



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104144700 B

(45)授权公告日 2016.10.19

(21)申请号 201280050432.2

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2012.10.15

C12N 5/10(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104144700 A

(43)申请公布日 2014.11.12

(30)优先权数据

2011904190 2011.10.14 AU

61/547307 2011.10.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.04.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2012/001247 2012.10.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/053021 EN 2013.04.18

(73)专利权人 特瓦制药澳大利亚私人有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士省

(72)发明人 J.K.纳姆比亚尔 L.D.波顿

A.克拉克 A.J.波 D.塔姆瓦基斯

G.科普斯达斯 A.G.多伊勒

M.波拉德 H.穆斯塔发

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 李炳爱

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61P 11/06(2006.01)

A61P 17/06(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2000002583 A1,2000.01.20,

US 20080254037 A,2008.10.16,

Lappas CM.Adenosine A2A receptor

activation reduces hepatic ischemia

reperfusion injury by inhibition CD1d-

dependent NKT cell activation.《Journal of

Experimental Medicine》.2006,第203卷(第12

期),2639-2648.

Lisbonne M.Cutting edge: invariant

Vα14 NKT cells are required for allergen-

induced airway inflammation and

hyperreactivity in an Experimental Asthma

Model.《The journal of Immunology》.2003,第

171卷1637-1641.

Fais F.CD1d is expressed on B-chronic

lymphocytic leukemia cells and mediates

alpha-galactosylceramide presentation to

natural killer T lymphocytes.

《International Journal of Cancer》.2004,第

109卷402-411.

Pichavant M.Ozone exposure in a mouse

model induces airway hyperreactivity that

requires the presence of natural killer T

cells and IL-17.《Journal of Experimental

Medicine》.2008,第205卷(第2期),385-393.

(续)

审查员 孙谦

权利要求书2页 说明书67页

序列表87页 附图27页

(54)发明名称

抗CD1d的抗体

(57)摘要

本发明提供结合CD1d的分离的抗体或其抗

原结合部分。这些抗体及其抗原结合部分具有在治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况中的应用。

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Kim HY.The development of airway hyperreactivity in I-bet-deficient mice requires CD1d-restricted NKT cells.《The journal of Immunology》.2009,第182卷3252-3262.

Wallace KL.NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines.《Blood》.2009,第114卷667-676.

1. 结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含V_H域和V_L域,所述V_H域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列以及CDR1、CDR2和CDR3序列,所述V_L域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列以及CDR1、CDR2和CDR3序列,其中所述V_H CDR1序列是DYAMH(SEQ ID NO:124),所述V_H CDR2序列是TIIWNSAIIGYADSVKG(SEQ ID NO:131),所述V_H CDR3序列是DMCSSSGCPDGYFDS(SEQ ID NO:126)、DLCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:152)、DMCSSGGCPDGYFDS(SEQ ID NO:153)或DMCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:154),所述V_L CDR1序列是RASQHISSWLA(SEQ ID NO:141),所述V_L CDR2序列是AASSLQS(SEQ ID NO:145),且所述V_L CDR3序列是QQANRFPLT(SEQ ID NO:143)。

2. 如权利要求1所述的结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含具有SEQ ID NO:148的序列的V_H域和具有SEQ ID NO:149的序列的V_L域。

3. 如权利要求1所述的结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含具有选自SEQ ID NO:1、5、24、25、26、30、32、33、36、40和41的序列的V_H域和具有选自SEQ ID NO:2、6、46、49、55和62的序列的V_L域。

4. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含选自以下的V_H和V_L序列对:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:64。

5. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:55的V_H和V_L序列对。

6. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分结合具有如使用基于细胞的效价测定测得的0.5ng/ml至20ng/ml的EC₅₀的人CD1d。

7. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含人kappa链恒定区。

8. 如权利要求7所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述人kappa链恒定区为人lambda链恒定区。

9. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述分离的抗体或其抗原结合部分包含IgG1或IgG4恒定区。

10. 如权利要求9所述的分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述IgG1或IgG4恒定区为包含S228P突变的IgG4恒定区。

11. 分离的DNA分子,其编码如权利要求1至10中任一项所述分离的抗体或其抗原结合部分。

12. 如权利要求11所述的分离的DNA分子,其中所述DNA分子的序列选自SEQ ID NO.10、

11、14、15和68至87,以及91至109。

13. 转化细胞,其产生如权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

14. 如权利要求13所述的转化细胞,其中所述细胞用如权利要求11或12所述的DNA分子转化。

15. 如权利要求1至10中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况的药物中的用途,其中所述病况选自牛皮癣、溃疡性结肠炎、原发性胆汁性肝硬变、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝炎、自身免疫性肝炎、缺血再灌注损伤、与镰状细胞病相关的肺部炎症或机能障碍、和哮喘。

抗CD1d的抗体

[0001] 提交数据

[0002] 本申请与2011年10月14日提交的澳大利亚专利申请号2011904190和2011年10月14日提交的美国专利申请号61/547,307相关并要求其优先权,这些申请各自的全部内容经此引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及结合CD1d并抑制CD1d介导的生物学功能(例如活化CD1d限制性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞)的抗体。

[0004] 发明背景

[0005] 按照字母顺序在说明书结尾处收集了作者在本说明书中提及的出版物的书目细节。

[0006] 在本说明书中提及任何现有技术不被也不应视为是承认或以任何形式暗示现有技术在任何国家构成公知常识的一部分。

[0007] CD1d是对触发细胞群体(例如NKT细胞)以释放高水平的细胞因子(与某些炎症疾病相关的活性)必不可少的反受体。因此阻断CD1d介导的作用具有潜在的治疗益处。

[0008] CD1d蛋白质显示于许多抗原呈递细胞(APC)亚群上,包括朗氏细胞(皮肤中的主要树突状抗原呈递细胞)、活化B细胞、淋巴结中的树突细胞、活化的血单核细胞。经CD1d刺激的一个细胞群体是NKT细胞——与多种通常与NK细胞相关的分子标记物例如CD161和NKG2D一起表达 α/β T细胞受体(TCR)的T细胞亚群。抗原呈递细胞(APC)经CD1d呈递脂质或糖脂刺激NKT细胞。大多数人CD1d限制性NKT细胞表达包含与V β 11配对的V α 24J α 18的半不变TCR(Brigl, M等人, 2004 Annu. Rev. Immunol., 22:817-890)。CD1d-TCR相互作用快速诱导许多Th1-或Th2-样细胞因子,例如干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α ,以及白细胞介素(IL)-4、IL-5和IL-13。已知Th1/Th2细胞因子响应的平衡在编排免疫反应性质方面起重要的作用。

[0009] 迄今已经在人体内识别了五种CD1基因:CD1a、CD1b、CD1c、CD1d和CD1e。CD1蛋白被表达为与 β 2-微球蛋白(β 2M)非共价相关的大的亚单位(重链)(Van Agthoven, A.和Terhorst, C., 1982 J. Immunol. 128:426-432; Terhorst, C.等人, 1981 Cell 23:771-780)。CD1d的胞外域由三个域组成: α 1域(残基20-108)、 α 2域(残基109-201)和 α 3域(残基202-295)(Pellicci, D.G.等人, 2009 Immunity 31:47-59)。

[0010] 多种具有不同结构的脂质已经显示:以在CD1d分子的两个疏水性结合口袋(A'和F)各个中提供脂肪酸链的独特方式结合CD1d分子。能够结合CD1d分子的脂质物类包括分枝菌酸类、二酰甘油类、鞘脂类、类聚异戊二烯类、脂肽类、phosphomycoketides和小的疏水性化合物(Venkataswamy, M.M.和Porcelli, S.A., 2010 Semin Immunol 22:68-78)。用于研究体内和体外的NKT细胞激活的原型化合物是KRN7000,一种衍生自海绵Agelasmauritianus的 α -半乳糖苷神经酰胺("aGalCer")。附加的激动剂包括但不限于异球三己糖基神经酰胺("iGb3"),据报道其是内源性鞘糖脂,以及一类衍生自微生物的 α -葡萄糖醛酸基神经酰胺

(glycuronosylceramides)的成员与多种人类糖脂如溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine)和溶鞘磷脂(lysosphingomyelin)(Fox, L.M. 等人, 2009 Plos Biol 7:e1000228)。某些天然存在的 β -连接的糖鞘脂例如 β -D-吡喃葡萄糖基神经酰胺的C24:1形式也是NKT细胞的弱激动剂(Brennan, P.J. 等人, 2011 Nat Immunol 12:1202-1211)。

[0011] NKT细胞过度产生细胞因子可能会贡献于某些自身免疫性或炎症疾病的病理, 例如重症肌无力(Reinhardt, C. 等人, 1999 Neurology 52:1485-87)、牛皮癣(Bonish, B.D. 等人, 2000 J. Immunol. 165:4076-85)、溃疡性结肠炎(Saubermann, L.J. 等人, 2000 Gastroenterology 119:119-128)、原发性胆汁性肝硬变(Kita, H. 等人, 2002 Gastroenterology 123:1031-43)、结肠炎(Heller, F. 等人, 2002 Immunity 17, 629-638)、脂肪性肝炎(Syn, W. 等人, (2010) Hepatology, 51(6):1998-2007)、自身免疫性肝炎(Santodomingo-Garzon, T. 和 Swain, M.G. (2011) Autoimmunity Reviews 10:793-800)、动脉粥样硬化(Kyriakakis, E. 等人, Eur J Immunol 2010 40:3268-79)或与镰状细胞病相关的肺部炎症或机能障碍(Wallace 等人, 2009 Blood 114:667-676)。越来越多的证据表明NKT细胞在哮喘中施加了有害影响(Iwamura, C. 和 Nakayama, T., 2010 Curr Opin Immunol 22:807-13)。

[0012] 哮喘是慢性炎症肺疾病, 其特征是慢性局部炎症引起的可逆的气道阻塞、粘液阻塞和响应于非特异性刺激的支气管痉挛(Murdoch, J.R. 和 Lloyd, C.M. 2010 Mutat Res 690:24-39)。高哮喘患病率, 越来越高的发病率和庞大的相关医疗保健开支使哮喘成为主要公共卫生问题(Holgate, S.T. 和 Polosa, R. 2008 Nat Rev Immunol 8:218-30; Bahadori, K., Doyle-Waters M.M. 等人, 2009 BMC Pulm Med 9:24)。在患有严重形式的哮喘, 例如皮质类固醇难治性哮喘的患者的治疗方面存在显著的未满足的医疗需求。患有严重哮喘的患者不能对标准治疗产生响应, 并占全部哮喘人群的约5-10%。这仅在美国就包括约850,000例患者。

[0013] 在过敏性哮喘的小鼠模型中, NKT细胞已经显示使疾病加重(Akbari, O. 等人, 2003 Nat Med 9:582-8)。NKT细胞可以被CD1d限制性糖脂抗原激活并释放细胞因子例如IFN- γ 、IL-4、IL-5和IL-13, 这些细胞因子激活在哮喘中重要的嗜酸性粒细胞和其它细胞亚群(Chuang, Y.H. 等人, 2011 J Immunol 186:4687-92)。通过针对NKT细胞, 施用抗-CD1d抗体或CD1d-依赖性拮抗剂在实验中抑制了诱发的气道炎症(Lisbonne, M. 等人, 2003 J Immunol 171:1637-41; Pichavant, M. 等人, 2008 J Exp Med, 205:385-93)。NKT细胞在哮喘的非人类灵长类动物模型中是也有害的(Matangkasombut, P. 等, 2008 J Allergy Clin Immunol 121:1287-9)。这样的结果表明, 肺中存在的低数量NKT细胞对人哮喘的发展和延续非常重要。

[0014] 非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)是其中过量脂肪堆积在无酗酒史的患者体内的一种病况。NAFLD分为单纯性脂肪变性和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。在NASH中, 存在脂肪变性、小叶内炎症和肝细胞气球样, 通常伴随着进行性纤维化。长期NASH会发展为肝硬化, 并且肝细胞癌(HCC)可能是一种结果。NAFLD被认为是代谢综合征的肝脏表现。NAFLD在近数十年来已经与增加流行的肥胖、2型糖尿病与高脂血症一起在世界范围内增加。NAFLD/NASH目前被认为是世界范围内最常见的慢性肝病。据估计, 全部成年人的约20%患有NAFLD, 而2-3%的成年人患有NASH。非酒精性脂肪肝疾病是慢性肝病的主要原因。其涵盖组织病理学的范围, 包括肝脂肪变性(脂肪肝)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0015] 肝脏包含可以调节先天性免疫应答的NKT细胞定居群体。例如, 含有不变的T细胞

受体的NKT细胞,其包含小鼠肝脏中最多20%的T细胞。此类细胞也富集在包含更多样化的NKT细胞的组成部分的人肝脏中(最多10%的T细胞)。在这两种物种体内,NKT细胞主要存在于肝窦状隙中,在这里它们提供血管内的免疫监视。NKT细胞特异性地识别糖脂抗原并可以在激活时产生细胞因子。该细胞亚群可能贡献于NASH的发病机理(参见例如Syn,W.等人,(2010)Hepatology,51(6):1998-2007)。因此,输送在体内阻断NKT细胞的功能的抗CD1d抗体可以具有治疗益处。

[0016] 自身免疫性肝病的三个主要大类是自身免疫性肝炎(AIH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)和原发性硬化性胆管炎(PSC)。这些疾病各自具有相对独特的临床、血清学和组织学表现。这三种肝病在肝损伤的病理组织学形态方面也各不相同。AIH的特征在于肝实质的进行性破坏,称为界面性肝炎。另一方面,PBC的特征在于小肝内胆管的特异性破坏,而PSC主要涉及大胆管的破坏。尽管这些病况的表现不同,所有这些自身免疫性肝疾病共享涉及T淋巴细胞(其识别和摧毁干细胞)的肝复原的免疫介导肝损伤的共同径路,并最终发展为肝纤维化。NKT细胞可能有助于自身免疫性肝病的病理(Santodomingo-Garzon,T.和Swain,M.G.(2011)AutoimmunityReviews10:793-800)。激活的NKT细胞可以直接通过上调细胞表面FasL表达和/或释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与穿孔素/粒酶B诱导肝细胞死亡。NKT细胞可以通过释放促炎细胞因子例如IFN- γ 间接诱导肝细胞死亡。NKT细胞还可以产生IL-4,其诱导Th2响应和随后的由浆细胞产生自身抗体。由于NKT细胞的活化会导致肝细胞破坏并最终导致肝硬化的发展。通过输送抗CD1d抗体阻断NKT细胞功能可因此具有治疗益处。除了细胞因子释放外,导致细胞溶解的NKT效应细胞功能,例如穿孔素释放和粒酶释放以及Fas介导的细胞死亡,以及其它已知的NKT功能例如IL-2介导的旁观者效应可能也与涉及NKT细胞的病况相关。阻断NKT细胞活化剂CD1d,例如通过施用抗CD1d抗体,也可以调节这些NKT效应子功能。

[0017] 发明概述

[0018] 迫切需要抑制CD1d介导的细胞活化并随后表现出在治疗炎性疾病(例如严重的皮质类固醇难治性哮喘)中的益处的疗法。完全人抗体具有实现开发提高治疗效果的人用药物的目的多个优点。它们可以靶向结合高度有效的中和表位并在施用于人类时耐受良好。虽然已经在现有技术中描述了结合CD1d并与其反应的小鼠抗体,本发明描述了在抑制CD1d介导的NKT细胞活化和所得效应子功能方面表现出强大效力的人抗体。令人惊讶地,在某些情况下,这些抗体的效力比现有技术抗体的当前状态高几个数量级。具有显著提高的效力的此类抗体应当能够治疗CD1d-介导的疾病,并应表现出优异的临床疗效。

[0019] 因此,在第一方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分与选自401.11和402.8的至少一种抗体竞争与CD1d的结合。

[0020] 在第二方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分结合与选自401.11和402.8的至少一种抗体所结合的表位相同的表位。

[0021] 在第三方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含具有选自SEQ ID NO1、3、5、7、8、9、24、25、26、30、33、36、40、41、42、43、44和45的序列和至少95%与之相同的序列的VH域。

[0022] 在第四方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含具有选自SEQ ID NO:2、4、6、46、49和62的序列和至少95%与之相同的序列的VL域。

[0023] 在第五方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VH域,该VH域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1的序列是DYAMH(SEQ ID NO:124)或GYYS(SEQ ID NO:125)。

[0024] 在第六方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VH域,该VH域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1的序列是GFTFDDY(SEQ ID NO:135)或GGSFSGY(SEQ ID NO:136)。

[0025] 在第七方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VL域,该VL域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1的序列是RASQHISSWLA(SEQ ID NO:141)或ASSSGAVSSGNFPN(SEQ ID NO:142)。

[0026] 在第八方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分结合具有如使用基于细胞的效价测定测得的小于20ng/ml的EC50的CD1d。在一个实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分结合具有0.5ng/ml至20ng/ml的EC50的人CD1d。

[0027] 在第九方面中,本发明提供分离的DNA分子,其编码本发明的分离的抗体或其抗原结合部分。

[0028] 在第十方面中,本发明提供在人类对象中治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况的方法,包括向该对象施用本发明的抗体或其抗原结合部分。

[0029] 在第十一方面中,本发明提供检测样品中存在CD1d的方法,该方法包括使怀疑含有CD1d的样品与本发明的分离的抗体或其抗原结合部分在允许该抗体或其抗原结合部分结合CD1d的条件下接触以形成复合物并检测样品中该复合物的存在。

[0030] 在第十二方面中,本发明提供检测细胞样品中CD1d阳性细胞的存在的方法,该方法包括将细胞群体与本发明的分离的抗体或其抗原结合部分接触以允许该抗体或其抗原结合部分结合CD1d阳性以形成复合物并检测该抗体或其抗原结合部分-细胞复合物的存在。

[0031] 在第十三方面中,本发明提供从多种CD1d结合蛋白中选择特异性地结合人CD1d并与选自401.11、402.8和401.11.158的至少一种抗体竞争在CD1d上的结合的CD1d结合蛋白的方法,该方法包括:

[0032] 在足以允许CD1d结合蛋白结合该突变蛋白以形成CD1d结合蛋白-人CD1d突变蛋白复合物和排除的多种没有结合该人CD1d突变蛋白的CD1d结合蛋白的条件下,使多种CD1d结合蛋白接触人CD1d突变蛋白,在所述人CD1d突变蛋白中SEQ ID NO:116的氨基酸位置87至93和141-143已经被这些位置处的相应的小鼠氨基酸取代,并且

[0033] 从排除的多种CD1d结合蛋白中收集没有结合人CD1d突变蛋白的CD1d结合蛋白,

[0034] 其中收集的CD1d结合蛋白特异性地结合人CD1d并与选自401.11、402.8和

401.11.158的至少一种抗体竞争在CD1d上的结合。

[0035] 在第十四方面中,本发明提供从多种CD1d结合蛋白中选择特异性地结合人CD1d的CD1d结合蛋白的方法,该方法包括:

[0036] 在足以允许CD1d结合蛋白结合hCD1dmu以形成CD1d结合蛋白-hCD1dmu复合物和排除的多种没有结合hCD1dmu的CD1d结合蛋白的条件下,使多种CD1d结合蛋白接触其中位于人CD1d(SEQ ID NO:116)的位置87至93和141至143处的氨基酸已经被这些位置处的相应小鼠序列替代的hCD1dmu(SEQ ID NO:119),并且

[0037] 从排除的多种CD1d结合蛋白中收集没有结合hCD1dmu的CD1d结合蛋白,

[0038] 其中收集的CD1d结合蛋白特异性地结合人CD1d(SEQ ID NO:116)或mCD1dhu(SEQ ID NO:118)。

[0039] 在任意上述方面的一个实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分还结合食蟹猴和猕猴CD1d。

[0040] 附图简述

[0041] 图1:证明通过抗CD1d抗体抑制四聚体结合的测定结果的图示。在使用 α -半乳糖苷神经酰胺(α -GalCer)脂质装载的CD1d四聚体(其结合用NKT细胞受体稳定转染的J.RT3-T3.5细胞)的测定中,由信号平均荧光强度降低,抗CD1d抗体401.11和402.8与抗体42和51.1相比显示出提高的对CD1d四聚体结合的抑制。不相关的特异性阴性对照物没有显示出抑制。表2列举了所有受试抗体的EC50值。

[0042] 图2:证明通过抗CD1d抗体抑制IL-2释放的测定结果的图示。在使用 α -GalCer-装载的CD1d-阳性U-937细胞和NKT细胞受体稳定转染的J.RT3-T3.5细胞的测定中,如通过ELISA测定的那样,抗CD1d抗体402.8和401.11与抗CD1d抗体42和51.1相比在24小时后显示出提高的IL-2释放的抑制。在所有测定中,不相关的特异性阴性对照物抗体没有显示出对IL-2释放的抑制。表3中提出了来自代表性试验的EC50值。

[0043] 图3:通过流式细胞计量术证明抗CD1d抗体结合初生外周血单个核细胞(PBMC)的测定结果的图示。如通过流式细胞术测定的那样,作为本说明书中所述抗体实例而非不相关的特异性对照物抗体的抗CD1d抗体402.8结合初生人PBMC中的CD1d-阳性、CD11c-阳性群体。

[0044] 图4:在使用THP-1细胞系作为抗原呈递细胞的基于初生NKT细胞的测定中证明通过抗CD1d抗体抑制初生NKT细胞功能的测定结果的图示。如通过ELISA测定的那样,与抗CD1d抗体42相比,抗体401.11和402.8分别表现出高达114倍和高达180倍的24小时后的IFN- γ (A)、IL-4(B)、IL-5(C)和IL-13(D)释放的抑制。该结果来自于使用 α -GalCer-扩增的NKT细胞和 α -GalCer-装载的THP-1细胞作为CD1d阳性细胞的测定。在所有测定中,不相关的特异性阴性对照物抗体没有抑制细胞因子释放。表4中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0045] 图5:在使用初生CD14+单核细胞作为抗原呈递细胞的基于初生NKT细胞的测定中证明通过抗CD1d抗体抑制初生NKT细胞功能的测定结果的图示。在使用 α -GalCer-扩增的NKT细胞和 α -GalCer-装载的CD14+单核细胞-衍生树突细胞作为CD1d阳性细胞的测定中,如通过ELISA测定的那样,与抗CD1d抗体42和51.1相比,抗体401.11和402.8证实了在24小时后显著提高的IFN- γ (A)、IL-4(B)、IL-5(C)和IL-13(D)释放的抑制。在所有测定中,不相关

的特异性阴性对照物抗体没有抑制细胞因子释放。表5中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0046] 图6:证明高度有效的抗CD1d抗体共享不同于通过较低效现有技术抗体所看到的表位的类似中和表位的竞争ELISA的结果图示。根据实施例7,如通过对应于结合的生物素化402.8(A)水平的450nm下吸光度读数与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,使用基于竞争ELISA方法,抗CD1d抗体402.8与其本身和与401.11竞争但不与抗CD1d抗体42和51.1竞争结合人CD1d。

[0047] 图7:证明与重组食蟹猴CD1d的交叉反应性的测定结果的图示。根据实施例8,抗CD1d抗体401.11和402.8结合人CD1d(A),并通过ELISA与食蟹猴CD1d(B)是交叉反应性的。

[0048] 图8:证明与基于食蟹猴细胞的CD1d的交叉反应性的测定结果的图示。根据实施例9,如通过流式细胞术所示,抗CD1d抗体402.8而非不相关的特异性阴性对照物抗体结合来自两只独立的食蟹猴供体的PBMC上的CD1d。数据显示为筛选的活细胞(gated live cells)的流式细胞计量术柱状图,以柱状图形式划分CD1d阳性细胞的百分比。

[0049] 图9:证明食蟹猴CD1d介导的初生NKT扩增的细胞基抑制的测定结果的图示。根据实施例10,如通过流式细胞计量术通过量化CD3+Vα24+细胞所显示的那样,抗CD1d抗体402.8而不是不相关的特异性阴性对照物抗体在αGalCer-装载的CD1d-阳性PBMC的存在下抑制食蟹猴NKT细胞的扩增。

[0050] 图10:显示401.11的可变区的序列的序列比对。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0051] 图11:显示402.8的可变区的序列的序列比对。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0052] 图12:401.11的变体的比对。根据实施例11,显示了401.11对IGHV-9.01和401.11的变体的重链与轻链的氨基酸序列比对。

[0053] 图13:401.11的优化变体的比对。根据实施例11,显示了401.11及其变体的重链与轻链的氨基酸序列比对。

[0054] 图14:证明通过抗CD1d抗体401.11的增强变体对初生NKT细胞功能的提高抑制的测定结果的图示。根据实施例11,401.11及其变体从1μg/mL滴定。在使用α-GalCer-扩增NKT细胞与α-GalCer-装载的CD14+单核细胞-衍生的树突细胞作为CD1d阳性细胞的测定中,401.11抗体变体证实与401.11相比通过ELISA测定的在24小时后类似或提高的IFN-γ(A)与IL-4(B)释放的抑制,以及与从10μg/mL滴定的抗CD1d抗体42和51.1相比通过ELISA测定的在24小时后显著提高的IFN-γ(A)与IL-4(B)释放的抑制。在所有测定中,不相关的特异性阴性对照物抗体没有抑制细胞因子释放。表13中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0055] 图15:402.8的优化变体的比对。根据实施例11,显示了402.8对402.8的变体的重链的氨基酸序列比对。

[0056] 图16:证明通过抗CD1d抗体402.8的增强变体抑制初生NKT细胞功能的测定结果的图示。根据实施例11,在使用α-GalCer-扩增NKT细胞和α-GalCer-装载的CD14+单核细胞-衍生树突细胞作CD1d阳性细胞的测定中,402.8及其变体由10μg/mL滴定并证实与由10μg/mL滴定的抗CD1d抗体42相比,通过ELISA测定的在24小时后的类似的IFN-γ(A)与IL-4(B)释

放的抑制,和通过ELISA测定的在24小时后显著提高的IFN- γ (A)与IL-4(B)释放的抑制。在所有测定中,不相关的特异性阴性对照物抗体没有抑制细胞因子释放。在表18中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0057] 图17:证明在使用 α -GalCer的替代抗原的基于初生NKT细胞的测定中通过抗CD1d抗体对初生NKT细胞功能的提高抑制的测定结果的图示。根据实施例12,在使用 α -GalCer-扩增NKT细胞和C24:1 β -D-吡喃葡萄糖基神经酰胺-装载的CD14+单核细胞-衍生树突细胞作为CD1d阳性细胞的测定中,由10 μ g/mL滴定的抗CD1d抗体42和51相比,由1 μ g/mL滴定的抗体401.11.158、401.11和402.8证实了通过ELISA测定的在24小时后IFN- γ (A)和IL-4(B)释放的显著提高的抑制。在所有测定中,不相关的特异性阴性对照物抗体没有抑制细胞因子释放。在表20中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0058] 图18:证明在修正的条件下高度有效的抗CD1d抗体共享不同于通过现有技术抗体所看到的表位的类似中和表位的竞争ELISA的结果图示。根据实施例13,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗体402.8与其本身和与401.11竞争但不与抗体42和51.1竞争结合人CD1d。

[0059] 图19:证明是401.11变体的高度有效的抗CD1d抗体与402.8共享类似中和表位的竞争ELISA的结果图示。根据实施例13,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体402.8与其本身并与作为401.11抗体变体实例的401.11.160、401.11.161和401.11.165强烈竞争结合人CD1d。

[0060] 图20:证明衍生自402.8的高度有效的抗CD1d抗体与402.8共享类似中和表位的竞争ELISA的结果图示。根据实施例13,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体402.8与其本身并与作为402.8抗体变体实例的402.8.84、402.8.86和402.8.87强烈竞争结合人CD1d。

[0061] 图21:证明单克隆抗人CD1d抗体不竞争402.8的中和表位的竞争ELISA的结果图示。如实施例13中所述,如通过吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体402.8与其本身强烈竞争但不与其它单克隆抗人CD1d抗体例如AD58E7、C3D5和C-9竞争结合人CD1d。

[0062] 图22:证明单克隆抗小鼠CD1d抗体不竞争402.8的中和表位的竞争ELISA的结果图示。如实施例13中所述,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体402.8与其本身强烈竞争但不与其它单克隆抗小鼠CD1d抗体例如HB-321、HB-322和HB-323竞争结合人CD1d。

[0063] 图23:证明多克隆抗人CD1d抗体不竞争402.8的中和表位的竞争ELISA的结果图示。如实施例13中所述,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体402.8与其本身强烈竞争但不与作为多克隆抗人CD1d抗体的实例的C-19、H70和Ab96515竞争结合人CD1d。

[0064] 图24:证明高度有效的抗CD1d抗体共享不同于其它抗CD1d抗体所结合表位的类似中和表位的竞争ELISA的结果图示。如实施例13中所述,如通过450nm下吸光度读数(A)与竞争转化度(百分比)值(B)所显示的那样,抗CD1d抗体401.11.158与其本身并与402.8强烈竞争,但不与抗CD1d抗体42和51.1竞争结合人CD1d。

[0065] 图25:证明402.8以及Fab或全长IgG形式的401.11.165结合至人CD1d的ELISA结果

的图示。

[0066] 图26:用于阐明抗CD1d抗体结合的人CD1d上的位置的CD1d结构的序列比对。

[0067] 图27:证明结合人CD1d和已经向其中引入人序列的小鼠CD1d(mCD1dhu)的抗体402.8(A)与401.11.158(B)的滴定的ELISA结果的图示。两种抗体均没有结合小鼠CD1d和已经向其中引入小鼠序列的人CD1d(hCD1dmu)。

[0068] 图28:证明抗人CD1d抗体的表位的氢氘交换图谱实验结果的图示。(A)具有以黑色显示的氨基酸89-94和141-14的人CD1d(灰色)。注意:X射线结构是具有表面描述的3HUJ。(B)与NKT细胞受体(α 和 β 链)复合的人CD1d(具有结合的 α -GalCer)。人CD1d上的抗CD1d抗体的表位(氨基酸89-94和141-142)的原子用深灰色着色。该抗CD1d抗体的表位位于该NKT细胞受体 β -链的结合位点的附近。

[0069] 图29A:优化的401.11抗体的V_H区的比对和共有序列。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0070] 图29B:优化的401.11抗体的V_L区的比对和共有序列。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0071] 图30A:优化的402.8抗体的V_H区的比对和共有序列。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0072] 图30B:优化的402.8抗体的V_L区的比对和共有序列。框出区含有Kabat编号系统与增强Chothia编号系统所定义的CDR(如所示)。由Kabat编号系统定义的CDR以粗体显示。由增强Chothia编号系统定义的CDR具有下划线。

[0073] 发明详述

[0074] 本发明涉及结合CD1d的特定表位的人和人源化的抗体及其抗原结合部分。本发明人已经发现,结合CD1d的这种表位的抗体在减轻CD1d对NKT细胞的影响方面特别有效。由于这种影响,据信这些抗体与其抗原结合部分将可用于治疗其中NKT细胞效应子功能(例如NKT细胞过度产生细胞因子)起作用的病况,例如哮喘。

[0075] 因此,在第一方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分与选自401.11和402.8的至少一种抗体竞争与CD1d的结合。

[0076] 在第二方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分结合与选自401.11和402.8的至少一种抗体所结合的表位相同的CD1d表位。

[0077] 在第三方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含具有选自SEQ ID NO1、3、5、7、8、9、24、25、26、30、33、36、40、41、42、43、44和45的序列和至少95%与之相同的序列的V_H域。

[0078] 在第四方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含具有选自SEQ ID NO2、4、6、46、49和62的序列和至少95%与之相同的序列的V_L域。

[0079] 在第五方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VH域,该VH域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1的序列是DYAMH(SEQ ID NO:124)或GYYSW(SEQ ID NO:125)。

[0080] 在本发明的这一方面的实施方案中,CDR3的序列是DMCSSSGCPDGYFDS(SEQ ID NO:126)、DLCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:152)、DMCSSGGCPDGYFDS(SEQ ID NO:153)、DMCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:154)、GEIYDFWNSYMDV(SEQ ID NO:127)、GEIYDFWKS YMDV(SEQ ID NO:128)、GEIYDFYKSYLDV(SEQ ID NO:155)、GEIYDFYKSYMDV(SEQ ID NO:156)、GEIYDFWKS YLDV(SEQ ID NO:129)或GEIYDFYNSYMDV(SEQ ID NO:130)。在进一步的实施方案中,CDR2的序列是TIIWNSAIIGYADSVKG(SEQ ID NO:131)、EINHSGSTNYPNPSLKS(SEQ ID NO:132)、EINPSGSTNYPNPSLKS(SEQ ID NO:133)或EINHAGSTNYPNPSLKS(SEQ ID NO:134)。

[0081] 在第六方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VH域,该VH域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1序列是GFTFDDY(SEQ ID NO:135)或GGSFSGY(SEQ ID NO:136)。

[0082] 在本发明的第六方面的实施方案中,CDR3的序列是DMCSSSGCPDGYFDS(SEQ ID NO:126)、DLCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:152)、DMCSSGGCPDGYFDS(SEQ ID NO:153)、DMCSSGGCPEGYFDS(SEQ ID NO:154)、GEIYDFWNSYMDV(SEQ ID NO:127)、GEIYDFWKS YMDV(SEQ ID NO:128)、GEIYDFYKSYLDV(SEQ ID NO:155)、GEIYDFYKSYMDV(SEQ ID NO:156)、GEIYDFWKS YLDV(SEQ ID NO:129)或GEIYDFYNSYMDV(SEQ ID NO:130)。在进一步的实施方案中,CDR2的序列是IWNSAI(SEQ ID NO:137)、NHSGS(SEQ ID NO:138)、NPSGS(SEQ ID NO:139)或NHAGS(SEQ ID NO:140)。

[0083] 在第七方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分包含VL域,该VL域包含人FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中CDR1的序列是RASQHISSWLA(SEQ ID NO:141)或ASSSGAVSSGNFPN(SEQ ID NO:142)。

[0084] 在本发明的第七方面的实施方案中,CDR3的序列是QQANRFPLT(SEQ ID NO:141)或LLYFGDTQLGV(SEQ ID NO:142)。在进一步的实施方案中,CDR2的序列是AASSLQS(SEQ ID NO:145)或SASNKHS(SEQ ID NO:146)。

[0085] 在第八方面中,本发明提供结合人CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分,其中该分离的抗体或其抗原结合部分结合具有如使用基于细胞的效价测定测得的小于20ng/ml的EC50的CD1d。在实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分结合具有0.5ng/ml至20ng/ml的EC50的人CD1d。

[0086] 在本发明的实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的VH和VL序列对。

[0087] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:46的VH和VL序列对。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:47的VH和VL序列对。

[0089] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的VH和VL序列对。

[0090] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:48的VH和VL序列对。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:49的VH和VL序列对。

[0092] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:50的VH和VL序列对。

[0093] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:51的VH和VL序列对。

[0094] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:52的VH和VL序列对。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:53的VH和VL序列对。

[0096] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:54的VH和VL序列对。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:55的VH和VL序列对。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:56的VH和VL序列对。

[0099] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:57的VH和VL序列对。

[0100] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:58的VH和VL序列对。

[0101] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:59的VH和VL序列对。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:60的VH和VL序列对。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:61的VH和VL序列对。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:62的VH和VL序列对。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:63的VH和VL序列对。

[0106] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:64的VH和VL序列对。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的VH和VL序列对。

[0108] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID

NO:7和SEQ ID NO:4的VH和VL序列对。

[0109] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:4的VH和VL序列对。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:4的VH和VL序列对。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:65的VH和VL序列对。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:66的VH和VL序列对。

[0113] 在本发明的一个实施方案中,提供分离的抗体或其抗原结合部分,其包含SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:67的VH和VL序列对。

[0114] 在任一上述方面的一个实施方案中,该抗体或其抗原结合部分结合人CD1d(SEQ ID NO:116),但是不结合hCD1dmu(SEQ ID NO:119)。在任意上述方面的一个实施方案中,该抗体或其抗原结合部分结合mCD1dhu(SEQ ID NO:118),但是不结合mCD1d(SEQ ID NO:117)。

[0115] 在第九方面中,本发明提供分离的DNA分子,其编码本发明的分离的抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中,该分离的DNA分子选自以下SEQ ID NO的任意种:10、11、12、13、14、15、16、17、18、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115或至少95%与之相同的序列或在中等至高度严格条件下与之杂交的序列。在一个实施方案中,分离的DNA分子选自以下SEQ ID NO的任一种:10、11、12、13、14、15、16、17、18、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114或115。

[0116] 在第十方面中,本发明提供在人类对象中治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况的方法,包括向对象施用本发明的分离的抗体或其抗原结合部分。

[0117] 在第十一方面中,本发明提供检测样品中存在CD1d的方法,其包括使怀疑含有CD1d的样品与本发明的分离的抗体或其抗原结合部分在允许该抗体或其抗原结合部分结合CD1d的条件下接触以形成复合物并检测样品中该复合物的存在。

[0118] 在第十二方面中,本发明提供检测细胞样品中CD1d阳性细胞的存在的方法,该方法包括将细胞群体与本发明的分离的抗体或其抗原结合部分接触以允许该抗体或其抗原结合部分结合CD1d阳性以形成复合物并检测该抗体或其抗原结合部分细胞复合物的存在。

[0119] 在第十三方面中,本发明提供从多种CD1d结合蛋白中选择特异性地结合人CD1d并与选自401.11、402.8和401.11.158的至少一种抗体竞争在CD1d上的结合的CD1d结合蛋白的方法,该方法包括:

[0120] 在足以允许CD1d结合蛋白结合该突变蛋白以形成CD1d结合蛋白-人CD1d突变蛋白复合物和排除的多种没有结合该人CD1d突变蛋白的CD1d结合蛋白的条件下使多种CD1d结合蛋白接触人CD1d突变蛋白,在所述人CD1d突变蛋白中SEQ ID NO:116位置87至93和141-143的氨基酸已经被这些位置处的相应的小鼠氨基酸取代,并且从排除的多种CD1d结合蛋

白中收集没有结合人CD1d突变蛋白的CD1d结合蛋白,其中收集的CD1d结合蛋白特异性地结合人CD1d并与选自401.11、402.8和401.11.158的至少一种抗体竞争在CD1d上的结合。

[0121] 在第十四方面中,本发明提供从多种CD1d结合蛋白中选择特异性地结合人CD1d的CD1d结合蛋白的方法,该方法包括:

