



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107474134 B

(45) 授权公告日 2021.07.27

(21) 申请号 201610399254.4

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2016.06.08

A61P 29/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 37/08 (2006.01)

申请公布号 CN 107474134 A

(56) 对比文件

WO 0192340 A2, 2001.12.06

(43) 申请公布日 2017.12.15

CN 102197052 A, 2011.09.21

(73) 专利权人 苏州康乃德生物医药有限公司

CN 1886426 A, 2006.12.27

地址 215400 江苏省太仓市朝阳东路3号香
塘发展大厦10楼

AU 2007314522 A1, 2009.04.30

(72) 发明人 郑伟 潘武宾 杨欣 陈阳
张立民 蒋洁

CN 103998053 A, 2014.08.20

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

马安伦.抗 IL-14R 单抗在 SLE 患者中对
IL-14R 的表达及其 Ig 分泌的影响.《中华风湿
病学杂志》.1990, 第3卷(第1期), 第39-41页.

代理人 张伟

审查员 刘帅

(51) Int.Cl.

权利要求书3页 说明书27页

C07K 16/28 (2006.01)

序列表60页 附图4页

(54) 发明名称

用于结合白细胞介素4受体的抗体

(57) 摘要

本发明提供一种能够结合白细胞介素4(IL-4)受体(IL-4R)的抗体。此外,本发明提供编码所述抗体的核酸序列,包含所述核酸序列的载体以及用所述载体转化或转染的宿主细胞。更进一步地,本发明提供用于生产本发明所述抗体的方法,所述抗体的医学用途以及包含所述抗体的试剂盒。

1. 一种能够结合白细胞介素4(IL-4)受体(IL-4R)的抗体,所述抗体的特征在于,所述抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自下述的CDR1、CDR2和CDR3组合:

- (i) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:5所示的CDR3;
- (ii) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;和
- (iii) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;

和,所述抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含下述的CDR1、CDR2和CDR3组合:

SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:18所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;和,所述抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:18所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体包含选自下述的轻链可变区和重链可变区组合:

- (i) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区;
- (ii) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区;和
- (iii) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体包含下述的轻链可变区和重链可变区组合:SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够结合白细胞介素4(IL-4)受体(IL-4R)。

6. 根据权利要求5所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够结合IL-4Ra。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够结合哺乳动物类IL-4Ra。

8. 根据权利要求7所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够结合人IL-4Ra。

9. 根据权利要求8所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够结合人可溶性IL-4Ra。

10. 根据权利要求6所述的抗体,其特征在于,所述抗体能够以小于100nM、小于10nM、小于1nM、小于0.5nM或甚至小于0.1nM的亲和力结合IL-4Ra。

11. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体、完全或部分人源化抗体或嵌合抗体。

12. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其特征在于,所述抗体为免疫球蛋白。

13. 根据权利要求12所述的抗体,其特征在于,所述抗体为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。

14. 根据权利要求12所述的抗体,其特征在于,所述抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。

15. 一种融合蛋白或偶联物,所述融合蛋白或偶联物包含权利要求1至14中任一项所述的抗体。

16. 一种核酸序列,所述核酸序列编码权利要求1至14中任一项所述的抗体的重链可变区和轻链可变区。

17. 根据权利要求16所述的核酸序列,其特征在于,所述核酸序列编码权利要求1至14中任一项所述的抗体的重链和轻链。

18. 一种包含权利要求16或17所述的核酸序列的载体。

19. 一种采用权利要求16或17所述的核酸序列或权利要求18所述的载体转化或转染的宿主细胞。

20. 一种用于生产权利要求1至14中任一项所述的抗体的方法,所述方法包括:由权利要求16或17所述的核酸序列获得所述抗体的重链可变区和轻链可变区,或者获得所述抗体的重链和轻链,并与所述抗体的任选其他结构域组装成抗体;或者

所述方法包括:在允许权利要求19所述的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和轻链可变区或者所述抗体的重链和轻链以组装成所述抗体的情况下,培养所述宿主细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法,其特征在于,所述方法还包括回收产生的抗体。

22. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至14中任一项所述的抗体、权利要求15所述的融合蛋白或偶联物、权利要求16或17所述的核酸序列、权利要求18所述的载体、权利要求19所述的宿主细胞和/或通过权利要求20或21所述的方法生产的抗体。

23. 根据权利要求22所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物为药物制剂。

24. 根据权利要求23所述的药物组合物,其特征在于,所述药物制剂为注射剂剂型。

25. 根据权利要求22或23所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物或药物制剂还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

26. 根据权利要求22或23所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物或药物制剂还包含至少一种选自下述的药物:平喘药,抗组胺药,免疫抑制剂,M受体阻断剂,白三烯受体阻断药,磷酸二酯酶抑制剂,非甾体抗炎药,激素。

27. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述平喘药为沙丁胺醇。

28. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述抗组胺药为氯雷他定。

29. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述免疫抑制剂为他克莫司或吡美莫司。

30. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述M受体阻断剂为异丙托溴铵。

31. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述白三烯受体阻断药为孟鲁司特。

32. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述磷酸二酯酶抑制剂为茶碱。

33. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述非甾体抗炎药为5-氨基水杨酸。

34. 根据权利要求26所述的药物组合物,其特征在于,所述激素为倍氯米松或布地奈德。

35. 权利要求1至14中任一项所述的抗体、权利要求15所述的融合蛋白或偶联物、权利要求16或17所述的核酸序列、权利要求18所述的载体、权利要求19所述的宿主细胞和/或通过权利要求20或21所述的方法生产的抗体在制备用于预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病的药物中的用途。

36. 根据权利要求35所述的用途,其特征在于,所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病。

37. 根据权利要求35或36所述的用途,其特征在于,所述炎症或过敏性疾病选自过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉和类风湿性关节炎。

38. 根据权利要求35或36所述的用途,其特征在于,所述炎症或过敏性疾病为过敏性皮

炎、哮喘或嗜酸性粒细胞食管炎。

39. 一种试剂盒，所述试剂盒包括权利要求1至14中任一项所述的抗体、权利要求15所述的融合蛋白或偶联物、权利要求16或17所述的核酸序列、权利要求18所述的载体、权利要求19所述的宿主细胞和/或通过权利要求20或21所述的方法生产的抗体。

用于结合白细胞介素4受体的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药领域,具体而言,本发明涉及能够结合白细胞介素4(IL-4)受体(IL-4R)的抗体及其用途。

背景技术

[0002] 白细胞介素-4(IL-4)是主要由活化的T细胞、单核细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞和嗜酸粒细胞产生的细胞因子。IL-4涉及多种生物学过程,已知其生物作用包括刺激活化B细胞和T细胞增殖、CD4⁺T细胞分化成II型辅助T细胞。研究表明,IL-4在介导过敏性疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤等疾病的免疫反应中有多重作用,对肿瘤、自身免疫性疾病和感染性疾病等有治疗作用,并且IL-4对疫苗免疫应答具有调节作用,因此,IL-4一直是人们关注的研究热点之一。

[0003] IL-13也是由活化的T细胞分泌产生的一种细胞因子,在不同的细胞类型如单核细胞、B细胞、肥大细胞和角质形成细胞中具有不同功能。IL-13能抑制单核细胞释放炎性细胞因子和化学因子,诱导B细胞增殖和分化,促进IgE合成。IL-13与IL-4在生物功能方面有许多共性,包括抑制单核细胞释放炎症介质,诱导巨噬细胞树突样变,促进单核细胞表面表达CD23及刺激B细胞合成免疫球蛋白。同时IL-13也具有自身的生物学功能特点,主要包括:促进单核细胞分化及细胞表面抗原发生改变;诱导B细胞增殖,分化,促进B细胞分泌抗体;调节IgE合成,与机体变态反应相关;抑制肿瘤细胞生长;抑制HIV的复制等。

[0004] IL-4的生物活性是由特异的细胞表面IL-4受体(IL-4R,在人类中为“hIL-4R”)介导的。人IL-4R是由两条多肽链形成的异二聚体,其中一条 α 链(hIL-4R α ,UniProtKB:P24394)对IL-4有很高的亲和力。并且研究表明,IL-13的细胞表面受体 α 链(IL-13R α 链)也和IL-4R α 链共同组成另一种形式的IL-4R复合体。由于在IL-4R复合物中IL-4R α 链对IL-4的结合起主导作用,并且其还涉及其他细胞因子,因此目前人们把IL-4R α 链作为主要对象开展研究,并且针对该靶点的人单克隆抗体已经在临幊上证明可以有效缓解和治疗哮喘、湿疹以及特应性皮炎等症狀。

[0005] 已知人白细胞介素-4受体可产生一种可溶形式的蛋白(shIL-4R α ,SEQ ID NO.94),这种可溶形式的蛋白可以抑制IL-4介导的细胞增殖和T细胞介导的IL-5上调。该受体的两种形式与过敏反应相关,其表现为过敏性鼻炎、鼻窦炎、哮喘或湿疹等症狀。因此将该蛋白作为靶点的阻断抗体有助于治疗和缓解此类疾病。

[0006] 哮喘(Asthma)是一种由多种炎症细胞如嗜酸性粒细胞、肥大细胞和淋巴细胞共同参与的慢性气道炎症性疾病,其具体发病机制目前尚不清楚。IL-4等细胞因子在支气管哮喘发生发展中起着十分重要的作用,研制IL-4的特异性抗体是解决哮喘治疗的有效途径之一。抑制IL-4/IL-4R α 可以对哮喘起到有效的免疫调节作用。

[0007] 过敏性鼻炎(allergic rhinitis,AR)与哮喘的发病机制有许多共同之处,均属于I型变态反应。研究发现,IL-4、IL-17和IgE在过敏性鼻炎的发病机制中扮演了重要的角色。药物治疗是目前AR治疗的重点,其中,鼻用皮质类固醇和抗组胺药物处于核心地位。

[0008] 特应性皮炎(atopic dermatitis,AD),又称异位性皮炎或遗传过敏性皮炎,是皮肤科常见疾病,多见于儿童和青少年,常与某些遗传过敏性疾病如过敏性鼻炎、哮喘等并发。IL-4和IL-13等细胞因子参与的免疫因素是其主要发病机制之一。

