-08 | 6,34E+04 | 9,34E-04 |
| 15E3-G3 | 1,40E-08 | 7,22E+04 | 1,01E-03 |
| 14H9-F3 | 8,24E-09 | 8,98E+04 | 7,40E-04 |
| 10F4-H2 | 5,72E-09 | 1,09E+05 | 6,21E-04 |
| 11H11-G11 | 2,91E-09 | 2,70E+05 | 7,87E-04 |

图16

| 抗体 | KD (M) | ka (1/Ms) | kd (1/s) |
|---|---|---|---|
| 15E3 | 1,08E-07 | 1,57E+04 | 1,69E-03 |
| 5D1 | 1,74E-08 | 6,89E+04 | 1,20E-03 |
| 6C5 | 4,03E-08 | 4,45E+04 | 1,79E-03 |
| 14H9 | 1,59E-08 | 7,80E+04 | 1,24E-03 |
| 11H11 | 4,48E-10 | 1,88E+05 | 1,90E-04 |
| C+抗Clec | 7,89E-09 | 3,64E+05 | 2,88E-03 |

图17

| | ED50细胞计数 [ng/ml] U266细胞 | |
|---|---|---|
| 克隆ID | 平均值 | % + 细胞 |
| C+抗Clec1 | 5,1E+03 | 9,1E+03 |
| **11H11-G11** | 3,3E+01 | 7,7E+00 |
| **10F4-H2** | 2,2E+02 | 3,4E+01 |
| **15E3-G3** | 5,9E+02 | 7,4E+01 |
| **14H9-F3** | 7,2E+01 | 6,5E+00 |
| **5D1-A5** | 1,2E+02 | 6,4E+00 |
| **6C5-A4** | 1,7E+02 | 5,1E+01 |

图18

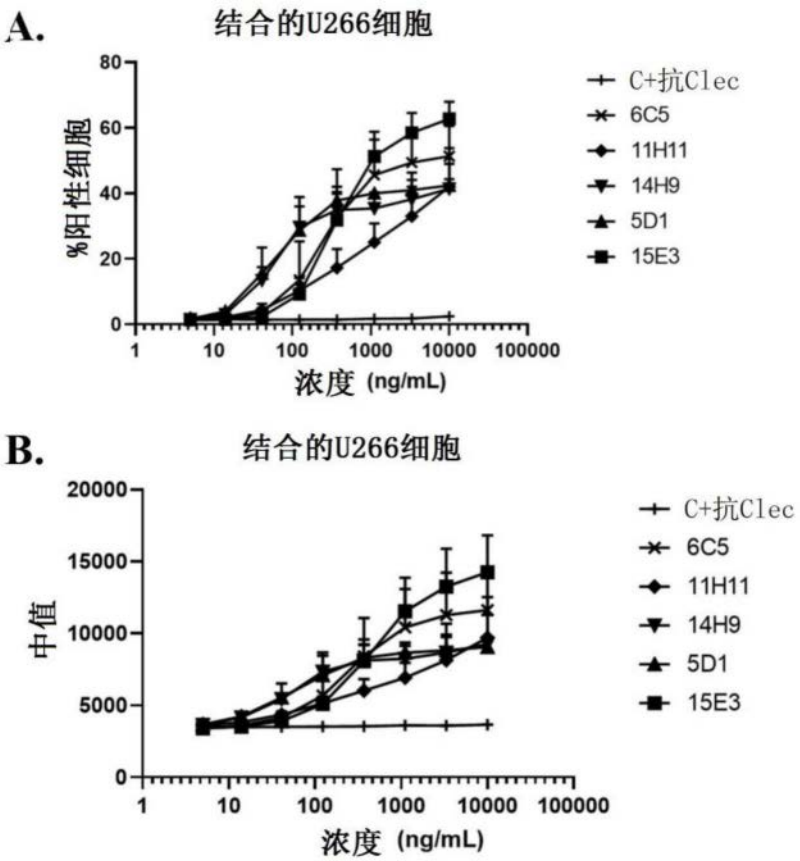
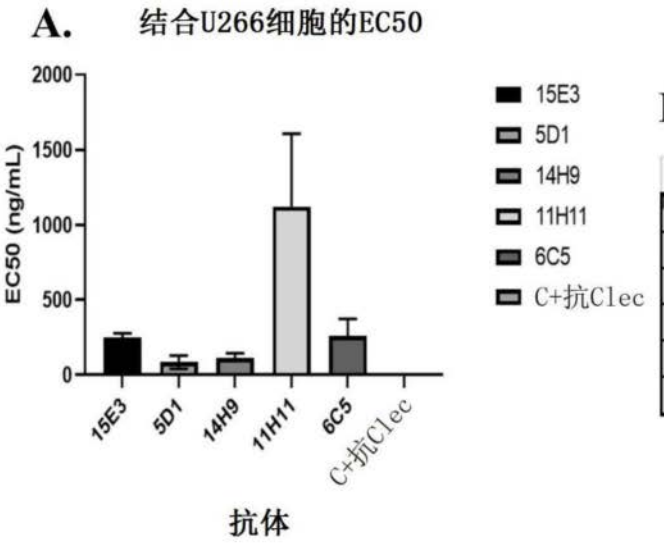