[0122] 在足以允许CD1d结合蛋白结合hCD1dmu以形成CD1d结合蛋白-hCD1dmu复合物和排除的多种没有结合hCD1dmu的CD1d结合蛋白的条件下,使多种CD1d结合蛋白与其中位于人CD1d(SEQ ID NO:116)的位置87至93和141至143处的氨基酸已经被相应于小鼠的这些位置处的序列替代的hCD1dmu(SEQ ID NO:119)接触,并从排除的多种CD1d结合蛋白中收集没有结合hCD1dmu的CD1d结合蛋白,其中收集的CD1d结合蛋白特异性地结合人CD1d(SEQ ID NO:116)或mCD1dhu(SEQ ID NO:118)。本发明的抗CD1d抗体还可以用于从血液中识别或选择CD1d阳性细胞群体。抗CD1d抗体可用于在人类患者的外周血中检测CD1d阳性细胞群,包括骨髓细胞如单核细胞,或淋巴样细胞如B细胞。该抗体可用于在其中此类CD1d阳性细胞导致疾病的病况中检测这些细胞,所述疾病例如是某些白血病,包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)(Metelitsa等人,Leukemia(2003)17,1068-1077;Kotsianidis等人,2011;AmJClinPath136,400-408)。

[0123] 该抗人CD1d抗体还可以用于使用本领域公知的方法对组织切片进行染色用于免疫组织化学。

[0124] 在本发明的某些具体实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分可以包含人kappa链恒定区或人lambda链恒定区。在某些实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分包含IgG1或IgG4恒定区。当该抗体包含IgG4恒定区时,其可以包括S228P突变。

[0125] 本发明还提供编码本发明的分离的抗体或其抗原结合部分的DNA分子。在某些实施方案中,该DNA分子的序列选自SEQ ID NO.10至18、SEQ ID NOS68至115或至少95%与之相同的序列或在中等至高度严格条件下与之杂交的序列的任意一种。

[0126] 本发明还提供在人类对象中治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况的方法,其包括向该对象施用本发明的分离的抗体或其抗原结合部分。可以治疗的涉及NKT细胞效应子功能例如NKT细胞过度产生细胞因子的病况实例包括牛皮癣、溃疡性结肠炎、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、哮喘和与镰状细胞病相关的肺部炎症或机能障碍。

[0127] 如在下列实施例中描述的那样,本发明人已经开发了结合CD1d的特定表位的有效抗体。确定这个表位的性质是抗体和抗原提供(arm)的领域中的技术人员的常规技术。本领域那些技术人员公知的可用于确定抗体401.11和402.8结合的CD1d表位的方法包括CD1d丙氨酸扫描诱变、氢/氘交换图谱(mapping)、X射线晶体学、核磁共振和光亲和标记法。

[0128] 丙氨酸扫描诱变(参见例如Ausubel:Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,ISBN047 150338,1987,第8和15章;或Cunningham等人,1989Science244 1081-5)在CD1d分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变。随后对所得突变分子测试它们结合该401.11和/或402.8抗体的能力。损失结合意味着已经变为丙氨酸的特定残基可能包括在该表位中。

[0129] 在使用氢氘交换的表位图谱中,CD1d中的氢在溶液中用氘交换。该401.11和/或402.8抗体随后结合到CD1d上,其随后在H₂O中交换回氢。在该方法中,存在于该表位中的氘

被抗体的结合保护。比较受该抗体结合保护和未受保护的CD1d的交换模式揭示了作为保留氘的CD1d的氨基酸残基的该表位。

[0130] 在X射线晶体学中,将401.11和/或402.8抗体与之结合的CD1d结晶,并通过X射线衍射检查该晶体。这种方法提供了抗体与之结合的CD1d的区的明确信息。核磁共振或光亲和标记也可使用,如deVos等人,1992Science255 306-12;和Smith等人,1992J MolBiol224 899-904中所述。

[0131] 如本领域技术人员将理解的那样,通过本发明的抗体或其抗原结合部分识别的表位可以包含氨基酸的线性系列或可以是构象表位。

[0132] 在一方面中,本发明涉及与至少一种选自401.11和402.8的抗体竞争结合人CD1d的抗体。

[0133] 本文中所述的“竞争”指的是该抗体或其抗原结合部分以浓度依赖性方式降低了选自401.11、401.11.28、402.8、402.8.45、402.8.53和402.8.60的至少一种抗体与CD1d的结合。在下面给出的实施例7中提供了评估其的方式的一个实例。特别地,当选自401.11和402.8的至少一种抗体与测试抗体的结合比与相同浓度使用的抗体42或51.1结合极大降低时,抗体或其抗原结合部分被称为与至少一种选自401.11和402.8的抗体“竞争”与CD1d的结合(现有技术的抗体42和51.1描述在Exley等人,1997JExp Med186,109-120和W003/092615中)。

[0134] 如本文中所述,“竞争结合CD1d”的抗体或其抗原结合部分在竞争ELISA的归一化结果中表现出至少50%的竞争,其中40 μ g/mL的非生物素化测试抗体与结合到固定在固体底物上的1.0 μ g/mL重组人CD1d上结合的0.2 μ g/mL生物素化抗CD1d抗体402.8或401.11或401.11.158竞争。

[0135] 在某些实施方案中,本发明提供分离的抗体或其抗原结合部分,其结合具有如使用基于细胞的效价测定测得的小于20ng/mL的EC50的CD1d。在某些实施方案中,该分离的抗体或其抗原结合部分结合至具有0.5ng/mL至20ng/mL的EC50的CD1d。如本文中所用,如下文给出的实施例4中那样评估该抗体或其抗原结合部分的EC50。

[0136] 如上所述,该抗体或其抗原结合部分特异性地结合CD1d。本文中所用的术语“特异性地”指的是与CD1d的结合是经由该抗体或其抗原结合部分的VH和VL域并且不是非特异性结合(例如可以经Fc区发生的)。

[0137] 如在下列实施例中所述,本发明的抗体或其抗原结合部分与人CD1d、和食蟹猴或猕猴CD1d结合。这与现有技术的抗体42和51.1不同。

[0138] 人CD1d的氨基酸序列可以是例如:

[0139]

MGCLLFLLLWALLQAWGSAEVPQRLFPLRCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTHSWNSDSTVRSCLKPWSQGTFS
DQQWETLQHIFRVYRSSFTRDVKFAKMLRLSYPLELQVSAGCEVHPGNASNNFFHVAFAQGKDILSFQGTSEPTQE
APLWVNLAIQVLNQDKWTRETVQWLLNGTCPQFVSGLLESGKSELKKQVKPKAWLSRGPSPGPRLLLLVCHVSGFYF
KPVVWKWMRGEQEQQGTQPGDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSCRVKHSSLEGQDIVLYWGGSYTSMGLIALA
VLACLLFLLIVGFTSRFKRQTSYQGVL(SEQ ID NO:157)人CD1d的UniProt登录号为P15813。

[0140] 在另一方面,本发明涉及抗体,其结合与选自401.11和402.8(在某些实施方案中为40.11.158)的至少一种抗体所结合的表位相同的CD1d的表位。如上所述,通过特定抗体

结合的CD1d的表位可以通过许多方法评估,并且随后可以与指定抗体所结合的表位进行比较。

[0141] 在一个实施方案中,该表位包含SEQ ID NO:116的残基141至143或SEQIDNO:116的残基87至93和141至143。

[0142] 本文中所用的术语“抗体”广泛地指由四条多肽链——两条重(H)链和两条轻(L)链——组成的任何免疫球蛋白(Ig)分子,或其保留了Ig分子的必需表位结合特征的任何功能性片段、突变体、变体或其衍生物。此类突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的。下面讨论其非限制性实施方案。

[0143] 在全长抗体中,各重链由重链可变区(在本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。各轻链由轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为称作互补决定区(CDR)的超可变区,该超可变区点缀有称为框架区(FR)的更保守的区。各VH和VL由三个CDR和四个FR组成,其以下列次序从氨基端向羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以具有任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0144] 本文中所用术语抗体的“抗原结合部分”指的是保留了特异性地结合抗原(例如CD1d)的能力的抗体或蛋白质的一个或多个片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。此类抗体实施方案还可以是双特异性、双重特异性的或多重特异性的形式;特异性地结合两个或多个不同的抗原。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的一价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)结构域抗体(dAb)(Ward等人,1989Nature341544-6,Winter等人,PCT公开W090/05144,均经此引用并入本文),其包含单个可变结构域;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但可以使用重组方法,通过能够使其制成单个蛋白质链的合成连接子,将它们接合,其中VL和VH区配对形成一价分子(称为单链Fv(scFv));(参见例如Bird等人,1988Science242 423-6;Huston等人,1988Proc Natl Acad Sci USA85 5879-83)。此类单链抗体也意在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中。还涵盖了其它形式的单链抗体,例如也涵盖双抗体。双抗体是二价的、双特异性的抗体,其中在单个多肽链上表达VH和VL结构域,但使用太短以至于不允许同一链上两个结构域之间配对的连接子,由此迫使该结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448;Poljak,R.J.等人,1994,Structure2:1121-1123)。此类抗体结合部分在本领域中是已知的(Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering2001Springer-Verlag.New York.第790页,ISBN3-540-41354-5)。

[0145] 本文中描述的抗体可以是人源化抗体。术语“人源化抗体”应理解为是指包含类人可变区的蛋白质,其包括移植到或插入到来自人抗体的FR中的来自源于非人物种(例如小鼠或大鼠或非人灵长目动物)的抗体的CDR(这种类型的抗体也称为“CDR移植抗体”)。人源化抗体还包括其中人蛋白质的一个或多个残基被一个或多个氨基酸置换改性和/或人蛋白质的一个或多个FR残基用相应的非人残基替换的蛋白质。人源化抗体还可以包含既非在人

抗体中或也非在非人抗体中发现的残基。该蛋白质的任何附加区(例如Fc区)通常是人的。人源化可以使用本领域已知的方法进行,例如US 5225539、US 6054297、US 7566771或US5585089。术语“人源化抗体”还涵盖超人源化蛋白质,例如如在US 7732578中所述。

[0146] 本文中所述的抗体可以是人的。本文中所用的术语“人抗体”指的是具有在人类中,例如在人类种系或体细胞中,发现的可变抗体区和任选恒定抗体区的蛋白质或来自使用此类区制得的文库的蛋白质。“人”抗体可以包括并非由人序列编码的氨基酸残基,例如通过在体外的随机或定点突变引入的突变(特别是包括在少量蛋白质残基中,例如在蛋白质的残基的1、2、3、4、或5中的保守性置换或突变的突变)。这些“人抗体”不一定需要作为人的免疫响应而产生,相反,它们可以使用重组手段(例如筛选噬菌体展示文库)和/或通过包含编码人抗体恒定和/或可变区的核酸的转基因动物(例如小鼠)和/或使用定向选择(例如如US5565332中所述)产生。该术语还涵盖此类抗体的亲和力成熟形式。就本公开目的而言,人蛋白质还被认为包括含有来自人抗体的FR或包含来自人FR的共有序列的序列的FR,其中CDR的一种或多种是随机或半随机的,例如如US6300064和/或US6248516中所述。

[0147] 可以根据Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991(在本文中也称为“Kabat编号系统”)来限定指定给CDR和FR的氨基酸位置。在其它实施方案中,根据Enhanced Chothia Numbering Scheme(<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)限定指定给CDR和FR的氨基酸位置。根据Kabat的编号系统,VHFR和CDR可如下定位:残基1-30(FR1)、31-35(CDR1)、36-49(FR2)、50-65(CDR2)、66-94(FR3)、95-102(CDR3)和103-113(FR4)。根据Kabat的编号系统,VLFR和CDR如下定位:残基1-23(FR1)、24-34(CDR1)、35-49(FR2)、50-56(CDR2)、57-88(FR3)、89-97(CDR3)和98-107(FR4)。本公开不限于通过Kabat编号系统限定的FR和CDR,而是包括所有编号系统,包括规范的编号系统或Chothia和Lesk, J. Mol Biol. 196:901-917, 1987; Chothia等人, Nature 342, 877-883, 1989; 和/或Al-Lazikani等人, J Mol Biol 273, 927-948, 1997; Honnegger和Plückthun的编号系统 J. Mol. Biol., 309:657-670, 2001; 或在 Giudicelli等人, Nucleic Acids Res., 25:206-211 1997中所讨论的IMGT系统。在一个实例中,根据Kabat编号系统限定该CDR。任选地,根据Kabat编号系统的重链CDR2不包含本文中列举的五个C-端氨基酸,或者这些氨基酸的任意一个或多个被另一天然存在的氨基酸置换。在附加的或替换的选项中,轻链CDR1不包含本文中列举的四个N-端氨基酸,或者那些氨基酸的任意一个或多个被另一天然存在的氨基酸置换。在这方面, Padlan等人, FASEBJ., 9: 133-139, 1995证实了重链CDR2的五个C端氨基酸和/或轻链CDR1的四个N端氨基酸通常不涉及抗原结合。

[0148] 本文中所用的术语“抗体构建体”指的是包含连接到连接多肽或免疫球蛋白恒定结构域上的本发明的一个或多个抗原结合部分的多肽。连接多肽包含两个或多个通过肽键接合的氨基酸残基并用于连接一个或更多抗原结合部分。此类连接多肽在本领域中是公知的(参见例如Holliger等人, 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 6444-8)。

[0149] 免疫球蛋白恒定结构域指的是重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列在本领域中是已知的,并且实例如下所示。

[0150] 人重链IgG1恒定域(或其衍生物,如NCBI登录号:P01857)

[0151]

ASTKNPDVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:158)

[0152] 人重链IgG4恒定结构域(如NCBI登录号:P01861)

[0153]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK(SEQ ID NO:159)

[0154] 参入S228P突变的人重链IgG4恒定结构域

[0155]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK(SEQ ID NO:160)

[0156] 如US7,083,784中所述的参入S228P突变和YTE突变的人重链IgG4恒定结构域也可以使用。

[0157] 人轻链kappa恒定结构域(如NCBI登录号:P01834)

[0158]

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:161)

[0159] 人轻链lambda恒定结构域(如NCBI登录号:P01842)

[0160]

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:162)

[0161] 如将被理解的,本发明中开发和描述的序列可以使用本领域公知的方法改性以提高结合,例如通过亲和力成熟,或通过除去预测的MHCII类结合基序来降低免疫原性。可以通过调节其功能特性,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、血清半衰期、生物分布和与Fc受体结合或任意这些方法的组合来进一步增强本文中开发和描述的序列的治疗实用性。这种调节可以通过蛋白质工程、糖工程或化学方法来实现。取决于所需的治疗应用,可以有利地提高或降低这些活性的任意种。

[0162] 用于抗体的亲和力成熟的多种方法在本领域是已知的。这些方法许多基于通过诱变并接着为提高的亲和力而选择和/或筛选生成变体蛋白的组或文库的一般策略。诱变通常在DNA水平进行,例如通过易错PCR法(Thie H2009Methods Mol Biol.525:309-22),通过

基因改组(Kolkman和Stemmer2001Nat Biotechnol.May;19(5):423-8),通过使用诱变化学物质或辐射,通过使用具有易错复制机制的“突变子”株(Greener1996)或通过利用天然亲和力和成熟机制的体细胞超突变方法(Peled,Kuang等人,2008)。还可以在RNA水平下进行诱变,例如通过使用Q β 复制酶(Kopsidas,Roberts等人,2006)酶。允许筛选提高的变体蛋白的基于文库的方法可以基于各种展示技术,如噬菌体、酵母、核糖体、细菌或哺乳动物细胞,并且在本领域是公知的(Benhar2007)。亲和力和成熟可以通过更有针对性/更有预测性的方法来实现,例如通过定点诱变或通过来自3D蛋白质建模的发现所指导的基因合成(参见例如Queen,Schneider等人,1989或美国专利6,180,370或美国专利5,225,539)。

[0163] 用于调节抗体血清半衰期和生物分布的多种方法基于改变抗体与新生Fc受体(FcRn)之间的相互作用,所述新生Fc受体是在保护IgG免受分解代谢并保持高血清抗体浓度中起关键作用的受体。Da11'Acqua等人描述了在IgG1的Fc区中增强与FcRn的结合亲和力的置换,由此提高血清半衰期(Da11'Acqua,Woods等人,2002),并用M252Y/S254T/T256E(YTE突变)的三重置换进一步证实了增强的生物利用率与ADCC活性的调节(Da11'Acqua,Kiener等人,2006)。还参见美国专利号6,277,375;6,821,505;和7,083,784。Hinton等人已经描述了赋予提高的体内半衰期的在位置250和428处的恒定结构域氨基酸置换(Hinton,Johlfis等人,2004)(Hinton,Xiong等人,2006)。还参见美国专利号7,217,797。Petkova等人已经描述了赋予提高的体内半衰期的在位置307、380和434处的恒定结构域氨基酸置换(Petkova,Akilesh等人,2006)。还参见Shields等人(Shields,Namenuk等人,2001)和W02000/42072。抗体恒定区还可以改性以去除效应子功能。位置297处的天冬酰胺(N)突变为谷氨酰胺(Q)去除了介导Fc向Fc受体的结合的N-联碳水化合物。此类糖基化抗体不结合到人Fc γ RI并且不会激活补体途径(complement pathway)(Tao和Morrison1989)。调节与Fc受体的结合以及随后通过这些受体介导的功能(包括FcRn结合和血清半衰期)的恒定结构域氨基酸置换的其它实例描述在美国专利申请号20090142340;20090068175;和20090092599中。

[0164] 在包含Fc区的本发明的分子中,在某些实施方案中工程设计置换L235E中以减少或消除Fc结合和Fc相关效应子功能是有利的,如在Lund,Winter等人,(1991)J Immunology147:2657-2662和Alegre等人,(1992)J Immunology148:3461-3468中所述。该抗体可以是IgG1,和IgG3或IgG4。

[0165] 在包含Fc区的本发明的分子中,在某些实施方案中工程设计或以其它方式选择其中C端赖氨酸(K447)被删除的Fc是有利的。优选这种修改通过降低表达的分子的异质性的提高可制造性。

[0166] 连接抗体分子的多糖已知会影响抗体与Fc受体和多糖受体的相互作用并由此影响抗体活性,包括血清半衰期(Kaneko,Nimmerjahn等人,2006Jones,Papac等人,2007;和Kanda,Yamada等人,2007)。因此,调节期望的抗体活性的某些糖形可以赋予治疗优势。产生工程的糖形的方法是本领域已知的,并且包括但不限于美国专利号6,602,684;7,326,681;7,388,081;和W02008/006554中描述的那些。

[0167] 通过添加聚乙二醇(PEG)延长半衰期已经广泛用于延长蛋白质的血清半衰期,例如由Fishburn2008所综述的。

[0168] 本发明还提供包含至少一种本发明的分离的抗体或其抗原结合部分的组合物。这

种组合物通常将包含至少一种配制剂,所述配制剂选自无菌水、无菌缓冲水和/或至少一种防腐剂,所述防腐剂选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苜醇、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苜索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞,或在水性稀释剂中的混合物,任选地,其中蛋白质的浓度为约0.1mg/ml至约200mg/ml,进一步包含至少一种等渗剂或至少一种生理可接受的缓冲剂。

[0169] 本发明的抗体组合物可以任选进一步包含有效量的至少一种化合物或蛋白质,其选自抗感染药、心血管(CV)系统药、中枢神经系统(CNS)药、自主神经系统(ANS)药、呼吸道药、胃肠(GI)道药、激素药、用于体液或电解质平衡的药、血液学药、抗肿瘤药、免疫调节药、眼、耳或鼻药、局部用药、营养药等等的至少一种。这些药在本领域是公知的,包括各种本文中提出的制剂、指征、剂量和给药(参见例如Nursing2001Handbook of Drugs,第21版, Springhouse Corp.,Springhouse,Pa.,2001;Health Professional's Drug Guide2001,编辑Shannon,Wilson,Stang,Prentice-Hall,Inc,Upper Saddle River,N.J.;Pharmacotherapy Handbook,Wells等人编辑,Appleton&Lange,Stamford,Conn.,其各自经此引用全文并入本文)。

[0170] 本发明的组合物可以进一步包含任何合适的助剂的至少一种,例如但不限于稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等等。优选药学上可接受的助剂。此类无菌溶液的非限制性实例及其制备方法在本领域是公知的,例如但不限于Gennaro编辑,Remington'sPharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.(Easton,Pa.)1990。可以如本领域中公知或如本文中所述那样常规选择适于给药方式、抗体组合物的溶解性和/或稳定性的药学可接受载体。

[0171] 可用于本组合物的药物赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如,糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和寡糖;衍生糖,例如糖醇类、醛糖酸类、酯化糖类等;以及多糖或糖聚合物),其可以单独或组合地存在,单独或组合地构成1-99.99重量%或体积%。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等等。也可以在缓冲能力方面起作用的代表性的氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等等。一种优选的氨基酸是组氨酸。第二优选的氨基酸是精氨酸。

[0172] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括例如单糖类,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等;二糖类,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维素二糖等等;多糖类,例如蜜三糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等等;以及糖醇类,例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(山梨醇)、肌醇等等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和蜜三糖。

[0173] 抗体组合物还可以包括缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐,如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris、盐酸氨丁三醇(tromethamine)或磷酸盐缓冲剂。用于本组合物的优选缓冲剂是有机酸盐,如柠檬酸盐。

[0174] 此外,本发明的组合物可以包含聚合赋形剂/添加剂,如聚乙烯吡咯烷酮、菲可(一种聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如,环糊精,如2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微

生物剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如聚山梨酯,例如“TWEEN® 20”和“TWEEN® 80”)、脂质(例如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇)和螯合剂(例如EDTA)。

[0175] 适用于本发明的抗体组合物的这些和其它已知药物赋形剂和/或添加剂在本领域中是已知的,例如如在“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”,第19版,Williams & Williams, (1995)和在“Physician's Desk Reference”,第52版,Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)中所列举的,其公开内容经此引用全部并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物(例如糖和糖醇)和缓冲剂(例如柠檬酸盐)或聚合剂。

[0176] 本发明还提供了治疗涉及NKT细胞效应子功能的病况的方法,其包括施用该抗体或其抗原结合部分。本文中所用的术语“NKT细胞效应子功能”意在包括由致使NKT细胞的CD1d限制性糖脂活化所产生的NKT细胞功能。此类功能包括但不限于以下的任何一种或多种:由NKT细胞的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IFN- γ 、IL-4、IL-5或IL-13释放,NKT细胞表面FasL表达的上调、释放穿孔素以及由NKT细胞释放粒酶B。

[0177] 给药途径可以选自宽范围的给药途径,包括肠胃外、肌内、静脉内、推注(bolus)、腹膜内、皮下、呼吸、吸入、局部、鼻、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内、真皮下和经皮。但是目前据信最合适的途径是肠胃外或吸入。关于吸入蛋白质的附加信息可以在Borish LC等人,1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160(6), 1816-1823中找到。

[0178] 对于肠胃外给药,该抗体或其抗原结合部分可以配制成溶液、悬浮液、乳液或冻干粉末,与药学上可接受的肠胃外载体结合或单独地提供。此类载体的实例是水、盐水、林格氏溶液、右旋葡萄糖溶液和1-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,如不挥发油。载体或冻干粉末可含有保持等渗性的添加剂(例如氯化钠、甘露糖醇)和保持化学稳定性的添加剂(例如,缓冲剂和防腐剂)。通过已知的或合适的技术将该制剂灭菌。

[0179] 本发明的分离的核酸分子可以包括包含开放阅读框(ORF)的核酸分子,任选具有一个或多个内含子,例如但不限于分别具有至少一个重链或轻链的至少一个CDR(如CDR1、CDR2和/或CDR3)的至少一个特定部分;包含抗体或其抗体结合部分的编码序列的核酸分子;和包含基本上不同于上述那些的核苷酸序列但其因遗传密码简并仍编码本文中所述的和/或本领域已知的至少一种抗体或抗体结合部分的核酸分子。当然,遗传密码在本领域中是公知的。因此,产生编码本发明的特异性抗体或其抗体结合部分的此类简并核酸变体对本领域技术人员而言是常规的。参见例如Ausubel等人(上文),并且此类核酸变体包括在本发明中。

[0180] 如本文所示,包含编码抗体或其抗体结合部分的核酸的本发明的核酸分子可以包括但不限于自身编码抗体或其抗体结合部分的氨基酸序列的那些;整个抗体或其抗体结合部分的编码序列;抗体或其抗体结合部分的编码序列以及附加序列,例如至少一个信号前导或融合肽的编码序列,含有或不含有前述附加编码序列,例如至少一个内含子,以及附加的非编码序列,包括但不限于非编码5'和3'序列,如在转录、mRNA加工(包括剪接和多腺苷酸化信号——例如核糖体结合和mRNA的稳定性)中起作用的转录、未翻译的序列;编码附加氨基酸的附加编码序列,例如提供附加功能的那些。由此,编码抗体或其抗体结合部分的序列可以融合成标记序列(例如编码有助于纯化该融合抗体或其抗体结合部分的肽的序列)。

[0181] 本发明提供了在选择性杂交条件下与编码本发明的抗体或其抗体结合部分的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此,该具体实施方案的多核苷酸可以用于分离、检测和/或量化包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可以用于识别、分离或扩增保藏文库中的部分或全长克隆。在某些具体实施方案中,该多核苷酸是从人或哺乳动物核酸文库分离的基因组或cDNA序列,或者是与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA互补的基因组或cDNA序列。

[0182] 该cDNA文库优选包含至少80%的全长序列,优选至少85%或90%的全长序列,更优选至少95%的全长序列。可以将cDNA文库标准化以提高罕见序列的呈现。通常,但不限于,与相对于互补序列具有降低的序列同一性的序列,使用低或中等严格杂交条件。对于同一性较高的序列,任选使用中等和高度严格条件。低严格条件允许具有约70%的序列同一性的序列的选择性杂交,并可以用于识别直系同源序列或旁系同源序列。

[0183] 任选地,本发明的多核苷酸将编码由本文中所述多核苷酸编码的抗体或其抗原结合部分的至少一部分。本发明的多核苷酸包括可用于与编码本发明的抗体或其抗原结合部分的多核苷酸选择性杂交的核酸序列(参见例如Ausubel,上文)。

[0184] 可以使用本领域公知的(a)重组方法,(b)合成技术,和(c)纯化技术,或其组合来制备本发明的分离的核酸。

[0185] 该核酸可以方便地包含除本发明的多核苷酸外的序列。例如,可以将包含一个或多个限制性核酸内切酶位点的多克隆位点插入到该核酸中以帮助多核苷酸的分离。此外,可以插入可翻译序列以帮助分离本发明的翻译的多核苷酸。例如,六-组氨酸标记序列提供方便的手段以纯化本发明的蛋白质。除该编码序列外,本发明的核酸任选是用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、接头或连接区。

[0186] 可以将附加序列添加到此类克隆和/或表达序列中以优化它们在克隆和/或表达中的功能,以便帮助多核苷酸的分离,或改善将多核苷酸引入到细胞中。克隆载体、表达载体、接头和连接区的使用在本领域中是公知的(参见例如Ausubel,上文)。

[0187] 可以使用任何数量的本领域技术人员已知的克隆方法,从生物来源获得本发明的分离的核酸组合物,例如RNA、cDNA、基因组DNA或其任意组合。在一些具体实施方案中,在严格条件下与本发明的多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在cDNA或基因组DNA文库中识别所需序列。RNA的分离以及cDNA和基因组文库的构建是本领域普通技术人员公知的(参见例如Ausubel,上文)。

[0188] 可以使用基于本发明的多核苷酸序列(如本文公开的那些)的探针来筛选cDNA或基因组文库。探针可以用于与基因组DNA或cDNA序列杂交以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域技术人员将认识到在测定中可以使用各种严格程度的杂交;并且杂交或洗涤介质可以是严格的。当杂交条件变得更严格时,用于发生双链体形成的探针与靶标之间的互补程度必须更高。可以通过温度、离子强度、pH和存在部分变性溶剂(例如甲酰胺)的存在中的一种或多种来控制严格程度。例如,通过经由在0%至50%范围内控制甲酰胺浓度来改变反应物溶液的极性,由此方便地改变杂交的严格性。可检测结合所需的互补性(序列同一性)程度将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度最适宜为100%,或90-100%,或其中任何的范围或值。但是,应当理解的是,探针和引物中较小的序列变化可以通过降低杂交和/或洗涤介质的严格性来补偿。

[0189] RNA或DNA的扩增方法在本领域中是公知的,并且可以基于本文中提供的教导和指导根据本发明使用,而无需过度试验。已知的DNA或RNA的扩增方法包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)和相关的扩增方法(参见例如授予Mullis等人的美国专利号4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188;授予Tabor等人的美国专利号4,795,699和4,921,794;授予Innis的美国专利号5,142,033;授予Wilson等人的美国专利号5,122,464;授予Innis的美国专利号5,091,310;授予Gyllensten等人的美国专利号5,066,584;授予Gelfand等人的美国专利号4,889,818;授予Silver等人的美国专利号4,994,370;授予Biswas的美国专利号4,766,067;授予Ringold的美国专利号4,656,134)和使用作为用于双链DNA合成的模板的目标序列的反义RNA的RNA介导扩增(授予Malek等人的美国专利号5,130,238,商标名为NASBA),参考文献的全部内容经此引用并入本文(参见例如Ausubel,上文)。

[0190] 例如,PCR技术可以用于扩增本发明的多核苷酸序列和直接来自基因组DNA或cDNA文库的相关基因。PCR和其它体外扩增方法也可用于例如克隆编码待表达蛋白质的核酸序列、制造用作检测样品中所需mRNA的存在、用于核酸测序或用于其它目的的探针的核酸。通过体外扩增方法足以指导技术人员的技术实例可以在下列参考文献中找到:Ausubel,上文,以及Mullis等人,美国专利号4,683,202(1987);和Innis等人,PCR Protocols A Guide to Methods and Applications,Eds,Academic Press Inc.,San Diego,Calif.(1990)。用于基因组PCR扩增的市售试剂盒在本领域中是已知的。参见例如 **Advantage®**-GC Genomic PCR Kit(Clontech)。T4基因32蛋白(Boehringer Mannheim)可以用于提高长PCR产物的产率。

[0191] 还可以通过已知方法通过直接化学合成来制备本发明的分离的核酸(参见例如Ausubel等人,上文)。化学合成通常产生单链寡核苷酸,其可以通过与互补序列的杂交,或通过使用单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合,转化成双链DNA。本领域技术人员将认识到,虽然DNA的化学合成限于约100个或更多个碱基的序列,但是通过较短序列的连接可以获得更长的序列。通过重叠寡核苷酸的组装来合成更长的序列在本领域中是常规的。

[0192] 本发明进一步提供了包含本发明的核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列,例如,编码本发明的抗体或其抗原结合部分的cDNA或基因组序列,可以用于构建重组表达盒,该重组表达盒可以被引入至少一个所需宿主细胞中。重组表达盒通常包含可操作地连接至转录起始调控序列的本发明的多核苷酸,所述转录起始调控序列将指导多核苷酸在预期的宿主细胞中转录。可以使用异源和非异源(即内源)启动子来指导本发明核酸的表达。

[0193] 在一些实施方案中,可以在本发明的非异源形式的多核苷酸的合适位置中(上游、下游或内含子中)引入用作启动子、增强子或其他元件的分离的核酸,以上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如,可以通过突变、删除和/或置换在体内或体外改变内源性启动子。

[0194] 本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用该重组载体遗传工程化的宿主细胞和如本领域中公知的那样通过重组技术生产至少一种抗体或其抗原结合部分。参见例如Ausubel等人,上文。可以任选将该多核苷酸接合到含有可选标记的载体上用于在宿主中繁殖。通常,在沉淀物如磷酸钙沉淀物中或在与带电荷的脂质的复合物中引入质粒载体。如果载体是病毒,可以使用合适的包装细胞系在体外将其包装并随后转导到宿主细胞中。

[0195] DNA插入物应当可操作地与合适的启动子连接。表达构建体将进一步含有用于转

录起始、终止的位点,并且在转录区中,含有用于翻译的核糖体结合位点。通过构建体表达的成熟转录本的编码部分优选将包含适当位于待翻译的mRNA末端的开始和终止密码子(例如UAA、UGA或UAG)上的翻译起始,UAA和UAG优选用于哺乳动物或真核细胞的表达。

[0196] 表达载体优选但任选包括至少一个可选择的标记。此类标记包括但不限于对真核细胞培养具有抗性的氨甲蝶呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR,美国专利号4,399,216;4,634,665;4,656,134;4,956,288;5,149,636和5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS,美国专利号5,122,464;5,770,359和5,827,739),以及对于在大肠杆菌和其它细菌或原核生物中的培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因(上述专利经此引用全文并入本文)。用于上述宿主细胞的合适的培养基和条件在本领域中是已知的。合适的载体对于技术人员是显而易见的。可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它已知方法实现将载体构建体引入宿主细胞中。此类方法描述在本领域中,例如Ausubel,上文,第1、9、13、15、16章。

[0197] 可以以改进的形式,例如融合蛋白,来表达本发明的至少一种抗体或其抗原结合部分,并且不仅可以包括分泌信号,而且还包括附加的异源功能区。例如,可以将附加氨基酸(特别是带电荷的氨基酸)区,添加至抗体或其抗原结合部分的N-端以提高纯化过程或随后的操作和存储过程中在宿主细胞中的稳定性和持久性。此外,可以将肽部分添加到本发明的抗体或其抗原结合部分中以促进纯化。在抗体或其至少一个片段的最终制备之前,可以将此类区除去。此类方法描述在许多标准实验手册中,例如Ausubel,上文,第16、17和18章。本领域普通技术人员可以得知可用于编码本发明的蛋白质的核酸的表达的许多表达系统。

[0198] 可选地,通过在含有编码本发明的抗体或其抗原结合部分的内源DNA的宿主细胞中起始(通过操纵),可以在宿主细胞中表达本发明的核酸。此类方法在本领域中是公知的,例如如美国专利号5,580,734、5,641,670、5,733,746和5,733,761中描述,其通过参考全文并入本文。

[0199] 用于生产抗体、其特定部分或变体的说明性细胞培养物是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常是单层细胞的形式,尽管也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。本领域已经研发了许多能够表达完整糖基化蛋白质的合适宿主细胞系,并且包括COS-1(例如ATCC CRL1650)、COS-7(例如ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如ATCC CRL-10)、CHO(例如ATCC CRL1610)和BSC-1(例如ATCC CRL-26)细胞系、COS-7细胞、CHO K1SV细胞、hepG2细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293细胞、海拉细胞等等,其可以容易地获自例如American Type Culture Collection, Manassas, Va。优选的宿主细胞包括淋巴来源的细胞,例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是CHO K1(ATCC: CRL-9618)或CHO K1SV(例如Lonza Biologics)。

[0200] 用于这些细胞的表达载体包括一个或多个以下的表达控制序列,例如但不限于,复制起点;启动子(例如,晚期或早期SV40启动子,CMV启动子;美国专利号5,168,062;5,385,839),HSVtk启动子,pgk启动子(磷酸甘油酸激酶)启动子,EF-1 α 启动子(美国专利号5,266,491),至少一种人免疫球蛋白启动子;增强子,和/或加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点(例如,SV40大TAg polyA添加位点)和转录终止子序列。参见例如Ausubel等人,上文。用于生产本发明的核酸或蛋白质的其它细胞是已知的和/或可

获自例如美国典型培养物中心的细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org)或其它已知或商业来源。

[0201] 使用真核宿主细胞时,通常将聚腺苷酸化或转录终止子序列参入到该载体中。终止子序列的一个实例是来自牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。还可以包含用于精确剪接转录本的序列。剪接序列的实例是来自SV40的VP1内含子(Sprague等人,1983JVirol45773-81)。此外,如本领域已知的那样,可以将控制宿主细胞中复制的基因序列参入到载体中。

[0202] 如将要看到的那样,本说明书使用术语“%相同”来描述大量序列。要理解的是,术语“%相同”指的是在特定区的两个序列的比较中,两个序列在相同位置具有特定数目的相同残基。同一性水平可以使用具有缺省参数的CLUSTALW来确定。

[0203] 还应当指出的是,该序列与比较序列“至少95%相同”。在某些实施方案中,优选该序列与比较序列至少96%或至少97%或至少98%或至少99%相同。

[0204] 本文中所用的与杂交条件相关的术语“中等严格”指的是在 $2\times$ SSC缓冲液,0.1%(w/v)SDS中在45℃至65℃温度下或等价条件下进行的杂交和/或洗涤。本文中所用的与杂交条件相关的术语“高度严格”指的是在 $0.1\times$ SSC缓冲液,0.1%(w/v)SDS或更低盐浓度中并在至少65℃的温度下或等价条件下进行的杂交和/或洗涤。本文中提到特定水平的严格性包括使用本领域技术人员已知的除SSC之外的洗涤/杂交溶液的等价条件。例如,计算双链核酸的链分解时的温度(也称为熔融温度,或 T_m)的方法在本领域是已知的。类似于(例如在5℃内或在10℃内)或等于核酸的 T_m 的温度被认为是高度严格的。中等严格性被认为在核酸的计算 T_m 的10℃至20℃内或10℃至15℃内。

[0205] 在整个说明书中,词语“包含”(或变形如“comprises”或“comprising”)将理解为意味着包括所述要素、整体(integer)或步骤,或要素、整体或步骤的组,但不排除任何其它要素、整体或步骤,或要素、整体或步骤的组。

[0206] 本说明书中提及的所有出版物经此引入并入本文。本说明书中已经包括的文献、法案、材料、装置、论文等等的任何讨论仅是用于提供本发明内容的目的。并未视为允许这些内容的任一或全部构成现有技术基础的一部分或者是本发明相关领域中的公知常识,如在本申请的每个权利要求的优先权日之前,其存在于澳大利亚或别处。

[0207] 必须注意,如本说明书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物,除非上下文另行明确指出。因此,例如,“一个”的提法包括单个以及两个或多个;“一种”的提法包括单种以及两种或多种;“该”的提法包括单个以及两个或多个,等等。