[0009] 嗜酸粒细胞性食管炎(eosinophilic esophagitis,EoE)是以食管壁全层嗜酸粒细胞(eosinophils, EOS)浸润为特征的慢性免疫性炎性疾病。EoE发病与Th2细胞功能紊乱相关。目前特异性强的方案,如新型生物制剂抗IL-5(如美泊利单抗)成为研究的热点。免疫调节治疗已在动物模型中取得成果,但人类临床试验仍需探索。PGD2抑制剂、抗TNF- α 、抗IL-13等药物正在探索中。

[0010] 目前针对hIL-4R靶点的单克隆抗体药物进入临床试验,如Dupilumab,在治疗特应性皮炎的II期临床中表现出了较好疗效。除Dupilumab以外,亦有公司申请了针对hIL-4R的其他单克隆抗体专利,如US 7,186,809和US 7,638,606。

发明内容

[0011] 本发明通过抗体筛选和优化获得了针对IL-4R的特异性抗体,所述抗体能够作为IL-4与IL-4R结合的阻断剂,通过与IL-4R结合,可以用于治疗炎症或过敏性疾病等。

[0012] 优选地,本发明的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含选自下述的CDR1、CDR2和CDR3组合:

[0013] (1) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:5所示的CDR3;

[0014] (2) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:5所示的CDR3;

[0015] (3) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:5所示的CDR3;

[0016] (4) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO.4所示的CDR2和SEQ ID NO:5所示的CDR3;

[0017] (5) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;

[0018] (6) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:7所示的CDR3;

[0019] (7) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;

[0020] (8) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;

[0021] (9) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:6所示的CDR3;

[0022] (10) SEQ ID NO:2所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;

[0023] (11) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:4所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;和

[0024] (12) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:3所示的CDR2和SEQ ID NO:8所示的CDR3;

[0025] 如/或

[0026] 所述抗体包含重链可变区 (VH) ,所述重链可变区包含选自下述的CDR1、CDR2和CDR3组合:

[0027] (1) SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3;

[0028] (2) SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:18所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3;

[0029] (3) SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2和SEQ ID NO:20所示的CDR3;

[0030] (4) SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:18所示的CDR2和SEQ ID NO:20所示的CDR3;

[0031] (5) SEQ ID NO:15所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3;

[0032] (6) SEQ ID NO:16所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3;和

[0033] (7) SEQ ID NO:14所示的CDR1,SEQ ID NO:18所示的CDR2和SEQ ID NO:19所示的CDR3。

[0034] 进一步地,所述抗体的轻链可变区包含选自下述的FR1、FR2、FR3和FR4组合:

[0035] (1) SEQ ID NO:9所示的FR1,SEQ ID NO:10所示的FR2,SEQ ID NO:12所示的FR3和SEQ ID NO:13所示的FR4;和

[0036] (2) SEQ ID NO:9所示的FR1,SEQ ID NO:11所示的FR2,SEQ ID NO:12所示的FR3和SEQ ID NO:13所示的FR4。

[0037] 进一步地,所述抗体的重链可变区包含选自下述的FR1、FR2、FR3和FR4组合:

[0038] (1) SEQ ID NO:21所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0039] (2) SEQ ID NO:22所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0040] (3) SEQ ID NO:23所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0041] (4) SEQ ID NO:24所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0042] (5) SEQ ID NO:24所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0043] (6) SEQ ID NO:25所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

[0044] (7) SEQ ID NO:26所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;

- [0045] (8) SEQ ID NO:27所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0046] (9) SEQ ID NO:29所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0047] (10) SEQ ID NO:30所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0048] (11) SEQ ID NO:24所示的FR1,SEQ ID NO:33所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0049] (12) SEQ ID NO:24所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:36所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0050] (13) SEQ ID NO:24所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:37所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0051] (14) SEQ ID NO:31所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0052] (15) SEQ ID NO:27所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0053] (16) SEQ ID NO:26所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0054] (17) SEQ ID NO:25所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0055] (18) SEQ ID NO:28所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0056] (19) SEQ ID NO:28所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:34所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0057] (20) SEQ ID NO:23所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;
- [0058] (21) SEQ ID NO:22所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4;和
- [0059] (22) SEQ ID NO:21所示的FR1,SEQ ID NO:32所示的FR2,SEQ ID NO:35所示的FR3和SEQ ID NO:38所示的FR4。
- [0060] 按照本领域公知的抗体轻链可变区、重链可变区的结构域组成,本发明抗体的轻链可变区或重链可变区以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序包含上述结构域组分,或者以(X)n-FR1-(X)n-CDR1-(X)n-FR2-(X)n-CDR2-(X)n-FR3-(X)n-CDR3-(X)n-FR4-(X)n的顺序包含上述结构域组分,其中X为任意氨基酸残基,n为零或大于零的整数。
- [0061] 优选地,本发明提供的抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的轻链可变区:
- [0062] SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58;

[0063] 和/或

[0064] 本发明提供的抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的重链可变区：

[0065] SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93。

[0066] 根据本发明的具体实施方式，本发明提供的抗体包含选自下述的轻链可变区和重链可变区组合：

[0067] (1) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.62所示的重链可变区；

[0068] (2) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.63所示的重链可变区；

[0069] (3) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.59所示的重链可变区；

[0070] (4) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.60所示的重链可变区；

[0071] (5) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.61所示的重链可变区；

[0072] (6) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.67所示的重链可变区；

[0073] (7) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.65所示的重链可变区；

[0074] (8) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.66所示的重链可变区；

[0075] (9) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.64所示的重链可变区；

[0076] (10) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.68所示的重链可变区；

[0077] (11) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.69所示的重链可变区；

[0078] (12) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.70所示的重链可变区；

[0079] (13) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.71所示的重链可变区；

[0080] (14) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.72所示的重链可变区；

[0081] (15) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.73所示的重链可变区；

[0082] (16) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.89所示的重链可变区；

[0083] (17) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.88所示的重链可变区；

[0084] (18) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.87所示的重链可变区；

[0085] (19) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.86所示的重链可变区；

[0086] (20) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.83所示的重链可变区；

[0087] (21) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.82所示的重链可变区；

[0088] (22) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.81所示的重链可变区；

[0089] (23) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.85所示的重链可变区；

[0090] (24) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.84所示的重链可变区；

[0091] (25) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区；

[0092] (26) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.90所示的重链可变区；

[0093] (27) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.74所示的重链可变区；

[0094] (28) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.75所示的重链可变区；

[0095] (29) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.76所示的重链可变区；

-
- [0096] (30) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.77所示的重链可变区；
 - [0097] (31) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.78所示的重链可变区；
 - [0098] (32) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.80所示的重链可变区；
 - [0099] (33) SEQ ID NO.39所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0100] (34) SEQ ID NO.40所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0101] (35) SEQ ID NO.41所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0102] (36) SEQ ID NO.42所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0103] (37) SEQ ID NO.43所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0104] (38) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0105] (39) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.62所示的重链可变区；
 - [0106] (40) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.68所示的重链可变区；
 - [0107] (41) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.72所示的重链可变区；
 - [0108] (42) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.82所示的重链可变区；
 - [0109] (43) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.85所示的重链可变区；
 - [0110] (44) SEQ ID NO.44所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区；
 - [0111] (45) SEQ ID NO.48所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0112] (46) SEQ ID NO.49所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0113] (47) SEQ ID NO.50所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0114] (48) SEQ ID NO.45所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0115] (49) SEQ ID NO.46所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0116] (50) SEQ ID NO.47所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0117] (51) SEQ ID NO.56所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0118] (52) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0119] (53) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.62所示的重链可变区；
 - [0120] (54) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.68所示的重链可变区；
 - [0121] (55) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.72所示的重链可变区；
 - [0122] (56) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.82所示的重链可变区；
 - [0123] (57) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.85所示的重链可变区；
 - [0124] (58) SEQ ID NO.55所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区；
 - [0125] (59) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0126] (60) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.62所示的重链可变区；
 - [0127] (61) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.68所示的重链可变区；
 - [0128] (62) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.72所示的重链可变区；
 - [0129] (63) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.82所示的重链可变区；
 - [0130] (64) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.85所示的重链可变区；
 - [0131] (65) SEQ ID NO.54所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区；
 - [0132] (66) SEQ ID NO.53所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0133] (67) SEQ ID NO.51所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；
 - [0134] (68) SEQ ID NO.52所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；

[0135] (69) SEQ ID NO.52所示的轻链可变区和SEQ ID NO.62所示的重链可变区；和

[0136] (70) SEQ ID NO.52所示的轻链可变区和SEQ ID NO.91所示的重链可变区；

[0137] (71) SEQ ID NO.58所示的轻链可变区和SEQ ID NO.92所示的重链可变区；和

[0138] (72) SEQ ID NO.57所示的轻链可变区和SEQ ID NO.93所示的重链可变区。

[0139] 本发明提供的抗体能够结合IL-4R，作为IL-4R的拮抗剂发挥作用。优选地，所述抗体能够结合IL-4Ra，优选结合哺乳动物类IL-4Ra，更优选结合人IL-4Ra，甚至更优选结合人可溶性IL-4Ra。

[0140] 可以通过Biacore或ELISA方法测定本发明提供的抗体与IL-4Ra的结合亲和力。测得所述抗体能够以小于100nM、小于10nM、小于1nM、小于0.5nM和甚至小于0.1nM亲和力结合IL-4Ra。

[0141] 在相同条件下，本发明提供的抗体与参照抗体的表达量比为0.1-3:1，优选0.3-3:1，更优选0.4-3:1，更优选0.5-3:1，更优选0.6-3:1，更优选0.7-3:1，更优选1-3:1。

[0142] 就抗体类别而言，本发明提供的抗体可以是单克隆抗体、完全或部分人源化抗体或嵌合抗体；

[0143] 或者优选地，所述抗体为免疫球蛋白，优选为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM，更优选为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型，更优选为IgG2或IgG4亚型。

[0144] 另一方面，本发明提供一种融合蛋白或偶联物，所述融合蛋白或偶联物包含本发明所述的抗体。该融合蛋白或偶联物还包含通过化学或物理方法结合于本发明所述抗体的细胞表面受体、活性蛋白及多肽、小分子化合物如氨基酸和糖类、小分子聚合物或对本发明所述抗体进行化学修饰的其它部分等。