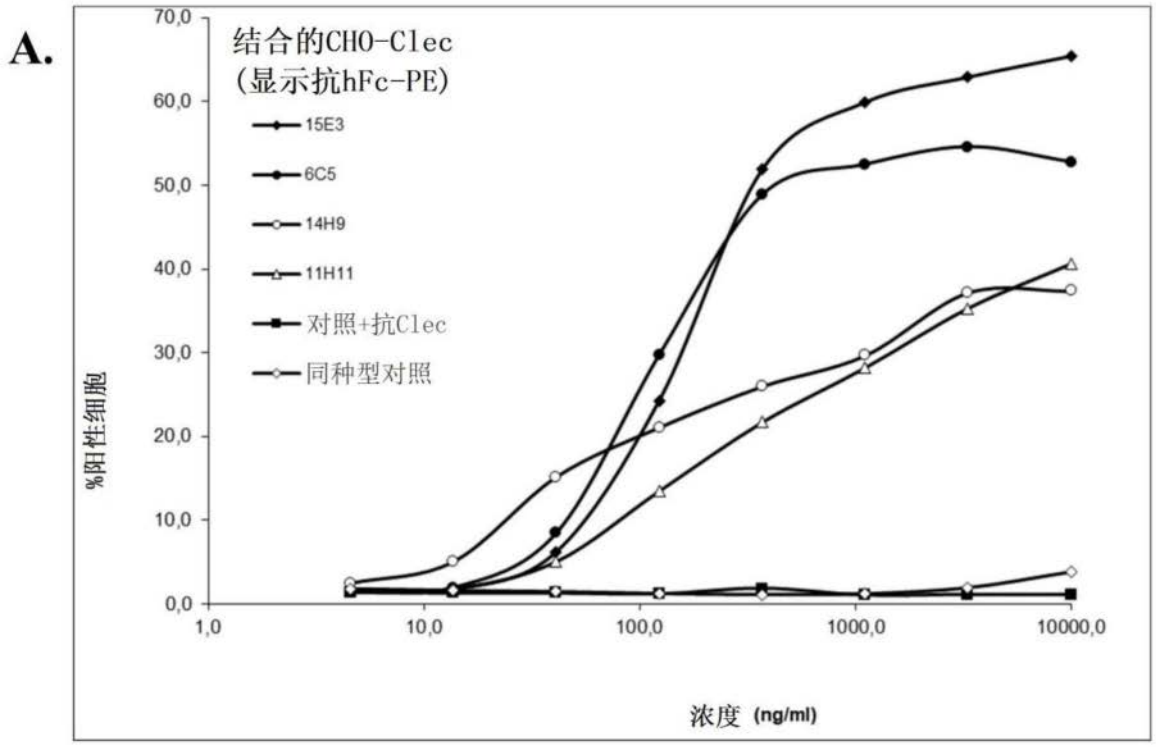

图19




B.