[0208] 已经概括地描述了本发明,通过参考下列实施例将更容易理解本发明,下列实施例以说明的方式提供,且不是限制性的。

[0209] 本发明的实施例

[0210] 一般方法

[0211] HEK293/pTT5表达系统

[0212] 对于涉及HEK293E/pTT5表达系统的所有转染,HEK293E细胞在完全细胞生长介质(1升的F17培养基(Invitrogen),9毫升的PluronicF68(Invitrogen),含有20%(w/v)TryptoneNI(Organotechnie)和50μL/100mL培养液的Geneticin(50mg/mL,Invitrogen)的2mMGlutamine)中培养。在转染之前的那天,通过离心采集细胞并重新悬浮在不含Geneticin的新鲜培养基中。第二天,将DNA与市售转染试剂混合,并将该DNA转染混合物逐

滴添加到培养物中。在没有Geneticin的情况下将培养物在37℃、5%CO₂和120rpm下培养整夜。第二天,每500毫升培养物添加12.5毫升的Tryptone和250微升的Geneticin。该培养物在37℃、5%CO₂和120rpm下培养七天,随后收集上清液并纯化。

[0213] CD1d/β2M蛋白质

[0214] 使用与编码β2M的DNA表达构建体(SEQ ID NO:20)共转染的、编码具有位于HIS标签的C端(SEQ ID NO:19)的CD1d胞外域的DNA表达构建体,在哺乳动物的HEK293E/pTT5表达系统中生产人CD1d/β2M。通过2000g下离心10分钟采集含有分泌的CD1d/β2M蛋白质的培养物上清液以除去细胞。使用His Trap™ HP柱(GE Healthcare)经His8亲和和标签由该上清液提纯该CD1d/β2M蛋白质复合物。洗脱的蛋白质用HiLoad16/60Superdex200制备级柱(GE Healthcare)缓冲交换到PBS中,并在HiLoad26/60Superdex200制备级柱(GE Healthcare)上通过凝胶过滤分离~50kDa的级份。以类似方式单独制造人β2M并纯化。采取类似的纯化方法纯化其它物种的CD1d(例如小鼠CD1d)和CD1d的合成构建体(如hCD1dmu和mCD1dmu)。

[0215] 为了确定食蟹猴CD1d的序列,从Biochain获得来自猴脾脏的cDNA。下列底物用于扩增基于猕猴CD1d mRNA的CD1d DNA(PubMed登录号:NM_001033114):

[0216] F1——GTGCCTGCTGTTTCTGCTG(SEQ ID NO:120)

[0217] R1——TGCCCTGATAGGAAGTTTGC(SEQ ID NO:121)

[0218] 建立扩增了1kbDNA产物的PCR。使用M13正向与反向引物将该DNA连接到pGEM-TEasy(Promega)中并测序。该序列与猕猴CD1d(UniProt登录号:Q4AD67)的序列比对并发现是相同的。随后合成该基因序列,添加C端HIS标签,亚克隆到pTT5载体中并使用该HEK-293E/pTT5系统表达。使用Ni层析经引入的HIS标签纯化该蛋白质。

[0219] 对于噬菌体展示试验,使用EZ-linkSulfo-NHS-LC-生物素试剂盒(Pierce)以3:1的biotin:CD1d/β2M比率将重组人CD1d/β2M生物素化。使用具有3.5kDa分子量筛截的Slide-A-Lyzer透析盒通过在PBS中的透析从蛋白质制剂中除去游离生物素。对于活动(campaign)2,也如上所述制备生物素化重组食蟹猴CD1d/β2M。

[0220] 表达抗体的载体的构建

[0221] 表达具有人恒定区(人IgG4重链CH1、铰链、CH2和CH3结构域)(例如在S228P处具有置换的NCBI登录号P01861)的VH氨基酸链。这可以通过将氨基酸序列反向翻译为DNA序列并随后重新合成和组装合成的寡核苷酸来实现。在基因合成后,将整个序列亚克隆到pTT5重链载体的多个克隆位点中(Durocher,Y.等人,2002,NucleicAcidsRes,30,E9)。通过将该序列亚克隆到pTT5轻链载体的多个克隆位点中,表达具有人kappa或lambda轻链恒定区(如NCBI登录号AAI10395和C6KXN3)的VL氨基酸链。

[0222] 抗体的表达和纯化

[0223] 将重链和轻链DNA载体共转染到HEK293/pTT5表达系统中并培养七天。在装载到HiTrapProteinA柱(5毫升,GE Healthcare)上之前将获自这些转染的上清液调节至pH7.4。该柱用50毫升的1XPBS(pH7.4)洗涤。使用0.1M柠檬酸pH2.5进行洗脱。洗脱的抗体用Zeba脱盐柱(Pierce)脱盐到1XPBS(pH7.4)中。该抗体用SDS-PAGE分析。抗体浓度使用BCA测定试剂盒(Pierce)测定。

[0224] 实施例1——生成抗CD1d抗体

[0225] 噬菌体展示

[0226] 从首次用于试验的噬菌粒文库中分离与人和食蟹猴CD1d/β2M结合的FAbs。

[0227] 在两次淘选“活动”(即具有不同试剂或淘选条件的分离的噬菌体展示试验)过程中从噬菌体展示文库中分离抗CD1d/β2MFAbs。一般试验规程遵循Marks等人概述的方法(Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, *Methods Mol Biol*, 248, 161-76)。

[0228] 各噬菌体展示活动包含三轮淘选。对每一轮, 通过与封闭缓冲液(在磷酸盐缓冲盐水中的5%脱脂奶, pH7.4)1:1混合并在室温下培育1小时, 将 $\sim 1 \times 10^{13}$ 噬菌体粒子封闭。封闭的噬菌体文库随后通过用100微升链霉亲和素偶联的Dynabead(Invitrogen)培育45分钟来预排除链霉亲和素结合剂, 将该链霉亲和素偶联的Dynabead如对文库所述进行封闭。在培育步骤后将该珠粒(以及连接于其上的链霉亲和素结合剂)丢弃。

[0229] 通过捕获至链霉亲和素偶联的Dynabead(Invitrogen)表面来制备重组CD1d/β2M抗原用于淘选。为此, 10-100皮摩尔的生物素化CD1d/β2M用100微升珠粒在室温下培育45分钟。将所得CD1d/β2M-珠粒复合物用PBS洗涤以除去游离的CD1d/β2M并随即用于随后的淘选反应。

[0230] 通过将封闭的和预排除的文库与该CD1d/β2M-珠粒复合物在1.5毫升微量离心管中混合并在室温下旋转2小时来进行文库淘选。用一系列洗涤除去非特异性结合的噬菌体。每次洗涤包括用磁架将珠粒复合物由溶液中牵引到管壁上, 吸取上清液, 并随后将珠粒再次悬浮在新鲜的洗涤缓冲液中。该洗涤用PBS洗涤缓冲液(含有0.5%脱脂奶的PBS)或PBS-T洗涤缓冲液(含有0.05%吐温20(Sigma)和0.5%脱脂奶的PBS)重复多次。通过用0.5毫升的100mM三乙胺(TEA)(Merck)在室温下培育20分钟, 将洗涤过程后保持结合的噬菌体从CD1d/β2M-珠粒复合物中洗脱。通过添加0.25毫升的1M Tris-HCl pH7.4(Sigma)来中和洗脱的“输出”噬菌体。

[0231] 在第一和第二轮淘选结束时, 将该输出噬菌体添加到10毫升指数增长的TG1大肠杆菌(酵母-胰胨(YT)生长培养基)的培养物中, 并通过在37℃下在无摇振的情况下培育30分钟并随后在250rpm的摇振下30分钟以感染该细胞。将编码该噬菌体展示输出的噬菌粒随后根据标准试验计划再活化(rescued)作为噬菌体粒子(Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, *Methods Mol Biol*, 248, 161-76)。在第三轮淘选结束时, 用输出噬菌体感染该TG1细胞, 但是细胞以足够的稀释度在固体YT生长培养基(补充有2%的葡萄糖和100微克/毫升的羧苄青霉素)上铺板以制备离散的大肠杆菌菌落。这些菌落用于接种1毫升液体培养物以允许表达用于筛选试验的FAb片段。

[0232] 用于CD1d结合的基于ELISA的筛选

[0233] 各单独的大肠杆菌菌落用于表达FAb, 筛选该FAb的CD1d/β2M结合活性。将菌落接种到96孔深孔板(Costar)中的1毫升YT起子培养物(补充有100微克/毫升的羧苄青霉素和2%的葡萄糖)并在以650rpm摇振的情况下在30℃下培育整夜。这些起子培养物以1:50稀释为1毫升表达培养物(仅用100微克/毫升的羧苄青霉素补充的YT)并生长至600nm下0.8-1.0的光学密度。通过添加异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷至1mM的最终浓度来诱导FAb表达。培养物在20℃下培育16小时。

[0234] 通过离心(2500g, 10分钟)采集细胞并进行周质提取来制备FAb样品。将细胞聚合体再悬浮于75微升提取缓冲液(30mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 20%蔗糖)中并以1000rpm

在4℃下摇振10分钟。通过添加225微升的H₂O,在1000rpm下摇振1小时并通过在2500g下离心10分钟以澄清提取物,由此完成提取物制备。将上清液回收,经Acroprep100kDa分子量筛截板(Pall Corporation)过滤并在4℃下储存直到下一次试验需要的时候。

[0235] 为了通过ELISA筛选由噬菌体展示产生的潜在人CD1d-结合剂,将人CD1d/β2M(如上所述在HEK293E细胞中制得并生物素化)以1微克/毫升捕获在涂布链霉亲和素的ELISA板(Pierce)上。随后洗涤该板并将单独的FAB样品(如上所述制备)添加到ELISA板上的单个孔中。让FAB在室温下结合捕获的CD1d/β2M两小时,随后用PBS-T洗涤三次和用PBS洗涤三次。使用针对融合到FAB重链C端的V5亲和标签(Sigma)的HRP-缀合抗体检测结合的FAB。检测抗体在室温下培育1.5小时。洗涤该板以除去未结合的抗体,并通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50μL1M HCl猝灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(Bio-Tek)在A450nm下读数。结果表示为原始A450nm值,其中任何大于平均测定背景2倍的信号定义为“阳性”。

[0236] 在后面的测定中,制备单独涂布未生物素化的人CD1d/β2M、食蟹猴CD1d/β2M或的β2M的Maxisorp ELISA板(Nunc)以检测FAB样品的结合。洗涤和检测步骤如上所述。

[0237] 对CD1d/β2M结合的FAB的SPR基筛选

[0238] 使用BIAcore4000Biosensor(GE Healthcare)以单一浓度分析物通过测定进行SPR筛选。使用标准胺偶联化学在pH5.5下在四个流动池各个的点1、2、4和5上将约10,000RU的抗V5抗体(Invitrogencat#R960CUS)固定在CM5Series S Sensor芯片上,留下点3未修饰。所用运行缓冲液是HBS-EP+(GE Healthcare),所有相互作用在25℃下测得,并将数据收集速率设定为10Hz。在各流动池的点1或5上以10微升/分钟的流速捕获100秒(通常捕获约200RU的FAB)之前,将V5-标记的FABs的粗周质制剂在运行缓冲液中稀释两倍。在短暂的稳定期后,人或食蟹猴CD1d/β2M同时以30微升/分钟的流速在所有四个流动池的所有点上通过100秒。在使用100mM磷酸的30秒脉冲再生回抗V5抗体之前测量相互作用的解离100秒。产生的传感图参考每个流动池的相邻抗V5抗体点,并用1:1朗缪尔方程拟合以确定ka、kd和KD。

[0239] 噬菌体展示活动的结果

[0240] 通过SPR测定对于与人和食蟹猴CD1d/β2M的结合筛选了超过4400个克隆。发现总计51种FABs具有对人和食蟹猴CD1d的高选择性。

[0241] 实施例2——证实IgG结合CD1d

[0242] 将人-食蟹猴CD1d反应性FAB转化为IgG4格式,将其如一般方法中所述表达并纯化。使用实施例1中描述的改进版本的测定通过ELISA和SPR测试纯化抗体与人和食蟹猴CD1d的结合。简而言之,对于ELISA测定,用合适的抗原以1微克/毫升涂布Maxisorp ELISA板(Nunc)。随后洗涤该板,并将纯化的IgG样品添加到ELISA板的单个孔中。让IgG与捕获的CD1d/β2M在室温下结合一小时,并随后用PBS-T洗涤三次和用PBS洗涤三次。使用针对人Fc(Sigma)的HRP-缀合抗体检测结合的IgG。检测抗体在室温下培育30分钟。洗涤该板以除去未结合的抗体,并通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50μL1M HCl猝灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(Bio-Tek)在A450nm下读数。结果表示为原始A450nm值,其中任何大于平均测定背景2倍的信号定义为“阳性”。

[0243] 还使用Biacore T100生物传感器(GE Healthcare)对纯化抗体进行全动力学表征

(full kinetic)。在Biacore T100生物传感器的流动池(FC)1和FC2(或者FC3和FC4)中使用标准胺偶联化学将约10,000RU的抗人IgG(Invitrogen cat#H10500)固定在CM5Series S Sensor芯片上。所用运行缓冲液是HBS-EP+(GE Healthcare),相互作用在25℃下测得。将峰值纯化IgG在运行缓冲液中稀释至10nM,并以10微升/分钟的流速在FC2(或者FC4)上捕获以捕获50-80RU的IgG。在适当的稳定期后,该目标一人或食蟹猴CD1d/ β 2M在33.3nM至0.4nM(使用三倍稀释的CD1d/ β 2M)浓度下以60微升/分钟的流速通过FC1和FC2(或FC3和FC4)。用于缔合的接触时间为120秒,对于最高浓度在20分钟测得解离,对该系列中所有其它浓度在240秒测得解离。从FC1中减去来自FC2的传感图数据,缓冲液仅为对照物。用1:1朗缪尔方程拟合曲线以生成 k_a 、 k_d 和KD值(表1)。

[0244] 表1:噬菌体展示抗体的ELISA和SPR结果

IgG	ELISA hCD1d	ELISA cCD1d	SPR 人 CD1d		
			k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
401.1	+	+	3.30E+05	6.10E-05	1.85E-10
401.3	+	-	1.55E+05	4.61E-03	2.98E-08
401.9	+	+	1.69E+05	2.21E-02	1.31E-07
401.11	+	+	1.80E+05	4.79E-04	2.66E-09
401.12	+	+	7.84E+05	4.59E-03	5.85E-09
401.14	+	+	1.37E+05	2.88E-03	2.10E-08
401.22	+	+	1.92E+05	2.70E-03	1.40E-08
401.24	+	+	9.02E+05	1.19E-03	1.32E-09
401.26	+	+	3.75E+05	6.02E-03	1.60E-08
401.28	+	-	5.10E+05	3.30E-03	6.47E-09
401.30	+	+	7.51E+05	3.42E-03	4.55E-09
401.33	+	+	1.16E+05	1.09E-03	9.40E-09
402.1	+	+	3.15E+05	7.01E-03	2.23E-08
402.2	+	-	8.31E+04	4.51E-04	5.43E-09
402.4	+	-	3.05E+05	2.89E-03	9.51E-09
402.5	+	-	1.80E+05	3.17E-03	1.76E-08
402.6	+	+	1.58E+05	3.12E-04	1.98E-09
402.7	+	+	1.71E+05	5.05E-03	2.95E-08
402.8	+	+	5.30E+05	1.61E-04	3.04E-10
402.9	+	+	2.56E+05	1.55E-03	6.04E-09
402.11	+	+	9.46E+04	5.22E-03	5.52E-08
402.12	+	+	1.18E+06	8.29E-04	7.01E-10
402.15	+	+	1.99E+05	4.31E-03	2.17E-08
402.16	+	+	1.96E+05	8.89E-04	4.54E-09
402.17	+	+	4.61E+05	2.88E-03	6.24E-09
402.18	+	+	1.25E+05	4.08E-04	3.27E-09

[0246] 实施例3——基于细胞的CD1d四聚体抑制效价测定

[0247] 产生稳定的NKTCR表达细胞系

[0248] 为了开发表征抗CD1d抗体的生物效价的基于细胞的测定,需要稳定的表达NKT细胞受体(NKTCR)的细胞系。选择细胞系J.RT3-T3.5(ATCC:TIB-153)以产生稳定的NKT细胞受体表达细胞系。J.RT3-T3.5衍生自缺少T细胞抗原受体的β链的Jurkat的E6-1克隆(ATCC:TIB152)。该细胞不表达CD3或表面上的T细胞受体αβ异源二聚体。J.RT3-T3.5细胞与两种载体共同电穿孔,一种含有该J3N.5NKTCR的α链(SEQ ID NO:21),另一种含有该J3N.5NKTCR的β链(SEQ ID NO:22)(Brigl, M. 等人, 2006 J Immunol 176:3625-34.)。这种NKT细胞受体对糖脂抗原α-GalCer是反应性的。编码该NKTCR的α和β链的这些载体还分别表达对遗传霉素和杀稻瘟素的抗性基因。通过在含有预定浓度的遗传霉素和杀稻瘟菌素的培养介质中繁殖这些细胞实现这些载体的稳定合并。

[0249] 为了诱导出克隆系,转染的J.RT3-T3.5细胞在遗传霉素和杀稻瘟菌素选择下在RPMI1640(Gibco)中生长至对数生长期,并在96孔平底板(Corning)中以每孔平均一个细胞限制性稀释。为了确定转染的NKTCR的稳定表达,将有活力的克隆在24孔板中亚克隆为更大的体积并通过多参数流式细胞计量术筛选。筛选克隆以便结合CD1d四聚体(ProImmune)、表达Vα24Jα18—人iNKTCR的接合区(junctional region)和表达CD3—TCR的共同受体。通过各标记物的高平均荧光强度(MFI)来选择具有这些标记物的高表达的克隆。在多次传代进入T25烧瓶中并在-180℃下在冷冻介质(90%的热灭活胎牛血清和10%的DMSO)中储存假定克隆后复苏后通过流式细胞计量术证实稳定性。识别稳定克隆并用于细胞基测定以表征抗CD1d抗体的功能效价。

[0250] CD1d四聚体抑制效价测定

[0251] 在基于流式细胞计量术的CD1d四聚体抑制测定中,用于表征抗CD1d抗体的效价的细胞基测定使用上述克隆NKT细胞系。该测定依赖于装载有α-GalCer的CD1d四聚体结合稳定转染到该J.RT3-T3.5细胞中的NKTCR的能力。抗CD1d抗体的效价通过该抗体抑制CD1d四聚体与稳定转染的J.RT3-T3.5细胞系上存在的NKTCR结合的能力来确定。抑制抗体结合该四聚体中的CD1d分子上的特定表位,这防止了该CD1d四聚体与J.RT3-T3.5细胞上稳定转染的NKTCR的相互作用。该测定的读出是该荧光染料标记的CD1d四聚体的平均荧光强度(MFI)的降低。通过滴定该抗CD1d抗体同时保持CD1d四聚体浓度恒定,产生近似的EC50值。为了确保测定的可重复性与可靠性,进行不同CD1d四聚体浓度下的优化实验以确定最佳的动态范围。该CD1d四聚体的最佳浓度测定为在1:1000稀释,对应于约10nM。

[0252] 为了进行测定,以由pH7.4的冷1XPBS中的0.1%牛血清白蛋白(BSA)中的10μg/mL起递减的浓度制备抗体。这些抗体以与最终浓度10nM的抗CD1d四聚体以1:1的比率在黑暗中以在室温下共同培育最多40分钟。将该CD1d四聚体/抗CD1d抗体混合物用于染色在96孔圆底板中以每孔 1×10^5 细胞铺板的J.RT3-T3.5细胞的NKTCR-稳定转染子。在1XPBS中的0.1%BSA中进行洗涤步骤。通过流式细胞计量术获得数据并用流式细胞计量术分析软件(FlowJo)对数据进行分析。

[0253] 在该测定中测试了抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14、401.28、401.30、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16、402.17和402.18。选择不相关的特异性阴性对照物抗体(人IgG1)作为阴性对照物。选择抗CD1d抗体42(BD Biosciences)和51.1(eBioscience)作为阳性对照物。在这些抗体中,仅401.11、401.28、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16和402.18在该测定中表现出类似于或优于抗体42的效价(表2)。相比较而言,

阴性对照抗体表现出可忽略不计的对与该细胞系的结合的四聚体的抑制。图1中显示了来自多个试验的代表性数据。该结果不能通过测量抗体与CD1d的直接结合的测定来预测。这表明,需要选择和筛选能够功能性抑制CD1d-NKT相互作用的抗体。

[0254] 表2.四聚体抑制测定的EC50值

[0255]

抗体名称	EC50(ng/mL)
401.11	283.9
402.1	387.5
402.6	601.6
402.7	791.3
402.8	164.7
402.16	351.6
402.17	可忽略的抑制
402.18	88.2
42	1435.0
51.1	775.4
阴性对照物	可忽略的抑制

[0256] 实施例4——NKT细胞系IL-2释放测定

[0257] 使用基于细胞系的功能性效价测定进一步表征抗CD1d抗体。U-937细胞系(ATCC: CRL1593.2)是一种CD1d阳性的骨髓单核细胞系。装载有 α GalCer的U-937细胞能够诱导由实施例3所述稳定的NKTCR细胞系生产IL-2。响应这些装载 α GalCer的U-937细胞,抑制性抗CD1d抗体降低了由NKTCR细胞系释放IL-2。通过标准ELISA技术(R&DSYSTEMS)测量IL-2水平。

[0258] 为了进行该测定,在RPMI1640(Gibco)中在96-孔平底板中以100ng/mL的最终浓度用 α GalCer装载约 1.5×10^5 个U-937细胞。在添加 α GalCer后60分钟,以起始于10 μ g/mL的递减浓度将抗CD1d抗体添加到该细胞。在抗体装载后六十分钟,向各孔中加入 1.5×10^5 个稳定的NKTCR转染J.RT3-T3.5细胞。添加NKTCR转染的J.RT3-T3.5细胞后24小时,使用不含细胞的培养物上清液通过ELISA(R&DSYSTEMS)测试IL-2水平。

[0259] 在该测定中测试了抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14、401.28、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16和402.18。选择抗CD1d抗体42和51.1作为阳性对照物。选择不相关的特异性阴性对照物抗体(人IgG1)作为阴性对照物。在这些抗体中,如通过EC50值(表3和图2中的代表性数据)测定的那样,仅401.11、402.1、402.6、402.8和402.16表现出与抗体42相比等效或更强的对IL-2释放的抑制。另外,与抗体51.1相比,401.11和402.8表现出对IL-2释放的较好的抑制(图2)。相比较而言,阴性对照抗体表现出可忽略不计的对IL-2释放的抑制。令人惊讶地,401.11比抗体42更有效约20倍,比51.1更有效约15倍。类似地,402.8比抗体42更有效约25倍,比51.1更有效约17倍(图2)。总之,这些数据表明,新型完全人抗CD1d抗体具有与本领域中描述的那些相比显著提高的生物效价。

[0260] 表3:EC50值-NKT细胞系IL-2测定

[0261]

抗体名称	EC50(ng/mL)
401.1	可忽略的抑制
401.9	286.0
401.11	5.3
401.12	576.3
401.14	可忽略的抑制
401.28	112.4
401.30	可忽略的抑制
402.8	4.5
42	110.7
51.1	77.3
(阴性对照物)	可忽略的抑制

[0262] 实施例5——测试抗CD1d抗体与原发性PBMC的结合

[0263] 表征抗CD1d抗体如在初级人体细胞上所表现的与CD1d结合的能力。将抗CD1d抗体402.8、401.11、158和不相关的特异性阴性对照物抗体调节至2mg/mL的浓度并根据制造商说明书(Invitrogen)缀合到荧光染料Pacific Blue上。

[0264] 由于已知CD1d在存在于人血液中的某些人细胞群上表达,使用外周血单核细胞(PBMC)证明抗CD1d抗体402.8对初级CD1d⁺细胞的结合。根据标准规程(Nycomed)在淋巴细胞分离剂梯度(lymphoprep gradient)上通过密度离心从暗黄覆盖层中分离PBMC。随后在1XPBS中将该细胞洗涤数次,并用抗CD1d抗体402.8(10 μ g/mL)或阴性对照物人IgG1(10 μ g/mL)染色,并用抗人CD11c(Biolegend)共同染色。抗CD1d抗体402.8结合其为CD11c⁺阳性的分离的CD1d阳性群落(图3)。相反,阴性对照物抗体表现出可忽略不计的结合(图3)。抗CD1d抗体401.11、158(10 μ g/mL)还结合该CD1d⁺阳性群落(未显示)。这些数据清楚地表明衍生自402.8和401.11的抗CD1d抗体结合初级人细胞中的CD1d⁺群落。

[0265] 实施例6——测试抗CD1d抗体在基于初级NKT细胞的测定中的功效

[0266] 人NKT细胞能够响应CD1d背景中提出的脂质或糖脂抗原诱发快速效应子功能。这种快速效应子功能可以通过释放细胞因子例如IFN- γ 、IL-4、IL-5和IL-13来证实。抑制性抗CD1d抗体可以通过结合细胞上存在的CD1d并防止NKT细胞和它们的CD1d与糖脂的同源复合物之间的相互作用来抑制这些NKT细胞的功能。合适的抗原呈递细胞可以包括永生的髓样细胞系或初级人树突细胞。鉴于人类供体的外周血中NKT细胞的稀有,首先成功的测定中需要此类初级NKT细胞的分离和扩增。

[0267] NKT细胞的分离与扩增

[0268] 在淋巴细胞分离剂(Nycomed)梯度上从暗黄覆盖层中分离PBMC。随后通过标准磁性相关细胞分选(MACS)方法富集NKT细胞(Exley等人,2010Curr Protoc Immunol,第14章,Unit14:11)。简而言之,NKT细胞针对V α 24-J α 18iNKT标记物与MACS微珠(Miltenyi Biotec)一起培育。过量的微珠通过在冷PBS中洗涤细胞悬浮液两次来除去。随后让细胞悬浮液通过MACS柱并保留含有富集的NKT细胞的阳性级份。来自阴性级份的细胞可能含有CD1d阳性细胞,如单核细胞和树突细胞,并可用作进料(feeder)以刺激富集的NKT细胞。该进料细胞首

先用丝裂霉素C(一种有丝分裂的抑制剂)在37℃下处理30分钟。这些细胞随后用组织培养液洗涤数次,并随后装载100ng/mL的最终浓度的 α -GalCer,并在96孔圆底板中与每孔 1×10^4 个NKT细胞以1:1的比例共同培养。在37℃和5%CO₂下培育后16小时,以10ng/mL的最终浓度将IL-2添加到培养基中。令细胞培养约14天。NKT细胞群的纯度通过多参数流式细胞计量术,使用荧光染料缀合的CD1d四聚体(ProImmune)、荧光染料缀合的抗V α 24J α 18(MiltenyiBiotec)和荧光染料缀合的抗CD3(BD Biosciences)测定。用于细胞基测定的合适的NKT群落的纯度常规上大于通过流式细胞计量术分析的70%NKT细胞。

[0269] 检测方法

[0270] 除非另行说明,所有基于初级细胞的测定均在37℃和5%CO₂下进行。THP-1细胞以每孔 2×10^4 个细胞的浓度分配到96孔平底板中。在十分钟后,以100ng/mL的最终浓度将 α -GalCer装载到细胞上。在添加 α -GalCer后45分钟时,以从10 μ g/mL开始递减的浓度添加抗CD1d抑制性抗体。在添加抗体后30分钟时,随后以每孔 2×10^4 个细胞添加NKT细胞。在培育后24小时收集不含细胞的培养物上清液。对培养物上清液进行人细胞因子的ELISA:人IFN- γ 、IL-4、IL-5和IL-13(均为R&DSYSTEMS)。

[0271] 使用初级NKT细胞的功能性测定的结果

[0272] 在该测定中测试了抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14和402.8。将不相关的特异性阴性对照物抗体(人IgG1)用作阴性对照物。将抗CD1d抗体42和51.1作为阳性对照物。类似于实施例4中描述的IL-2细胞系测定的结果,仅抗体401.11和402.8显示出对细胞CD1d背景中糖脂-抗原诱导的初级人NKT细胞释放细胞因子的强抑制(图4和表4,参见IFN- γ 测定EC50值)。通过比较,阴性对照抗体表现出可忽略的抑制。抗体42在高剂量(10微克/毫升)下显示出对NKT细胞的细胞因子释放的抑制,但是这种效果在低浓度下未能保持(图4)。抗体42被认为是在体外的NKT细胞活性的强中和剂并如此广泛公布(Exley, M.等人,1997, J. Exp. Med. 186:109-120; W003/092615)。与抗体42相比,抗体401.11和402.8分别表现出高达114倍和高达180倍的提高的效价。

[0273] 为了确定抗体401.11和402.8针对存在于非永生人细胞上的CD1d的抑制性效价,使用初级人单核细胞衍生树突细胞开发了功能性测定。可以通过扩大表达CD1d抗原的细胞的比例,由此提高对CD1d响应性NKT细胞的抗原呈递的水平,由此提高该测定的动态范围。通过磁活化细胞分选(MACS)分离CD14+细胞并按照标准规程在GM-CSF和IL-4中培养这些细胞,由此从PBMC中分离单核细胞。树突细胞以每孔 2×10^4 个细胞在96孔平底板中培养,并以100ng/mL用 α GalCer装载1小时。在以1:1的与树突细胞的比例添加扩增NKT细胞之前,将抑制性抗体添加到培养物中1小时。二十四小时后,对不含细胞的上清液测定IFN- γ 、IL-4、IL-5和IL-13释放。在该测定中测试抗CD1d抗体401.11和402.8;将不相关的特异性人IgG1用作阴性对照物,并且将抗体42(BD Biosciences)和51.1(eBioscience)用作阳性对照物。在此类基于初级细胞的测定中,仅有抗体401.11和402.8表现出对糖脂-抗原诱导的初级人NKT细胞释放细胞因子的强抑制(图5和表5)。相比较而言,阴性对照物抗体表现出可忽略的抑制。CD1d抗体42和51.1在高剂量(10微克/毫升)下显示出一些对NKT细胞释放细胞因子的抑制,但是这种效果在较低剂量下未能保持。与抗体42相比,抗体401.11和402.8分别表现出高达200倍和高达50倍的提高的效价(图5和表5,;参见IFN- γ 测定EC50值)。与抗体51.1相比,抗体401.11和402.8表现出显著提高的效价。这一结果因此证明,该抗CD1d抗体在天

然表达CD1d抗原的人体细胞的背景中显示出有效的中和活性。

[0274] 总之,完全人抗CD1d抗体402.8和401.11证实了并表现出对NKT细胞活性的高度有效的抑制。这些抗体在与抗CD1d抗体42和51.1相比时表现出100倍提高了的效价。

[0275] 表4:EC50值-使用THP-1细胞系的初级NKT细胞系测定

[0276]

抗体名称	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)
401.11	3.8	1.9	1.7	2.5
402.8	2.4	1.7	1.2	1.5
42	429.1	76.1	64.7	153.8
阴性对照物	可忽略的抑制	可忽略的抑制	可忽略的抑制	可忽略的抑制

[0277] 表5:EC50值-使用初级CD14+细胞的初级NKT细胞系测定

[0278]

抗体名称	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)
401.11	6.8	5.9	6.2	12.1
402.8	28.6	4.0	6.9	39.9
51.1	168.2	DNI	DNI	221.7
42	1388.0	185.7	108.4	844.0
阴性对照物	可忽略的抑制	可忽略的抑制	可忽略的抑制	可忽略的抑制

[0279] DNI-没有抑制,其中该抗体的抑制活性通常小于1微克/毫升下人NKT细胞最大反应的50%。

[0280] 抗体401.11和402.8的VH与VL结构域的序列如下:

401.11 VH SEQ ID NO 1

401.11 VL SEQ ID NO 2

[0281]

402.8 VH SEQ ID NO 3

402.8 VL SEQ ID NO 4

[0282] 实施例7——402.8和401.11共享CD1d上的共同表位

[0283] 如上面的结果中所示,噬菌体展示活动产生了与现有技术的抗CD1d抗体相比显示出优异的生物效价的抗CD1d抗体401.11和402.8。据推测,这种显著提高的效价是由于高度中和表位的识别,该高度中和表位一旦被抗CD1d抗体结合将会阻止CD1d分子与其同源受体(例如存在于NKT细胞上的NKT细胞受体)之间的相互作用。阻断与CD1d的这种相互作用因此对抑制下游生物效应,例如NKT细胞的活化和促炎细胞因子的释放来说是必要和充分的。为了研究生成的高度有效的抗CD1d抗体与中和抗CD1d抗体相比是否具有不同的表位特异性,进行了竞争结合ELISA。

[0284] 检测方法

[0285] 使用EZ-link Sulfo-NHS-LC-生物素试剂盒(Pierce)以3:1的生物素:402.8的比

率将抗CD1d抗体402.8生物素化。通过用PBS多次洗涤并经具有30kDa筛截的离心过滤器(Millipore)通过离心(3000rpm)浓缩从该蛋白质制剂中除去游离的生物素。用0.5微克/毫升的人CD1d涂布Maxisorp ELISA板(Nunc)并令其在4℃下培育整夜。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次,随后将该板在室温下在1%的BSA中封闭1小时。生物素化402.8随后以1:1的比率与非生物素化的抗CD1d抗体(402.8、401.11、42和51.1)一起共同平衡5分钟。将这些抗体以始于50微克/毫升(即与0.1微克/毫升生物素化402.8相比过量最大500倍)的递减浓度在室温下添加到该板中1小时。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次。链霉亲和素辣根过氧化物酶偶联物(BD Biosciences)在黑暗中室温下添加到该板中1小时。洗涤该板以除去未结合的链霉亲和素辣根过氧化物酶。通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50μL1M HCl猝灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(FluoStar Galaxy)在A450nm下读数。结果表示为原始A450nm值,并通过从原始数据中减去符合0%抑制的读数转化为竞争度(百分比)值。

[0286] 使用上述方法表明,如450nm处的吸光度值(图6A)和与402.8的竞争度(图6B)所示,401.11和402.8彼此竞争与CD1d结合,并因此共享重叠(overlapping)表位或共同表位。相反,402.8不与42或51.1共享重叠表位或共同表位。总而言之,这些数据表明,高度有效的抗CD1d抗体401.11和402.8结合了未被抗CD1d抗体42与51.1共享的类似高亲和力中和表位。

[0287] 实施例8——与食蟹猴CD1d的交叉反应性

[0288] 使用实施例1中描述的改进版测定,通过ELISA测试抗CD1d抗体401.11和402.8与食蟹猴CD1d的结合。用1微克/毫升的人或食蟹猴CD1d涂布Maxisorp ELISA板(Nunc),并令其在4℃下过夜培养。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次,随后将该板在室温下在1%的BSA中封闭1小时。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次。随后以始于10微克/毫升的递减浓度加入抗CD1d抗体。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次。使用HRP缀合的Fc-特异性抗体(Sigma)检测结合的抗体。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次以除去未结合的辣根过氧化物酶缀合的抗Fc。通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50微升1M HCl猝灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(FluoStar Galaxy)在A450nm下读数。结果表明,结合人CD1d(图7A)的抗体401.11和402.8也与食蟹猴CD1d是交叉反应性的(图7B)。与非人类灵长动物CD1d的交叉反应性对于允许在人类疾病的非人类灵长动物模型中的测试而言是合意的。

[0289] 实施例9——基于细胞的与食蟹猴CD1d的交叉反应性

[0290] 为了证实与细胞基形式的非人类灵长动物CD1d的交叉反应性,使用交叉反应性抗CD1d抗体402.8染色人和食蟹猴PBMC。如实施例8中描述地,以3:1的生物素对IgG的比率将该抗体生物素化。阴性对照物抗体(人IgG1)以类似方式生物素化。通过用藻红蛋白缀合的链霉亲和素培育该细胞来实现对结合的生物素化抗CD1d抗体的检测。抗CD1d抗体结合人(图3)与食蟹猴物种(图8)体内的CD1d-阳性初级单核细胞衍生DC。这些结果表明,402.8在基于细胞的背景中表现出人与食蟹猴交叉反应性,这对于在人类疾病的非人类灵长动物模型中的测试而言是重要的。

[0291] 实施例10:食蟹猴CD1d介导的初级NKT功能的基于细胞的功能抑制

[0292] 对于基于细胞的效价测定,在第0天用αGalCer(100ng/mL)并用或不用抗CD1d抗体

装载食蟹猴PBMC。培养物在湿润的培养器中在37℃、5%CO₂下在25孔板中制备。在第7天,加入IL-2(10U/mL)并让培养物在37℃、5%CO₂下进一步培育96小时。最终读数是使用抗CD3和抗T细胞受体Vα24抗体(BDBiosciences)的NKT细胞的计数。在不存在抗CD1d抗体的情况下,或在添加同种型的对照物抗体的情况下,NKT细胞在αGalCer的存在下扩展了约10倍。与没有用抗体或用人IgG阴性对照物抗体(图9)处理培养物相比,抗CD1d抗体401.11和402.8有效地封闭了αGalCer介导的CD1d限制性食蟹猴NKT细胞的增殖。

[0293] 实施例11:401.11和402.8的优化变体

[0294] 该401.11和402.8抗体可以以对抗体生物物理性质产生积极效果并同时对它们的效价具有可忽略的或积极的影响为目的通过变更抗体序列进一步优化。首先,提高抗体表达水平并具有共存的提高的生产水平的变更是合意的。其次,通过氨基酸置换除去潜在的不合意序列特征,例如暴露于溶剂的半胱氨酸残基或N-联糖基化位点可以降低潜在的产品异质性,这可以进一步增强这些抗体。第三,在纯化或储存过程中通过氧化或异构化潜在影响抗体稳定性的氨基酸残基置换可以用不会经历此类转变的氨基酸替代(Wang等人,2007Journal of Pharmaceutical Sciences96:1-26),这可以进一步改进这些抗体。最后,为了降低预测的免疫原性,可能潜在地促进免疫原性的稀有或非种系401.11和402.8氨基酸残基可以用其它氨基酸置换,这可以进一步改进这些抗体。下面描述了在抗体401.11和402.8上这些优化策略的实施。

[0295] 增强抗体401.11

[0296] 经由MegAlign(DNASTar)将401.11的可变重链和轻链序列与相应的人类种系序列进行比较。最同源的种系重链可变区——IGHV3-9*01——与401.11相差七个框架氨基酸。IGKV1-12*01与401.11轻链共享最高序列同源性,相差两个框架氨基酸(图12)。该信息用于生成含有用相应的种系框架残基置换的框架残基的一组401.11变体(图12)。