[0145] 另一方面，本发明提供一种核酸序列，所述核酸序列能够编码本发明所提供抗体的重链可变区和/或轻链可变区；

[0146] 优选地，所述核酸序列能够编码本发明提供抗体的重链和/或轻链。

[0147] 再一方面，本发明还提供一种包含本发明提供的核酸序列的载体。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

[0148] 上述载体或核酸序列可以用于转化或转染宿主细胞，用于保存或抗体表达等目的。因此，本发明还提供一种采用所述核酸序列或载体转化或转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

[0149] 本发明提供的抗体可以利用本领域已知的任何方法获得。例如，可以先由本发明提供的核酸序列获得所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者获得所述抗体的重链和/或轻链，然后与所述抗体的任选其他结构域组装成抗体；或者，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下，培养所述宿主细胞。

[0150] 任选地，所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

[0151] 本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞或者通过上述方法生产的抗体可以被包含在药物组合物中，更特别地被包含在药物制剂中，从而根据实际需要用于各种目的。因此，在又一方面，本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明所述的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过上述方法生产的抗体。

- [0152] 可选地,所述药物组合物可以是药物制剂。所述药物制剂例如为注射剂剂型。
- [0153] 取决于特定剂型,所述药物组合物或药物制剂还包含药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0154] 在药物组合物或药物制剂中,还可以包含至少一种选自下述的药物:平喘药如沙丁胺醇等,抗组胺药如氯雷他定等,免疫抑制剂如他克莫司、吡美莫司等,M受体阻断剂如异丙托溴铵等,白三烯受体阻断药如孟鲁司特等,磷酸二酯酶抑制剂如茶碱等,非甾体抗炎药如5-氨基水杨酸等,激素类如倍氯米松,布地奈德等,即本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞或者通过上述方法生产的抗体可以根据需要与其他药物联合使用。
- [0155] 再一方面,本发明还提供所述抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体在制备用于预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病的药物中的用途;
- [0156] 优选地,所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病,例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。
- [0157] 还一方面,本发明提供一种预防、治疗或改善受试者的炎症或过敏性疾病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体。
- [0158] 优选地,所述受试者为哺乳类动物;更优选地,所述受试者为人。
- [0159] 优选地,所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病,例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。
- [0160] 在预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病时,还可以联合应用其他药物,例如所述方法还包括给受试者施用至少一种选自下述的药物:平喘药如沙丁胺醇等,抗组胺药如氯雷他定等,免疫抑制剂如他克莫司、吡美莫司等,M受体阻断剂如异丙托溴铵等,白三烯受体阻断药如孟鲁司特等,磷酸二酯酶抑制剂如茶碱等,非甾体抗炎药如5-氨基水杨酸等,激素类如倍氯米松、布地奈德等。
- [0161] 优选地,所述药物与本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体同时或顺序施用。
- [0162] 再一方面,本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒包括本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体。

附图说明

- [0163] 结合本发明非限制性实施例和附图可以更好地理解本发明,在附图中:
- [0164] 图1示出了本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学曲线;
- [0165] 图2示出了本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学曲线;
- [0166] 图3A-3C通过FACS示出了本发明的抗体与表达IL-4R α 的TF-1细胞特异性结合,其中3A示出没有加入本发明抗体L1012H1031时的荧光信号,3B示出加入本发明抗体L1012H1031后的荧光信号,3C示出3A-3B的信号叠加比较。
- [0167] 图4A-4D通过FACS示出了本发明的抗体与表达IL-4R α 的TF-1细胞的特异性结合被体系中存在的sIL-4R α 所阻断,其中4A示出没有加入本发明抗体L1012H1031时的荧光信号,

4B示出加入本发明抗体L1012H1031后的荧光信号,4C示出加入本发明抗体L1012H1031及sIL-4R α 时的荧光信号,4D示出4A-4C的信号叠加比较。

具体实施方式

[0168] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0169] 下述实施例中的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0170] 在下述实施例中,示例性地提供并验证了表1中所示抗体的作用。

[0171] 表1本发明提供的示例性抗体

| 编号 | 轻链可变区和重量可变区的序列编号 |
|----------------------|-------------------------------|
| [0172] L1000H1007 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 62 |

| | | |
|--------|------------|-------------------------------|
| [0173] | L1000H1008 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 63 |
| | L1000H1009 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 59 |
| | L1000H1010 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 60 |
| | L1000H1011 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 61 |
| | L1000H1012 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 67 |
| | L1000H1013 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 65 |
| | L1000H1014 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 66 |
| | L1000H1015 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 64 |
| | L1000H1016 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 68 |
| | L1000H1017 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 69 |
| | L1000H1018 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 70 |
| | L1000H1019 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 71 |
| | L1000H1020 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 72 |
| | L1000H1021 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 73 |
| | L1000H1022 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 89 |
| | L1000H1023 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 88 |
| | L1000H1024 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 87 |
| | L1000H1025 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 86 |
| | L1000H1026 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 83 |
| | L1000H1027 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 82 |
| | L1000H1028 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 81 |
| | L1000H1029 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 85 |
| | L1000H1030 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 84 |
| | L1000H1031 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 91 |
| | L1000H1032 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 90 |
| | L1000H1033 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 74 |
| | L1000H1034 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 75 |
| | L1000H1035 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 76 |
| | L1000H1036 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 77 |
| | L1000H1037 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 78 |
| | L1000H1038 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 80 |
| | L1007H1000 | SEQ ID NO. 39 + SEQ ID NO. 92 |
| | L1008H1000 | SEQ ID NO. 40 + SEQ ID NO. 92 |

[0174]

| | |
|------------|-------------------------------|
| L1009H1000 | SEQ ID NO. 41 + SEQ ID NO. 92 |
| L1010H1000 | SEQ ID NO. 42 + SEQ ID NO. 92 |
| L1011H1000 | SEQ ID NO. 43 + SEQ ID NO. 92 |
| L1012H1000 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 92 |
| L1012H1007 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 62 |
| L1012H1016 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 68 |
| L1012H1020 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 72 |
| L1012H1027 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 82 |
| L1012H1029 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 85 |
| L1012H1031 | SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 91 |
| L1013H1000 | SEQ ID NO. 48 + SEQ ID NO. 92 |
| L1014H1000 | SEQ ID NO. 49 + SEQ ID NO. 92 |
| L1015H1000 | SEQ ID NO. 50 + SEQ ID NO. 92 |
| L1016H1000 | SEQ ID NO. 45 + SEQ ID NO. 92 |
| L1017H1000 | SEQ ID NO. 46 + SEQ ID NO. 92 |
| L1018H1000 | SEQ ID NO. 47 + SEQ ID NO. 92 |
| L1019H1000 | SEQ ID NO. 56 + SEQ ID NO. 92 |
| L1020H1000 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 92 |
| L1020H1007 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 62 |
| L1020H1016 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 68 |
| L1020H1020 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 72 |
| L1020H1027 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 82 |
| L1020H1029 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 85 |
| L1020H1031 | SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 91 |
| L1021H1000 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 92 |
| L1021H1007 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 62 |
| L1021H1016 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 68 |
| L1021H1020 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 72 |
| L1021H1027 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 82 |
| L1021H1029 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 85 |
| L1021H1031 | SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 91 |
| L1022H1000 | SEQ ID NO. 53 + SEQ ID NO. 92 |
| L1023H1000 | SEQ ID NO. 51 + SEQ ID NO. 92 |

| | |
|------------|-------------------------------|
| L1024H1000 | SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 92 |
| L1024H1007 | SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 62 |
| L1024H1031 | SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 91 |
| L1001H1000 | SEQ ID NO. 58 + SEQ ID NO. 92 |
| L1000H1001 | SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 93 |

[0176] 实施例1：本发明抗体的制备与非还原SDS-PAGE凝胶电泳法测定表达量

[0177] 将抗体轻链可变区的编码序列利用EcoRI和BsiWI酶切位点插入到pFUSE2ss-CL Ig-hK载体(Invivogen, 货号:pfuse2ss-hc1k)构成轻链表达载体；重链可变区的编码序列利用EcoRI和NheI酶切位点插入到pFUSEss-CH Ig-hG2载体(Invivogen, 货号:pfusess-hchg2)或pFUSEss-CH Ig-hG4载体(Invivogen, 货号:pfusess-hchg4)构成重链表达载体。

[0178] Expi293细胞的培养和转染按照Invitrogen公司Expi293TM Expression System Kit手册进行(货号:A14635)。转染时细胞密度调整为 2×10^6 个/ml, 每毫升细胞加入上述0.6 μ g轻链表达载体和0.4 μ g重链表达载体, 四天后收集培养上清。

[0179] 细胞培养上清按照《分子克隆实验指南》第三版附录8所述方法进行非还原SDS-PAGE凝胶电泳。

[0180] 使用东方君意凝胶扫描成像系统拍照并使用Gel-PRO ANALYZER软件进行凝胶定量, 以测定抗体瞬转的表达量。结果以相对于对照抗体1(根据专利US 7,186,809构建, 其轻链可变区为US 7,186,809的SEQ ID No.10, 重链可变区为US 7,186,809的SEQ ID No.12, 下同)的表达量表示(对照抗体2根据专利US 7,638,606构建, 其轻链可变区为US 7,638,606的SEQ ID No.6, 重链可变区为US 7,638,606的SEQ ID No.42, 下同), 见下表2a-2c。

[0181] 表2a本发明抗体的瞬转表达量(表达量较对照抗体1显著提高的抗体)：

| 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 | 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 |
|------------|---------------|------------|---------------|
| L1021H1000 | 2.08 | L1000H1028 | 1.27 |
| L1020H1000 | 1.58 | L1000H1015 | 1.19 |
| L1000H1027 | 1.56 | L1000H1032 | 1.18 |
| L1000H1024 | 1.51 | L1000H1026 | 1.15 |

| | | | |
|------------|------|------------|------|
| L1000H1025 | 1.48 | L1021H1029 | 1.12 |
| L1001H1000 | 1.48 | L1000H1030 | 1.1 |
| L1021H1016 | 1.43 | L1024H1031 | 1.08 |
| L1000H1014 | 1.35 | L1000H1016 | 1.05 |