| | EC50 (ng/mL) |
|---|---|
| **15E3** | 251,35 |
| **5D1** | 84,74 |
| **14H9** | 113,16 |
| **11H11** | 1123,13 |
| **6C5** | 258,44 |
| C+抗Clec | 未测定 |

图20


A.
结合的CHO-Clec
(显示抗hFc-PE)
15E3
6C5
14H9
11H11
对照+抗Clec
同种型对照
%阳性细胞
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
1,0
10,0
100,0
1000,0
10000,0
浓度 (ng/ml)

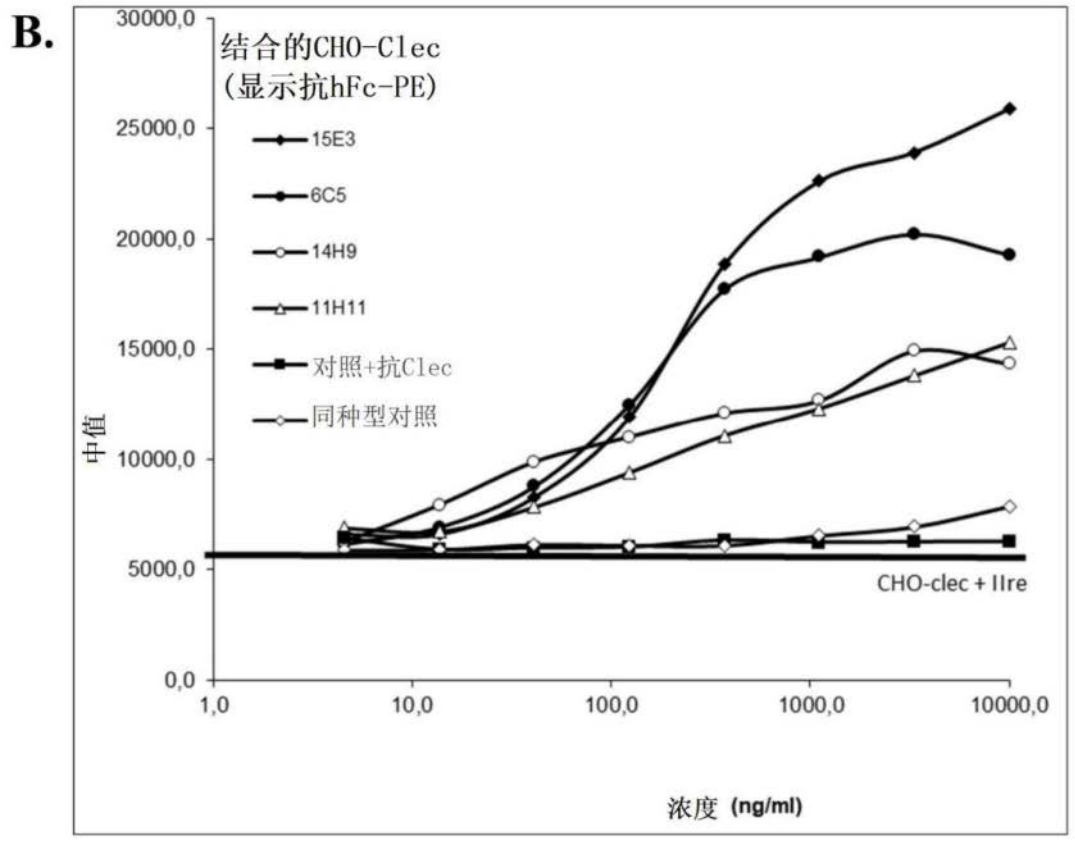

B.
结合的CHO-Clec
(显示抗hFc-PE)
15E3
6C5
14H9
11H11
对照+抗Clec
同种型对照
中值
30000,0
25000,0
20000,0
15000,0
10000,0
5000,0
0,0
CHO-clec + IIre
1,0
10,0
100,0
1000,0
10000,0
浓度 (ng/ml)

图21

| 抗体 | EC50 (ng/mL) |
| --- | --- |
| 15E3 | 122,78 |
| 6C5 | 123,23 |
| 14H9 | 895,18 |
| 11H11 | 1376,76 |
| C+抗Clec | 未测定 |