[0297] 通过将该重链与轻链共同转染到HEK-293E细胞中来制造抗体401.11和401.11.15至401.11.28(图12)。SPR(Biacore)用于测量各抗体的相对表达水平及其如通过平衡解离常数(KD)测得的与人CD1d的相应结合。表6中给出了所得数据。

[0298] 表6

[0299]

IgG	表达水平 (蛋白质 A 捕获) SPR	KD (pM)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	DNE	N/A	3.754	0.857
401.11.14	144	791	N/D	N/D
401.11.15	44	507	N/D	N/D
401.11.16	150	DNB	N/D	N/D
401.11.17	DNE	N/A	N/D	N/D
401.11.18	185	9970	N/D	N/D
401.11.19	385	667	N/D	N/D
401.11.20	109	977	N/D	N/D
401.11.21	534	951	N/D	N/D
401.11.22	553	754	N/D	N/D
401.11.23	227	1980	N/D	N/D
401.11.24	359	644	4.263	0.360
401.11.25	292	932	N/D	N/D
401.11.26	358	855	3.245	1.304
401.11.27	23	DNB	N/D	N/D
401.11.28	176	722	1.417	0.294

[0300] 备注:DNE-未表达;DNB-未结合;N/D-未确定;THP-1-用作抗原呈递细胞的THP-1细胞;moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。数据代表3次独立实验。

[0301] 在该试验中受试的十五种抗体中,十三种在转染的HEK-293E细胞的上清液中具有可测水平的抗体。这十三种抗体中的十种以小于1nM的平衡解离常数(KD)与CD1d结合(表6)。

[0302] 生成抗体401.11、401.11.24、401.11.26和401.11.28,并采用基于细胞的效价测定测试其对CD1d介导的NKT细胞释放细胞因子的功能性抑制(表6)。当THP-1细胞或初级CD14+树突细胞用作CD1d-阳性抗原呈递细胞(APC)时,抗体401.11.24、401.11.26和401.11.28显示出与401.11相比类似或提高的效价。

[0303] 401.11重链的CDR3的位置97至(100B)由序列CSSSGC组成。为了确定存在于CDR3中的半胱氨酸的作用,每个半胱氨酸用代表不同类别的氨基酸侧链的九种氨基酸之一置换(Rajpal等人,PNAS2005102:8466-8471)。在转染到HEK293E细胞中之后,对于任意这些变体,抗体表达均不可检测,导致没有通过SPR测得的与CD1d的可检测的结合。两个半胱氨酸均置换为丝氨酸残基(401.11.164)获得了被表达但是以相比于401.11较低的亲和力与人CD1d结合的抗体,这表明401.11的重链的CDR3的半胱氨酸对抗体表达和与CD1d的高亲和力结合而言是合意的(表7)。

[0304] 表7

[0305]

IgG	在可变重链中从 401.11 置换	轻链	KD (M)
401.11 WT	N/A	401.11	9.97 E-10
模拟 (Mock)	N/A	401.11	N/D
401.11.51	C97S	401.11	N/D
401.11.52	C97T	401.11	N/D
401.11.53	C97G	401.11	N/D
401.11.54	C97L	401.11	N/D
401.11.55	C97V	401.11	N/D
401.11.56	C97K	401.11	N/D
401.11.57	C97Y	401.11	N/D
401.11.58	C97R	401.11	N/D
401.11.59	C97H	401.11	N/D
401.11.92	C(100B)S	401.11	N/D
401.11.93	C(100B)T	401.11	N/D
401.11.94	C(100B)G	401.11	N/D
401.11.95	C(100B)L	401.11	N/D
401.11.96	C(100B)V	401.11	N/D
401.11.97	C(100B)K	401.11	N/D
401.11.98	C(100B)Y	401.11	N/D
401.11.99	C(100B)R	401.11	N/D
401.11.100	C(100B)H	401.11	N/D

[0306]

401.11.164	C97S & C(100B)S	N45K	6.56E-08
------------	--------------------	------	----------

[0307] N/D-未测定

[0308] 针对401.11的重链CDR3序列进行进一步改变以试图改进401.11的表达水平与亲和力和力。对于该分析而言,401.11的重链的CDR3中的各氨基酸用代表不同类别的氨基酸侧链的九种氨基酸之一置换。在表8和表9中给出了各种所得抗体的表达水平及其与CD1d的结合。

[0309] 表8

[0310]

IgG	置换 VH	表达水平	KD (M)
401.11	N/A	36	<0.1E-10*
模拟 (Mock)	N/A	-8	DNB
401.11.36	D95K	DNE	N/A
401.11.37	D95R	DNE	N/A
401.11.38	D95S	105	DNB
401.11.39	D95G	34	N/A
401.11.40	D95L	DNE	N/A
401.11.41	D95Y	DNE	N/A
401.11.42	D95F	DNE	N/A
401.11.43	D95Q	DNE	N/A
401.11.44	M96K	85	4.31E-10
401.11.45	M96R	63	2.49E-10
401.11.46	M96F	DNE	3.03E-10
401.11.47	M96Y	DNE	N/A
401.11.48	M96Q	DNE	N/A
401.11.49	M96S	47	4.01E-10
401.11.50	M96G	29	1.87E-10
401.11.60	S98D	DNE	N/A
401.11.61	S98T	57.85	2.42E-18
401.11.62	S98W	DNE	N/A
401.11.63	S98L	23.76	1.89E-10
401.11.64	S98V	84.5	2.30E-10
401.11.65	S98K	38.36	1.67E-09
401.11.66	S98R	75.87	1.56E-10

[0311]

IgG	置换 VH	表达水平	KD (M)
401.11.67	S98Y	DNE	4.85E-11
401.11.68	S98G	84.81	1.17E-09
401.11.69	S99D	57.92	1.44E-10
401.11.70	S99T	20.14	5.49E-10
401.11.71	S99W	63.04	<0.1E-10*
401.11.72	S99L	11.43	6.49E-10
401.11.73	S99V	61.56	5.27E-10
401.11.74	S99K	56.91	9.33E-11
401.11.75	S99R	14.06	DNB
401.11.76	S99Y	DNE	N/A
401.11.77	S99G	20.18	2.72E-10
401.11.78	S99D	DNE	N/A
401.11.79	S100T	16.81	DNB
401.11.80	S100W	29.03	2.34E-09
401.11.81	S100L	24.65	5.52E-10
401.11.82	S100V	20.35	DNB
401.11.83	S100K	45.84	1.55E-09
401.11.84	S100R	51.11	1.12E-09
401.11.85	S100Y	9.87	8.23E-08

[0312] 根据Kabat对残基编号。<0.1E-10*表示构建体的KD低于检测极限。DNE-未表达(低于10RU);DNB-未结合;N/A-不可用。

[0313] 表9

[0314]

IgG	置换 VH	表达水平	KD (M)
401.11	N/A	103	1.75E-10
模拟 (Mock)	N/A	3	DNB
401.11.86	S100G	337	1.39E-10
401.11.87	G(100A)S	24	7.13E-09
401.11.88	G(100A)A	103	1.89E-09
401.11.89	G(100A)D	40	5.30E-09
401.11.90	G(100A)K	21	<0.1E-10*
401.11.101	P(100C)S	95	<0.1E-10*
401.11.102	P(100C)T	130	4.57E-10
401.11.103	P(100C)G	115	<0.1E-10*

[0315]

IgG	置换 VH	表达水平	KD (M)
401.11.104	P(100C)L	44	4.87E-10
401.11.105	P(100C)F	34	1.52E-03
401.11.106	P(100C)K	64	1.93
401.11.107	P(100C)Y	38	9.96E-10
401.11.108	P(100C)R	49	<0.1E-10*
401.11.109	P(100C)W	16	DNB
401.11.110	D(100D)K	59	2.47E-10
401.11.111	D(100D)R	19	<0.1E-10*
401.11.112	D(100D)S	95	2.43E-09
401.11.113	D(100D)G	59	6.79E-10
401.11.114	D(100D)L	121	1509.04
401.11.115	D(100D)Y	86	6.67E-10
401.11.116	D(100D)F	96	3.77E-08
401.11.117	D(100D)Q	164	1.33E-09
401.11.118	G(100E)S	68	<0.1E-10*
401.11.119	G(100E)A	24	8.77E-10
401.11.120	G(100E)V	DNE	N/A
401.11.121	G(100E)D	DNE	N/A
401.11.122	G(100E)K	30	1.30E-10
401.11.123	G(100E)R	22	2.39E-10
401.11.124	Y(100F)W	DNE	1.38E-09
401.11.125	Y(100F)F	33	5.35E-10
401.11.126	Y(100F)S	38	3.13E-11
401.11.127	Y(100F)Q	26	2.70E-09
401.11.128	Y(100F)E	DNE	N/A
401.11.129	Y(100F)R	DNE	N/A
401.11.130	Y(100F)K	DNE	N/A
401.11.131	S102D	38	2.00E-10
401.11.132	S102T	55	5.69E-10
401.11.133	S102W	53	1.67E-10
401.11.134	S102L	73	5.32E-10
401.11.135	S102V	85	4.21E-10
401.11.136	S102K	22	<0.1E-10*
401.11.137	S102R	49	9.38E-10
401.11.138	S102Y	48	1.71E-10
401.11.139	S102G	44	5.94E-10

[0316] 根据Kabat对残基编号。<0.1E-10*表示构建体的KD低于机器的检测极限。DNE-未表达(低于10RU);DNB-未结合;N/A-不可用。

[0317] 抗体401.11.86以超过401.11的水平三倍表达并具有与401.11相比对CD1d更高的亲和力。将该抗体纯化并采用基于细胞的效价测定测试对CD1d介导的NKT细胞释放细胞因子的功能性抑制(表10)。该测定使用初级人单核细胞衍生树突细胞或THP-1细胞作为CD1d-阳性抗原呈递细胞和 α GalCer-扩增NKT细胞的来源。试验规程如实施例6中所述。

[0318] 表10

[0319]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL)(THP-1)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL)(THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	3.754	0.857	2.885	6.862
401.11.86	1.289	0.359	0.509	1.74

[0320] 备注:THP-1-用作抗原呈递细胞的THP-1细胞;moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。数据代表5次独立实验。

[0321] 401.11.86,其与401.11的差别之处在于在位置100处将丝氨酸置换为甘氨酸,与401.11相比更为有效。随后生成含有由上述最有效抗体识别的置换的抗体(图13)。

[0322] 401.11的可变重链序列的氨基酸分析识别了数种可能发生氧化或异构化的氨基酸。特别强调置于存在于该抗体的CDR序列中的氨基酸,因为对这些氨基酸的任何改变可能经时影响该抗体的结合特性。在可变重链中,M96被识别为潜在的氧化位点,而D(100D)被识别为潜在的异构化位点。采用半保守或保守的氨基酸置换以试图去除这些可能存在问题的氨基酸残基(图13)。这些置换对所得抗体的结合亲和力的影响显示在表11中。

[0323] 表11

[0324]

抗体	亲和力 K_D (pM) SPR
401.11	752
401.11.151	1750
401.11.152	2830
401.11.154	1770
401.11.155	2420
401.11.156	223
401.11.157	173
401.11.158	189
401.11.159	30
401.11.160	109
401.11.161	255
401.11.165	168
401.11.166	173
401.11.167	170
401.11.177	507
401.11.178	468
401.11.179	274
401.11.180	312
401.11.181	427

[0325] 受试的许多抗体具有与原始抗体401.11相比改进的亲和力。这些抗体随后在测量对CD1d介导的NKT细胞释放细胞因子的功能性抑制的基于细胞的效价测定中进行测试。试验规程如实施例6中所述。在受试的19种抗体中,14种抗体始终表现出与401.11抗体相比类似或提高的效价。这些抗体变体具有与抗CD1d抗体42与51.1相比显著提高的效价——这两种均在10微克/毫升的最高浓度下表现出一定程度的抑制活性,但是在较低抗体浓度下未能表现出抑制。在下表12-16中给出了来自代表性试验的EC50值。

[0326] 表12

[0327]

抗体	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	7.633	6.545	22.75	19.55
401.11.151	12.89	N/D	57.49	N/D
401.11.152	10.2	N/D	78.49	N/D
401.11.154	4.159	N/D	17.73	N/D
401.11.155	27.64	N/D	74.72	N/D
401.11.156	1.948	N/D	5.217	N/D
401.11.157	N/D	0.799	N/D	3.871
401.11.158	N/D	0.58	N/D	3.844
401.11.159	N/D	1.694	N/D	10.47
401.11.160	N/D	1.564	N/D	6.519
401.11.161	N/D	5.244	N/D	8.381
阴性对照物	DNI	DNI	DNI	DNI

[0328] N/D-未测定;阴性对照物-具有不相关特异性的IgG1;moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞;DNI-未抑制,其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%。

[0329] 表13

[0330]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT TNF EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	39.38	17.33	47.48	83.08	16.91
401.11.156	7.763	2.716	5.856	9.528	4.507
401.11.157	9.112	3.437	8.492	20.6	5.589
401.11.158	8.165	2.187	6.13	9.823	4.3
42	>1000	136.9	286.5	DNI	DNI
51.1	>1000	DNI	DNI	DNI	DNI

[0331] 备注:moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞;DNI-未抑制,其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%。

[0332] 表14

[0333]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT TNF EC50 (ng/mL) (THP-1)
401.11	55.16	2.977	6.961	27.25	9.179
401.11.156	5.811	1.993	4.446	6.909	3.846
401.11.157	5.449	1.807	4.476	6.98	3.545
401.11.158	6.404	2.662	4.502	7.776	4.141
401.11.165	6.153	1.112	3.730	5.762	3.043
401.11.166	6.983	2.745	5.379	7.253	4.022
401.11.167	6.510	2.889	4.979	7.465	4.000
同种型对照 物	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

[0334] 备注：同种型对照物-不相关特异性IgG4；DNI-未抑制，其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%；THP-1-用作抗原呈递细胞的THP-1细胞；moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。

[0335] 表1 5

[0336]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	12.44	1.98	2.251	2.361
401.11.158	2.797	0.4322	0.7043	0.5981
401.11.177	7.556	0.7306	1.398	1.271
401.11.178	15.06	0.9685	1.381	1.764
401.11.179	30.2	0.7301	2.097	2.431
401.11.180	49.55	1.312	3.353	4.092
42	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI
同种型对照 物	DNI	DNI	DNI	DNI

[0337] 备注：同种型对照物-不相关特异性IgG4；DNI-未抑制，其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%；TITP-1-用作抗原呈递细胞的TITP-1细胞；moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。

[0338] 表16

[0339]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (THP-1)
401.11	23.5	2.335	12.83	1.36	3.286
401.11.158	3.004	2.602	1.160	2.203	4.354
401.11.181	2.634	3.255	1.102	3.195	5.04
42	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI
同种型对照物	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

[0340] 备注:同种型对照物-不相关特异性IgG4;DNI-未抑制,其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%;THP-1-用作抗原呈递细胞的THP-1细胞;moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。

[0341] 在使用CD14+单核细胞衍生树突细胞作为抗原呈递细胞的基于初级NKT细胞的效价测定中,与母体抗体401.11相比,衍生自401.11的抗体表现出提高的抑制活性。这由抑制曲线中的左移清晰地显示,其中衍生自401.11的抗体需要较低浓度以实现相同的对NKT细胞介导细胞因子释放的抑制(图14)。例如,由1微克/毫升滴定的抗体401.11.156和401.11.158与由1微克/毫升滴定的401.11相比分别表现出约5.1倍改进和4.8倍改进(图14和表13,参见IFN- γ EC50值)。在几种试验中,抗CD1d抗体42和51.1显示出最小抑制,使得无法计算真实的EC50值。在能够确定EC50值的试验中,由1微克/毫升滴定的衍生自401.11的抗体与抗CD1d抗体42和51.1相比表现出显著提高的效价。这些抗体在10微克/毫升的最高浓度下表现出抑制活性,但是在较低抗体浓度下未能表现出抑制(图14和表13;参见IFN- γ EC50值)。

[0342] 总之,衍生自401.11的完全人优化的抗CD1d抗体被识别并在天然表达CD1d抗原的初级人细胞背景中表现出对NKT细胞活性的高度有效的抑制。这些抗体与抗CD1d抗体42和51.1相比表现出显著提高的效价。

[0343] 优化402.8抗体

[0344] 402.8的可变重链和轻链的氨基酸分析识别了几种有可能经历氧化、异构化或脱酰胺的存在于重链中的几种氨基酸(Wang等人,2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1-26)。这些包括在重链中的N(100B)处的潜在脱酰胺位点,在D101处的潜在异构化位点和在W(100A)与M(100E)处的潜在氧化位点。在重链中在N52处识别了潜在的N-联糖基化位点。为了除去潜在的脱酰胺、氧化和异构化位点,进行氨基酸置换:W(100A)Y、N(100B)K、M(100E)L、D(101)E。通过引入N54A(其扰乱N-联糖基化基序NX(S/T),其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸)除去潜在的N-联糖基化位点。以图15中所示的可变重链中的这些氨基酸置换的组合制备抗体。各抗体重链与402.8轻链(SEQ ID NO:4)一起共同转染到HEK-

293E细胞中,通过蛋白质A色谱法纯化并使用SPR测量各抗体的亲和力(表17)。随后在使用初级人单核细胞衍生树突细胞和自体 α GalCer-增殖NKT细胞的基于细胞的效价测定中测试这些抗体(表18和19)。

[0345] 表17

IgG	K_D (pM)
402.8	145
402.8.53	578
402.8.54	870
402.8.55	878
402.8.60	198
402.8.84	587
402.8.86	357
402.8.87	344

[0347] 表18

IgG	NKT IFN-γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
402.8	0.105	0.154
402.8.53	0.658	1.524
402.8.60	0.244	0.189
402.8.84	0.516	0.663
42	116.0	17.54
阴性对照 物	DNI	DNI

[0349] 备注:阴性对照物-不相关特异性IgG1;DNI-未抑制,其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%;moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。

[0350] 表19

[0351]

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)
402.8	14.96	22.45	4.358	0.273
402.8.53	277.2	105.4	ND	ND
402.8.54	137.6	109.1	ND	ND
402.8.55	444.6	175	ND	ND
402.8.60	24.68	26.8	ND	ND
402.8.84	ND	ND	30.64	0.593
402.8.86	ND	ND	14.31	0.721
402.8.87	ND	ND	25.91	1.008
42	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI
阴性对照 物	DNI	DNI	ND	ND

[0352] 备注：阴性对照物-不相关特异性IgG1；DNI-未抑制，其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%；moDC-用作抗原呈递细胞的初级单核细胞衍生树突细胞。

[0353] 衍生自402.8的这些变体抗体表现出对 α GalCer介导的初级NKT细胞释放细胞因子的强抑制。通过对NKT细胞驱动细胞因子释放的剂量依赖性抑制所测定的那样，一些变体抗体表现出与402.8相比降低的效价，而其它抗体保持了类似效价。在多个试验中，抗CD1d抗体42和51.1表现出最小抑制，以至于真实的EC50值无法计算（表19）。在可以测定EC50值的试验中，衍生自402.8的抗体具有与抗CD1d抗体42相比显著提高的效价，其在10微克/毫升的最高浓度下表现出一些抑制活性，但是在较低的抗体浓度下不能保持抑制活性（图16和表18）。该结果因此表明，在自然表达该CD1d抗原的初级人细胞的背景中，基于母体抗体402.8的优化抗CD1d抗体表现出与抗CD1d抗体42和51.1相比在有效中和活性方面的显著提高和与402.8相比类似的中和活性。

[0354] 实施例12——在使用替代 α -半乳糖苷神经酰胺的抗原的基于初级NKT细胞的测定中测试抗CD1d抗体的效力

[0355] 实施例6中描述的基于细胞的效价测定使用 α GalCer作为糖脂抗原。这表明，该抗CD1d抗体在替代 α GalCer的糖脂抗原的背景中具有抑制活性，支持了以下概念：此类高度有效的中和抗CD1d抗体在远离脂质和/或糖脂可能存在的区的位置处结合CD1d。自然界中发现的该CD1d限制性脂质和糖脂抗原在化学结构上不同于 α GalCer，因此其可用于证明本发明中描述的抗CD1d抗体在具有不同化学结构的糖脂抗原的背景中保持了抑制活性。此外，其可用于表征潜在的自体抗原的抑制活性，即在哺乳动物背景中发现的那些。

[0356] 仅仅表征了具有对NKT细胞的活性的少量的糖脂抗原。这些包括iGb3和溶血磷脂

胆碱,但是,此类抗原仅具有弱的NKT细胞活化。该内源性脂质—— β -D-吡喃葡萄糖基神经酰胺——的C24:1N-酰基变体(下文中称为C24:1 β -GluCer)被描述为具有对人NKT细胞的活性。进行了基于细胞的效价测定以表征在替代 α GalCer的该抗原的背景中这种专有抗CD1d抗体的抑制活性(Brennan, P.J. 等人, 2011 Nat Immunol 12:1202-1211)。

[0357] 测定方法与结果

[0358] β -D-吡喃葡萄糖基神经酰胺的C24:1N-酰基变体(Avanti; D-葡萄糖基- β -1,1'-N-(15Z-二十四碳酰基)-D-赤型-鞘氨醇N-(15Z-二十四碳酰基)-1- β -葡萄糖基-鞘氨-4-烯(D-glucosyl- β -1,1'-N-(15Z-tetracosenoyl)-D-erythro-sphingosine N-(15Z-tetracosenoyl)-1- β -glucosyl-sphing-4-ene))以5毫克/毫升在37°C下溶解在DMSO中2小时,随后储存为小等分试样。

[0359] 为了进行使用C24:1 β GluCer的基于细胞的效价测定,如实施例6所述用 α GalCer扩增的NKT细胞。尽管在 α GalCer存在下被刺激,这些NKT细胞保持对C24:1 β GluCer的功能活性,表明生成的NKT细胞系的TCR特异性在人CD1d的背景下也允许C24:1 β -GluCer识别。通过流式细胞计量术将NKT细胞表型化,并且如果该NKT细胞的纯度超过70%,其仅用于基于细胞的效价测定。

[0360] 如实施例6中描述地生成单核细胞衍生的树突细胞。这些细胞以每孔 2×10^4 个细胞在96孔平底板中培养,并用C24:1 β GluCer以10微克/毫升装载24小时。以始于1微克/毫升的递减浓度制备抑制性抗CD1d抗体401.11.158、401.11和402.8,并以始于10微克/毫升的递减浓度制备抑制性抗体42、51.1和阴性对照物抗体,并随后加入到装载C24:1 β GluCer的树突细胞培养物中1小时。随后,以1:1的与树突细胞的比率加入NKT细胞。二十四小时后,测定不含细胞的上清液的IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-13和TNF释放。作为实例,在该测定中测试401.11、401.11.158和402.8。将不相关的特异性阴性对照物抗体用作阴性对照物,抗CD1d抗体42(BD Biosciences)和51.1(eBioscience)用作阳性对照物。该42和51.1抗体与抗体401.11、401.11.158和402.8在该初级细胞基测定中表现出对C24:1 β GluCer诱导的初级人NKT细胞释放细胞因子的抑制(IFN- γ 和IL-4曲线显示在图17中)。相比较而言,该阴性对照物抗体表现出对NKT细胞释放细胞因子的可忽略的抑制。

[0361] 抗体42和51.1在高剂量(10微克/毫升)下显示出对NKT细胞释放细胞因子的一定程度的抑制,但是这种效果在较低剂量下并未保持。与抗体42相比,抗体401.11.158、401.11和402.8分别表现出高达216倍、高达58倍和高达139倍的提高的效价(图17和表20)。与抗体51.1相比,抗体401.11.158、401.11和402.8分别表现出高达175倍、高达47倍和高达112倍的提高的效价(图17和表20;参见IFN- γ 测定EC50值)。

[0362] 表20

[0363]

	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)	TNF- α EC50 (ng/mL)
401.11	2.376	1.452	1.231	5.549	1.793
402.8	0.9945	0.6364	0.9292	2.938	1.507
401.11.158	0.6397	0.6822	0.8679	1.439	0.8422
42	138.5	133.1	81.89	52.33	5.692
51.1	111.8	113.1	86.43	66.77	29.72
阴性对照物	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

[0364] 阴性对照物：导向除CD1d之外的目标的IgG4同种型的抗体；DNI-未抑制，其中该抗体的抑制活性通常低于1微克/毫升下人NKT细胞的最大响应的50%。

[0365] 实施例13——衍生自402.8和401.11的抗体共享CD1d上的共同表位，该共同表位未被抗CD1d抗体共享

[0366] 基于实施例7，在基于竞争的ELISA中测试402.8和401.11的变体，以及市售来源的抗CD1d抗体。首先表明，402.8的生物素化版本与非生物素化抗体401.11竞争，但是不与抗体42和51.1竞争。下面描述该工作。

[0367] 测定方法

[0368] 使用EZ-link Sulfo-NHS-LC-生物素试剂盒(Pierce)以3:1的生物素:402.8的比率将抗CD1d抗体402.8生物素化。通过用PBS多次洗涤并经具有30kDa筛截的离心过滤器(Millipore)通过离心(3000rpm)浓缩从该蛋白质制剂中除去游离的生物素。用1.0微克/毫升的人CD1d涂布Maxisorp ELISA板(Nunc)并让其在4℃下过夜培育。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次，随后将该板在室温下在1%的BSA中封闭1小时。生物素化402.8随后以1:1的比例与非生物素化的抗CD1d抗体一起共同平衡5分钟。将这些抗体以始于40微克/毫升(即与0.2微克/毫升生物素化402.8相比过量最大200倍)的两倍递减浓度在室温下添加到该板中1小时，具有最终稀释下的空白孔(即仅含有生物素化的402.8抗体)。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次。链霉亲和素辣根过氧化物酶偶联物(BD Biosciences)在黑暗中以室温下添加到该板中1小时。洗涤该板以除去未结合的链霉亲和素辣根过氧化物酶。通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50 μ L1M HCl猝灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(FluoStar Galaxy)在A450nm下读数。结果表示为原始A450nm值，并通过从原始数据中减去对应于0%抑制的读数转化为竞争度(百分比)值。

[0369] 为了确定该方法生成类似于如实施例7中所述的结果，生物素化抗体402.8与401.11以及抗CD1d抗体42和51.1竞争与人CD1d的结合。在这些测定条件下，如450nm处的吸光度值(图18A)和与402.8的竞争度(图18B)所示，402.8和401.11竞争与CD1d结合，并因此显而易见的是这些抗体共享hCD1d上的重叠表位或共同表位。相反，402.8不与42或51.1共享重叠表位或共同表位。总而言之，这个测定表明，高度有效的抗CD1d抗体402.8和401.11结合了并未被抗CD1d抗体42与51.1共享的类似高亲和力中和表位。

[0370] 使用该修改的测定，生物素化抗体402.8与下列抗体(实施例11中所述)竞争与重组人CD1d的结合：401.11.24、401.11.26、401.11.28、401.11.86、401.11.151、401.11.152、

401.11.154、401.11.155、401.11.156、401.11.157、401.11.158、401.11.159、401.11.160、401.11.161、401.11.165、401.11.166、401.11.167、401.11.179、401.11.180、401.11.181、402.8.45、402.8.53、402.8.60、402.8.84、402.8.86和402.8.87。如450nm处的吸光度值和转化的与402.8的竞争百分比所示,所有这些抗体均与生物素化402.8竞争与人CD1d的结合。特别地,如通过显示450nm处的吸光度值(图19A)和竞争度(图19B)的图所证明的那样,抗体401.11.160、401.11.161和401.11.165与生物素化402.8强烈竞争,如通过显示450nm处的吸光度值(图20A)和竞争度(图20B)的图所证明的那样,抗体402.8.84、402.8.86和402.8.87也类似。

[0371] 测试与附加抗CD1d抗体的竞争

[0372] 为了研究衍生自402.8或401.11的抗体是否与其它抗CD1d抗体竞争,测试了总计23种市售来源的抗CD1d抗体。这些抗体包含抗人CD1d单克隆抗体、抗鼠CD1d单克隆抗体和多克隆抗-人CD1d抗体。这些抗体的细节描述在表21中。大鼠抗-鼠抗体杂交瘤HB-321、HB-322、HB-323、HB-326和HB-327来源于American Type Culture Collection并根据供应商的说明进行传代。衍生自这些细胞系的抗体通过ProteinG亲和力和色谱法纯化并验证与小鼠CD1d的结合(未显示)。

[0373] 表21中描述的23种抗CD1d抗体均不与402.8竞争与人CD1d的结合,如通过450nm处的吸光度值和与402.8的竞争百分比所示。图21-23中显示了这些结果的实例。该抗-人CD1d抗体AD58E7、C3D5和C-9不与402.8竞争与人CD1d的结合,如通过450nm处的吸光度读数(图21A)和转化的竞争度值(图21B)所示。作为这些结果的另一实例,抗鼠CD1d抗体HB-321、HB-322和HB-323不与402.8竞争与人CD1d的结合,如通过450nm处的吸光度读数(图22A)和转化的竞争度值(图22B)所示。类似地,作为多克隆抗人CD1d抗体的实例,C-19、H70和Ab96515不与402.8竞争与人CD1d的结合,如通过450nm处的吸光度读数(图23A)和转化的竞争度值(图23B)所示。值得注意的是,受试的多克隆抗CD1d抗体均不与402.8竞争与人CD1d的结合。这些数据表明,作为受试的高度有效的新型抗CD1d抗体,高度有效的抗CD1d抗体402.8结合到没有被广泛列举的受试抗CD1d抗体共享的类似高亲和力中和表位。

[0374] 表21

[0375]

抗体编号	克隆或目录号	同种型	特异性	来源
1	NOR3.2	小鼠单克隆	人 CD1d	Pierce
2	AD5-8E7	小鼠单克隆	人 CD1d	Miltenyi Biotec
3	C3D5	小鼠单克隆	人 CD1d	Santa Cruz Biotechnology
4	C-9	小鼠单克隆	人 CD1d	Santa Cruz Biotechnology
5	G10	小鼠单克隆	人 CD1d	Santa Cruz Biotechnology
6	3H649	小鼠单克隆	人 CD1d	Santa Cruz Biotechnology
7	LS-C122839	小鼠单克隆	人 CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
8	LS-C4448	小鼠单克隆	人 CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
9	LS-C4449	小鼠单克隆	人 CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
10	LS-C122840	大鼠单克隆	鼠 CD1d	LifeSpan Biosciences, Inc.
11	1B1	大鼠单克隆	鼠 CD1d	BD Biosciences
12	HB-321 (克隆 19F8)	大鼠单克隆	鼠 CD1d	American Type Culture Collection
13	HB-322 (克隆 15F7)	大鼠单克隆	鼠 CD1d	American Type Culture Collection
14	HB323 (克隆 20H2)	大鼠单克隆	鼠 CD1d	American Type Culture Collection
15	HB-326 (克隆 15C6)	大鼠单克隆	鼠 CD1d	American Type Culture Collection
16	HB-327 (克隆 4C4)	大鼠单克隆	鼠 CD1d	American Type Culture Collection
17	3C11	大鼠单克隆	鼠 CD1d	BD Biosciences
18	K253	小鼠单克隆	鼠 CD1d	Biolegend
19	C-19	山羊多克隆	人 CD1a, CD1b, CD1d	Santa Cruz Biotechnology
20	H70	兔多克隆	人 CD1d	Santa Cruz Biotechnology
21	Ab96515	兔多克隆	人 CD1d	AbCam
22	GTX104898	兔多克隆	人 CD1d	GeneTex
23	1401052	鼠多克隆	人 CD1d	Sigma Aldrich

[0376] 作为上述实施例的附属,使用衍生自401.11的抗体的生物素化版本进行扩展试验。进行该试验以证明与402.8竞争与人CD1d结合的抗体也可以在修改的测定(amended assay)中用作生物素化反应物,并显示出相同的结果。在下面的描述中,修改该测定以将401.11.158——401.11衍生抗体的实例——生物素化并与402.8和其它抗CD1d抗体42与51.1竞争。

[0377] 测定方法

[0378] 使用EZ-link Sulfo-NHS-LC-生物素试剂盒(Pierce)以3:1的生物素:401.11.158的比率将抗CD1d抗体401.11.158生物素化。通过用PBS多次洗涤并经具有30kDa筛截的离心过滤器(Millipore)通过离心(3000rpm)浓缩从该蛋白质制剂中除去游离的生物素。用1.0

微克/毫升的人CD1d涂布MaxisorpELISA板(Nunc)并让其在4℃下过夜培育。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次,随后将该板在室温下在1%的BSA中封闭1小时。生物素化401.11.158随后以1:1的比率与非生物素化的抗CD1d抗体(401.11.158、402.8、401.11, 42和51.1)一起共同平衡5分钟。将这些抗体以始于40微克/毫升(即与0.2微克/毫升生物素化401.11.158相比过量最大200倍)的两倍递减的浓度在室温下添加到该板中1小时。随后在含有0.1%的吐温20的PBS中洗涤该板三次。链霉亲和素辣根过氧化物酶偶联物(BD Biosciences)在黑暗中在室温下添加到该板中1小时。洗涤该板以除去未结合的链霉亲和素辣根过氧化物酶。通过用50微升3,3',5,5'-四甲基联苯胺(KPL)培育并用50μL1M HCl淬灭以显现测定信号。测定信号使用酶标仪(FluoStarGalaxy)在A450nm下读数。结果表示为原始A450nm值,并通过从原始数据中减去对应于0%抑制的读数转化为竞争度(百分比)值。

[0379] 使用上述方法,如通过450nm处的吸光度读数(图24A)和与401.11.158的竞争度(图24B)所示,401.11.158和402.8竞争与人CD1d的结合,并因此共享重叠表位或共同表位。相反,401.11.158不与42或51.1共享重叠表位或共同表位。总而言之,这些数据表明,高度有效的抗CD1d抗体401.11.158和402.8可以结合到不被具有较低效价的现有技术抗体42与51.1共享的类似高亲和力中和表位。

[0380] 实施例14——表位图谱(mapping)试验

[0381] 方法

[0382] 制备FAb

[0383] 根据制造商说明书使用FAb制备试剂盒(Pierce)通过木瓜蛋白酶消化制备抗CD1d抗体402.8与401.11.165的FAb。通过让样品在用磷酸盐缓冲盐水(1XPBS)pH7.0平衡的ProteinA柱上通过并收集流出物(flow-through),由此从含有Fc的蛋白质(可结晶片段)中除去完整的FAb。随后通过使用TSK凝胶G3000SWx1柱(TOSOH)的尺寸排阻色谱法(SEC)在0.5毫升/分钟下用1XPBS作为电泳缓冲液(running buffer)分析该FAb。结果表明,该FAb纯度>95%。

[0384] FAb-CD1d结合ELISA

[0385] 为了证实FAb与人CD1d的结合,进行ELISA,其中人CD1d在PBS中的1微克/毫升涂布到Maxisorp板(NUNC)上在4℃下过夜。随后用含有0.05%吐温-20的1XPBS(Sigma)单独洗涤孔三次。用1%的PBS中的BSA在室温下封闭孔1小时。随后如上所述用1XPBS洗涤孔。随后由10微克/毫升的浓度开始进行FAb或全长抗体的滴定,并在该板上进行1:4系列的稀释。包括仅有PBS的对照物。该板在室温下培育1小时并随后如前所述洗涤孔。在1XPBS中以1:2000的稀释比添加每孔100微升的第二抗体(山羊抗人Kappa F+B HRP0 Conjugate,Invitrogen)并在室温下培育1小时,随后如前所述洗涤孔。添加50微升的TMB(Sigma)并培育该板直至显色。通过向各孔中添加50微升1M HCl来终止反应。在450nm处读取吸光度(在620nm处参照)。

[0386] H/D交换试验

[0387] 人CD1d在1XPBS(pH7)中稀释至12.8μM的浓度。其随后与14.1μM浓度下的402.8或401.11.165的FAb片段混合。将14微升该溶液与26微升的在D2O(其中D是氘)中的50mM磷酸盐pH7混合。制备单独的溶液并在23℃下培育30、100、300或1000秒。在培育期结束时,向各溶液中加入20微升的2M脲、1MTCEPpH3.0。样品随后在H₂O中0.05%的三氟乙酸(TFA)中以200微升/分钟流经固定的胃蛋白酶柱。将消化性的片段装载到反相捕捉柱上并用0.05%在H₂O

中的TFA脱盐3分钟。通过具有13%至35%的缓冲液(包含95%乙腈、5% H_2O 、0.0025%TFA)的线性梯度的C18柱经23分钟分离肽。随后通过质谱法以轮廓模式分析该肽。通过将32.2微升0.615毫克/毫升CD1d与59.8微升100mM在 D_2O 中的TCEP混合并在60℃下培育3小时,由此制备全氘化对照样品。

[0388] CD1d突变蛋白ELISA

[0389] 所有溶液以50微升/孔添加。将CD1d(野生型)和相关构建体(例如突变蛋白质或具有氨基酸置换的CD1d)以PBS中的1微克/毫升在4℃下涂布在96孔MaxisorpELISA板(NUNC)上过夜。该孔随后用洗涤缓冲液(PBS+0.05%吐温-20)洗涤三次。该板在室温下在封闭缓冲液(PBS+1%BSA)中封闭1小时并随后洗涤三次。将抗体稀释剂(PBS+1%BSA+0.05%吐温20)中的抗体由10微克/毫升开始以半对数滴定添加到孔中,包括无抗体(0微克/毫升)作为阴性对照物。该板随后在室温下培育1小时。随后如上所述洗涤该板。在抗体稀释剂中以1:2000的稀释比添加第二抗体(HRP-山羊抗人IgG(H+L), Invitrogen)并在室温下培育1小时。在洗涤该板后,向各孔中添加50微升的TMB(Sigma)。在显色后添加50微升1MHC1来终止反应。在450nm处读取该板各孔的吸光度(在620nm处参照)。

[0390] 结果:

[0391] 生产402.8和401.11.165的FAb

[0392] 使用木瓜蛋白酶消化,将402.8和401.11.165的FAb分离。如通过尺寸排阻色谱法(SEC)测得的那样,该构建体具有>95%的纯度。当在ELISA中测试时,该FAb保持与人CD1d的结合(图25)。