[0184] 表2b本发明抗体的瞬转表达量(表达量较对照抗体1略有降低的抗体)：

| 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 | 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 |
|-------------------|---------------|------------|---------------|
| L1000H1031 | 0.99 | L1017H1000 | 0.85 |
| L1021H1031 | 0.99 | L1020H1016 | 0.84 |
| L1020H1029 | 0.96 | L1000H1009 | 0.81 |
| 对照抗体 2 | 0.93 | L1000H1007 | 0.8 |
| [0185] L1012H1000 | 0.89 | L1000H1023 | 0.8 |
| L1019H1000 | 0.87 | L1020H1027 | 0.78 |
| L1020H1031 | 0.87 | L1024H1007 | 0.77 |
| L1021H1020 | 0.87 | L1000H1013 | 0.75 |
| L1000H1029 | 0.86 | L1020H1007 | 0.74 |
| L1008H1000 | 0.86 | L1021H1007 | 0.74 |
| L1000H1001 | 0.85 | L1000H1021 | 0.71 |

[0186] 表2c本发明抗体的瞬转表达量(表达量较对照抗体1有大幅降低的抗体)：

| 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 | 抗体编号 | 表达量 vs 对照抗体 1 |
|-------------------|---------------|------------|---------------|
| L1000H1020 | 0.69 | L1024H1000 | 0.52 |
| [0187] L1010H1000 | 0.69 | L1000H1008 | 0.51 |
| L1000H1022 | 0.67 | L1000H1037 | 0.5 |
| L1000H1012 | 0.64 | L1007H1000 | 0.49 |
| L1022H1000 | 0.64 | L1016H1000 | 0.49 |
| L1011H1000 | 0.63 | L1000H1017 | 0.47 |
| L1000H1011 | 0.62 | L1000H1035 | 0.46 |
| L1000H1033 | 0.62 | L1012H1027 | 0.46 |
| L1020H1020 | 0.61 | L1018H1000 | 0.44 |
| L1000H1036 | 0.6 | L1023H1000 | 0.43 |

| | | | | |
|--------|------------|------|------------|------|
| [0188] | L1021H1027 | 0.6 | L1012H1016 | 0.42 |
| | L1012H1007 | 0.59 | L1013H1000 | 0.41 |
| | L1009H1000 | 0.57 | L1000H1034 | 0.4 |
| | L1012H1020 | 0.57 | L1000H1018 | 0.35 |
| | L1012H1031 | 0.56 | L1000H1019 | 0.34 |
| | L1000H1038 | 0.54 | L1015H1000 | 0.27 |
| | L1012H1029 | 0.54 | L1014H1000 | 0.17 |
| | L1000H1010 | 0.53 | | |

[0189] 实施例2:检测本发明的抗体抑制hIL-4或hIL-13对TF-1细胞的增殖作用

[0190] 1. 试剂的配制

[0191] hIL-4 (Invivogen, 货号: rhIL-4) 溶液: 用100μl含0.1% BSA (Beyotime, 货号: ST023) 的PBS溶液溶解hIL-4, 得到100μg/ml的浓度, 将溶解后的hIL-4按照5μl每管的体积分装至1.5ml (Nunc) 离心管内, 并存放于-20℃冰箱内。

[0192] WST-1 (Beyotime, 货号: C0036) 溶液: 把5ml电子耦合剂 (C0036-2) 加入到WST-1粉末 (C0036-1) 中, 完全溶解即成WST-1溶液, 按照每管620μl体积分装至1.5ml离心管内, 并存放于-20℃冰箱内。

[0193] 2. TF-1细胞培养

[0194] 取出液氮中冻存的TF-1 (ATCC:CRL-2003TM) 细胞, 在37℃水浴中震荡, 使其迅速溶解。将溶解后的细胞悬液移至15ml离心管内, 加1640培养基至10ml, 800rpm离心5min, 吸去上清, 保留细胞沉淀, 重复洗涤一次, 加入10ml含10% FBS和2ng/ml GM-CSF (Sino Biological, 货号: 10015-H01H) 的1640培养基, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml, 移至T75细胞培养瓶 (Nunc) 中, 置于37℃, 5% CO₂培养箱 (Thermo) 中静置培养。每隔2-3天, 取细胞悬液, 800rpm离心5min, 用10ml培养基重悬细胞, 计数细胞 1×10^6 个细胞移入新的T75细胞瓶中, 同时补加培养基至10ml, 连续传代2-3次, 至细胞状态良好 (细胞透亮, 单一悬浮的略微不规则形态细胞) 后可进行增殖实验。

[0195] 3. 抗体的制备和纯化

[0196] a) 本发明抗体细胞培养上清样品:

[0197] 将带有不同组抗体基因的质粒转染Expi293细胞, 转染后4天取细胞培养上清200μl, 800rpm离心5min, 将上清经0.22μm孔径滤膜过滤后, 用于增殖阻断实验。

[0198] b) 纯化的本发明抗体样品: 取表达本发明抗体的细胞培养上清, 过0.22μm滤膜, 经GE MabSelect Sure (Cat Number: 11003494) Protein A亲和层析柱纯化, 纯化系统为GE AKTA purifier 10, 纯化后收集的抗体使用Amicon超滤浓缩管 (Cat Number: UFC903096) 浓缩并定量。检测时, 用PBS稀释抗体至0至1μg/ml用于增殖阻断实验。

[0199] 4. 抑制增殖实验

[0200] 取T75细胞瓶中生长状态良好细胞, 移入15ml离心管内, 800rpm离心5min, 弃上清, 取细胞沉淀。用10ml PBS重悬细胞, 800rpm离心5min, 弃上清, 取细胞沉淀。用10ml含10% FBS的1640培养基 (不含GM-CSF) 重悬细胞, 800rpm离心5min, 弃上清, 取细胞沉淀。用5ml含

10%FBS的1640培养基(不含GM-CSF)重悬细胞,细胞计数后,补加培养基,调整细胞密度至 5×10^5 个/ml。将细胞悬液按每孔80 μ l体积加入96孔板内(预留外圈防挥发孔不加细胞)。将准备好的不同浓度的纯化抗体10 μ l或细胞培养上清10 μ l加入96孔的细胞内(3个重复孔)。然后用含10%FBS的1640培养基稀释hIL-4至50ng/ml。将50ng/ml的hIL-4按照10 μ l每孔的体积分别加入96孔板上对应的细胞孔内,使得最终的细胞密度为 4×10^5 个/ml,hIL-4浓度为5ng/ml,最终96孔板每孔体积为100 μ l,设置不添加hIL-4,不添加抗体,仅加入相同数量细胞与同体积培养液的阴性对照组(3个重复孔),另设置不添加抗体,补加相同体积培养液,细胞中仅加入相同浓度hIL-4的阳性对照组(3个重复孔)。在96孔细胞板外圈每孔加入200 μ l PBS防止内圈液体挥发。将96孔细胞板置于37℃,5%CO₂培养箱中静置培养。

[0201] 使用500ng/ml的hIL-13(加入细胞后的终浓度为50ng/ml),按照相同过程重复上述实验。

[0202] 5. 数据统计

[0203] 96孔细胞板在5%CO₂培养箱中静置培养72h后,在每孔细胞内加入10 μ l WST-1溶液。将96孔细胞板继续置于37℃,5%CO₂培养箱中静置培养。24h后,将96孔板置于flexstation 3 (Molecular Devices) 中,读取OD450-OD650的值。

[0204] 对于本发明抗体培养上清,测得的OD450-OD650数值(OD值)与阳性对照组和阴性对照组的数值进行计算,抑制百分率=(转染后细胞上清OD值-阳性对照组OD值)/(阴性对照组OD值-阳性对照组OD值)×100%。本发明的抗体对hIL-4或hIL-13的TF-1细胞增殖作用的阻断作用结果见下表3a-3b。

[0205] 对于经过纯化的不同浓度的本发明抗体,测得的OD450-OD650数据输入prism5软件中,将阴性对照组数值设为最低值,阳性对照组数值设为最高值,抗体浓度取对数值,由prism5软件拟合抗体浓度对数值与OD450-OD650的曲线,计算得到的IC50见下表4。

[0206] 表3a本发明的抗体抑制TF-1细胞增殖活性的筛选结果(抑制率较对照抗体1增加的抗体)

[0207]

| 抗体编号 | IL-4 促增殖作用受抑制率 | IL-13 促增殖作用受抑制率 |
|------------|----------------|-----------------|
| 对照抗体 1 | 0.87 | 0.63 |
| 对照抗体 2 | 1 | 0.87 |
| L1020H1029 | 1.03 | 0.93 |
| L1000H1001 | 1.03 | 0.93 |
| L1021H1027 | 1.02 | 0.94 |
| L1020H1027 | 1.02 | 0.92 |
| L1021H1029 | 1.02 | 0.92 |
| L1020H1016 | 1.01 | 0.97 |
| L1024H1031 | 1.01 | 0.94 |
| L1021H1031 | 1.01 | 0.93 |
| L1020H1031 | 1.01 | 0.93 |
| L1000H1029 | 1.01 | 0.92 |
| L1000H1027 | 1.01 | 0.86 |
| L1021H1016 | 1 | 0.94 |
| L1021H1007 | 1 | 0.86 |
| L1000H1028 | 1 | 0.84 |
| L1000H1014 | 0.99 | 0.78 |
| L1001H1000 | 0.98 | 0.85 |
| L1000H1024 | 0.98 | 0.75 |
| L1000H1031 | 0.97 | 0.83 |
| L1000H1007 | 0.96 | 0.82 |

| | | | |
|--------|------------|------|------|
| [0208] | L1000H1023 | 0.96 | 0.8 |
| | L1000H1032 | 0.96 | 0.74 |
| | L1020H1007 | 0.95 | 0.9 |
| | L1021H1000 | 0.95 | 0.78 |
| | L1000H1016 | 0.95 | 0.76 |
| | L1012H1029 | 0.94 | 0.95 |
| | L1012H1007 | 0.93 | 0.88 |
| | L1021H1020 | 0.91 | 0.75 |
| | L1020H1000 | 0.91 | 0.7 |
| | L1000H1025 | 0.91 | 0.69 |
| | L1012H1020 | 0.9 | 0.78 |
| | L1000H1020 | 0.88 | 0.76 |
| | L1000H1012 | 0.88 | 0.58 |
| | L1020H1020 | 0.87 | 0.76 |