图22

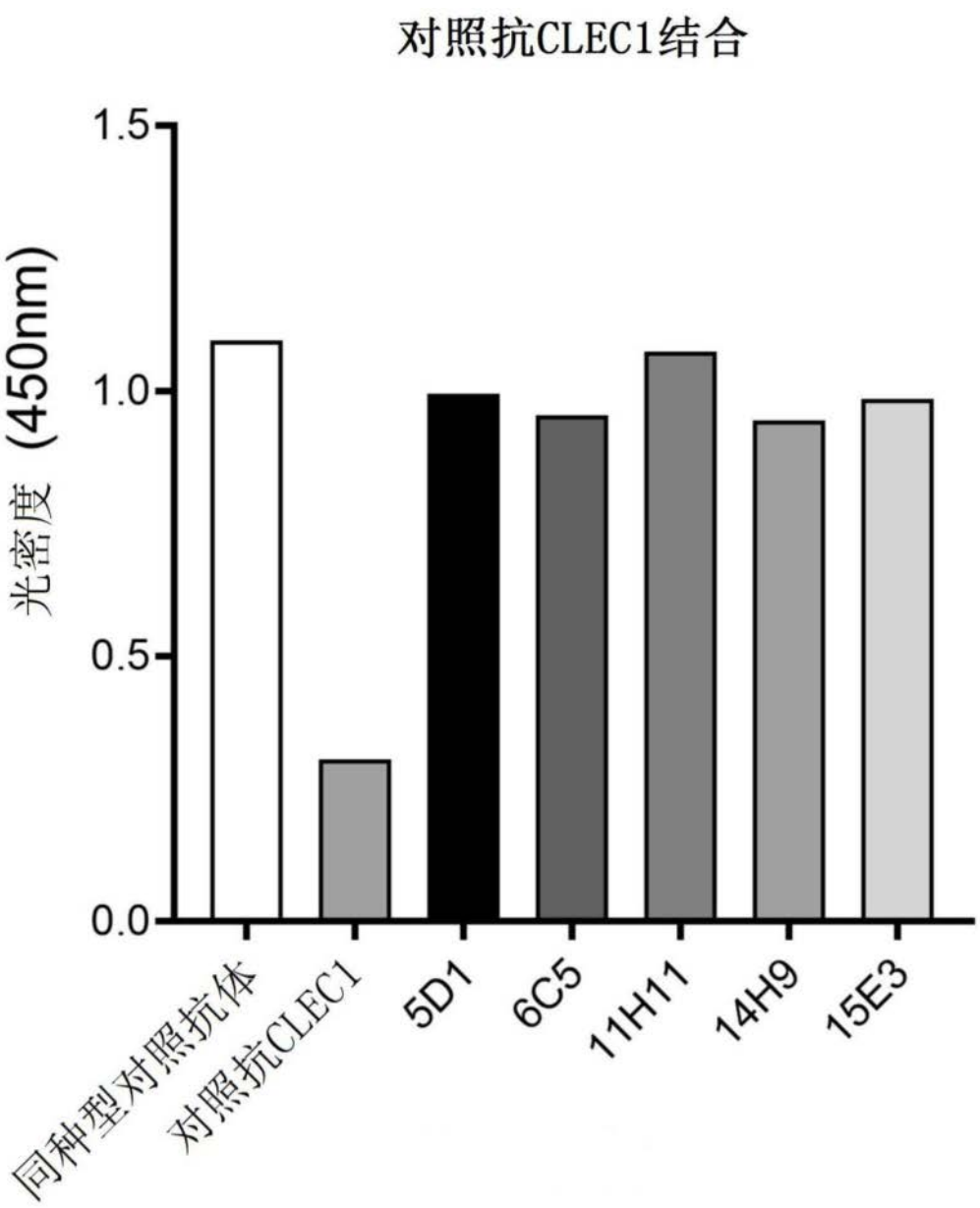

对照抗CLEC1结合
光密度 (450nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
同种型对照抗体
对照抗CLEC1
5D1
6C5
11H11
14H9
15E3