[0393] H/D交换试验

[0394] 使用上述H/D交换方法,将FAb形式的抗体402.8和401.11.165复合到人CD1d上,随后在 D_2O 中培育。这在CD1d分子上将氢交换为氘,除了在其中该抗体已经与CD1d结合和 D_2O 无法到达的位置中。在不存在抗体的情况下人CD1d与 D_2O 一起单独培育,来自两个样品的CD1d经胰蛋白酶(trypic)消化并随后经质谱法分析。对于使用和不使用FAb402.8和401.11.165的交换试验在CD1d的各片段中氘化水平的差异分别显示在下表22和23中。在下面列举了这些试验中使用的CD1d的胞外域的序列:

[0395]

EVPQRLFPLRCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTHSWNSDSTVRSCLKPWSQGTFSQQWETLQHIFRVYRSSFT
RDVKEFAKMLRLSYPLELQVSAGCEVHPGNASNNFFHVAFAQGKDILSFQGTSEPTQEAPLWVNLAIQVLNQDKWTR
ETVQWLLNGTCPQFVSGLLESGKSELKKQVKPKAWLSRGPSPGPGRLLLVCHVSGFYPKPVWVKWMRGEQEQGTQP
GDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSCRVKHSSLEGQDIVLYWGGSYTSGLVPRGSGSKRVHHHHHHHHH(SEQ
ID NO:19)

[0396] 表22:对于使用或不使用FAb402.8的交换试验CD1d各片段中氘化水平的差异

[0397]

肽		培育时间(s)					肽		培育时间(s)				
始	终	30	100	300	1,000	平均	始	终	30	100	300	1,000	平均
3	11	-3%	-1%	-2%	0%	-2%	204	216	1%	0%	2%	0%	1%
3	16	-3%	-3%	0%	-3%	-2%	206	216	2%	1%	4%	0%	2%
12	16	-2%	-6%	4%	-8%	-3%	219	224	1%	1%	1%	2%	1%
16	18	5%	-12%	-18%	-9%	-9%	219	239	1%	2%	-2%	1%	0%
16	28	-3%	-9%	-15%	-10%	-9%	219	242	0%	1%	-1%	1%	0%
19	28	-6%	-8%	-13%	-10%	-9%	225	242	0%	1%	-2%	0%	0%
31	34	-2%	0%	-1%	2%	0%	244	248	1%	0%	-2%	0%	0%
31	36	1%	-4%	-1%	1%	-1%	245	248	1%	1%	-1%	0%	0%
35	36	7%	-12%	0%	-1%	-2%	251	259	3%	-1%	0%	4%	1%
48	61	-2%	1%	-1%	2%	0%	251	271	0%	3%	-2%	-1%	0%
48	62	-1%	2%	2%	2%	1%	261	271	-3%	-4%	-2%	2%	-2%
64	76	3%	-2%	2%	-1%	1%	274	303	-3%	0%	-2%	0%	-1%
65	76	4%	-2%	0%	-1%	0%	277	303	-5%	0%	-2%	0%	-2%
79	86	-1%	-6%	-14%	-22%	-11%	326	332	-2%	1%	-2%	0%	-1%
89	94	-50%	-46%	-44%	-44%	-46%	326	345	0%	0%	-2%	0%	-1%
89	95	-58%	-61%	-58%	-52%	-57%	335	345	-1%	0%	-2%	1%	-1%
114	119	0%	-9%	-19%	-16%	-11%	348	359	0%	-1%	0%	-1%	-1%
114	123	-3%	-6%	-12%	-10%	-8%	351	359	1%	-2%	0%	1%	0%
115	123	-5%	-11%	-15%	-12%	-11%	360	362	1%	4%	1%	1%	1%
120	123	-7%	-2%	-1%	-2%	-3%	360	377	0%	1%	-4%	-3%	-1%
126	139	-7%	-3%	-3%	-3%	-4%	365	377	0%	0%	-2%	2%	0%
126	142	-13%	-9%	-10%	-9%	-10%	380	385	-3%	-4%	-4%	-1%	-3%
141	142	-43%	-45%	-36%	-25%	-37%	382	385	-5%	-3%	-3%	-2%	-3%
145	155	-7%	-8%	-9%	-10%	-9%	388	389	0%	0%	0%	-1%	0%
146	155	-7%	-5%	-16%	-13%	-10%	388	390	0%	0%	-1%	-1%	0%
158	172	-3%	-5%	-6%	-7%	-5%	392	401	3%	1%	-2%	1%	1%
175	188	2%	1%	-2%	-1%	0%	392	402	3%	1%	-3%	0%	0%
175	190	2%	2%	-3%	1%	0%	404	422	-1%	0%	-2%	0%	-1%
191	201	-1%	1%	-3%	1%	-1%	406	422	0%	0%	-3%	-2%	-1%
193	201	2%	-1%	-4%	3%	0%							

[0398] 对50%的具有最低%氘差别的肽计算平均值±标准偏差(S.D.)%氘差别。比平均值-3S.D.较低的值被认为是明显的。整个数据组的该平均值(50%)-3S.D.%氘差别为0%。在与402.8复合时具有最大受保护区的CD1d序列是：

[0399] SEQ ID NO:116的89-95——LSYPLEL

[0400] SEQ ID NO:116的141-142——NL

[0401] 表23:对于使用或不使用FAb401.11.165的交换试验CD1d各片段中氘化水平的差异

[0402]

肽		培育时间(s)					肽		培育时间(s)				
始	终	30	100	300	1,000	平均	始	终	30	100	300	1,000	平均
3	11	1%	-1%	-1%	-1%	0%	193	201	4%	2%	-4%	-2%	0%
3	16	2%	-3%	2%	-2%	0%	204	216	1%	2%	1%	0%	1%
12	16	3%	-6%	5%	-3%	0%	206	216	3%	2%	2%	-1%	2%
16	18	3%	-1%	4%	3%	2%	219	224	2%	2%	2%	2%	2%
16	28	1%	0%	0%	0%	0%	219	239	-1%	2%	0%	-1%	0%
19	28	1%	0%	-1%	-1%	0%	219	242	2%	1%	0%	-1%	0%
31	34	1%	0%	0%	1%	1%	225	242	2%	0%	-1%	-2%	0%
31	36	1%	0%	1%	-1%	0%	244	248	1%	0%	-1%	0%	0%
35	36	1%	-1%	1%	-6%	-1%	245	248	2%	1%	-1%	-1%	0%
48	61	-	-	-	-	-	251	259	6%	0%	2%	-1%	2%
48	62	4%	0%	0%	-4%	0%	251	271	0%	4%	0%	-4%	0%
64	76	6%	2%	5%	2%	4%	261	271	1%	-2%	3%	4%	1%
65	76	4%	2%	3%	-1%	2%	274	303	1%	0%	0%	-1%	0%
79	86	2%	2%	-3%	-5%	-1%	277	303	0%	0%	-1%	-1%	0%
89	94	-14%	-10%	-12%	-19%	-14%	326	332	2%	1%	-1%	-2%	0%
89	95	-	-	-	-	-	326	345	2%	0%	-1%	-1%	0%
114	119	-	-	-	-	-	335	345	2%	-1%	-1%	-1%	0%
114	123	6%	9%	6%	6%	7%	348	359	3%	-1%	1%	-3%	0%
115	123	11%	10%	9%	10%	10%	351	359	2%	0%	1%	-2%	0%
120	123	-	-	-	-	-	360	362	2%	4%	2%	-1%	2%
126	139	-13%	-14%	-10%	-10%	-12%	360	377	2%	1%	0%	-1%	1%
126	142	-23%	-19%	-19%	-22%	-20%	365	377	3%	0%	-1%	0%	1%
141	142	-69%	-70%	-61%	-67%	-67%	380	385	-2%	-5%	-4%	-4%	-4%
145	155	0%	4%	-2%	-6%	-1%	382	385	-3%	-3%	-3%	-3%	-3%
146	155	-	-	-	-	-	388	389	0%	0%	0%	-1%	0%
158	172	4%	6%	5%	1%	4%	388	390	1%	0%	0%	-1%	0%
175	188	1%	3%	1%	0%	1%	392	401	5%	1%	-1%	-1%	1%
175	190	2%	1%	-3%	-2%	0%	392	402	4%	1%	-3%	-1%	0%
191	201	1%	1%	-1%	0%	0%	404	422	2%	0%	0%	-1%	0%
							406	422	3%	1%	-1%	-1%	0%

[0403] 类似于401.11.165,对50%的具有最低%氘差别的肽计算平均值±标准偏差(S.D.)%氘差别。低于平均值-3S.D.的值被认为是显而易见的。整个数据组的该平均值(50%)-3S.D.%氘差别为-5%。在与401.11.165复合时具有最大受保护区的TCD1d序列是:

[0404] SEQ ID NO116的89-94——LSYPLE

[0405] SEQ ID NO116的126-142——QGTSWEPTQEAPLWVNL

[0406] 虽然具有不同的初级氨基酸序列,401.11.165与402.8在结合人CD1d时保护了该分子的类似区。这些区(统称为表位)包括在序列LSYPLE(SEQ ID NO 116的89-94)周围的

CD1d的区。区QGTSWEPTQEAPLWVNL(SEQ ID NO:116的126-142)在上述H/D交换试验中也受到保护,并且在此类更大区中的几个氨基酸NL(SEQ ID NO:116的141-142)受到高度保护。

[0407] 为了证实人CD1d上的序列LSYPLE(SEQ ID NO:116的89-94)和NL(SEQ ID NO:116的141-142)对于本文中所述抗CD1d抗体的结合是否重要,制备了一系列CD1d构建体。这些构建体列示在图26中并描述在下面:

[0408] -hCD1dmu(SEQ ID NO:119)——人CD1d,其中位于位置87至93(LRLSYPL)和141至143(NLA)之间的氨基酸已经被具有根据人CD1d(SEQ ID NO:116)编号的位置的小鼠CD1d序列(分别为MSPKEDYPI和DLP)取代。

[0409] -mCD1dhu(SEQ ID NO:118)——小鼠CD1d,其中位于位置85至93(MSPKEDYPI)和141至143(DLP)之间的氨基酸已经被具有根据小鼠CD1d(SEQ ID NO:117)编号的位置的人CD1d序列(分别为LRLSYPL和NLA)取代。

[0410] 所有CD1d构建体在HEK-293E细胞中表达并在ELISA形式中通过针对人或小鼠CD1d的多克隆抗体检测。将人CD1d、小鼠CD1d、mCD1dhu和hCD1dmu涂布到ELISA板上并检测抗体402.8和401.11.158与这些CD1d构建体的结合。两种抗体均与人CD1d结合但不结合小鼠CD1d(图27)。它们均结合已经向其中引入人类序列的小鼠CD1d(mCD1dhu),表明这些人类序列氨基酸对抗体与CD1d结合而言至关重要(图27)。同样地,当人CD1d上的这些氨基酸被相应位置处的小鼠序列取代时(hCD1dmu),该抗体不再结合该CD1d构建体(图27)。总之,这些结果表明,89-95和141-143之间的人CD1d的序列在这些抗CD1d抗体结合的表位中。

[0411] 这些区全体构成可能的结合位点或表位,其上抗CD1d抗体与人CD1d结合。当在人CD1d(如3HUJ:PDB数据库)的X射线晶体结构上分析该区时可以看出,尽管这些个别区在初级氨基酸序列上很远,它们均在蛋白质三级结构中位于彼此靠近(图28A)。LSYPLE(89-94)和NL(141-142)位于存在于CD1d中并有助于向NKT细胞受体呈递脂质的 α -螺旋上或附近。这个表位位于靠近人CD1d上的NKT细胞受体 β 链的结合位点(图28B)。结合到CD1d上的该位置的抗体能够竞争并抑制CD1d-NKT细胞受体 β 链相互作用。此类抑制将防止生成CD1d与NKT细胞受体复合物并由此防止NKT细胞的下游活化。

[0412] 实施例15——食蟹猴中的哮喘的猪蛔虫(*Ascaris suum*)模型

[0413] 在哮喘的食蟹猴模型中研究抗CD1d抗体的疗效。在该试验规程中,用烟雾化的*A.suum*提取物攻击对线虫寄生虫猪蛔虫(*Ascaris suum*)敏化的动物以高度模仿人体内急性哮喘加剧的病因学的方式诱发急性支气管收缩和随后发生的嗜酸性炎症与气道过度反应性。已有描述此类试验规程(Hart,T.等人,(2001)*JAllergy Clin Immunol*1108:250-257)。该模型的特点是慢性人类哮喘的许多特征,包括粘液细胞增生、上皮纤维化、基层细胞膜增厚和对乙酰甲胆碱的持续的基线过度反应性。在用*A.suum*提取物攻击之前给予抗体治疗,并对以下的治疗效果可以进行评估:气道阻力和顺应性,PC50、PCO2和O2水平、血清IgE和支气管肺泡灌洗(BAL)测量,如IL-4、IL-5与IL-13的浓度和白细胞亚群(例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞)的相对频率。

[0414] 实施例16:肺部炎症的替代动物模型

[0415] 气道过度反应性的猕猴模型

[0416] 在气道过度反应性模型中可以测试抗CD1d抗体的疗效和安全性。例如,可以通过用屋尘螨抗原(来自*Dermatophagoides farinariae*)的连续攻击在猕猴(*Macaca mulatta*)体

内诱发气道过度反应性(Seshasayee,D.等人,2007J Clin Invest 117,3868-78)。通过用屋尘螨提取物攻击诱发哮喘加剧(其特征在于咳嗽、快速浅呼吸和提高的气道阻力)。症状可以通过药理学干涉,例如阿布特诺气雾剂治疗来逆转。可以测量响应乙酰甲胆碱攻击的肺功能,例如气道阻力和动态顺应性。在用屋尘螨抗原再次攻击前给予抗体治疗,并评估通过乙酰甲胆碱攻击测定的肺功能。

[0417] 在 α -GalCer诱发气道过度反应性的食蟹猴模型中评价抗CD1d抗体

[0418] 可以使用公开的气道过度反应性食蟹猴模型测试抗CD1d抗体的疗效和安全性(Matangkasombut,P.等人,2008J Allergy Clin Immunol,121,1287-9)。在该模型中,通过肺雾化器用特定NKT细胞激动剂 α -半乳糖苷神经酰胺(α -GalCer)向已经用猪蛔虫敏化的食蟹猴给药。该 α -GalCer治疗诱发气道过度反应性,如通过上述的乙酰甲胆碱攻击所确定的那样。

[0419] 在用 α -GalCer再次攻击前给予抗体治疗,并通过乙酰甲胆碱攻击评估肺功能。此外,对支气管肺泡灌洗(BAL)液体样品分析与气道炎症相关的介质存在,例如可以评估BAL中IL-4、IL-5和IL-13的浓度。此外,通过标准临床病理技术,如使用自动血液分析仪(例如Advia系统)进行细胞分析以测定主要白细胞亚群(如嗜中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞)的相对频率,由此检查BAL中的细胞浸润。

[0420] 实施例17:NKT细胞推进的炎症的替代动物模型

[0421] 溃疡性结肠炎

[0422] 在各种公开的人炎性肠病模型中测试抗CD1d抗体的疗效和安全性(Wirtz等人,Nat Protoc 2:541-546,2007)。例如,噁唑酮的直肠内给药诱发在组织学上类似于人溃疡性结肠炎并且其特征也在于腹泻、隐血、体重减轻和偶尔的直肠脱垂的局部溃疡与炎症。噁唑酮诱发的结肠炎的病理可以通过NKT细胞介导,特别是经由NKT细胞推进的IL-13的分泌,由此可能通过用抗CD1d抗体治疗来缓解疾病(Heller,F.等人,2002Immunity 17,629-638)。在该模型中,在结肠炎诱导起始时开始进行抗体治疗,并评估对体重、粪便稠度、隐血和结肠架构的影响。

[0423] 此外,在通过活化(CD4+CD45RB^{high})T细胞过继性转移诱发的鼠结肠炎模型中测试抗CD1d抗体(Ostanin,D.V.等人,(2009)Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296:G135-G146)。在该模型中,将CD4+CD45RB^{high} T细胞转移到免疫缺陷的小鼠体内,造成体重减轻和腹泻、广泛性结肠浸润和炎症、杯状细胞损失和结肠上皮增生。测试该抗体减轻体重损失和腹泻以及缓解结肠炎症与组织学变化的能力。

[0424] 此外,在通过在饮用水中施用葡聚糖硫酸酯钠(DSS)诱发的结肠炎的小鼠模型中测试抗CD1d抗体(Wirtz等人,Nat Protoc 2:541-546,2007)。DSS施用诱发了顽固的肠道广泛性炎症,其特征在于糜烂性损伤和炎性浸润。症状通常包括腹泻、隐血、体重减轻和偶尔的直肠脱垂。DSS诱发的结肠炎模型可以是涉及施用DSS七天的急性的,或长期施用DSS而得慢性的。

[0425] 预防性或治疗性地测试该抗体。在预防性模型中,在开始施用DSS时开始抗体治疗。在治疗性模型中,在诱导开始几天后开始抗体治疗。确定对体重和粪便稠度的治疗效果,以及对上皮完整性与炎性浸润程度的微观效果。

[0426] 非酒精性脂肪性肝炎

[0427] 此外,在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的啮齿目动物模型中测试了抗CD1d抗体,描述在例如Takahashi等人(2012)World Journal of Gastroenterology18(19):2300-2308中。例如,在C57BL/6小鼠中,在新生期输送链脲菌素(STZ,一种肝细胞毒化合物)并随后给予高脂肪饮食,造成了NASH的主要特征的发展。作为另一实例,向C57BL/6或ob/ob小鼠提供高脂肪饮食可以造成NASH的诱发和保持。在再一实例中,可以通过高脂肪饮食加复发性与间歇性的低氧应激在小鼠中产生NASH。在这些模型的一种或多种中,通过对肝脏总重量、血清转氨酶水平、血清甘油三酯水平、血糖水平、肝脏病理组织学方面的提高和基因表达模式(pattern)的改变的效果来确定在治疗的啮齿目动物体内抗CD1d抗体的疗效。

[0428] 自身免疫性肝病

[0429] 此外,在自身免疫性肝病的动物模型中测试了抗CD1d抗体。例如,已经描述了在小鼠中,通过静脉注射伴刀豆球蛋白A(conA)诱发肝炎(Takeda,K.等人,(2000)PNAS97(10):5498-5503)。ConA经尾部静脉注射到小鼠体内。在ConA注射后20小时获得血清样品。使用标准光度技术测量血清转氨酶[丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)]水平。此外,通过肝脏形态的宏观与微观检验评估肝脏病理。评估抗体对血清ALT和AST以及肝脏病理的影响。

[0430] 实施例18:生成结合蛋白质的方法

[0431] 使用402.8或401.11抗体从抗体文库中选择

[0432] 使用噬菌体展示,其中使用约100pmol的抗原密度(即生物素化CD1d)和如前所述的基于TEA的洗脱步骤来进行第一轮淘选。第二和第三轮使用降低的抗原密度(例如约50pmol)。通过以10倍摩尔过量添加402.8或401.11(或相关抗体)IgG并在室温下培育该反应2、5、10或20分钟来洗脱噬菌体。预期该IgG将特异性替换和洗脱与402.8/401.11表位结合的噬菌体表达Fab。在这些条件下,非特异性结合体和与CD1d表面上其它区结合的噬菌体不太可能被洗脱。

[0433] 洗涤方案包括对第1和2轮用M-PBS洗涤六次。对于第3轮,洗涤为用PBST洗涤三次并随后用PBS洗涤三次。

[0434] 洗脱的噬菌体用于感染TG1大肠杆菌,以便噬菌粒再活化(rescue)或生成用于如对其余噬菌体展示试验所述的筛选的菌落。

[0435] 使用合成CD1d构建体选择/制造抗体

[0436] 使用合成CD1d构建体,例如hCD1dmu或mCD1dhu作为用于噬菌体展示的淘选反应物,可以获得识别类似于402.8和401.12的表位的表位的抗体。噬菌体展示文库可以清空用类似hCD1dmu(SEQ ID NO:119)(人CD1d,其中包含该表位的关键氨基酸被它们相应的小鼠氨基酸取代)的构建体识别CD1d的抗体。随后该文库可以针对人CD1d进行淘选。所得分离的抗体将可能与人CD1d(SEQ ID NO:116)的89至94与141至142之间的氨基酸结合。

[0437] 免疫接种方法

[0438] 将CD1d上的402.8/401.11抗体表位的肽或蛋白质模仿物用作抗原,取代文库展示技术或免疫/杂交瘤方法中的CD1d。例如,构建嵌合的CD1d分子以便在框架(该框架否则为小鼠CD1d)中含有人CD1d的402.8/401.11表位(例如mCD1dhu(SEQ ID NO:118))。当此类构建体用作小鼠中的免疫原时,免疫响应预期集中于非鼠序列。

[0439] 抗体序列ID词汇索引

[0440]

抗体	VH 氨基酸 (SEQ ID No)	VH 核苷酸 (SEQ ID No)	VL 氨基酸 (SEQ ID No)	VL 核苷酸 (SEQ ID No)
401.11	1	10	2	11
401.11.24	23	68	46	91
401.11.26	24	69	47	92
401.11.28	5	14	6	15
401.11.86	25	70	48	93
401.11.151	26	71	49	94
401.11.152	27	72	50	95
401.11.154	28	73	51	96
401.11.155	29	74	52	97
401.11.156	30	75	53	98
401.11.157	31	76	54	99
401.11.158	32	77	55	100
401.11.159	33	78	56	101
401.11.160	34	79	57	102
401.11.161	35	80	58	103
401.11.165	36	81	59	104
401.11.166	37	82	60	105
401.11.167	38	83	61	106
401.11.179	40	85	62	107
401.11.180	41	86	63	108
401.11.181	42	87	64	109

[0441]

抗体	VH 氨基酸 (SEQ ID No)	VH 核苷酸 (SEQ ID No)	VL 氨基酸 (SEQ ID No)	VL 核苷酸 (SEQ ID No)
402.8	3	12	4	13
402.8.45	7	16	4	110
402.8.53	8	17	4	111
402.8.60	9	18	4	112
402.8.84	43	88	65	113
402.8.86	44	89	66	114
402.8.87	45	90	67	115

[0442] 其它序列说明

[0443]

SEQ ID NO	说明
19	人CD1d合成构建体
20	人 β -2-微球蛋白
21	TCR α 链克隆J3N.5
22	TCR β 链克隆J3N.5
117	鼠CD1d胞外域构建体
118	mCD1dhu CD1d合成构建体
119	hCD1dmu CD1d合成构建体
120	正向引物
121	反向引物
122	CD1d的89-94
123	CD1d的126-142
124	VH CDR1(401.11)
125	VH CDR1(402.8)
126	VH CDR3(401.11)
127	VH CDR3(402.8)

[0444]

SEQ ID NO	说明
128	VH CDR3(402.8)
129	VH CDR3(402.8)
130	VH CDR3(402.8)

131	VH CDR2(401.11)
132	VH CDR2(402.8)
133	VH CDR2(402.8)
134	VH CDR2(402.8)
135	VH CDR1(401.11)
136	VH CDR1(402.8)
137	VH CDR2(401.11)
138	VH CDR2(402.8)
139	VH CDR2(402.8)
140	VH CDR2(402.8)
141	VL CDR1(401.11)
142	VL CDR1(402.8)
143	VL CDR3(401.11)
144	VL CDR3(402.8)
145	VL CDR2(401.11)
146	VL CDR2(402.8)
147	CD1d的89-95
148	401.11VH共有序列
149	401.11VL共有序列
150	402.8VH共有序列
151	402.8VL共有序列
152	VH CDR3(401.11)
153	VH CDR3(401.11)
154	VH CDR3(401.11)
155	VH CDR3(402.8)
156	VH CDR3(402.8)

[0445]

SEQ ID NO	说明
157	人CD1d
158	人重链IgG1恒定结构域
159	人重链IgG4恒定结构域
160	人重链IgG4恒定结构域(S228P)
161	人轻链kappa恒定结构域
162	人轻链lambda恒定结构域

[0446] 参考文献

[0447] ALEGRE,M.L.,COLLINS,A.M.,PULITO,V.L.,BROSIUS,R.A.,OLSON,W.C.,ZIVIN,R.A.,KNOWLES,R.,THISTLETHWAITE,J.R.,JOLLIFFE,L.K.&BLUESTONE,J.A.(1992)Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a"humanized"OKT3monoclonal antibody.J Immunol,148,3461-8.

- [0448] AL-LAZIKANI,B.,LESK,A.M.&CHOTHIA,C.(1997)Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins.J Mol Biol,273,927-48.
- [0449] ANGULO,P.(2002)Nonalcoholic fatty liver disease.N Engl J Med,346,1221-31.
- [0450] AUSUBEL IN:CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY.WILEY INTERSCIENCE, ISBN047150338,1987;第8和15章
- [0451] AKBARI,O.,STOCK,P.,MEYER,E.,KRONENBERG,M.,SIDOBRE,S.,NAKAYAMA,T.,TANIGUCHI,M.,GRUSBY,M.J.,DEKRUYFF,R.H.&UMETSU,D.T.(2003)Essential role of NKT cells producing IL-4and IL-13in the development of allergen-induced airway hyperreactivity.Nat Med,9,582-8.
- [0452] BAHADORI,K.,DOYLE-WATERS,M.M.,MARRA,C.,LYND,L.,ALASALY,K.,SWISTON,J.& FITZGERALD,J.M.(2009)Economic burden of asthma:a systematic review.BMC Pulm Med,9,24.
- [0453] BENHAR,I.(2007)Design of synthetic antibody libraries.Expert Opin Biol Ther,7,763-79.
- [0454] BIRD,R.E.,HARDMAN,K.D.,JACOBSON,J.W.,JOHNSON,S.,KAUFMAN,B.M.,LEE,S.M.,LEE,T.,POPE,S.H.,RIORDAN,G.S.&WHITLOW,M.(1988)Single-chain antigen-binding proteins.Science,242,423-6.
- [0455] BONISH,B.,JULLIEN,D.,DUTRONC,Y.,HUANG,B.B.,MODLIN,R.,SPADA,F.M.,PORCELLI,S.A.&NICKOLOFF,B.J.(2000)Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependen t IFN-gamma production by NK-Tcells.JImmunol,165,4076-85.
- [0456] BORISH,L.C.,NELSON,H.S.,LANZ,M.J.,CLAUSSEN,L.,WHITMORE,J.B.,AGOSTI,J.M.&GARRISON,L.(1999)Interleukin-4receptor in moderate atopic asthma.A phase I/II randomized,placebo-controlled trial.Am J Respir Crit Care Med,160,1816-23.
- [0457] BRENNAN,P.J.,TATITURI,R.V.,BRIGL,M.,KIM,E.Y.,TULI,A.,SANDERSON,J.P.,GADOLA,S.D.,HSU,F.F.,BESRA,G.S.&BRENNER,M.B.Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals.Nat Immunol,12,1202-11.
- [0458] BRIGL,M.&BRENNER,M.B.(2004)CD1:antigen presentation and T cell function.Annu Rev Immunol,22,817-90.
- [0459] BRIGL,M.,VANDENELZEN,P.,CHEN,X.,MEYERS,J.H.,WU,D.,WONG,C.H.,REDDINGTON,F.,ILLARIANOV,P.A.,BESRA,G.S.,BRENNER,M.B.&GUMPERZ,J.E.(2006)Conserved and heterogeneous lipid antigen specificities of CD1d-restricted NKT cell receptors.J Immunol,176,3625-34.
- [0460] CHOTHIA,C.&LESK,A.M.(1987)Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins.JMol Biol,196,901-17.
- [0461] CHOTHIA,C.,LESK,A.M.,TRAMONTANO,A.,LEVITT,M.,SMITH-GILL,S.J.,AIR,G.,

SHERIFF, S., PADLAN, E. A., DAVIES, D., TULIP, W. R. & ET AL. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342, 877-83.

[0462] CHUANG, Y. H., WANG, T. C., JEN, H. Y., YU, A. L. & CHIANG, B. L. (2011) {alpha}-Galactosylceramide-Induced Airway Eosinophilia Is Mediated through the Activation of NKT Cells. *J Immunol*, 186, 4687-92.

[0463] CUNNINGHAM, B. C. & WELLS, J. A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244, 1081-5.

[0464] DALL'ACQUA, W. F., WOODS, R. M., WARD, E. S., PALASZYNSKI, S. R., PATEL, N. K., BREWAH, Y. A., WU, H., KIENER, P. A. & LANGERMANN, S. (2002) Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J Immunol*, 169, 5171-80.

[0465] DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. (2006) Properties of human IgG1 s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24.

[0466] DE VOS, A. M., ULTSCH, M. & KOSSIAKOFF, A. A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255, 306-12.

[0467] DUROCHER, Y., PERRET, S. & KAMEN, A. (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30, E9.

[0468] EXLEY, M., GARCIA, J., BALK, S. P. & PORCELLI, S. (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+CD4-CD8-T cells. *J Exp Med*, 186, 109-20.

[0469] EXLEY, M. A., WILSON, B. & BALK, S. P. (2010) Isolation and functional use of human NKT cells. *Curr Protoc Immunol*, 第14章, 第1411单元.

[0470] FISHBURN, C. S. (2008) The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *J Pharm Sci*, 97, 4167-83.

[0471] FOX, L. M., COX, D. G., LOCKRIDGE, J. L., WANG, X., CHEN, X., SCHARF, L., TROTT, D. L., NDONYE, R. M., VEERAPEN, N., BESRA, G. S., HOWELL, A. R., COOK, M. E., ADAMS, E. J., HILDEBRAND, W. H. & GUMPERZ, J. E. (2009) Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol*, 7, e1000228.

[0472] GENNARO, ED., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH EDITION, MACK PUBLISHING CO. (EASTON, PA.) 1990.

[0473] GIUDICELLI, V., CHAUME, D., BODMER, J., MULLER, W., BUSIN, C., MARSH, S., BONTROP, R., MARC, L., MALIK, A. & LEFRANC, M. P. (1997) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 25, 206-11.

[0474] GREENER, A., CALLAHAN, M. AND JERPSETH, B. (1996) IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS. HUMANA PRESS, NJ HART, T. K., COOK, R. M., ZIA-AMIRHOSSEINI, P., MINTHORN, E., SELLERS, T. S., MALEEFF, B. E., EUSTIS, S., SCHWARTZ, L. W., TSUI, P., APPELBAUM, E. R., MARTIN, E. C., BUGELSKI, P. J. & HERZYK, D. J. (2001) Preclinical efficacy and safety of

mepolizumab(SB-240563),a humanized monoclonal antibody to IL-5,in cynomolgus monkeys.J Allergy Clin Immunol,108,250-7.

[0475] HEALTH PROFESSIONAL'S DRUG GUIDE2001,ED.,SHANNON,WILSON,STANG, PRENTICE-HALL,INC,UPPERSADDLERIVER,N.J.;HELLER,F.,FUSS,I.J.,NIEUWENHUIS,E.E., BLUMBERG,R.S.&STROBER,W.(2002)Oxazolone colitis,a Th2colitis model resembling ulcerative colitis,is mediated by IL-13-producing NK-Tcells.Immunity,17,629-38.

[0476] HINTON,P.R.,JOHLFS,M.G.,XIONG,J.M.,HANESTAD,K.,ONG,K.C.,BULLOCK,C., KELLER,S.,TANG,M.T.,TSO,J.Y.,VASQUEZ,M.&TSURUSHITA,N.(2004)Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates.J Biol Chem,279,6213-6.

[0477] HOLGATE,S.T.&POLOSA,R.(2008)Treatment strategies for allergy and asthma.Nat Rev Immunol,8,218-30.

[0478] HOLLIGER,P.,PROSPERO,T.&WINTER,G.(1993)"Diabodies":small bivalent and bispecific antibody fragments.Proc Natl Acad Sci USA,90,6444-8.

[0479] HONEGGER,A.&PLUCKTHUN,A.(2001)Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool.J Mol Biol,309,657-70.

[0480] HUSTON,J.S.,LEVINSON,D.,MUDGETT-HUNTER,M.,TAI,M.S.,NOVOTNY,J., MARGOLIES,M.N.,RIDGE,R.J.,BRUCCOLERI,R.E.,HABER,E.,CREA,R.&ETAL.(1988)Protein engineering of antibody binding sites:recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli.Proc Natl Acad Sci USA,85,5879-83.

[0481] INNIS,ETAL.,PCR PROTOCOLS A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS,EDS., ACADEMIC PRESS INC.,SAN DIEGO,CALIF.(1990).

[0482] IWAMURA,C.&NAKAYAMA,T.(2010)Role of NKT cells in allergic asthma.Curr Opin Immunol,22,807-13.

[0483] JONES,A.J.,PAPAC,D.I.,CHIN,E.H.,KECK,R.,BAUGHMAN,S.A.,LIN,Y.S.,KNEER, J.&BATTERSBY,J.E.(2007)Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys.Glycobiology,17,529-40.

[0484] KANDA,Y.,YAMADA,T.,MORI,K.,OKAZAKI,A.,INOUE,M.,KITAJIMA-MIYAMA,K., KUNI-KAMOCHI,R.,NAKANO,R.,YANO,K.,KAKITA,S.,SHITARA,K.&SATO,M.(2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides:the high-mannose,hybrid,and complex types.Glycobiology,17,104-18.

[0485] KANEKO,Y.,NIMMERJAHN,F.&RAVETCH,J.V.(2006)Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation.Science,313,670-3.

[0486] KITA,H.,NAIDENKO,O.V.,KRONENBERG,M.,ANSARI,A.A.,ROGERS,P.,HE,X.S.,

KONING,F.,MIKAYAMA,T.,VAN DE WATER,J.,COPPEL,R.L.,KAPLAN,M.&GERSHWIN,M.E. (2002)Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer.Gastroenterology,123, 1031-43.

[0487] KOLKMAN,J.A.&STEMMER,W.P.(2001)Directed evolution of proteins by exon shuffling.Nat Biotechnol,19,423-8.

[0488] KONTERMANN AND DUBEL EDS.,ANTIBODY ENGINEERING2001SPRINGER-VERLAG.NEW YORK.790PP.,ISBN3-540-41354-5KOPSIDAS,G.,ROBERTS,A.S.,COIA,G.,STRELTSOV,V.A.& NUTTALL,S.D.(2006)In vitro improvement of a shark IgNAR antibody by Qbeta replicase mutation and ribosome display mimics in vivo affinity maturation.Immunol Lett,107,163-8.

[0489] KOTSIANIDIS,I.,NAKOU,E.,SPANOUidakis,E.,BOUCHLIOU,I.,MOUSTAKIDIS,E., MILTIADES,P.,VADIKOLIA,C.M.,SZYDLO,R.,KARADIMITRIS,A.&TSATALAS,C.The diagnostic value of CD1d expression in a large cohort of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders.(2011)Am J Clin Pathol,136,400-8.

[0490] KYRIAKAKIS,E.,CAVALLARI,M.,ANDERT,J.,PHILIPPOVA,M.,KOELLA,C.,BOCHKOV, V.,ERNE,P.,WILSON,S.B.,MORI,L.,BIEDERMANN,B.C.,RESINK,T.J.&DELIBERO,G.(2010) Invariantnatural killer T cells:Linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis.Eur J Immunol.

[0491] LISBONNE,M.,DIEM,S.,DECASTROKELLER,A.,LEFORT,J.,ARAUJO,L.M.,HACHEM, P.,FOURNEAU,J.M.,SIDOBRE,S.,KRONENBERG,M.,TANIGUCHI,M.,VANENDERT,P.,DY,M., ASKENASE,P.,RUSSO,M.,VARGAFTIG,B.B.,HERBELIN,A.&LEITE-DE-MORAES,M.C.(2003) Cutting edge:invariant V alpha14NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model.J Immunol,171,1637-41.

[0492] LUND,J.,WINTER,G.,JONES,P.T.,POUND,J.D.,TANAKA,T.,WALKER,M.R., ARTYMIUK,P.J.,ARATA,Y.,BURTON,D.R.,JEFFERIS,R.&ETAL.(1991)Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG.J Immunol,147,2657-62.

[0493] MARKS,J.D.&BRADBURY,A.(2004)Selection of human antibodies from phage display libraries.Methods Mol Biol,248,161-76.

[0494] MATANGKASOMBUT,P.,PICHAVANT,M.,YASUMI,T.,HENDRICKS,C.,SAVAGE,P.B., DEKRUYFF,R.H.&UMETSU,D.T.(2008)Direct activation of natural killer T cells induces airway hyperreactivity in nonhuman primates.J Allergy Clin Immunol, 121,1287-9.

[0495] METELITSA,L.S.,WEINBERG,K.I.,EMANUEL,P.D.&SEEGER,R.C.(2003)Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells.Leukemia,17,1068-77.

[0496] MORRISON,S.L.(1985)Transfectomas provide novel chimeric

antibodies.Science,229,1202-7.

[0497] MURDOCH,J.R.&LLOYD,C.M.(2010)Chronic inflammation and asthma.MutatRes,690,24-39.

[0498] NURSING2001HANDBOOK OF DRUGS,21ST EDITION,SPRINGHOUSE CORP., SPRINGHOUSE,PA.,2001;OSTANIN,D.V.,BAO,J.,KOBOZIEV,I.,GRAY,L.,ROBINSON-JACKSON,S.A.,KOSLOSKI-DAVIDSON,M.,PRICE,V.H.&GRISHAM,M.B.(2009)T cell transfer model of chronic colitis:concepts,considerations,and tricks of the trade.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,296,G135-46.

[0499] PADLAN,E.A.,ABERGEL,C.&TIPPER,J.P.(1995)Identification of specificity-determining residues in antibodies.Faseb J,9,133-9.

[0500] PELED,J.U.,KUANG,F.L.,IGLESIAS-USSEL,M.D.,ROA,S.,KALIS,S.L.,GOODMAN,M.F.&SCHARFF,M.D.(2008)The biochemistry of somatic hypermutation.Annu Rev Immunol,26,481-511.

[0501] PELLICCI,D.G.,PATEL,O.,KJER-NIELSEN,L.,PANG,S.S.,SULLIVAN,L.C., KYPARISSOUDIS,K.,BROOKS,A.G.,REID,H.H.,GRAS,S.,LUCET,I.S.,KOH,R.,SMYTH,M.J., MALLEVAEY,T.,MATSUDA,J.L.,GAPIN,L.,MCCLUSKEY,J.,GODFREY,D.I.&ROSSJOHN,J. (2009)Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta8.2and V beta7semi-invariant NKT T cell receptors.Immunity,31,47-59.