[0209] 表3b本发明的抗体抑制TF-1细胞增殖活性的筛选结果(抑制率较对照抗体1等同或降低的抗体)

| 抗体编号 | IL-4 促增殖作用受抑制率 | IL-13 促增殖作用受抑制率 |
|--------|----------------|-----------------|
| [0210] | L1000H1022 | 0.87 |
| | L1000H1017 | 0.87 |
| | L1000H1030 | 0.87 |
| | L1024H1007 | 0.86 |
| | L1000H1013 | 0.86 |
| | L1012H1031 | 0.85 |
| | L1000H1015 | 0.85 |
| | L1000H1026 | 0.85 |
| | L1000H1018 | 0.84 |
| | L1000H1009 | 0.83 |
| | L1012H1000 | 0.78 |
| | L1012H1016 | 0.78 |

| | | |
|------------|-------|-------|
| L1000H1021 | 0.73 | 0.56 |
| L1019H1000 | 0.72 | 0.49 |
| L1008H1000 | 0.67 | 0.27 |
| L1009H1000 | 0.66 | 0.35 |
| L1000H1008 | 0.66 | 0.19 |
| L1012H1027 | 0.65 | 0.63 |
| L1000H1011 | 0.61 | 0.26 |
| L1000H1010 | 0.54 | 0.1 |
| L1000H1019 | 0.52 | 0.29 |
| L1007H1000 | 0.49 | 0.15 |
| L1024H1000 | 0.44 | 0.39 |
| L1011H1000 | 0.44 | 0.13 |
| L1017H1000 | 0.44 | 0.02 |
| L1018H1000 | 0.42 | -0.12 |
| L1010H1000 | 0.38 | 0.06 |
| L1000H1036 | 0.27 | 0.18 |
| L1023H1000 | 0.26 | 0.07 |
| L1000H1033 | 0.23 | 0.14 |
| L1015H1000 | 0.16 | 0.09 |
| L1000H1034 | 0.15 | 0.1 |
| L1016H1000 | 0.1 | -0.36 |
| L1013H1000 | 0.01 | -0.21 |
| L1022H1000 | -0.05 | 0.02 |
| L1000H1038 | -0.05 | -0.15 |
| L1014H1000 | -0.05 | -0.29 |
| L1000H1037 | -0.06 | -0.13 |
| L1000H1035 | -0.12 | -0.13 |

[0211]

表4抗体600-900ml瞬转纯化产物活性数据

| | IC50 (ng/ml) (抑制 IL-4 的增殖) | IC50 (ng/ml) (抑制 IL-13 的增殖) |
|--------|-------------------------------|--------------------------------|
| 对照抗体 1 | 184.03±61.95 | 345.1±73.9 |
| 对照抗体 2 | 27.79±3.22 | 52.06±14.97 |

[0213]

| | | | |
|--------|------------|-------------|-------------|
| [0214] | L1021H1016 | 28.46±7.82 | 69.67±28.38 |
| | L1021H1020 | 15.36±2.46 | 28.64±10.46 |
| | L1021H1031 | 34.27±12.17 | 76.51±31.94 |
| | L1020H1016 | 24.19±6.91 | 44.62±14.79 |
| | L1020H1020 | 23.63±8.73 | 53.73±17.34 |
| | L1020H1031 | 25.6±7.46 | 60.17±19.02 |
| | L1012H1016 | 32.44±7.45 | 75.33±43.63 |
| | L1012H1020 | 21.09±4.72 | 56.65±23.34 |
| | L1012H1031 | 39.26±15.61 | 76.87±40.97 |

[0215] 实施例3:ELISA检测本发明的抗体与sIL-4Ra的结合能力

[0216] 1. 试剂的配制

[0217] sIL-4Ra (PEPRO TECH, 货号:200-04R) 溶液: 取一支sIL-4Ra, 加入1ml ddH2O, 上下颠倒混匀, 即为100μg/ml溶液, 然后分装后于-20℃冰箱中保存。

[0218] 待测样品: 取瞬染后表达本发明抗体的Expi293细胞培养物上清液(培养基为Expi293 Expression Medium, Invitrogen, 货号:A1435102; 在8%CO2培养箱中, 连续100rpm悬浮培养4天) 10μl和2μl, 分别加至990μl和998μl的PBS溶液中, 配制成为1:100和1:500稀释的待测抗体样品。

[0219] 对照样品: 正常细胞培养上清(Expi293细胞不经过转染, 培养基为Expi293 Expression Medium (Invitrogen, 货号:A1435102; 在8%CO2培养箱中, 连续100rpm悬浮培养4天) 同样进行1:100和1:500稀释, 作为阴性对照样品。

[0220] 2. ELISA检测

[0221] 取100μl 100μg/ml sIL-4Ra溶液, 加入到9.90ml PBS包被液中, 上下颠倒混匀, 即为1.0μg/ml抗原包被液。将配好的抗原包被液加入到96孔酶标板(corning)中, 每孔100μl。将96孔酶标板置于4℃冰箱中孵育过夜。第二天, 弃去其中溶液, 向96孔酶标板中逐排加入含2%BSA的PBS溶液, 每孔300μl。4℃冰箱中孵育2h。弃去2%BSA, 使用PBST洗涤3次。将稀释好的待测抗体依次加入到相应的孔中, 同时加入正常细胞培养上清作为阴性对照样品, 每个样品做三个复孔, 每孔100μl。将酶标板用保鲜膜包裹(或加盖)后, 置于10℃恒温培养箱中孵育1h。将96孔酶标板取出, 弃去其中溶液, PBST洗涤3次后向96孔酶标板中逐排加入TMB溶液(Solarbio, Cat Number:PR1200), 每孔100μl。室温放置5分钟后, 立即向96孔酶标板中加入2M H2SO4溶液终止反应。将96孔酶标板置于flexstation 3 (Molecular Devices) 中, 读取OD450的值, 数据收集计算分析。结果以相对于对照抗体1的亲和力示出, 见下表5a-5c。

[0222] 表5a本发明的抗体对sIL-4Ra的亲和力(亲和力显著大于对照抗体1的抗体)

| | | |
|--------|------------|-------------------------------|
| [0223] | 抗体编号 | OD 450/OD450 _{对照抗体1} |
| | 对照抗体1 | 1 |
| | L1021H1000 | 2.42 |
| | L1020H1000 | 2.27 |
| | L1019H1000 | 1.79 |

| | |
|------------|------|
| L1001H1000 | 1.56 |
| L1012H1000 | 1.22 |
| L1000H1031 | 1.14 |
| L1020H1031 | 1.12 |
| L1000H1014 | 1.06 |
| L1020H1029 | 1.01 |

[0224] 表5b本发明的抗体对sIL-4Ra的亲和力(亲和力较对照抗体1等同或略有降低的抗体)

| 抗体编号 | OD 450/OD450 _{对照抗体1} |
|------------|-------------------------------|
| L1010H1000 | 1 |
| L1021H1029 | 1 |
| L1011H1000 | 0.9 |
| L1008H1000 | 0.9 |
| L1021H1031 | 0.9 |
| L1024H1031 | 0.9 |
| L1007H1000 | 0.8 |
| L1020H1016 | 0.8 |
| L1000H1029 | 0.8 |
| L1000H1001 | 0.7 |

[0226] 表5c本发明的抗体对sIL-4Ra的亲和力(亲和力较对照抗体1显著降低的抗体)

| 抗体编号 | OD 450/ OD450 对照抗体 1 |
|------------|----------------------|
| L1024H1000 | 0.69 |
| L1015H1000 | 0.67 |
| L1000H1015 | 0.65 |
| L1009H1000 | 0.64 |
| L1021H1016 | 0.63 |
| L1000H1023 | 0.63 |
| L1000H1016 | 0.61 |
| L1000H1009 | 0.56 |
| L1000H1032 | 0.53 |
| L1017H1000 | 0.49 |
| L1021H1007 | 0.44 |
| L1000H1027 | 0.44 |
| L1020H1007 | 0.40 |
| L1020H1027 | 0.40 |
| L1012H1007 | 0.40 |
| L1000H1013 | 0.38 |
| L1000H1007 | 0.37 |
| L1000H1021 | 0.35 |
| L1000H1028 | 0.33 |
| L1021H1027 | 0.29 |
| L1016H1000 | 0.27 |
| L1020H1020 | 0.26 |
| L1000H1024 | 0.26 |
| L1021H1020 | 0.24 |
| L1013H1000 | 0.24 |
| L1024H1007 | 0.23 |
| L1000H1020 | 0.23 |
| L1000H1035 | 0.22 |
| L1000H1008 | 0.21 |

[0227]

[0228]

| | |
|------------|-------|
| L1000H1025 | 0.21 |
| L1000H1030 | 0.20 |
| L1000H1012 | 0.18 |
| L1000H1022 | 0.18 |
| L1022H1000 | 0.16 |
| L1012H1031 | 0.16 |
| L1000H1017 | 0.13 |
| L1000H1010 | 0.11 |
| L1000H1026 | 0.11 |
| L1012H1020 | 0.11 |
| L1012H1029 | 0.11 |
| L1000H1036 | 0.10 |
| L1000H1018 | 0.09 |
| L1000H1034 | 0.09 |
| L1000H1011 | 0.09 |
| L1000H1033 | 0.08 |
| L1012H1016 | 0.08 |
| L1018H1000 | 0.06 |
| L1023H1000 | 0.05 |
| L1000H1038 | 0.04 |
| L1000H1019 | 0.02 |
| L1012H1027 | 0.02 |
| L1014H1000 | 0.01 |
| L1000H1037 | -0.01 |

[0229] 实施例4:本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学

[0230] 为了进一步筛选抗体,在小鼠体内进行了一系列的药代动力学实验。

[0231] 选择6-8周龄SPF级Balb/c小鼠,以5mg(本发明的抗体或对照抗体2)/kg(小鼠体重)的量进行抗体皮下注射。于药前(0h),药后2、8、24、48、72、120、168、216、264、336h的时间点采集血样。取样为动物用异氟烷吸入麻醉后,眼眶静脉丛取血,每只取血量约0.1mL;药后336h动物首先用异氟烷吸入麻醉,下腔静脉取血安乐死。

[0232] 血样不抗凝,取血后2h之内室温1500g离心10min以分离血清。收集的上清液立即转移至新的标记好的离心管,血清保存于-70℃以下暂存。使用ELISA方法测定小鼠体内的抗体浓度:

[0233] 1. 试剂的配制

[0234] sIL-4Ra (PEPRO TECH, 货号:200-04R) 溶液: 取一支sIL-4Ra, 加入1ml ddH2O, 上下颠倒混匀, 即为100 μ g/ml溶液, 然后分装后于-20℃冰箱中保存。

[0235] 待测样品: 取不同时间段采集的血清各1 μ l, 加入至999 μ l含1%BSA的PBS溶液中, 即成1:1000稀释的待测血清样品。

[0236] 标准品: 将待检测抗体用含1%BSA和0.1%正常动物血清 (Beyotime, 货号:ST023) 的PBS溶液稀释成0.1 μ g/ml。分别取0.1 μ g/ml的待检测抗体800、600、400、200、100、50、10、0 μ l, 分别加入含1%BSA和0.1%正常动物血清的PBS溶液200、400、600、800、900、950、990、1000 μ l, 配成最终浓度分别为80、60、40、20、10、5、1、0ng/ml的本发明抗体标准品。

[0237] 2. ELISA检测

[0238] 取250 μ l 100 μ g/ml sIL-4Ra溶液, 加入到9.75ml PBS包被液中, 上下颠倒混匀, 即为2.5 μ g/ml抗原包被液。将配好的抗原包被液加入入96孔酶标板 (corning) 中, 每孔100 μ l。将96孔酶标板用保鲜膜包裹 (或加盖) 后, 4℃冰箱中孵育过夜。第二天, 将96孔酶标板取出, 弃去其中溶液, 加入含2%BSA的PBS溶液, 每孔300 μ l。将酶标板用保鲜膜包裹 (或加盖) 后, 于4℃冰箱中孵育2h。将96孔酶标板取出, 弃去其中溶液, PBST重复洗涤3次。将稀释好的标准抗体及待测血清样品依次加入到相应的孔中, 每个样品做三个复孔, 每孔100 μ l。将酶标板用保鲜膜包裹 (或加盖) 后, 室温孵育1h。弃去其中溶液, PBST洗涤3次。向96孔酶标板中逐排加入TMB溶液 (Solarbio, Cat Number:PR1200), 每孔100 μ l。室温放置5分钟, 立即向96孔酶标板中加入2M H2S04溶液终止反应。将96孔酶标板置于flexstation 3 (Molecular Devices) 中, 读取OD450的值, 收集数据使用Winnonlin软件计算结果。药代动力学结果见图1与下表6。

表 6 本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学结果

[0239]

| 编号 | 半衰期 h | 达峰时间 h | 峰值浓度 μg/ml | 药时曲线 下面积 h*μg/ml | 分布容积 ml/kg | 清除率 ml/h/kg |
|------------|----------|-----------|---------------|------------------------|---------------|----------------|
| L1020H1031 | 均值 | 269.34 | 72 | 33.79 | 7679.28 | 138.92 |
| | 标准差 | 105.73 | 0.00 | 0.42 | 163.91 | 22.48 |
| L1012H1031 | 均值 | 167.27 | 48 | 45.5 | 9852.3 | 91.3 |
| | 标准差 | 8.52 | 0.00 | 1.86 | 448.34 | 5.58 |
| 对照抗体 2 | 均值 | 56.67 | 36 | 7.88 | 1132.68 | 288.92 |
| | 标准差 | 25.84 | 16.97 | 0.25 | 94.42 | 49.45 |

[0240] 实施例5:本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学

[0241] 为了进一步筛选抗体,在食蟹猴体内进行了一系列的药代动力学实验。

[0242] 选择3-5岁食蟹猴,体重2-5Kg,以5mg(本发明的抗体或对照抗体2)/kg(食蟹猴体重)的量进行抗体皮下注射。用一次性无菌注射器准确抽取要施用的抗体或对照抗体2,于动物大腿内侧皮下进行多点注射,每点注射容量不超过2ml。于药前(0h),药后0.5、2、4、8、24、48、72、120、168、240、336h、432h、504h、600h、672h的时间点从动物后肢皮下静脉采集全

血,每只取血量1.5ml。

[0243] 血样不抗凝,取血后2h之内室温1500g离心10min以分离血清。收集的上清液立即转移至新的标记好的离心管,血清保存于-70℃以下暂存。采用实施例4所述方法测定食蟹猴体内的抗体浓度。药代动力学结果见图2与下表7。

表 7 本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学结果

| 编 号 | 半衰期 h | 达峰时间 h | 峰值浓度 μg/ml | 药时曲线 下面积 h*μg/ml | | 分布容积 ml/kg | 清除率 ml/h/kg |
|------------|----------|-----------|---------------|------------------------|------------------------|---------------|----------------|
| | | | | 峰值浓度 μg/ml | 药时曲线 下面积 h*μg/ml | | |
| L1020H1031 | 均 值 | 254.95 | 48.00 | 89.65 | 22189.91 | 75.94 | 0.22 |
| | 标 准 差 | 44.57 | 33.94 | 44.29 | 8557.15 | 22.95 | 0.10 |
| L1012H1031 | 均 值 | 185.75 | 48 | 65 | 16185.73 | 73.41 | 0.28 |
| | 标 准 差 | 42.54 | 33.94 | 4.5 | 2506.98 | 0.81 | 0.06 |
| 对照抗体 2 | 均 值 | 37.03 | 16 | 37.82 | 2773.21 | 93.97 | 1.78 |
| | 标 准 差 | 18.03 | 11.31 | 6.75 | 155.84 | 42.47 | 0.07 |

[0244]

[0245] 实施例6:FACS检测本发明的抗体与TF-1细胞的结合

[0246] 1. 细胞培养

[0247] 在液氮中取出冻存的TF-1 (ATCC:CRL-2003TM) 细胞,在37℃水浴中不停轻柔震荡,

使其迅速溶解。加溶解后的细胞悬液移至15ml离心管内,加1640培养基(Hyclone,货号:SH30809.01B)至10ml,800rpm离心5min,吸去上清,保留细胞沉淀,重复洗涤一次,加入含10%FBS(Hyclone,货号:SV30184.02)、2ng/ml GM-CSF(Sino Biological,货号:10015-H01H)的1640培养基,调整细胞密度为 1×10^5 - 1×10^6 个/ml,移至T75细胞培养瓶(Nunc)中,置于37℃,5%CO₂培养箱(Thermo)中静置培养。每隔2-3天,取细胞悬液,800rpm离心5min,用10ml培养基重悬细胞,计数细胞 1×10^6 个细胞移入新的T75细胞瓶中,同时补加培养基至10ml,连续传代2-3次,至细胞状态良好(细胞透亮,单一悬浮的略微不规则形态细胞)后可进行实验。

[0248] 2. 细胞处理

[0249] 取TF-1细胞,通过显微镜计数,将细胞分为3组,分别置于3个1.5ml离心管内,每组细胞个数为 1×10^6 个。800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细胞,重复洗涤一次。800rpm 5min离心细胞,每个离心管内加入冷的含1%BSA的PBS 45μl重悬细胞后,其中第一个离心管内加入本发明L1012H1031抗体5μl(500μg/ml),第二个离心管内加入PBS 5μl作为阴性对照。冰上静置45min后,800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细胞,重复洗涤一次。800rpm 5min离心细胞,每个离心管内加入冷的含1%BSA的PBS 499 μl重悬细胞后,加入1μl FITC标记山羊抗人IgG(H+L)(Beyotime,货号:A0556)。冰上静置45min后,800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细胞,重复洗涤一次,细胞待测。

[0250] 3. FCS上机检测

[0251] 按正确流程打开仪器和操作系统,设置正确的参数后,将细胞加入检测管内,检测FL1通道的荧光信号,使用FlowJo 7.6软件进行分析,结果见图3A-3C,显示本发明的抗体能够与表达IL-4Ra的TF-1细胞特异性结合。

[0252] 实施例7:FACS检测可溶性hIL-4Ra(sIL-4Ra)对抗体与TF-1细胞结合的阻断作用

[0253] 1. 试剂的配制

[0254] 按照实施例1中所述进行hIL-4(Invivogen,货号:rhil-4)溶液的配制。

[0255] 2. 细胞培养

[0256] 按照实施例6中所述进行TF-1(ATCC:CRL-2003TM)的细胞培养。

[0257] 3. sIL-4Ra与本发明的抗体的混合

[0258] 取sIL-4Ra 10μl(100μg/ml)与本发明的L1012H1031抗体5μl(500μg/ml)以2:1的摩尔比在1.5ml离心管内混合均匀。同时取PBS 10μl与本发明L1012H1031抗体5μl混合作为阳性对照,取PBS 15μl作为阴性对照。将离心管放37℃培养箱内静置1h。

[0259] 4. 细胞处理

[0260] 取TF-1细胞,通过显微镜计数,将细胞分为4组,分别置于3个1.5ml离心管内,每组细胞个数为 1×10^6 个。800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细胞,重复洗涤一次。800rpm 5min离心细胞,每个离心管内加入冷的含1%BSA的PBS 35μl重悬细胞后,加入步骤3中不同抗体混合物与对照15μl。冰上静置45min后,800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细胞,重复洗涤一次。800rpm 5min离心细胞,每个离心管内加入冷的含1%BSA的PBS 499μl重悬细胞后,加入1μl FITC标记山羊抗人IgG(H+L)(Beyotime,货号:A0556)。冰上静置45min后,800rpm 5min离心细胞,用冷的含1%BSA的PBS 1ml重悬细

胞,重复洗涤一次,细胞待测。

[0261] 5.FACS上机检测

[0262] 按正确流程打开仪器和操作系统,设置正确的参数后,将细胞加入检测管内,检测FL1通道的荧光信号,使用FlowJo 7.6软件进行分析,结果见图4A-4D,显示sIL-4Ra能够特异性地有效阻断本发明抗体与TF-1细胞的特异性结合。

[0263] 实施例8:Biocore抗体亲和力测定

[0264] 首先将抗人Fc (AHC) 抗体 (GE Healthcare) 偶联到CM5芯片上,然后用AHC捕获本发明抗体,再将不同浓度的人sIL-4Ra流过捕获了本发明抗体的芯片表面,其中本发明抗体稀释到2 μ g/ml,抗原sIL-4Ra稀释至0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0和100.0nM。然后在Biacore T200 control software软件中建立实验方法,之后运行实验程序检测。结果见下表8。