图23

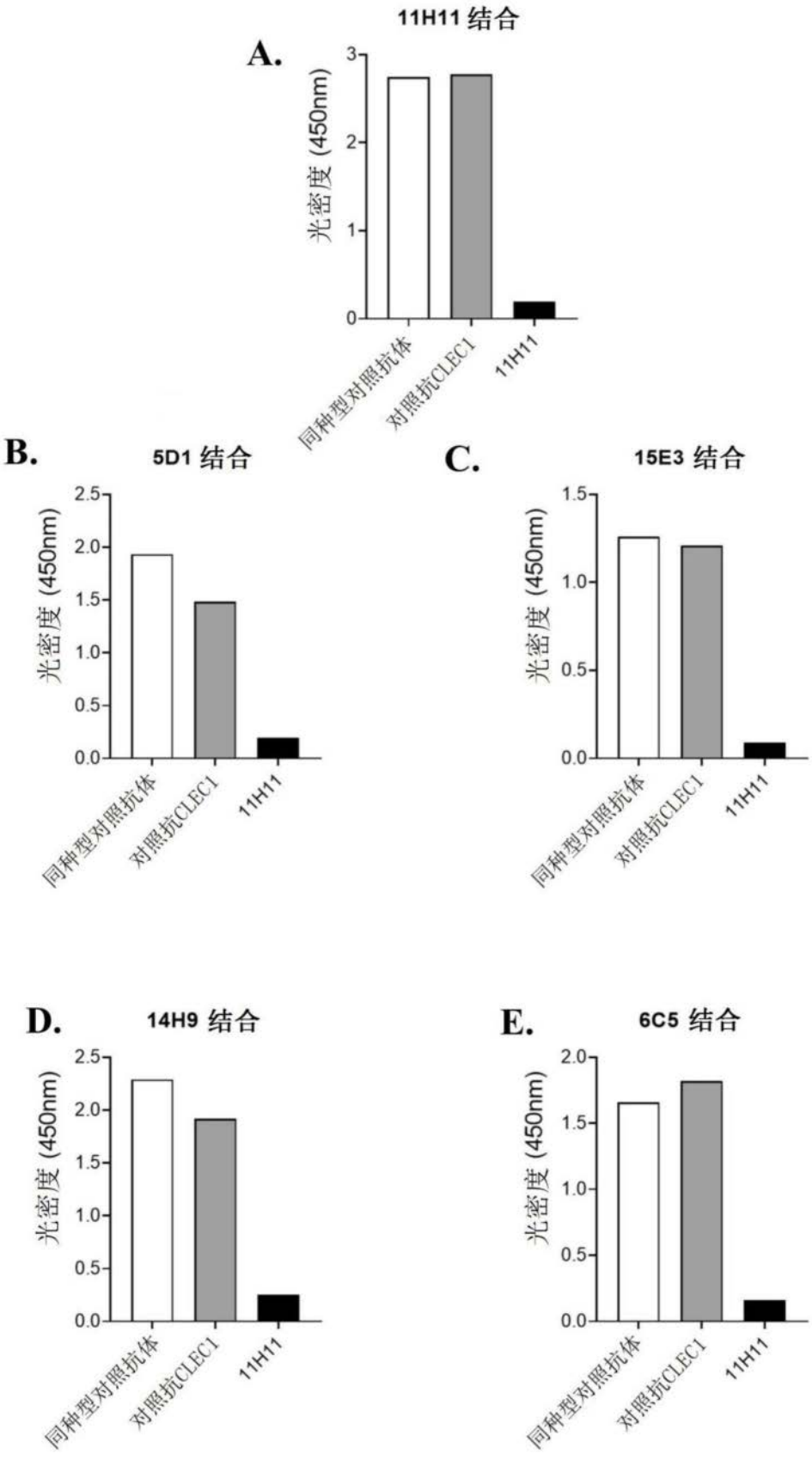

A.
11H11 结合
光密度 (450nm)
同种型对照抗体
对照抗CLEC1
11H11
B.
5D1 结合
C.
15E3 结合
D.
14H9 结合
E.
6C5 结合

图24