[0502] PETKOVA,S.B.,AKILESH,S.,SPOULE,T.J.,CHRISTIANSON,G.J.,ALKHABBAZ,H., BROWN,A.C.,PRESTA,L.G.,MENG,Y.G.&ROOPENIAN,D.C.(2006)Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease.Int Immunol, 18,1759-69.

[0503] PHYSICIAN'S DESK REFERENCE,52ND ED.,MEDICAL ECONOMICS,MONTVALE,N.J. (1998)PICHAVANT,M.,GOYA,S.,MEYER,E.H.,JOHNSTON,R.A.,KIM,H.Y.,MATANGASOMBUT, P.,ZHU,M.,IWAKURA,Y.,SAVAGE,P.B.,DEKRUYFF,R.H.,SHORE,S.A.&UMETSU,D.T.(2008) Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17.J ExpMed,205,385-93.

[0504] POLJAK,R.J.(1994)Production and structure of diabodies.Structure,2, 1121-3.

[0505] QUEEN,C.,SCHNEIDER,W.P.,SELICK,H.E.,PAYNE,P.W.,LANDOLFI,N.F.,DUNCAN, J.F.,AVDALOVIC,N.M.,LEVITT,M.,JUNGHANS,R.P.&WALDMANN,T.A.(1989)A humanized antibody that binds to the interleukin2receptor.Proc Natl Acad Sci USA,86, 10029-33.

[0506] REINHARDT,C.&MELMS,A.(1999)Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis.Neurology,52,1485-7.

[0507] SANTODOMINGO-GARZON,T.&SWAIN,M.G.Role of NKT cells in autoimmune liver disease.Autoimmun Rev,10,793-800.

[0508] SAUBERMANN,L.J.,BECK,P.,DEJONG,Y.P.,PITMAN,R.S.,RYAN,M.S.,KIM,H.S.,

EXLEY,M.,SNAPPER,S.,BALK,S.P.,HAGEN,S.J.,KANAUCHI,O.,MOTOKI,K.,SAKAI,T.,TERHORST,C.,KOEZUKA,Y.,PODOLSKY,D.K.&BLUMBERG,R.S.(2000)Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice.Gastroenterology,119,119-28.3

[0509] SESHASAYEE,D.,LEE,W.P.,ZHOU,M.,SHU,J.,SUTO,E.,ZHANG,J.,DIEHL,L.,AUSTIN,C.D.,MENG,Y.G.,TAN,M.,BULLENS,S.L.,SEEBER,S.,FUENTES,M.E.,LABRIJN,A.F.,GRAUS,Y.M.,MILLER,L.A.,SCHELEGLE,E.S.,HYDE,D.M.,WU,L.C.,HYMOWITZ,S.G.&MARTIN,F.(2007)In vivo blockade of OX40ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation.J Clin Invest,117,3868-78.

[0510] SHIELDS,R.L.,NAMENUK,A.K.,HONG,K.,MENG,Y.G.,RAE,J.,BRIGGS,J.,XIE,D.,LAI,J.,STADLEN,A.,LI,B.,FOX,J.A.&PRESTA,L.G.(2001)High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI,Fc gamma RII,Fc gamma RIII,and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R.J Biol Chem,276,6591-604.

[0511] SMITH,L.J.,REDFIELD,C.,BOYD,J.,LAWRENCE,G.M.,EDWARDS,R.G.,SMITH,R.A.&DOBSON,C.M.(1992)Human interleukin4.The solution structure of a four-helix bundle protein.J Mol Biol,224,899-904.

[0512] SPRAGUE,J.,CONDRA,J.H.,ARNHEITER,H.&LAZZARINI,R.A.(1983)Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein.J Virol,45,773-81.

[0513] SYN,W.K.,OO,Y.H.,PEREIRA,T.A.,KARACA,G.F.,JUNG,Y.,OMENETTI,A.,WITEK,R.P.,CHOI,S.S.,GUY,C.D.,FEARING,C.M.,TEABERRY,V.,PEREIRA,F.E.,ADAMS,D.H.&DIEHL,A.M.Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease.Hepatology,51,1998-2007.

[0514] TAKAHASHI,Y.,SOEJIMA,Y.&FUKUSATO,T.Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis.World J Gastroenterol,18,2300-8.

[0515] TAKEDA,K.,HAYAKAWA,Y.,VANKAER,L.,MATSUDA,H.,YAGITA,H.&OKUMURA,K.(2000)Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis.Proc Natl Acad Sci USA,97,5498-503.

[0516] TAO,M.&MORRISON,S.(1989)Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG.Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region.J Immunology,143,2595-2601

[0517] TERHORST,C.,VAN AGTHOVEN,A.,LECLAIR,K.,SNOW,P.,REINHERZ,E.&SCHLOSSMAN,S.(1981)Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigensT6,T9andT10.Cell,23,771-80.

[0518] THIE,H.,VOEDISCH,B.,DUBEL,S.,HUST,M.&SCHIRRMANN,T.(2009)Affinity maturation by phage display.Methods Mol Biol,525,309-22,xv.

[0519] VAN AGTHOVEN,A.&TERHORST,C.(1982)Further biochemical characterization

of the human thymocyte differentiation antigen T6. *J Immunol*, 128, 426-32.

[0520] VENKATASWAMY, M.M. & PORCELLI, S.A. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol*, 22, 68-78.

[0521] WALLACE, K.L., MARSHALL, M.A., RAMOS, S.I., LANNIGAN, J.A., FIELD, J.J., STRIETER, R.M. & LINDEN, J. (2009) NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. *Blood*, 114, 667-76.

[0522] WANG, W., SINGH, S., ZENG, D.L., KING, K. & NEMA, S. (2007) Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci*, 96, 1-26

[0523] WARD, E.S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A.D., JONES, P.T. & WINTER, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544-6.

[0524] WELLS et al., ed., 1990; *Pharmacotherapy Handbook*, Appleton & Lange, Stamford, Conn.,

[0525] WILLIAMS & WILLIAMS, (1995), *Remington: The Science & Practice of Pharmacy*, 19th ed.,

[0526] WIRTZ, S., NEUFERT, C., WEIGMANN, B. & NEURATH, M.F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2, 541-6.

序列表

<110> CEPHALON AUSTRALIA PTY LTD
 NAMBIAR, Jonathan Kannan (US Only)
 POULTON, Lynn Dorothy (US Only)
 CLARKE, Adam (US Only)
 POW, Andrew James (US Only)
 TAMVAKIS, Debra (US Only)
 KOPSIDAS, George (US Only)
 DOYLE, Anthony Gerard (US Only)
 POLLARD, Matthew (US Only)
 MUSTAFA, Huseyin (US Only)

<120> CD1d抗体

<130> 35115153/WJP

<150> AU 2011904190
 <151> 2011-10-14

<150> US 61/547,307
 <151> 2011-10-14

<160> 162

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人

[0001]

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 401.11可变重链

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

	85	90	95
	Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp		
	100	105	110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
<210>	2		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	401.11可变轻链		
<400>	2		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp		
	20 25 30		
[0002]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100 105		
<210>	3		
<211>	121		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	402.8可变重链		

<400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Asn Ser Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

[0003]

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 402.8可变轻链

<400> 4

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asn Phe Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala
35 40 45

Leu Ile Phe Ser Ala Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe

	50	55	60
	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Val Leu Thr Leu Ser Gly Val 65 70 75 80		
	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Leu Tyr Phe Gly Asp 85 90 95		
	Thr Gln Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly 100 105 110		
<210>	5		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 28可变重链		
<400>	5		
	Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg 1 5 10 15		
[0004]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 20 25 30		
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
	Ala Thr Ile Ile Trp Asn Ser Ala Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp 100 105 110		
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120		
<210>	6		
<211>	108		
<212>	PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 28可变轻链

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

[0005]

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

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402. 8. 45可变重链

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Lys Ser Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402.8.53可变重链

<400> 8

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

[0006]

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Lys Ser Tyr Leu Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 402.8.60可变重链

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

[0007] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Asn Ser Tyr Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 401.11可变重链

<400> 10
 caggtgcagc tgggtggggtc tgggggagge ttggtaagc ctggcaggte cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt cggcaagct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtcgcaact attattigga atagtgtat cataggctat 180
 gcggactctg tgaagggcgg attcatgctc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

	ctgcaaatga acagtctgag agcagaggac atggccttgt attactgtgc aaaagatatg	300
	tgtagtagta gtggttgccc tgatggctac ttgactcct ggggccaggg aaccctgggtg	360
	acagtgtcct ca	372
	<210> 11	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11可变轻链	
	<400> 11	
	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtc gcatattage agctggtag cctggatatca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaatctcct gatetatget gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaggt tcccgctcac tttcggegga	300
	gggaccaagc tggagatcaa acgg	324
[0008]	<210> 12	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<223> 402.8可变重链	
	<400> 12	
	caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgagge ctteggagac cctgtccctc	60
	acctgcgctg tetatggtgg gtecttcagt ggttactact ggagctggat tegccagccc	120
	ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac	180
	cctgctctca agagtegagt caccataica gtagacaegt ccaagaacca gttctccctg	240
	aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt	300
	tacgattttt ggaactccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc	360
	tea	363
	<210> 13	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人	

	<220>		
	<221>	尚未归类的特征	
	<223>	402.8可变轻链	
	<400>	13	
	cagactgtgg	tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc	60
	aacctgtgett	ccagctctgg agcagtcage agtggtaact ttccaaactg gttccagcag	120
	aaacctggac	aagcaccctcg ggcaactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttggaac	180
	cctgcccgggt	tttcaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcagggtgtg	240
	cagccagagg	acgaggetga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
	gtgttcggcg	gagggaccaaa ggtgaccgtc ctaggt	336
	<210>	14	
	<211>	372	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成; 401.11.28可变重链	
	<400>	14	
	caggtgcage	tcgtgggctc tgccggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg	60
[0009]	agctgtgccg	ccagcggett caccctcgac gaactaccca tgcactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg	gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtctac	180
	gccgacagcg	tgaagggcgg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga	acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagct	ctggetgccc cgacggctac ttcgattett ggggccaggg caccctggtc	360
	accgtgtect	ca	372
	<210>	15	
	<211>	324	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成; 401.11.28可变轻链	
	<400>	15	
	gacatccaga	tgaccagag ccccagcage gtgtccgcca gctggggcga cagagtgaac	60
	atcacctgtc	gggccagcca gcacatcage agctggetgg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggecc	ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaaagc	180
	agattcagcg	gcagcggtc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccgt tccccctgac ctttggega 300
ggcaccaagc tggaaatcaa gegt 324

<210> 16
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 402. 8. 45可变重链

<400> 16
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctteggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gttactact ggagctggat tgcceagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatccca gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt 300
tacgattttt ggaagtccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc 360
tea 363

[0010]

<210> 17
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 402. 8. 53可变重链

<400> 17
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctteggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gttactact ggagctggat tgcceagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt 300
tacgattttt ggaagtccta cctggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc 360
tea 363

<210> 18
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 402. 8. 60可变重链

<400> 18
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc ctteggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt gggtactact ggagctggat tcgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt 300
 tacgattttt acaactecta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc 360
 tca 363

<210> 19
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 人CD1d 合成构建体

<400> 19

Met Gly Cys Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Gln Ala Trp
 1 5 10 15

[0011]

Gly Ser Ala Glu Val Pro Gln Arg Leu Phe Pro Leu Arg Cys Leu Gln
 20 25 30

Ile Ser Ser Phe Ala Asn Ser Ser Trp Thr Arg Thr Asp Gly Leu Ala
 35 40 45

Trp Leu Gly Glu Leu Gln Thr His Ser Trp Ser Asn Asp Ser Asp Thr
 50 55 60

Val Arg Ser Leu Lys Pro Trp Ser Gln Gly Thr Phe Ser Asp Gln Gln
 65 70 75 80

Trp Glu Thr Leu Gln His Ile Phe Arg Val Tyr Arg Ser Ser Phe Thr
 85 90 95

Arg Asp Val Lys Glu Phe Ala Lys Met Leu Arg Leu Ser Tyr Pro Leu
 100 105 110

Glu Leu Gln Val Ser Ala Gly Cys Glu Val His Pro Gly Asn Ala Ser
 115 120 125

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

130	135	140
Gln Gly Thr Ser Trp Glu Pro Thr Gln Glu Ala Pro Leu Trp Val Asn 145 150 155 160		
Leu Ala Ile Gln Val Leu Asn Gln Asp Lys Trp Thr Arg Glu Thr Val 165 170 175		
Gln Trp Leu Leu Asn Gly Thr Cys Pro Gln Phe Val Ser Gly Leu Leu 180 185 190		
Glu Ser Gly Lys Ser Glu Leu Lys Lys Gln Val Lys Pro Lys Ala Trp 195 200 205		
Leu Ser Arg Gly Pro Ser Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Val Cys 210 215 220		
His Val Ser Gly Phe Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Lys Trp Met Arg 225 230 235 240		
Gly Glu Gln Glu Gln Gln Gly Thr Gln Pro Gly Asp Ile Leu Pro Asn 245 250 255		
[0012]		
Ala Asp Glu Thr Trp Tyr Leu Arg Ala Thr Leu Asp Val Val Ala Gly 260 265 270		
Glu Ala Ala Gly Leu Ser Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Glu Gly 275 280 285		
Gln Asp Ile Val Leu Tyr Trp Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Gly Ser Leu 290 295 300		
Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Lys Arg Val His His His His His His 305 310 315 320		

His His

<210> 20
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 人 β -2-微球蛋白

<400> 20

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

[0013]

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 21

<211> 276

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> TCR α 链克隆J3N.5

<400> 21

Met Lys Lys His Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val
35 40 45

Ser Pro Phe Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly

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

[0014]

<210> 22

<211> 315
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> TCR β 链克隆J3N.5

<400> 22

Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile
 20 25 30

Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr Leu Glu Cys Ser Gln Thr Met Gly His
 35 40 45

Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu
 50 55 60

Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser
 65 70 75 80

[0015]

Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr
 85 90 95

Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Glu Ser Gln Tyr Gly Arg Ala Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly
 115 120 125

Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro
 130 135 140

Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr
 145 150 155 160

Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His
 165 170 175

Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val
 180 185 190

Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser

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

[0016]

<210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成；401.11.24可变重链蛋白质序列

<400> 23

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 401. 11. 26可变重链蛋白质序列

<400> 24

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

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

[0017]

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 401. 11. 86可变重链蛋白质序列

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

[0018]

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 151可变重链蛋白质序列

<400> 26

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

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

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

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

	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
		85	90 95
	Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp		
		100	105 110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
		115	120
<210>	27		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 152可变重链蛋白质序列		
<400>	27		
[0019]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
		20	25 30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
		35	40 45
	Ala Thr Ile Ile Trp Asn Ser Ala Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
		50	55 60
	Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
		85	90 95
	Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp		
		100	105 110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
		115	120

<210> 28
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 154可变重链蛋白质序列

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

[0020]

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 155可变重链蛋白质序列

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021] <220>
<223> 合成；401, 11, 156可变重链蛋白质序列

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp

	100	105	110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120		
<210>	31		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 157可变重链蛋白质序列		
<400>	31		
	Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 20 25 30		
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
[0022]	Ala Thr Ile Ile Trp Asn Ser Ala Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp 100 105 110		
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120		
<210>	32		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 158可变重链蛋白质序列		
<400>	32		
	Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg		

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

[0023]

<210> 33
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成；401. 11. 159可变重链蛋白质序列
 <400> 33

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 401.11.160可变重链蛋白质序列

<400> 34

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

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

[0024]

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 161可变重链蛋白质序列

<400> 35

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

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

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

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

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

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

[0025]

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 165可变重链蛋白质序列

<400> 36

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

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

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

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

97

<210> 38
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 167可变重链蛋白质序列

<400> 38

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

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

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

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

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

[0027]

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 158可变重链蛋白质序列

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

[0028] <220>
<223> 合成；401, 11, 179可变重链蛋白质序列

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Glu Gly Tyr Phe Asp

	100	105	110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
<210>	41		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 180可变重链蛋白质序列		
<400>	41		
	Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
	20	25	30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
[0029]	Ala Thr Ile Ile Trp Asn Ser Ala Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Lys Asp Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Glu Gly Tyr Phe Asp		
	100	105	110
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
<210>	42		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401. 11. 181可变重链蛋白质序列		
<400>	42		
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg		

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

[0030]

<210> 43
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成；402.8.84可变重链蛋白质序列

<400> 43

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Leu Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402.8.86可变重链蛋白质序列

<400> 44

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

[0031]

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Asn Ser Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402. 8. 87可变重链蛋白质序列

<400> 45

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

[0032]

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 24可变轻链蛋白质序列

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105		
<210>	47		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成; 401.11.26可变轻链蛋白质序列		
<400>	47		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
[0033]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp 20 25 30		
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105		
<210>	48		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			

<221> 尚未归类的特征
<223> 401. 11. 26可变轻链蛋白质序列

<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 401. 11. 86可变轻链蛋白质序列

<400> 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0034] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 49
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成: 401. 11. 151可变轻链蛋白质序列

<400> 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401.11.152可变轻链蛋白质序列

<400> 50

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

[0035]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401.11.154可变轻链蛋白质序列

<400> 51

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

[0036]

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401, 11, 155可变轻链蛋白质序列

<400> 52

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 53
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 401. 11. 156可变轻链蛋白质序列

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

[0037]

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 54
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 401. 11. 157可变轻链蛋白质序列

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 55
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

[0038] <220>
<223> 合成；401. 11. 158可变轻链蛋白质序列

<400> 55

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

	100	105
	<210> 56	
	<211> 108	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.159可变轻链蛋白质序列	
	<400> 56	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp	
	20 25 30	
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
[0039]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu	
	85 90 95	
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
	100 105	
	<210> 57	
	<211> 108	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.160可变轻链蛋白质序列	
	<400> 57	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp	
	20 25 30	
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile	

	35	40	45
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105		
	<210> 58 <211> 108 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成; 401.11.161可变轻链蛋白质序列		
	<400> 58		
[0040]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp 20 25 30		
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu 85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105		
	<210> 59 <211> 108 <212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 165可变轻链蛋白质序列

<400> 59

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

[0041]

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

<210> 60

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 166可变轻链蛋白质序列

<400> 60

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 61

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 167可变轻链蛋白质序列

<400> 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

[0042]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 179可变轻链蛋白质序列

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

[0043] <210> 63
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成; 401.11.180可变轻链蛋白质序列
<400> 63

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu

85

90

95

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

<210> 64

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401.11.181可变轻链蛋白质序列

<400> 64

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

[0044]

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402.8.84可变轻链蛋白质序列

<400> 65

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly

	20	25	30
	Asn Phe Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala 35 40 45		
	Leu Ile Phe Ser Ala Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe 50 55 60		
	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Val Leu Thr Leu Ser Gly Val 65 70 75 80		
	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Leu Tyr Phe Gly Asp 85 90 95		
	Thr Gln Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly 100 105 110		
	<210> 66 <211> 112 <212> PRT <213> 人工序列		
[0045]	<220> <223> 合成; 402.8.86可变轻链蛋白质序列		
	<400> 66		
	Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly 20 25 30		
	Asn Phe Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala 35 40 45		
	Leu Ile Phe Ser Ala Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe 50 55 60		
	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Val Leu Thr Leu Ser Gly Val 65 70 75 80		
	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Leu Leu Tyr Phe Gly Asp 85 90 95		
	Thr Gln Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly 100 105 110		

<210> 67
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 402.8.87可变轻链蛋白质序列

<400> 67

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Asn Phe Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala
 35 40 45

Leu Ile Phe Ser Ala Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

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

[0046]

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

Thr Gln Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 68
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.24可变重链核苷酸

<400> 68

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccctegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gectggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgcctat catcggtac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tccegggata acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccgtg actactgcgc caaggacatg 300
 tgcagcaget ctggetgccc cgaaggctac ttgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

	accgtgtcct ca	372
	<210> 69	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 26可变重链核苷酸	
	<400> 69	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	60
	agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac	180
	gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagca gcggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc	360
	accgtgtcct ca	372
[0047]	<210> 70	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 86可变重链核苷酸	
	<400> 70	
	caggtgcagc tegtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg	60
	agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac	180
	gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg gcggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc	360
	accgtgtcct ca	372
	<210> 71	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 151可变重链核苷酸	
	<400> 71	

```

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggegga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccagcggett cacccttegac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagca gcggtgccc cgacggctac ttcgattett ggggccaggg caccctggtc      360
accgtgtcct ca                                                                372

```

<210> 72
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 152可变重链核苷酸

[0048]

```

<400> 72
gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggegga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccagcggett cacccttegac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagca gcggtgccc cgacggctac ttcgattett ggggccaggg caccctggtc      360
accgtgtcct ca                                                                372

```

<210> 73
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 154可变重链核苷酸

```

<400> 73
caggtgcagc tegtgggctc tggcggegga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg      60
agctgtgccg ccagcggett cacccttegac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagct ctggtgccc cgacggctac ttcgattett ggggccaggg caccctggtc      360

```

	accgtgtcct ca	372
	<210> 74	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.155可变重链核苷酸	
	<400> 74	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	60
	agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggttac	180
	gccgacagcg tgaagggcgg gttcacgttg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggcctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagca gcggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc	360
	accgtgtcct ca	372
[0049]	<210> 75	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.156可变重链核苷酸	
	<400> 75	
	caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaage ctggcagaag cctgcggctg	60
	agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggttac	180
	gccgacagcg tgaagggcgg gttcacgttg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg gtggctgccc cgaeggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc	360
	accgtgtcct ca	372
	<210> 76	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.157可变重链核苷酸	
	<400> 76	

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300
 tgcagcagcg gtggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360
 accgtgtect ca 372

<210> 77
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.158可变重链核苷酸

[0050]

<400> 77
 caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300
 tgcagcagcg gtggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360
 accgtgtect ca 372

<210> 78
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.159可变重链核苷酸

<400> 78
 gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300
 tgcagcagcg gtggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

	accgtgtect ca	372
	<210> 79	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 160可变重链核苷酸	
	<400> 79	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg	60
	agetgtgccg ccageggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac	180
	gccgacagcg tgaagggccg gtcatcgtg tccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg gtggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggc caccctggtc	360
	accgtgtect ca	372
[0051]	<210> 80	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 161可变重链核苷酸	
	<400> 80	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg	60
	agetgtgccg ccageggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac	180
	gccgacagcg tgaagggccg gtcatcgtg tccgggata acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg gtggtgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggc caccctggtc	360
	accgtgtect ca	372
	<210> 81	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 165可变重链核苷酸	
	<400> 81	

```

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccageggctt cacccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagegccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagcg gtggetgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc      360
accgtgtcct ca                                                                372

```

<210> 82
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.166可变重链核苷酸

[0052]

```

<400> 82
gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccageggctt cacccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagegccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagcg gtggetgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc      360
accgtgtcct ca                                                                372

```

<210> 83
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.167可变重链核苷酸

```

<400> 83
gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccageggctt cacccttegac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagegccat catcggttac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg      300
tgcagcagcg gtggetgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc      360

```

	accgtgtcct ca	372
	<210> 84	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 158可变重链核苷酸	
	<400> 84	
	caggtgcagc tgggtgggctc tggcggcgga ctggtgaaac ccggcagaag cctgagactg	60
	agctgcgcgc ccagcggtt caccctcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc	120
	cctggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggttac	180
	gccgacagcg tgaagggcgc gttcatcgtg tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccgtg actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg ggggctgccc cgacggctac ttgatagct ggggccaggc caccctggtg	360
	acagtgtcct ca	372
[0053]	<210> 85	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 179可变重链核苷酸	
	<400> 85	
	caggtgcagc tgggtgggctc tggcggcgga ctggtgaaac ccggcagaag cctgagactg	60
	agctgcgcgc ccagcggtt caccctcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc	120
	cctggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggttac	180
	gccgacagcg tgaagggcgc gttcatcgtg tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccgtg actactgcgc caaggacatg	300
	tgcagcagcg ggggctgccc cgaaggctac ttgatagct ggggccaggc caccctggtg	360
	acagtgtcct ca	372
	<210> 86	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 180可变重链核苷酸	
	<400> 86	

caggtgcagc	tggtgggctc	tggcggcgga	ctggtgaaac	cggcagaag	cctgagactg	60
agctgcgccg	ccagcggctt	caccttegac	gactacgcca	tgcactgggt	ccgccaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggcaacc	atcatctgga	acagegccat	catcggtac	180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcatcgtg	tccagagaca	acgccaagaa	cagcctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgcg	ggccgaggac	accgccctgt	actactgcgc	caaggacctg	300
tgcagcagcg	ggggctgccc	cgaaggctac	tttgatagct	ggggccaggg	caccctggtg	360
acagtgtcct	ca					372

<210> 87
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401.11.181可变重链核苷酸

[0054]

<400>	87	
caggtgcagc	tggtggaatc	tggcggcgga
ctggtgaaac	cggcagaag	cctgagactg
		60
agctgcgccg	ccagcggctt	caccttegac
gactacgcca	tgcactgggt	ccgccaggcc
		120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggcaacc
atcatctgga	acagegccat	catcggtac
		180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcatcgtg
tccagagaca	acgccaagaa	cagcctgtac
		240
ctgcagatga	acagcctgcg	ggccgaggac
accgccctgt	actactgcgc	caaggacatg
		300
tgcagcagcg	ggggctgccc	cgacggctac
tttgatagct	ggggccaggg	caccctggtg
		360
acagtgtcct	ca	
		372

<210> 88
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 402.8.84可变重链核苷酸

<400>	88	
caggtgcagc	tgcaggagtc	ggggccagga
ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc
		60
acctgcgctg	tctatggtgg	gtccttcagt
ggttactact	ggagctggat	tcgccagccc
		120
ccagggaagg	ggctggagtg	gattggggaa
atcaatcatg	ccggaagcac	caactacaac
		180
ccgtccctca	agagtcgagt	caccatatac
gtagacacgt	ccaagaacca	gttctccctg
		240
aagctgagct	ctgtgaccgc	cgcggacacg
gctgtgtatt	actgtgcgag	aggtgagatt
		300
tacgattttt	acaagtccta	cctggacgtc
tggggcaaaag	ggaccacggt	gacagtgtcc
		360

	tca	363
	<210> 89	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 402. 8. 86可变重链核苷酸	
	<400> 89	
	caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
	aectgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcccagccc	120
	ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac	180
	ccgtccctca agagtcgagt caccataatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
	aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt	300
	tacgattttt acaactccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc	360
	tca	363
[0055]	<210> 90	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 402. 8. 87可变重链核苷酸	
	<400> 90	
	caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
	aectgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcccagccc	120
	ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac	180
	ccgtccctca agagtcgagt caccataatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
	aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt	300
	tacgattttt acaagtccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc	360
	tca	363
	<210> 91	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 24可变轻链核苷酸	
	<400> 91	

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
atcacctgtc gggeccagcca gcacatcage agctggettg cctggatatca gcagaagccc	120
ggcaaggeccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccage	180
agattcageg gcagcggcte cggcacccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccgt tccccctgac ctttgccgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324

<210> 92
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 26可变轻链核苷酸

<400> 92	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
atcacctgtc gggeccagcca gcacatcage agctggettg cctggatatca gcagaagccc	120
ggcaaggeccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaaage	180
agattcageg gcagcggcte cggcacccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccgt tccccctgac ctttgccgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324

[0056]

<210> 93
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 86可变轻链核苷酸

<400> 93	
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcaactgtc gggecgagtc gcataattage agctgggttag cctggatatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaatctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca	180
aggttcageg gcagtggatc tgggaacgat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaggt tcccctcac tttcgccgga	300
gggaccaagc tggagatcaa acgt	324

<210> 94
 <211> 324
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 151可变轻链核苷酸	
	<400> 94	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttgccgga	300
	ggcaccaage tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 95	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 152可变轻链核苷酸	
	<400> 95	
[0057]	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttgccgga	300
	ggcaccaage tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 96	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 154可变轻链核苷酸	
	<400> 96	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggegga	300

	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 97	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.155可变轻链核苷酸	
	<400> 97	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttacacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccgt tccccctgac ctttgccgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 98	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0058]	<220>	
	<223> 合成; 401.11.156可变轻链核苷酸	
	<400> 98	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttacacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccgt tccccctgac ctttgccgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 99	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401.11.157可变轻链核苷酸	
	<400> 99	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc	120

```

ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagccc tgcagagcgg cgtgccaaagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccggt tccccctgac ctttggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                     324

```

<210> 100
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 158可变轻链核苷酸

```

<400> 100
gacatccaga tgacctagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctgggtatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagccc tgcagagcgg cgtgcccagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccggt tccccctgac ctttggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                     324

```

[0059]

<210> 101
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 159可变轻链核苷酸

```

<400> 101
gacatccaga tgacctagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctgggtatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagccc tgcagagcgg cgtgtccagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaaaccggt tccccctgac ctttggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                     324

```

<210> 102
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成; 401. 11. 160可变轻链核苷酸

	<400> 102	
	gacatccaga tgacctagag cccacagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcage agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaaagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacccgt tccccctgac ctttggcgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 103	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 161可变轻链核苷酸	
	<400> 103	
	gacatccaga tgacctagag cccacagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcage agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccccagc	180
[0060]	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacccgt tccccctgac ctttggcgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 104	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 401. 11. 165可变轻链核苷酸	
	<400> 104	
	gacatccaga tgacctagag cccacagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc gggccagcca gcacatcage agctggctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccccagc	180
	agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacccgt tccccctgac ctttggcgga	300
	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt	324
	<210> 105	

<211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 166可变轻链核苷酸

<400> 105

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gegtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaacccgt tccccctgac ctttggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                     324
```

<210> 106
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 167可变轻链核苷酸

[0061]

<400> 106

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gegtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaaagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
gaggactteg ccacctacta ctgccagcag gccaacccgt tccccctgac ctttggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                     324
```

<210> 107
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 401. 11. 179可变轻链核苷酸