[0265] 表8抗体亲和力检测结果

| 编号 | Ka ($\times 10^5$ M $^{-1}$ s $^{-1}$) | Kd ($\times 10^{-5}$ s $^{-1}$) | KD (10 $^{-10}$ M) |
|------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| 对照抗体 1 | 7.63 | 52.3 | 6.85 |
| 对照抗体 2 | 3.85 | 1.73 | 0.448 |
| L1020H1031 | 4.61 | 4.79 | 1.04 |
| L1012H1031 | 5.18 | 9.49 | 1.83 |

[0266]

序列表

<110> 苏州康乃德生物医药有限公司

<120> 用于结合白细胞介素 4 受体的抗体

<130> LC16110057

<160> 94

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> LCDR1-1

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> LCDR1-2

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> LCDR2-1

<400> 3

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> LCDR2-2

<400> 4

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> LCDR3-1

<400> 5

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Trp Thr
1 5 10

[0002]

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> LCDR3-2

<400> 6

Gln Gln Tyr Asp His Ser Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> LCDR3-3

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ala Gly Trp Thr
1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> LCDR3-4

<400> 8

Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala Gly Trp Thr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> LFR1-1

<400> 9

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

[0003]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> LFR2-1

<400> 10

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Phe
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> LFR2-2

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> LFR3-1

<400> 12

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 13
 <211> 10
 [0004] <212> PRT
 <213> LFR4-1

<400> 13

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> HCDR1-1

<400> 14

Arg Asn Ala Met Phe
 1 5

<210> 15
 <211> 5

<212> PRT

<213> HCDR1-2

<400> 15

Arg Asn Ala Met His

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> HCDR1-3

<400> 16

Asp Tyr Ala Met Phe

1 5

<210> 17

[0005] <211> 17

<212> PRT

<213> HCDR2-1

<400> 17

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

1 5 10 15

Arg

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> HCDR2-2

<400> 18

Gly Ile Gly Thr Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> HCDR3-1

<400> 19

Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> HCDR3-2

[0006] <400> 20

Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp
1 5

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-1

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 30
 <212> PRT
 <213> HFR1-2

<400> 22

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

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

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> HFR1-3

<400> 23

[0007] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> HFR1-4

<400> 24

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

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

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-5

<400> 25

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

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

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-6

<400> 26

[0008]

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

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

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-7

<400> 27

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

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

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-8

<400> 28

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

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

<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-9

<400> 29

[0009]

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

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

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-10

<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> HFR1-11

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Asp
20 25 30

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> HFR2-1

[0010] <400> 32

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

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> HFR2-2

<400> 33

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 31
<212> PRT
<213> HFR3-1

<400> 34

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 35

<211> 31

<212> PRT

<213> HFR3-2

<400> 35

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

[0011] Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 36

<211> 31

<212> PRT

<213> HFR3-3

<400> 36

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 37

<211> 31

<212> PRT

<213> HFR3-4

<400> 37

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met
 1 5 10 15

Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> HFR4-1

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0012]

<210> 39

<211> 109

<212> PRT

<213> VL (L1007)

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1008)

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0013] 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1009)

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

[0014]

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1010)

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

[0015]

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43

<211> 109

<212> PRT

<213> VL (L1011)

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

[0016] <210> 44
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1012)

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 . 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 109

<212> PRT

<213> VL (L1016)

<400> 45

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

[0017]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Pro
 85 90 95

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 46
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1017)

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

[0018] Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1018)

<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

[0019] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1013)

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Pro

85 90 95

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 109

[0020] <212> PRT

<213> VL (L1014)

<400> 49

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

| | | | |
|---|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Pro | | | |
| 85 | | 90 | 95 |

| | | | |
|---|--|-----|--|
| Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| 100 | | 105 | |

| |
|------------------|
| <210> 50 |
| <211> 109 |
| <212> PRT |
| <213> VL (L1015) |

| |
|----------|
| <400> 50 |
|----------|

| | | | |
|---|---|----|----|
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

| | | | |
|--------|---|----|----|
| [0021] | Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser | | |
| | 20 | 25 | 30 |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser | | | |
| 50 | 55 | 60 | |

| | | | |
|---|----|----|----|
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |

| | | | |
|---|--|----|----|
| Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Pro | | | |
| 85 | | 90 | 95 |

| | | | |
|---|--|-----|--|
| Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| 100 | | 105 | |

<210> 51
<211> 109
<212> PRT
<213> VL (L1023)

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[0022] 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
<211> 109
<212> PRT
<213> VL (L1024)

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95
 [0023]

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1022)

<400> 53

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser | Ser | Arg | Ala | Thr | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Arg | Leu | Glu |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Tyr | Asp | His | Ser | Ala |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Trp | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
| 100 | | | | | | | | | | | | |

<210> 54

<211> 109

<212> PRT

[0024] <213> VL (L1021)

<400> 54

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Gly | Thr | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Val | Ser | Ser | Ser |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Arg | Leu | Leu |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Phe | Gly | Ala | Ser | Ser | Arg | Ala | Pro | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Arg | Leu | Glu |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | |

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 55
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1020)

<400> 55

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 [0025] 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 56
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1019)

<400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

[0026]

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 57
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> VL (L1000)

<400> 57

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

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

[0027]

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58

<211> 109

<212> PRT

<213> VL (L1001)

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Ser Ala
 85 90 95

Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1009)

[0028]

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 60
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1010)

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0029] 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 61
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1011)

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

[0030]

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 62
<211> 115
<212> PRT
<213> VH (H1007)

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0031] Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1008)

<400> 63

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

[0032] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 64

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1015)

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 [0033]

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 65
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1013)

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20

25

30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

[0034]

Val Ser Ser
 115

<210> 66
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1014)

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

[0035] <210> 67

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1012)

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20

25

30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 68
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1016)

[0036]

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 69
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1017)

<400> 69

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

[0037]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 115
<212> PRT
<213> VH (H1018)

<400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

[0038]

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 115
<212> PRT
<213> VH (H1019)

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0039] 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 115
<212> PRT

<213> VH (H1020)

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80
[0040]

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 73

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1021)

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

[0041]

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1033)

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

[0042] Val Ser Ser

115

<210> 75

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1034)

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

[0043] <210> 76

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1035)

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1036)

<400> 77
 [0044]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 78
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1037)

<400> 78

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

[0045] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 79

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1039)

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20

25

30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0046]

35

40

45

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

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 80
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1038)

<400> 80

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

[0047]

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 81
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1028)

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

[0048]

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 82

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1027)

<400> 82

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

[0049] Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 83
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1026)

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

[0050] Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1030)

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 115

[0051] <212> PRT

<213> VH (H1029)

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn

20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

| | | | |
|--|-----|-----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Val Ser Ser | | | |
| 115 | | | |
| | | | |
| <210> 86 | | | |
| <211> 115 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> VH (H1025) | | | |
| | | | |
| <400> 86 | | | |
| [0052] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| | | | |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| | | | |
| Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| | | | |
| Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| | | | |
| Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| | | | |
| Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala | | | |
| 85 | 90 | 95 | |

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 87
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1024)

<400> 87

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 [0053] 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 115
<212> PRT
<213> VH (H1023)

<400> 88

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0054] 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 89
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1022)

<400> 89

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

[0055]

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 90
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1032)

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

[0056]

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 91

<211> 115

<212> PRT

<213> VH (H1031)

<400> 91

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

[0057] Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 92
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1000)

<400> 92

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

[0058]

<210> 93
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> VH (H1001)

<400> 93

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Tyr Phe Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 94

<211> 209

[0059] <212> PRT

<213> sIL4R α

<400> 94

Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met
1 5 10 15

Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser
20 25 30

Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His
50 55 60

Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu
65 70 75 80

Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu
85 90 95

His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val
100 105 110

Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn
115 120 125

Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn
130 135 140

[0060] Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala
165 170 175

Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp
180 185 190

Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln
195 200 205

His

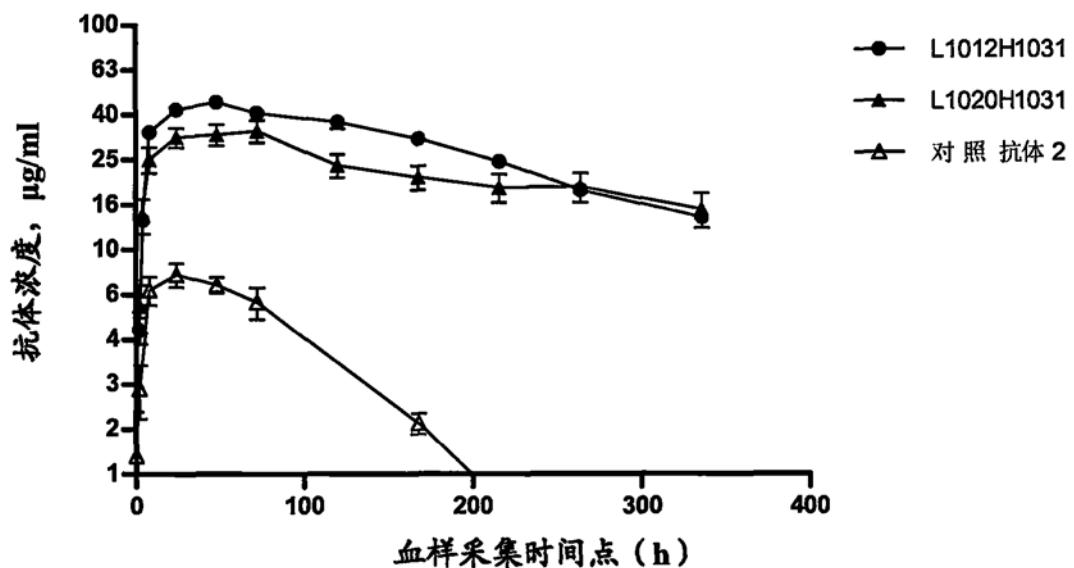


图1

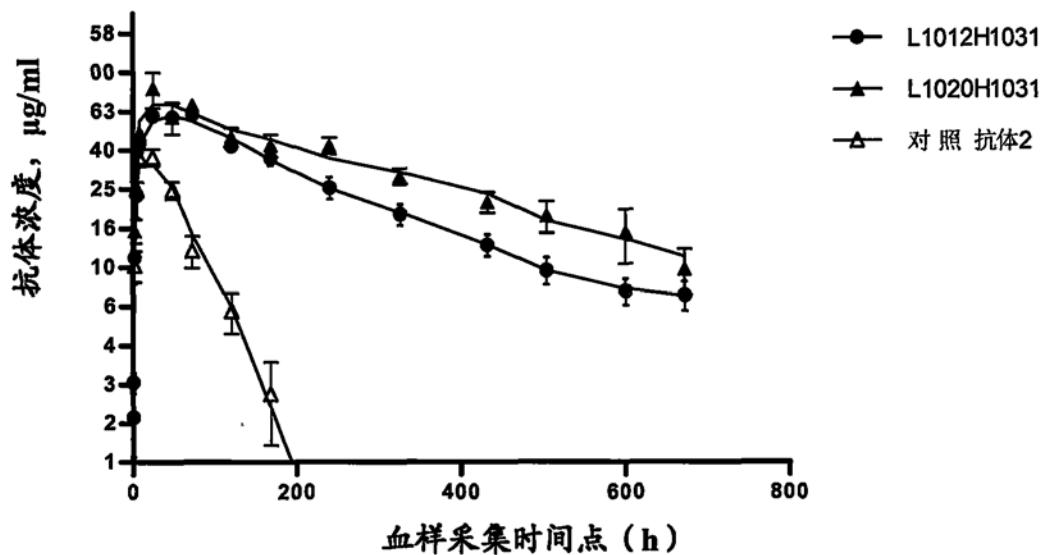


图2

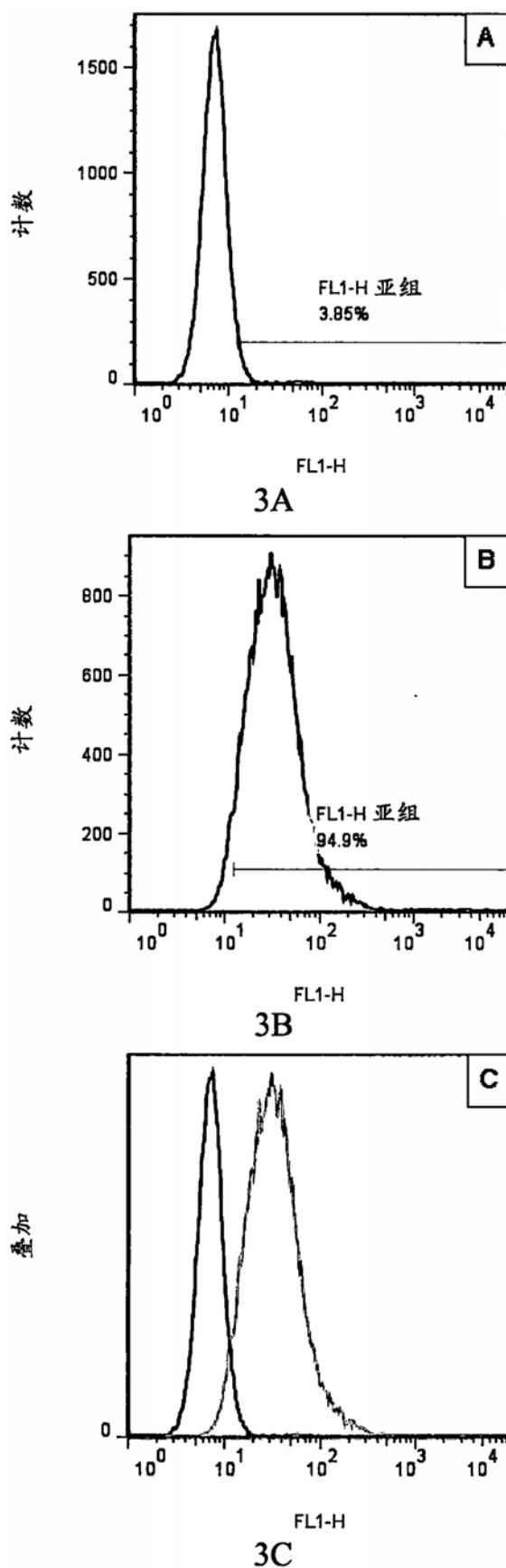
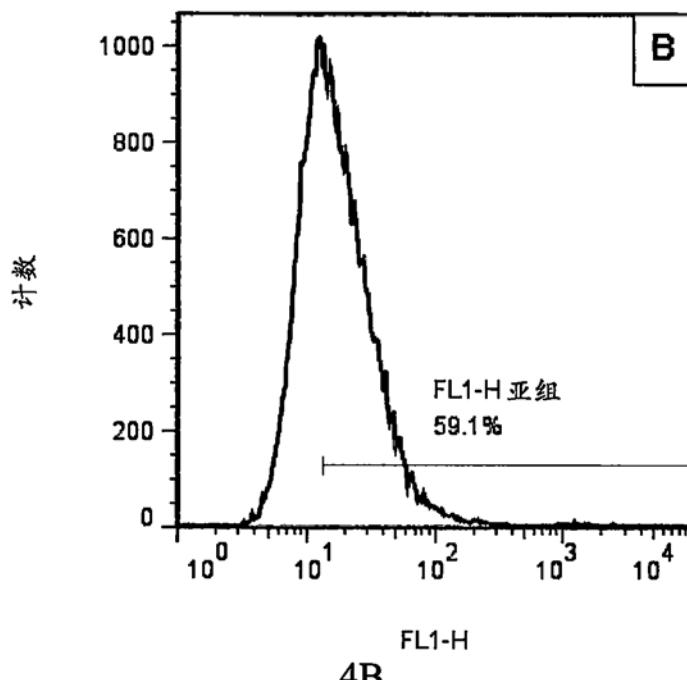
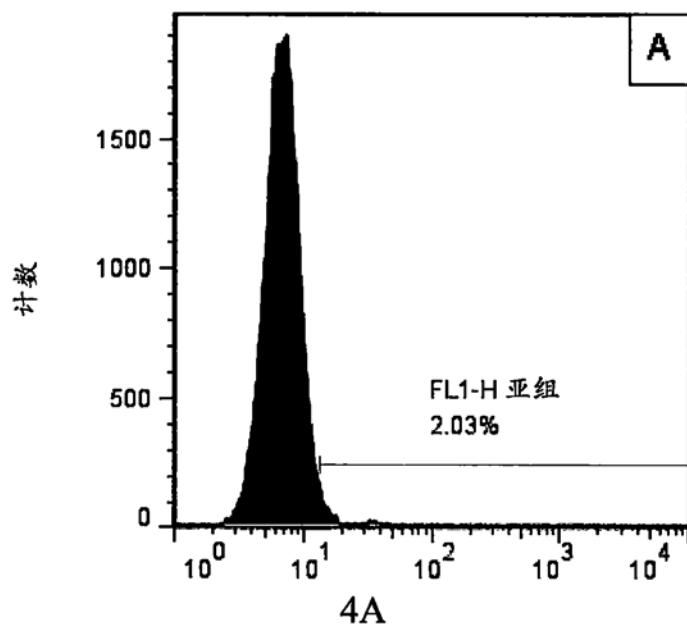


图3



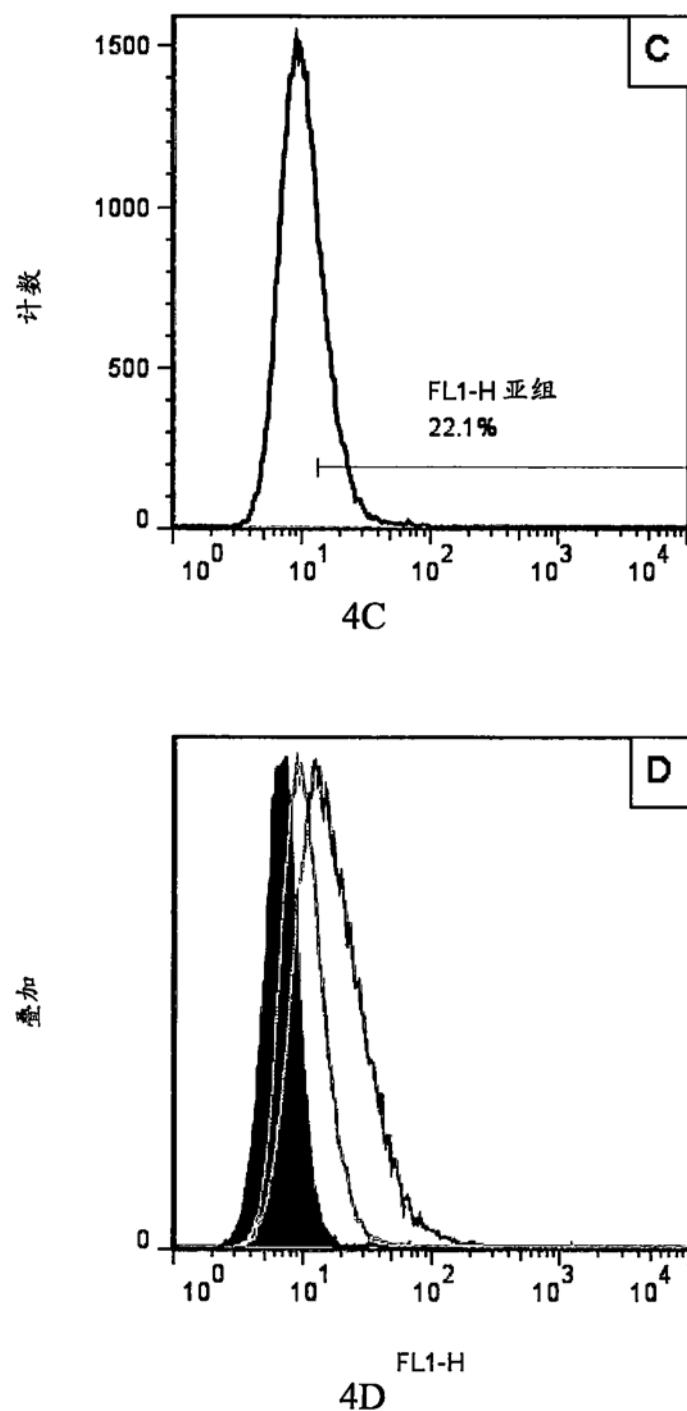


图4