<400> 107

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gegtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaaagc      180
agattcagcg gcagcggctc eggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc      240
```

		gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga	300
		ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg	324
	<210>	108	
	<211>	324	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成; 401. 11. 180可变轻链核苷酸	
	<400>	108	
		gacatccaga tgaccagag cccagcage gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
		atcacctgtc ggccagcca gcacatcage agctggctgg cctggtatca gcagaagecc	120
		ggcaaggecc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaaage	180
		agattcagcg gcagcgctc eggcaccgac ttcacctga ccacagctc cctgcagecc	240
		gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga	300
		ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg	324
	<210>	109	
	<211>	324	
[0062]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成; 401. 11. 181可变轻链核苷酸	
	<400>	109	
		gacatccaga tgaccagag cccagcage gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgaac	60
		atcacctgtc ggccagcca gcacatcage agctggctgg cctggtatca gcagaagecc	120
		ggcaaggecc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaaage	180
		agattcagcg gcagcgctc eggcaccgac ttcacctga ccacagctc cctgcagecc	240
		gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga	300
		ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg	324
	<210>	110	
	<211>	336	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成; 402. 8. 45可变轻链核苷酸	
	<400>	110	
		cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc	60

	accgtgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
	aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttggaac	180
	cctgccccgt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagetg tctgacact gtcagggtgtg	240
	cagcctgagg acgaggtctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
	gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgct ctaggt	336
	<210> 111	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 402.8.53可变轻链核苷酸	
	<400> 111	
	cagaactgttg tgactcagga gccctcaactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc	60
	accgtgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
	aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttggaac	180
	cctgccccgt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagetg tctgacact gtcagggtgtg	240
	cagcctgagg acgaggtctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
[0063]	gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgct ctaggt	336
	<210> 112	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成; 402.8.60可变轻链核苷酸	
	<400> 112	
	cagaactgttg tgactcagga gccctcaactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc	60
	accgtgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
	aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttggaac	180
	cctgccccgt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagetg tctgacact gtcagggtgtg	240
	cagcctgagg acgaggtctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
	gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgct ctaggt	336
	<210> 113	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> 合成; 402.8.84可变轻链核苷酸

<400> 113

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagac agtcactctc	60
acctgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
aaacctggac aagcacccecg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttectggacc	180
cctgcccgtt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcagggtgtg	240
cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
gtgttcggcg gagggaccaaa ggtgaccgtc ctaggt	336

<210> 114

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402.8.86可变轻链核苷酸

<400> 114

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagac agtcactctc	60
acctgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
aaacctggac aagcacccecg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttectggacc	180
cctgcccgtt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcagggtgtg	240
cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
gtgttcggcg gagggaccaaa ggtgaccgtc ctaggt	336

[0064]

<210> 115

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; 402.8.87可变轻链核苷酸

<400> 115

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagac agtcactctc	60
acctgtgctt ccagctcttg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag	120
aaacctggac aagcacccecg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttectggacc	180
cctgcccgtt ttccaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcagggtgtg	240
cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg	300
gtgttcggcg gagggaccaaa ggtgaccgtc ctaggt	336

<210> 116
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成；人CD1d胞外域构建体

<400> 116

Glu Val Pro Gln Arg Leu Phe Pro Leu Arg Cys Leu Gln Ile Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Ala Asn Ser Ser Trp Thr Arg Thr Asp Gly Leu Ala Trp Leu Gly
 20 25 30

Glu Leu Gln Thr His Ser Trp Ser Asn Asp Ser Asp Thr Val Arg Ser
 35 40 45

Leu Lys Pro Trp Ser Gln Gly Thr Phe Ser Asp Gln Gln Trp Glu Thr
 50 55 60

Leu Gln His Ile Phe Arg Val Tyr Arg Ser Ser Phe Thr Arg Asp Val
 65 70 75 80

[0065]

Lys Glu Phe Ala Lys Met Leu Arg Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Val Ser Ala Gly Cys Glu Val His Pro Gly Asn Ala Ser Asn Asn Phe
 100 105 110

Phe His Val Ala Phe Gln Gly Lys Asp Ile Leu Ser Phe Gln Gly Thr
 115 120 125

Ser Trp Glu Pro Thr Gln Glu Ala Pro Leu Trp Val Asn Leu Ala Ile
 130 135 140

Gln Val Leu Asn Gln Asp Lys Trp Thr Arg Glu Thr Val Gln Trp Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Gly Thr Cys Pro Gln Phe Val Ser Gly Leu Leu Glu Ser Gly
 165 170 175

Lys Ser Glu Leu Lys Lys Gln Val Lys Pro Lys Ala Trp Leu Ser Arg
 180 185 190

Gly Pro Ser Pro Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Val Cys His Val Ser

	195		200		205
	Gly Phe Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Lys Trp Met Arg Gly Glu Gln				
	210		215		220
	Glu Gln Gln Gly Thr Gln Pro Gly Asp Ile Leu Pro Asn Ala Asp Glu				
	225		230		235 240
	Thr Trp Tyr Leu Arg Ala Thr Leu Asp Val Val Ala Gly Glu Ala Ala				
		245		250	255
	Gly Leu Ser Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Glu Gly Gln Asp Ile				
		260		265	270
	Val Leu Tyr Trp Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Gly Ser Leu Val Pro Arg				
		275		280	285
	Gly Ser Gly Ser Lys Arg Val His His His His His His His His				
	290		295		300
[0066]	<210>	117			
	<211>	305			
	<212>	PRT			
	<213>	人工序列			
	<220>				
	<223>	合成；鼠CD1d胞外域构建体			
	<400>	117			
	Gln Gln Lys Asn Tyr Thr Phe Arg Cys Leu Gln Met Ser Ser Phe Ala				
	1	5		10	15
	Asn Arg Ser Trp Ser Arg Thr Asp Ser Val Val Trp Leu Gly Asp Leu				
		20		25	30
	Gln Thr His Arg Trp Ser Asn Asp Ser Ala Thr Ile Ser Phe Thr Lys				
		35		40	45
	Pro Trp Ser Gln Gly Lys Leu Ser Asn Gln Gln Trp Glu Lys Leu Gln				
		50		55	60
	His Met Phe Gln Val Tyr Arg Val Ser Phe Thr Arg Asp Ile Gln Glu				
	65	70		75	80
	Leu Val Lys Met Met Ser Pro Lys Glu Asp Tyr Pro Ile Glu Ile Gln				
		85		90	95

Leu Ser Ala Gly Cys Glu Met Tyr Pro Gly Asn Ala Ser Glu Ser Phe
100 105 110

Leu His Val Ala Phe Gln Gly Lys Tyr Val Val Arg Phe Trp Gly Thr
115 120 125

Ser Trp Gln Thr Val Pro Gly Ala Pro Ser Trp Leu Asp Leu Pro Ile
130 135 140

Lys Val Leu Asn Ala Asp Gln Gly Thr Ser Ala Thr Val Gln Met Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asp Thr Cys Pro Leu Phe Val Arg Gly Leu Leu Glu Ala Gly
165 170 175

Lys Ser Asp Leu Glu Lys Gln Glu Lys Pro Val Ala Trp Leu Ser Ser
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ala Asp Gly His Arg Gln Leu Val Cys His Val Ser
195 200 205

[0067] Gly Phe Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Met Trp Met Arg Gly Asp Gln
210 215 220

Glu Gln Gln Gly Thr His Arg Gly Asp Phe Leu Pro Asn Ala Asp Glu
225 230 235 240

Thr Trp Tyr Leu Gln Ala Thr Leu Asp Val Glu Ala Gly Glu Glu Ala
245 250 255

Gly Leu Ala Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Gly Gly Gln Asp Ile
260 265 270

Ile Leu Tyr Trp Asp Ala Arg Gln Ala Pro Val Gly Gly Ser Leu Val
275 280 285

Pro Arg Gly Ser Gly Ser Lys Arg Val His His His His His His His
290 295 300

His
305

<210> 118
<211> 303
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成; mCD1dhu CD1d合成构建体

<400> 118

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

Asn Arg Ser Trp Ser Arg Thr Asp Ser Val Val Trp Leu Gly Asp Leu
20 25 30

Gln Thr His Arg Trp Ser Asn Asp Ser Ala Thr Ile Ser Phe Thr Lys
35 40 45

Pro Trp Ser Gln Gly Lys Leu Ser Asn Gln Gln Trp Glu Lys Leu Gln
50 55 60

His Met Phe Gln Val Tyr Arg Val Ser Phe Thr Arg Asp Ile Gln Glu
65 70 75 80

Leu Val Lys Met Leu Arg Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Ile Gln Leu Ser
85 90 95

[0068]

Ala Gly Cys Glu Met Tyr Pro Gly Asn Ala Ser Glu Ser Phe Leu His
100 105 110

Val Ala Phe Gln Gly Lys Tyr Val Val Arg Phe Trp Gly Thr Ser Trp
115 120 125

Gln Thr Val Pro Gly Ala Pro Ser Trp Val Asn Leu Ala Ile Lys Val
130 135 140

Leu Asn Ala Asp Gln Gly Thr Ser Ala Thr Val Gln Met Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asp Thr Cys Pro Leu Phe Val Arg Gly Leu Leu Glu Ala Gly Lys Ser
165 170 175

Asp Leu Glu Lys Gln Glu Lys Pro Val Ala Trp Leu Ser Ser Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ala Asp Gly His Arg Gln Leu Val Cys His Val Ser Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Met Trp Met Arg Gly Asp Gln Glu Gln

	210	215	220
	Gln Gly Thr His Arg Gly Asp Phe Leu Pro Asn Ala Asp Glu Thr Trp 225 230 235 240		
	Tyr Leu Gln Ala Thr Leu Asp Val Glu Ala Gly Glu Glu Ala Gly Leu 245 250 255		
	Ala Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Gly Gly Gln Asp Ile Ile Leu 260 265 270		
	Tyr Trp Asp Ala Arg Gln Ala Pro Val Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg 275 280 285		
	Gly Ser Gly Ser Lys Arg Val His His His His His His His His 290 295 300		
	<210> 119 <211> 305 <212> PRT <213> 人工序列		
[0069]	<220> <223> 合成; hCD1dmu CD1d合成构建体		
	<400> 119		
	Glu Val Pro Gln Arg Leu Phe Pro Leu Arg Cys Leu Gln Ile Ser Ser 1 5 10 15		
	Phe Ala Asn Ser Ser Trp Thr Arg Thr Asp Gly Leu Ala Trp Leu Gly 20 25 30		
	Glu Leu Gln Thr His Ser Trp Ser Asn Asp Ser Asp Thr Val Arg Ser 35 40 45		
	Leu Lys Pro Trp Ser Gln Gly Thr Phe Ser Asp Gln Gln Trp Glu Thr 50 55 60		
	Leu Gln His Ile Phe Arg Val Tyr Arg Ser Ser Phe Thr Arg Asp Val 65 70 75 80		
	Lys Glu Phe Ala Lys Met Met Ser Pro Lys Glu Asp Tyr Pro Ile Glu 85 90 95		
	Leu Gln Val Ser Ala Gly Cys Glu Val His Pro Gly Asn Ala Ser Asn 100 105 110		

	Asn	Phe	Phe	His	Val	Ala	Phe	Gln	Gly	Lys	Asp	Ile	Leu	Ser	Phe	Gln	
				115				120					125				
	Gly	Thr	Ser	Trp	Glu	Pro	Thr	Gln	Glu	Ala	Pro	Leu	Trp	Val	Asp	Leu	
		130					135					140					
	Pro	Ile	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Asp	Lys	Trp	Thr	Arg	Glu	Thr	Val	Gln	
	145					150					155					160	
	Trp	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Cys	Pro	Gln	Phe	Val	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	
					165					170					175		
	Ser	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Gln	Val	Lys	Pro	Lys	Ala	Trp	Leu	
				180					185					190			
	Ser	Arg	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Leu	Val	Cys	His	
			195					200					205				
	Val	Ser	Gly	Phe	Tyr	Pro	Lys	Pro	Val	Trp	Val	Lys	Trp	Met	Arg	Gly	
		210					215					220					
[0070]	Glu	Gln	Glu	Gln	Gln	Gly	Thr	Gln	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Asn	Ala	
	225					230					235					240	
	Asp	Glu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Arg	Ala	Thr	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Gly	Glu	
					245					250					255		
	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Cys	Arg	Val	Lys	His	Ser	Ser	Leu	Glu	Gly	Gln	
				260					265					270			
	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	
			275					280					285				
	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Arg	Val	His	His	His	His	His	His	His	
		290					295					300					
	His																
	305																
	<210>	120															
	<211>	19															
	<212>	DNA															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	合成; F1															

	<400> 120 gtgectgetg tttctgetg	19
	<210> 121 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成; R1	
	<400> 121 tgccctgata ggaagtttgc	20
	<210> 122 <211> 6 <212> PRT <213> 人	
	<400> 122 Leu Ser Tyr Pro Leu Glu 1 5	
[0071]	<210> 123 <211> 17 <212> PRT <213> 人	
	<400> 123 Gln Gly Thr Ser Trp Glu Pro Thr Gln Glu Ala Pro Leu Trp Val Asn 1 5 10 15 Leu	
	<210> 124 <211> 5 <212> PRT <213> 人	
	<400> 124 Asp Tyr Ala Met His 1 5	
	<210> 125 <211> 5 <212> PRT <213> 人	
	<400> 125	

[0072]

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 126

Asp Met Cys Ser Ser Ser Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 127
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 127

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Asn Ser Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 128
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 128

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Lys Ser Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 129
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 129

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Trp Lys Ser Tyr Leu Asp Val
1 5 10

<210> 130
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 130

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Asn Ser Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 131

Thr Ile Ile Trp Asn Ser Ala Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 132
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 132

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 133
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

[0073]

<400> 133

Glu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 134
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 134

Glu Ile Asn His Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 135

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
1 5

<210> 136

<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 136

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
1 5

<210> 137
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 137

Ile Trp Asn Ser Ala Ile
1 5

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 138

[0074]

Asn His Ser Gly Ser
1 5

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 139

Asn Pro Ser Gly Ser
1 5

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 140

Asn His Ala Gly Ser
1 5

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 141

Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 142
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 142

Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly Asn Phe Pro Asn
1 5 10

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 143

Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

[0075]

<400> 144

Leu Leu Tyr Phe Gly Asp Thr Gln Leu Gly Val
1 5 10

<210> 145
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 145

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 146
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 146

Ser Ala Ser Asn Lys His Ser
1 5

	<210>	147
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人
	<400>	147
	Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Leu	
	1	5
	<210>	148
	<211>	124
	<212>	PRT
	<213>	人
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa是Q或E
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(6)..(6)
	<223>	Xaa是G或E
[0076]	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(13)..(13)
	<223>	Xaa是K或Q
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(91)..(91)
	<223>	Xaa是M或T
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(100)..(100)
	<223>	Xaa是M或L
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(104)..(104)
	<223>	Xaa是S或G
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(108)..(108)
	<223>	Xaa是D或E
	<400>	148
	Xaa Val Gln Leu Val Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Xaa Pro Gly Arg	
	1	5 10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
	20 25 30	

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

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

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

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

Ala Lys Asp Xaa Cys Ser Ser Xaa Gly Cys Pro Xaa Gly Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 149

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

[0077]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (45).. (45)

<223> X是N或K

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (59).. (59)

<223> X是S或P

<400> 149

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Xaa Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Xaa Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 150
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13).. (13)
<223> X是R或K

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (53).. (53)
<223> X是H或P

[0078] <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (54).. (54)
<223> X是S或A

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (104).. (104)
<223> X是W或Y

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (105).. (105)
<223> X是N或K

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (108).. (108)
<223> X是M或L

<400> 150

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Xaa Xaa Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Asp Val Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 151

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 151

[0079] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Ala Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asn Phe Pro Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ala
35 40 45

Leu Ile Phe Ser Ala Ser Asn Lys His Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Thr Gln Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 152

Asp Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Glu Gly Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 153

Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Asp Gly Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 154

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 154

Asp Met Cys Ser Ser Gly Gly Cys Pro Glu Gly Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

[0080]

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 155

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Leu Asp Val
1 5 10

<210> 156

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 156

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 157

<211> 335

<212> PRT

<213> 人

<400> 157

Met Gly Cys Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Gln Ala Trp

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

[0081]

	245	250	255
Ala Asp Glu Thr Trp Tyr Leu Arg	Ala Thr Leu Asp Val	Val Ala Gly	
260	265	270	
Glu Ala Ala Gly Leu Ser Cys Arg	Val Lys His Ser Ser	Leu Glu Gly	
275	280	285	
Gln Asp Ile Val Leu Tyr Trp Gly Gly	Ser Tyr Thr Ser Met Gly	Leu	
290	295	300	
Ile Ala Leu Ala Val Leu Ala Cys Leu	Leu Phe Leu Leu Ile Val	Gly	
305	310	315	320
Phe Thr Ser Arg Phe Lys Arg Gln Thr	Ser Tyr Gln Gly Val	Leu	
325	330	335	
<210> 158			
<211> 330			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 158			
[0082] Ala Ser Thr Lys Asn Pro Asp 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	
[0083]	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>	159															
	<211>	327															
	<212>	PRT															
	<213>	人															
	<400>	159															

	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	
[0084]	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> 160

<211> 327

<212> PRT

<213> 人

[0085]

<400> 160

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					
[0086]	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>	161															
	<211>	106															
	<212>	PRT															
	<213>	人															

<400> 161

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

[0087]

<210> 162

<211> 105

<212> PRT

<213> 人

<400> 162

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

[0088]

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

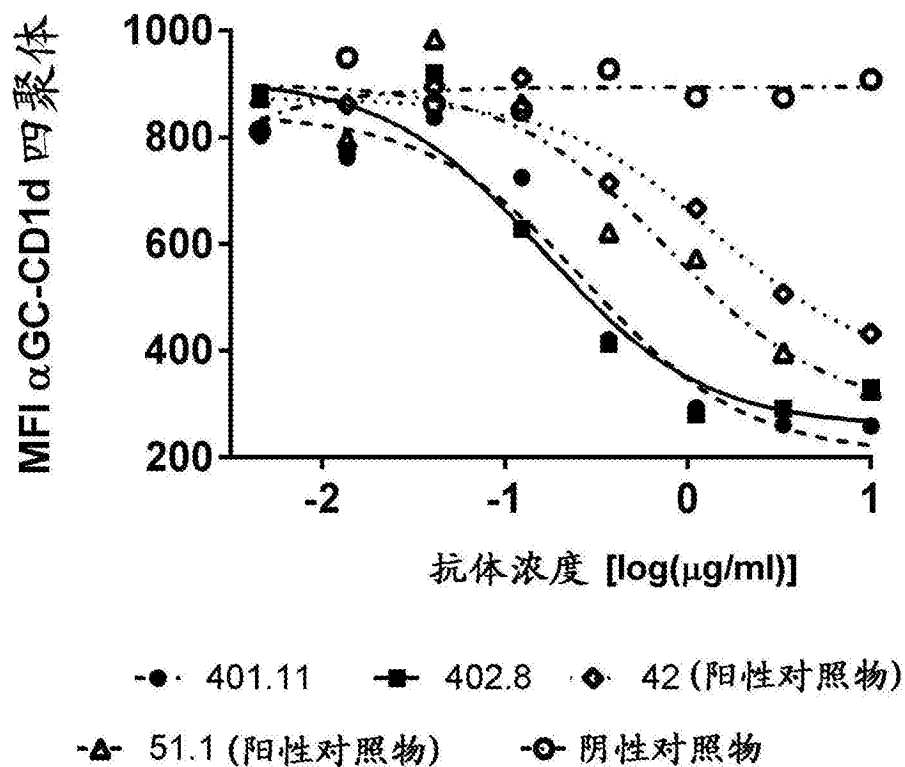


图1

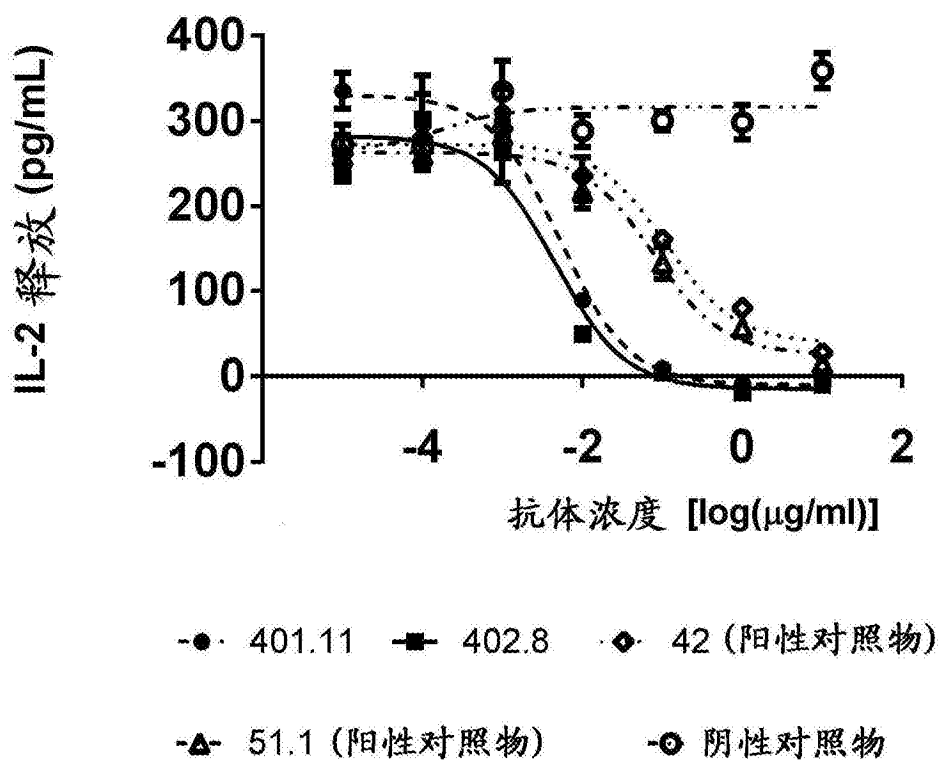
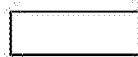
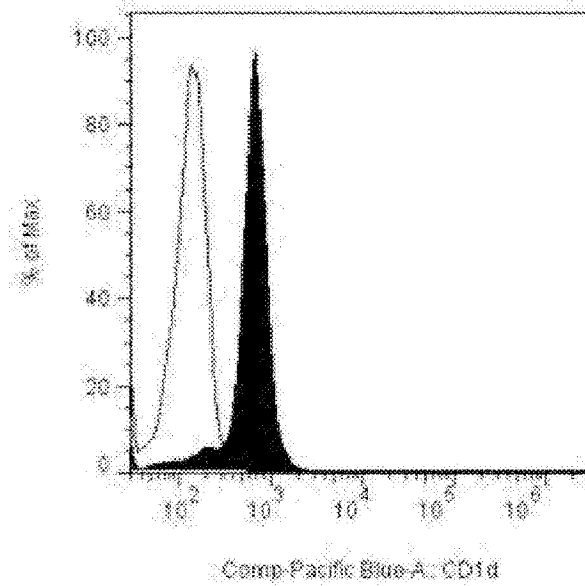


图2

人 CD11c-阳性 PBMC

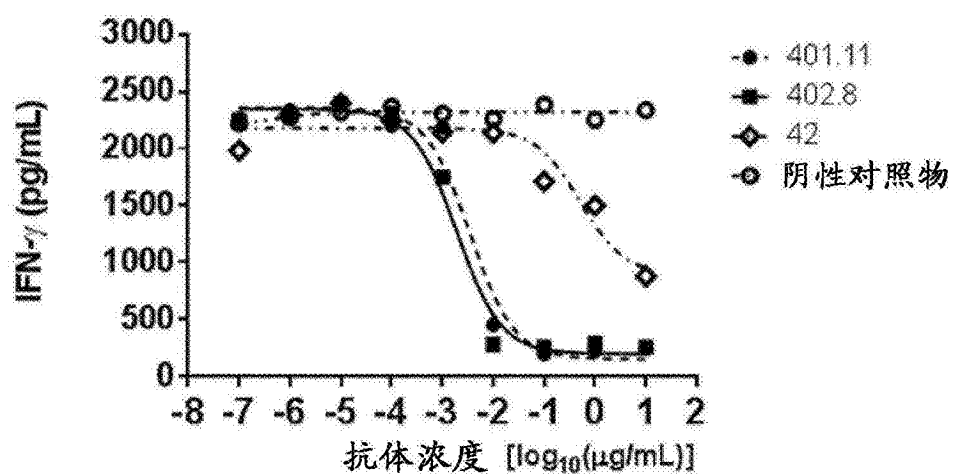
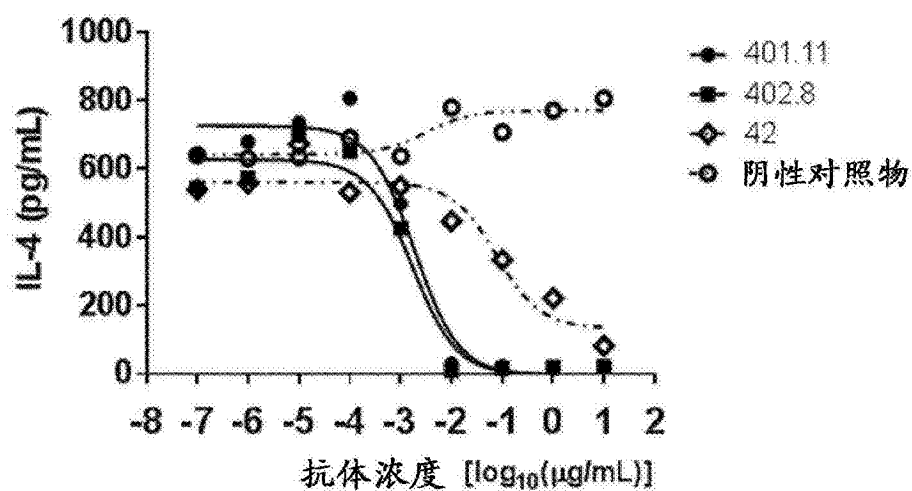


阴性对照物



抗-CD1d 402.8

图3

A**B**

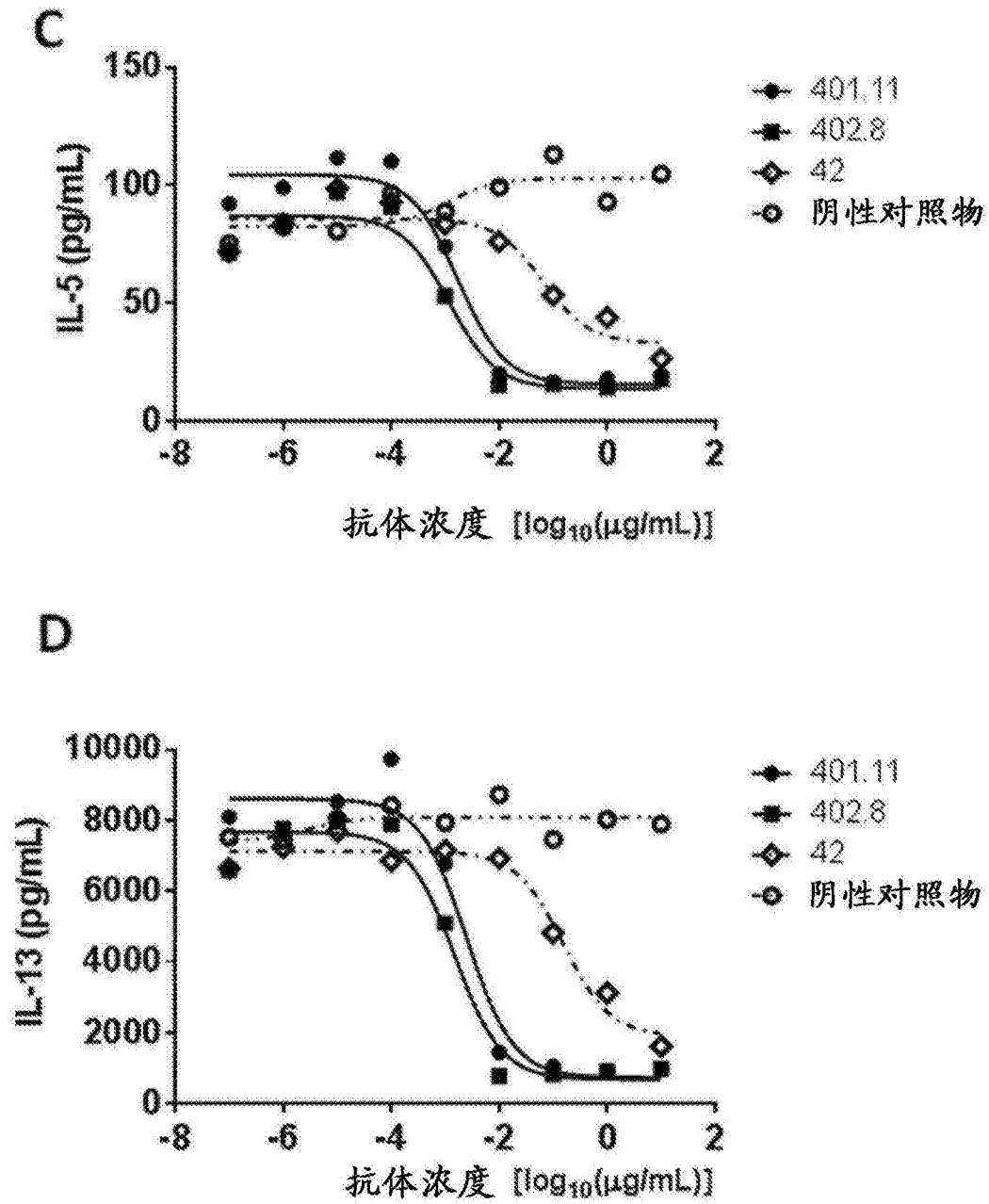
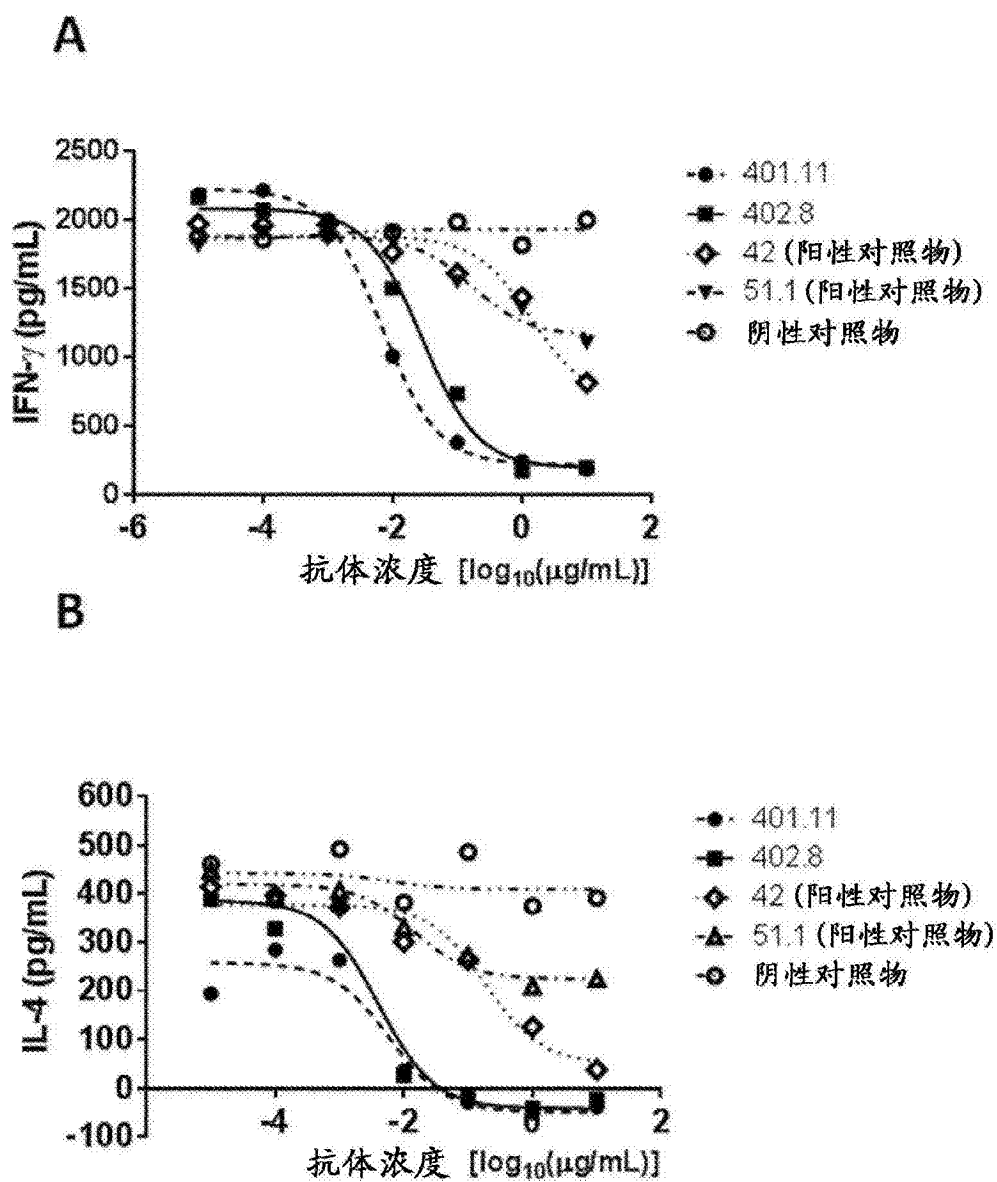
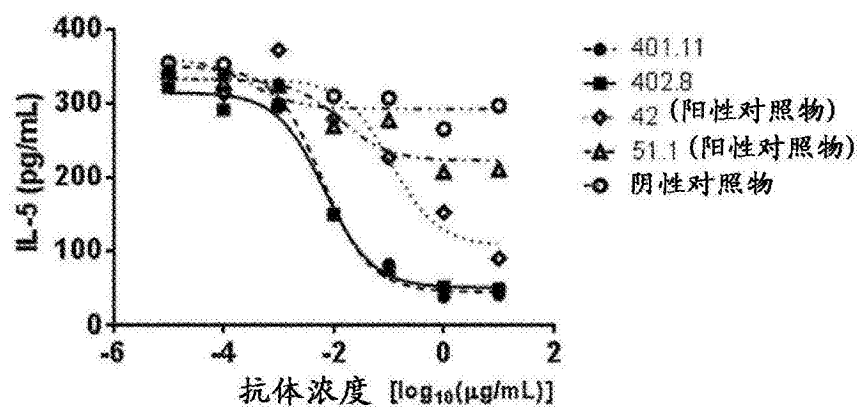


图4



C



D

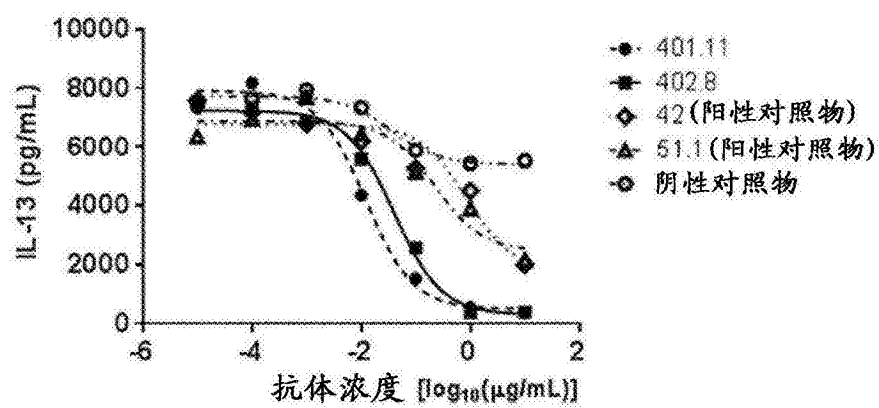


图5

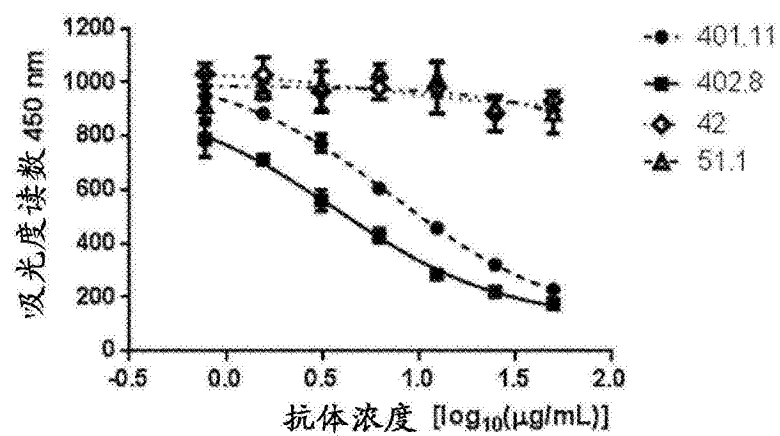
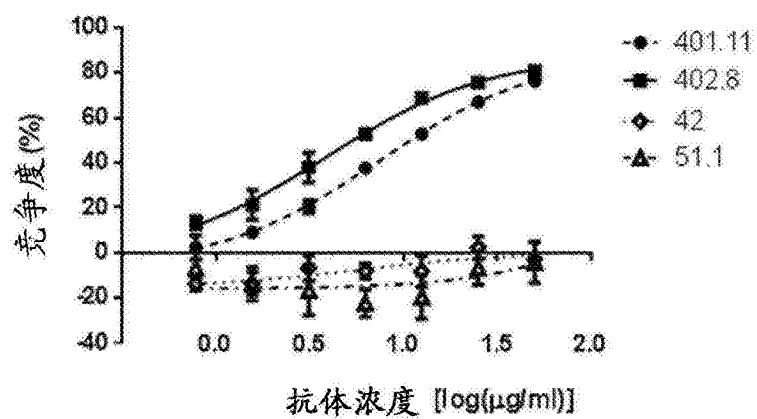
A**B**

图6

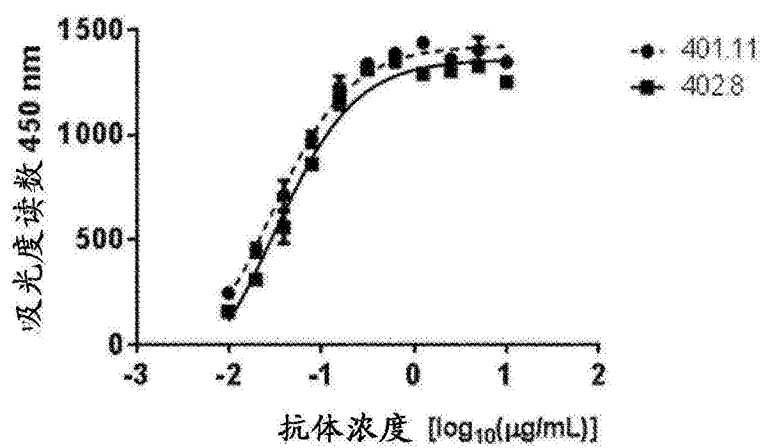
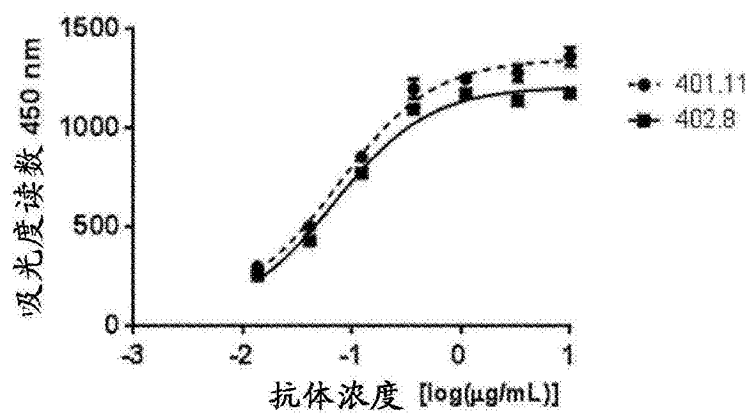
A**B**

图7

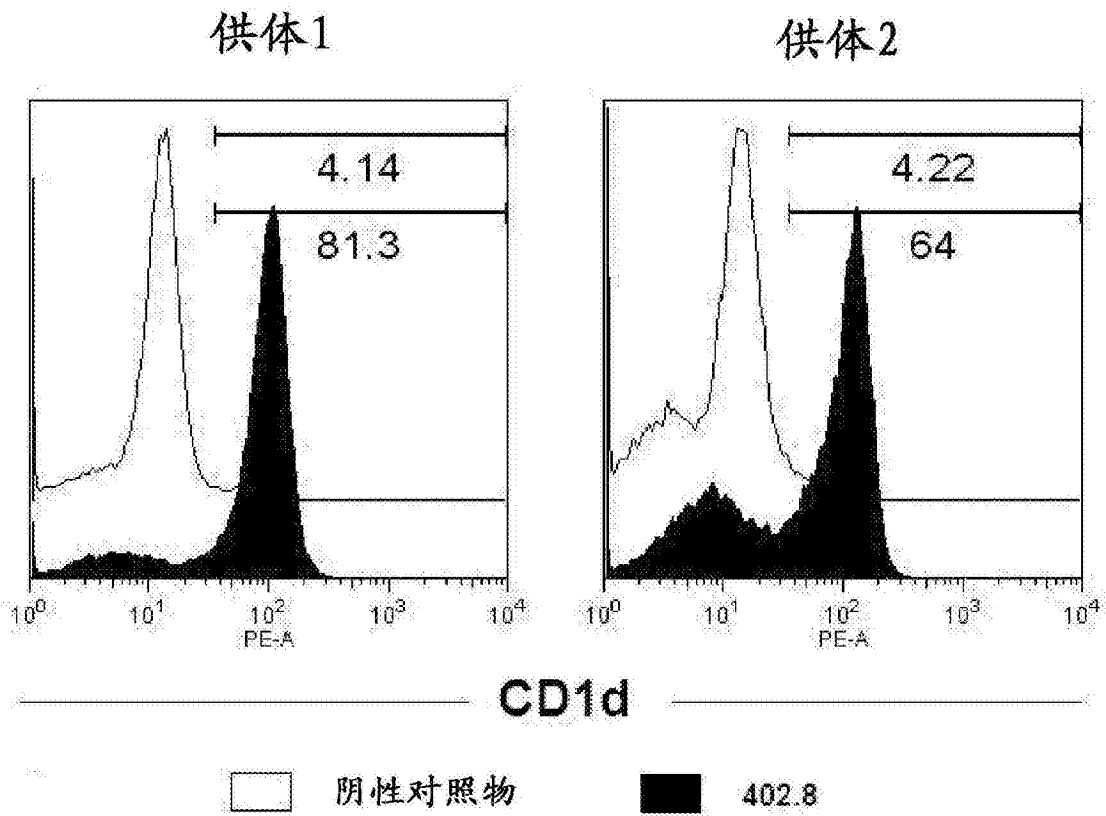


图8

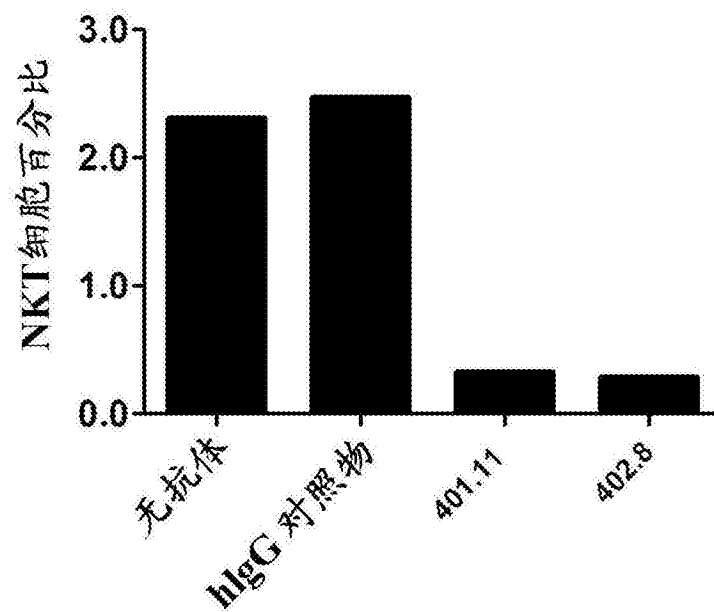


图9

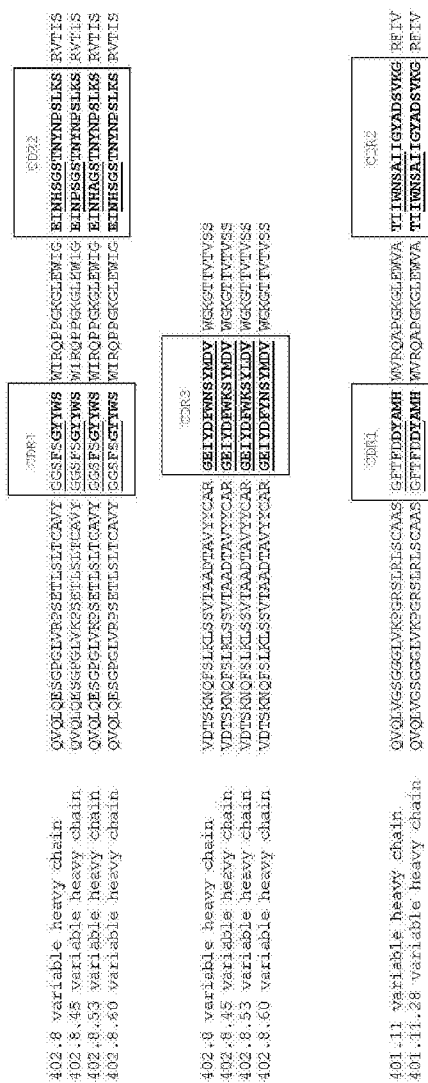


图10

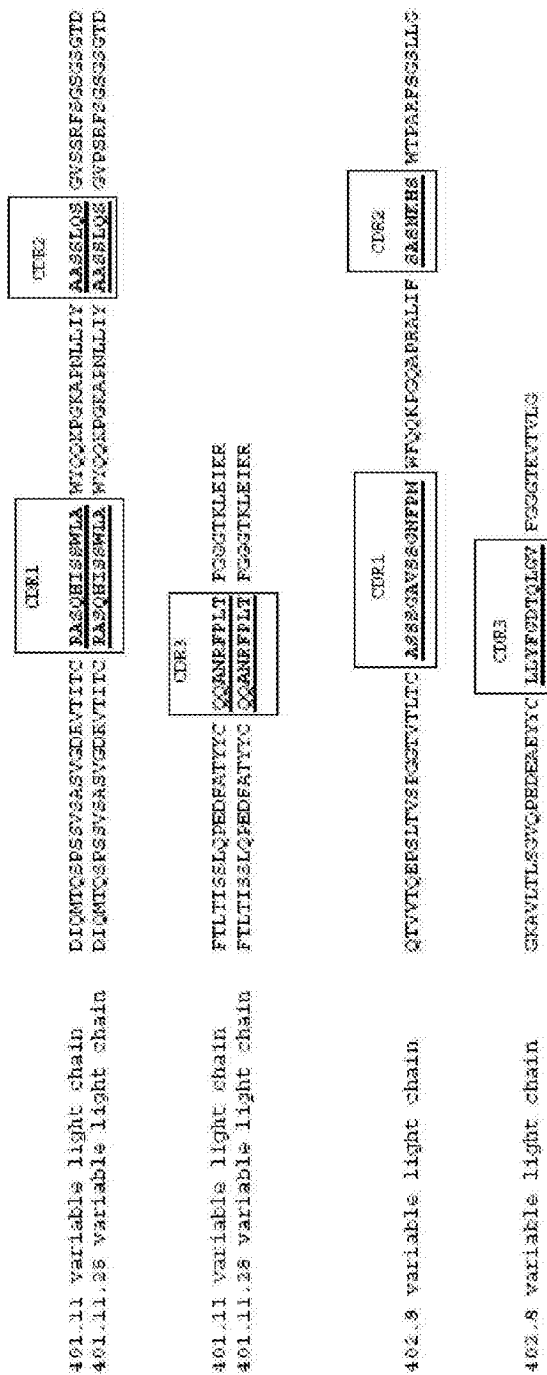


图11

[illegible]

1-615-284-1

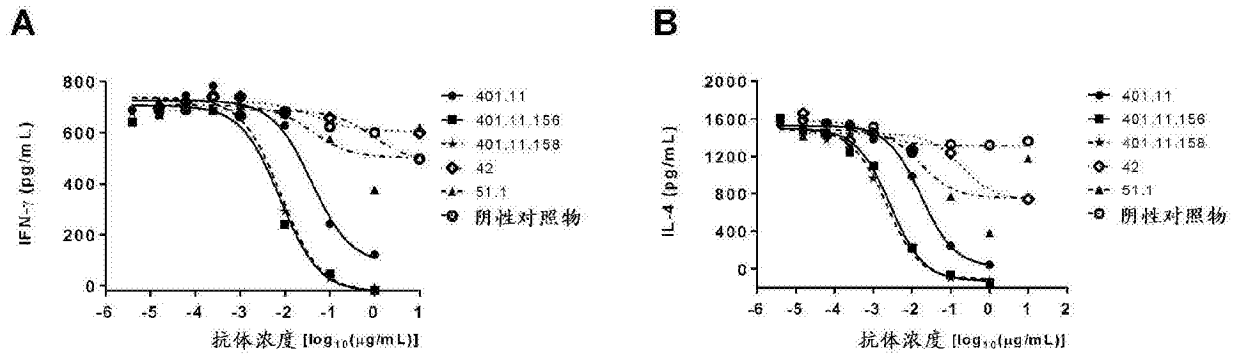


图14

402.8	K
402.9	A
403.0	K
403.1	K
403.2	K
403.3	K
403.4	K
403.5	K
403.6	K
403.7	K
403.8	K
403.9	K
404.0	K
404.1	K
404.2	K
404.3	K
404.4	K
404.5	K
404.6	K
404.7	K
404.8	K
404.9	K
405.0	K
405.1	K
405.2	K
405.3	K
405.4	K
405.5	K
405.6	K
405.7	K
405.8	K
405.9	K
406.0	K
406.1	K
406.2	K
406.3	K
406.4	K
406.5	K
406.6	K
406.7	K
406.8	K
406.9	K
407.0	K
407.1	K
407.2	K
407.3	K
407.4	K
407.5	K
407.6	K
407.7	K
407.8	K
407.9	K
408.0	K
408.1	K
408.2	K
408.3	K
408.4	K
408.5	K
408.6	K
408.7	K
408.8	K
408.9	K
409.0	K
409.1	K
409.2	K
409.3	K
409.4	K
409.5	K
409.6	K
409.7	K
409.8	K
409.9	K
410.0	K
410.1	K
410.2	K
410.3	K
410.4	K
410.5	K
410.6	K
410.7	K
410.8	K
410.9	K
411.0	K
411.1	K
411.2	K
411.3	K
411.4	K
411.5	K
411.6	K
411.7	K
411.8	K
411.9	K
412.0	K
412.1	K
412.2	K
412.3	K
412.4	K
412.5	K
412.6	K
412.7	K
412.8	K
412.9	K
413.0	K
413.1	K
413.2	K
413.3	K
413.4	K
413.5	K
413.6	K
413.7	K
413.8	K
413.9	K
414.0	K
414.1	K
414.2	K
414.3	K
414.4	K
414.5	K
414.6	K
414.7	K
414.8	K
414.9	K
415.0	K
415.1	K
415.2	K
415.3	K
415.4	K
415.5	K
415.6	K
415.7	K
415.8	K
415.9	K
416.0	K
416.1	K
416.2	K
416.3	K
416.4	K
416.5	K
416.6	K
416.7	K
416.8	K
416.9	K
417.0	K
417.1	K
417.2	K
417.3	K
417.4	K
417.5	K
417.6	K
417.7	K
417.8	K
417.9	K
418.0	K
418.1	K
418.2	K
418.3	K
418.4	K
418.5	K
418.6	K
418.7	K
418.8	K
418.9	K
419.0	K
419.1	K
419.2	K
419.3	K
419.4	K
419.5	K
419.6	K
419.7	K
419.8	K
419.9	K
420.0	K
420.1	K
420.2	K
420.3	K
420.4	K
420.5	K
420.6	K
420.7	K
420.8	K
420.9	K
421.0	K
421.1	K
421.2	K
421.3	K
421.4	K
421.5	K
421.6	K
421.7	K
421.8	K
421.9	K
422.0	K
422.1	K
422.2	K
422.3	K
422.4	K
422.5	K
422.6	K
422.7	K
422.8	K
422.9	K
423.0	K
423.1	K
423.2</	

图15

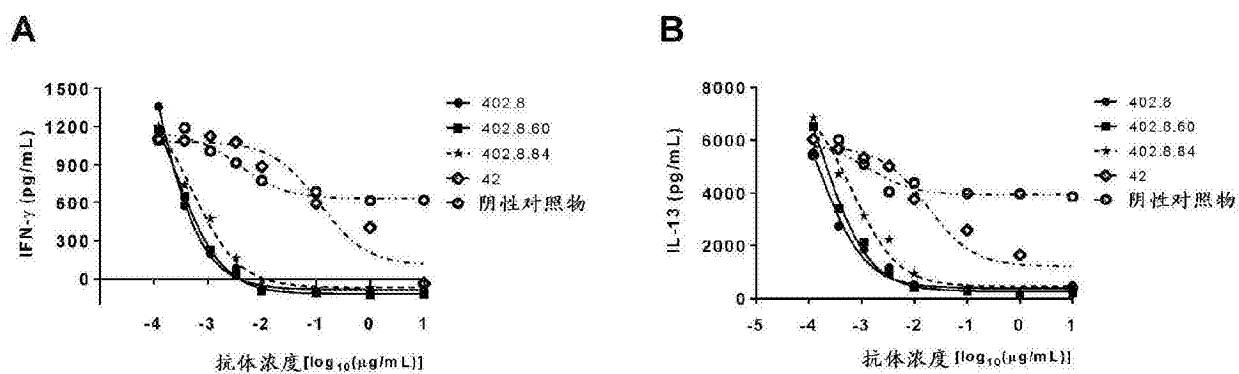


图16

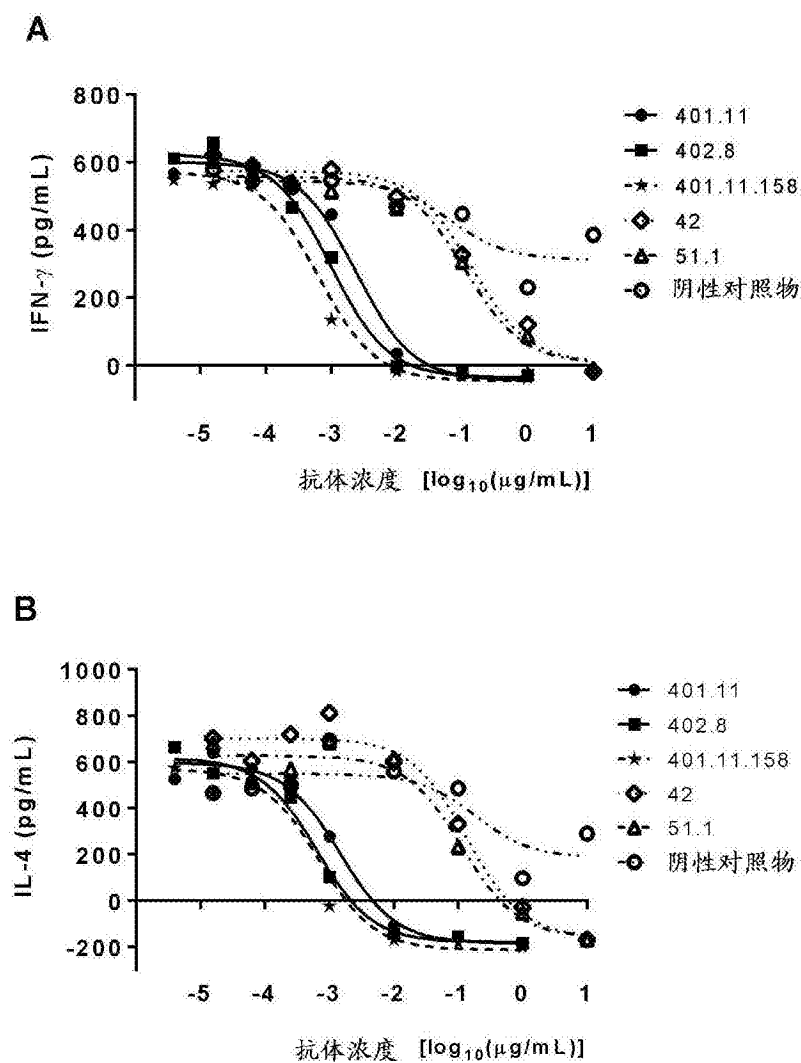


图17

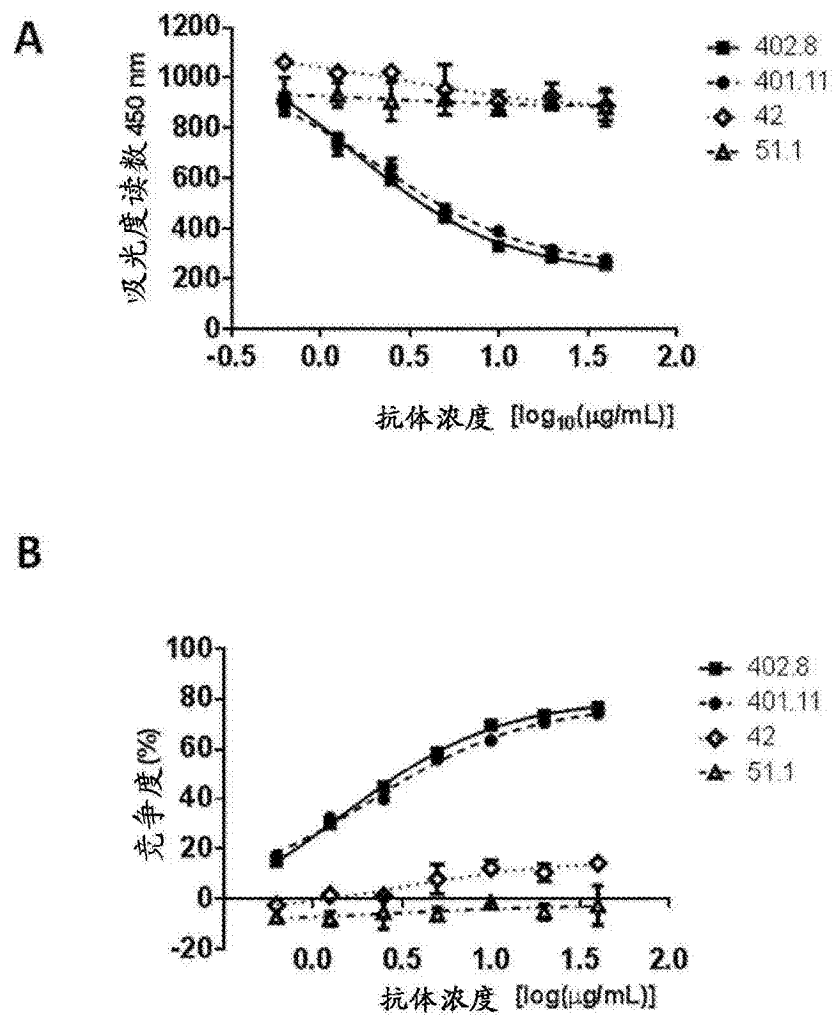


图18

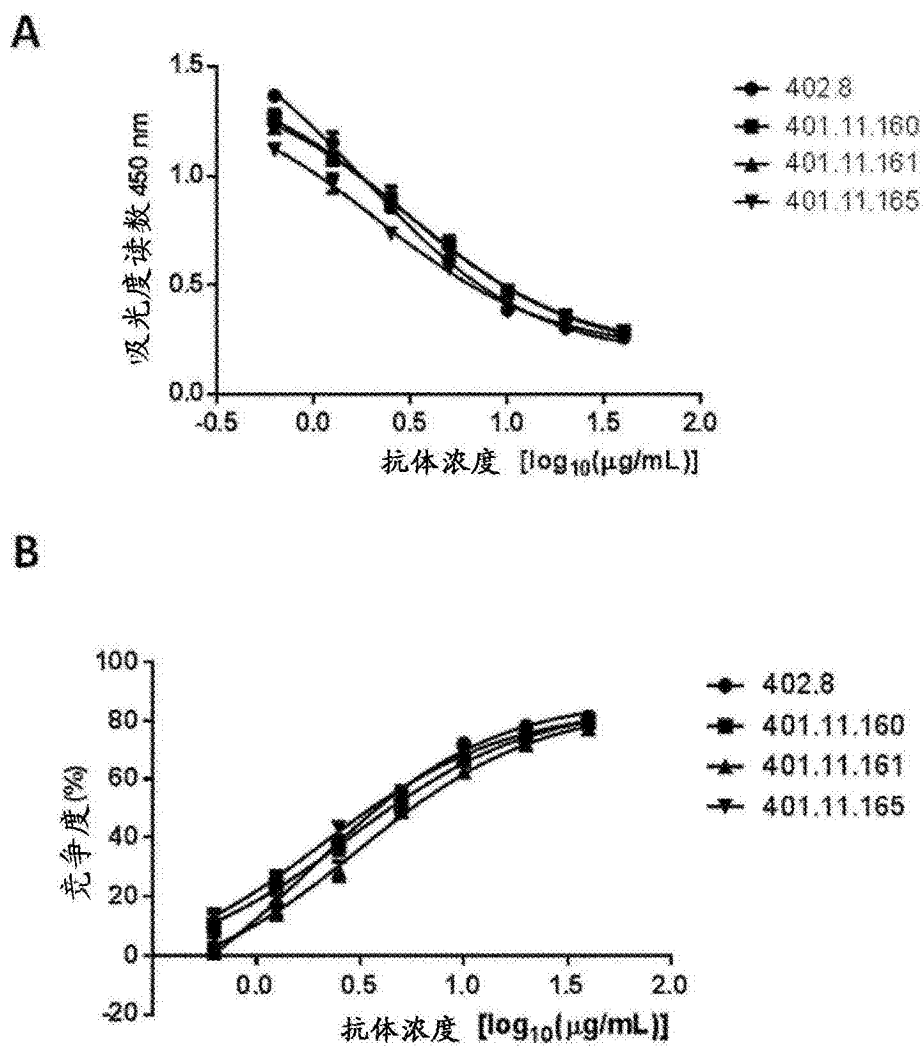


图19

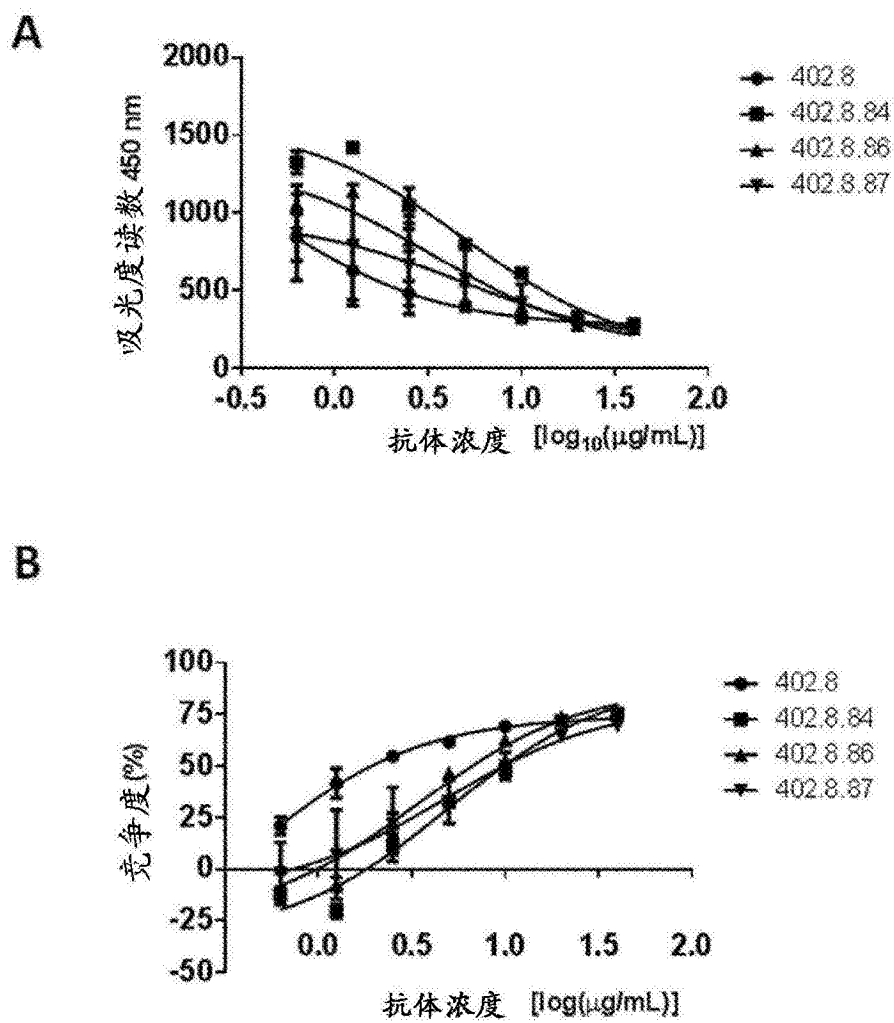


图20

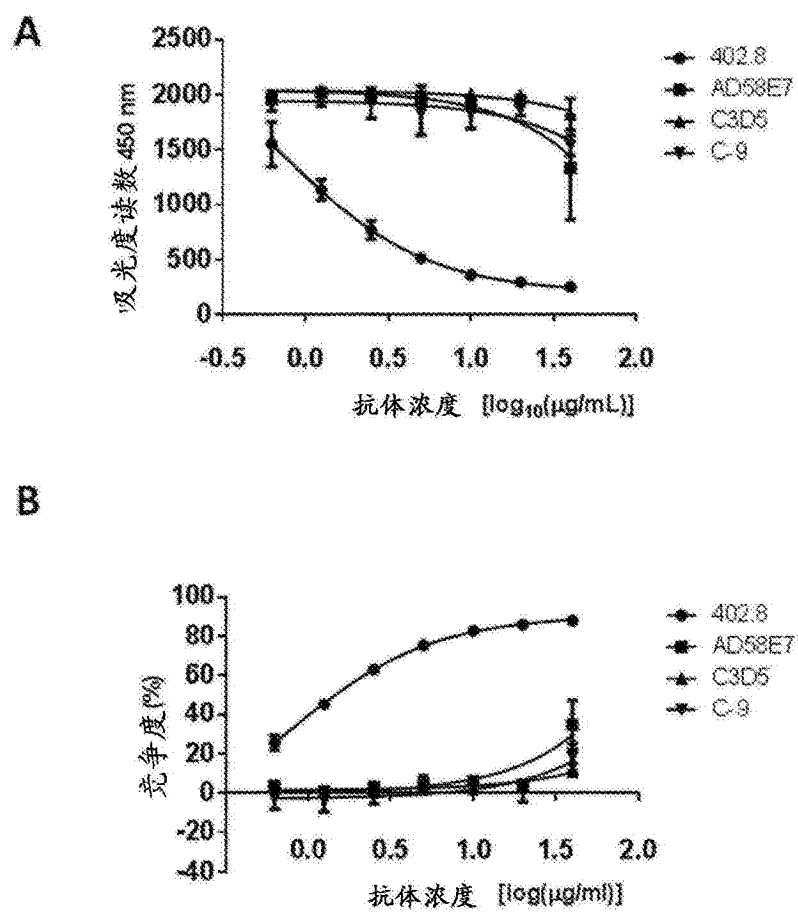


图21

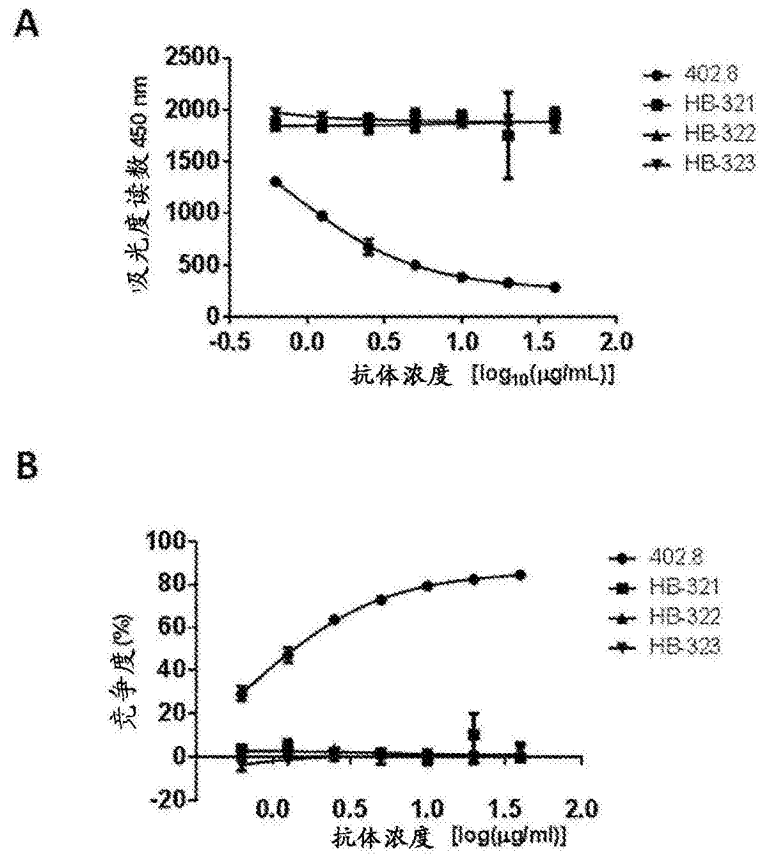


图22

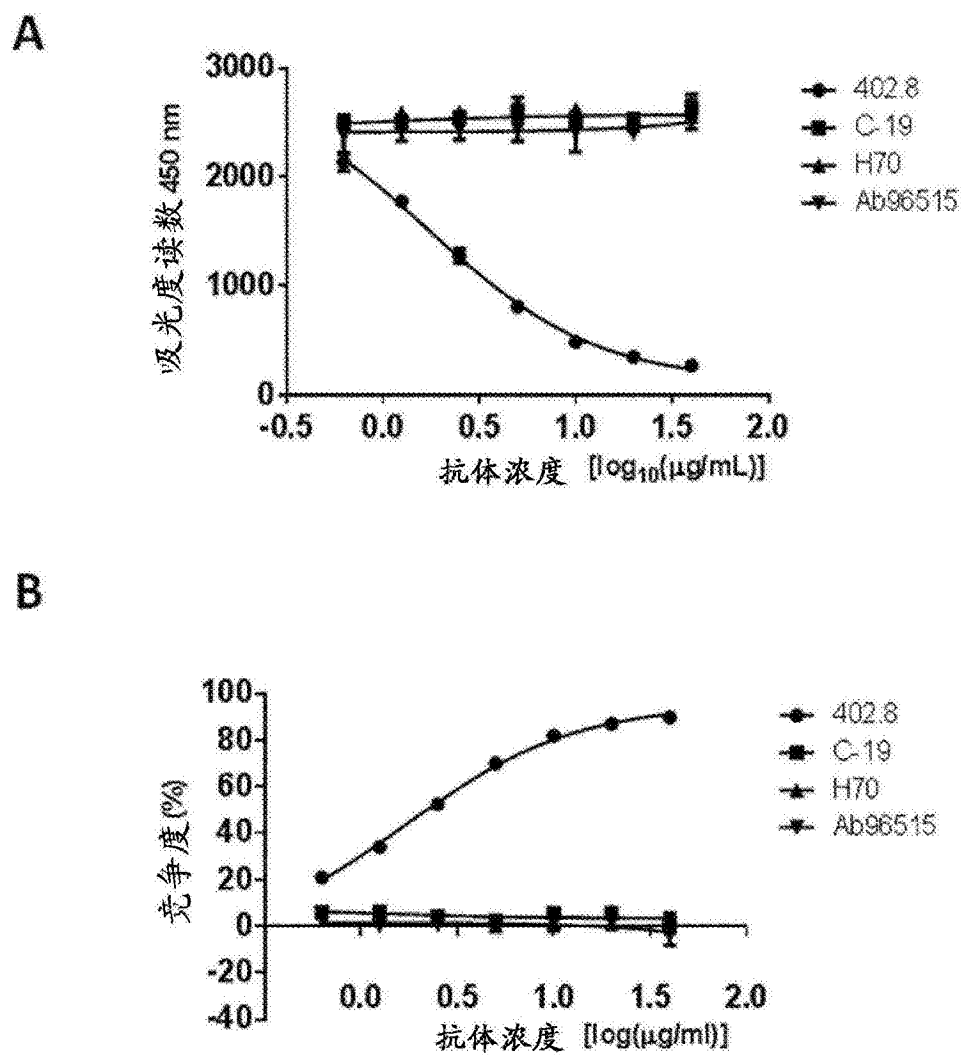


图23

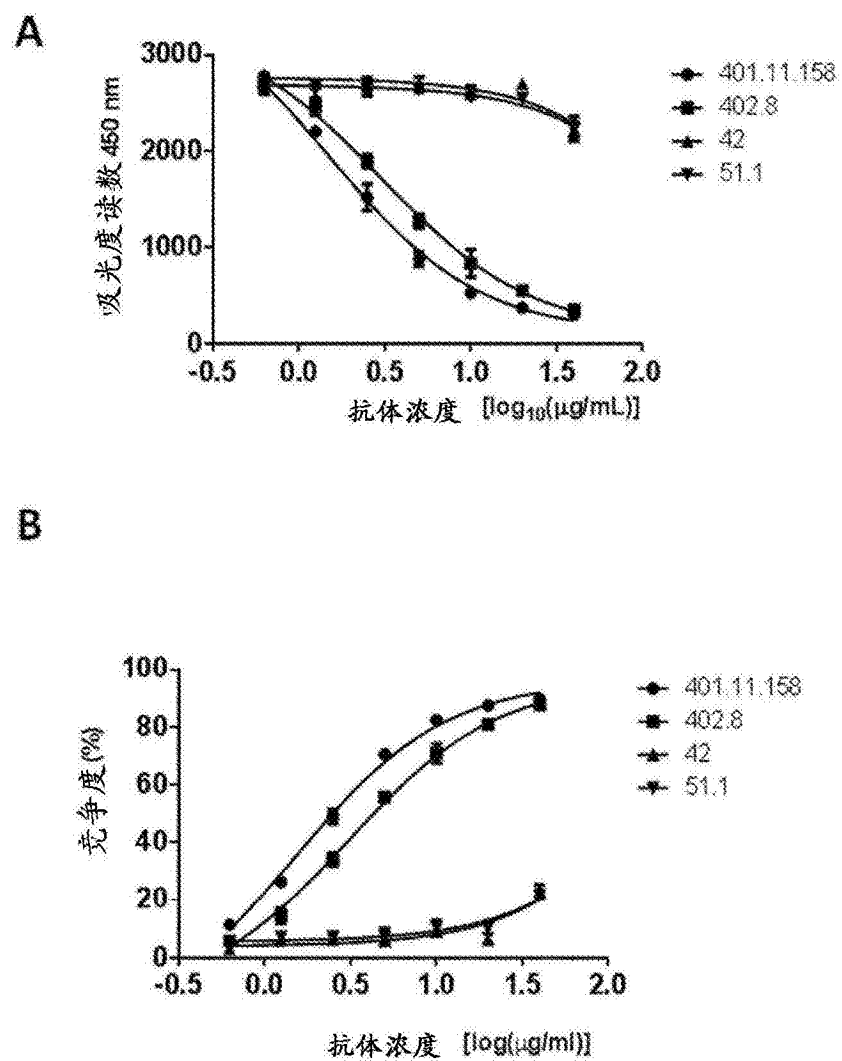


图24

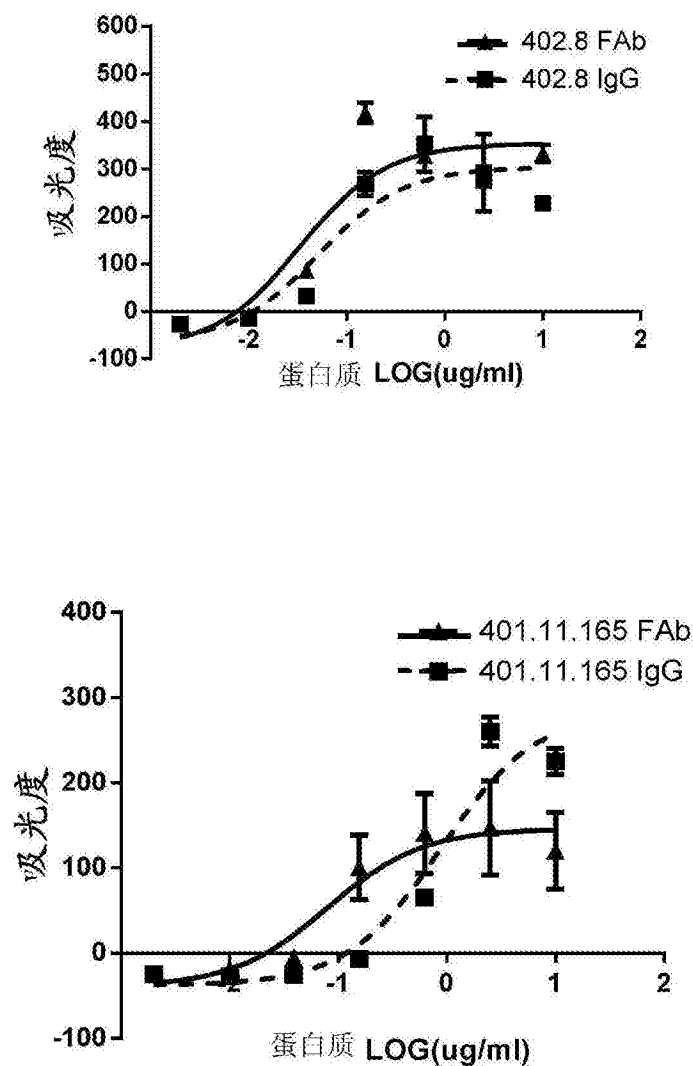
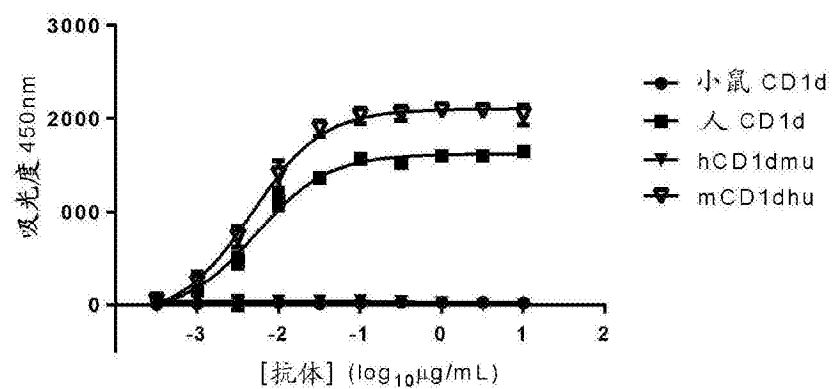


图25

human CD1d	EVPOELFPLRLCLQISFANSSWTFDGLANGLQTHSNENSTIVRSLEFMSQGTSTFQQTQNETLQHLFRTYRSSTFDV	FEPAFM	LPDS--YPL	ELQVEMKCEVHPGNASHNFFHVARQKHDIILSPGTSKSEPTKEPLMY	NLA	IGVLMQDKETPETVQ
mouse CD1d	--Q-KNYTF...M...R...S...SVV...D...K...A...ISFT...KL...N...K...M...Q...V...I	Q...LV...	MSPKED...I	I...L...MY...ES...L...YVVE...N...QTVEG...S...L...D...P...E...A...QG...SA...	D...P...	E...A...QG...SA...
hCD1dhu	--Q-KNYTF...M...R...S...SVV...D...R...A...ISFT...KL...N...K...M...Q...V...I	Q...LV...	MSPKED...I	I...L...MY...ES...L...YVVE...N...QTVEG...S...L...D...P...E...A...QG...SA...	D...P...	E...A...QG...SA...
hCD1dhu		Q...LV...	MSPKED...I	I...L...MY...ES...L...YVVE...N...QTVEG...S...L...D...P...E...A...QG...SA...	D...P...	E...A...QG...SA...
human CD1d						
mouse CD1d						
hCD1dhu						
hCD1dhu						
human CD1d						
mouse CD1d						
hCD1dhu						
hCD1dhu						

图26

402.8



B

401.11.158

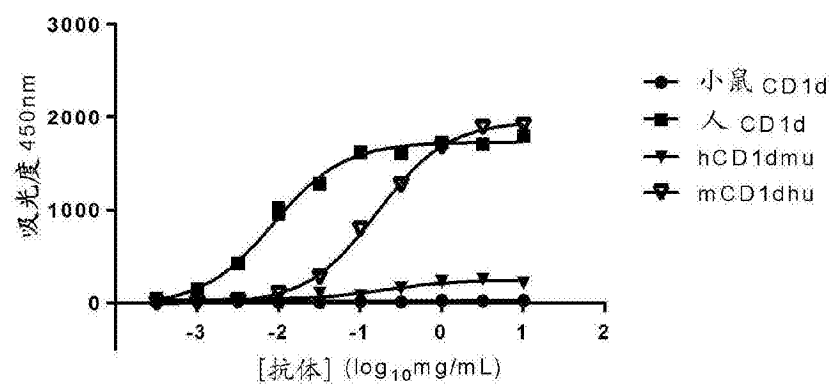


图27

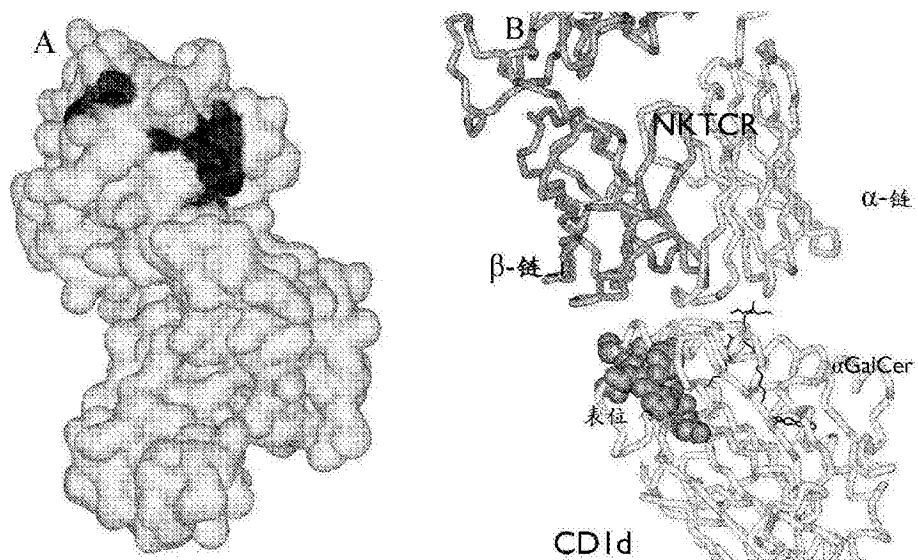


图28

[illegible]

图29A

CD41	CD42	CD43	CD44	CD45	CD46	CD47	CD48	CD49	CD50	CD51	CD52	CD53	CD54	CD55	CD56	CD57	CD58	CD59	CD60	CD61	CD62	CD63	CD64	CD65	CD66	CD67	CD68	CD69	CD70	CD71	CD72	CD73	CD74	CD75	CD76	CD77	CD78	CD79	CD80	CD81	CD82	CD83	CD84	CD85	CD86	CD87	CD88	CD89	CD90	CD91	CD92	CD93	CD94	CD95	CD96	CD97	CD98	CD99	CD100	CD101	CD102	CD103	CD104	CD105	CD106	CD107	CD108	CD109	CD110	CD111	CD112	CD113	CD114	CD115	CD116	CD117	CD118	CD119	CD120	CD121	CD122	CD123	CD124	CD125	CD126	CD127	CD128	CD129	CD130	CD131	CD132	CD133	CD134	CD135	CD136	CD137	CD138	CD139	CD140	CD141	CD142	CD143	CD144	CD145	CD146	CD147	CD148	CD149	CD150	CD151	CD152	CD153	CD154	CD155	CD156	CD157	CD158	CD159	CD160	CD161	CD162	CD163	CD164	CD165	CD166	CD167	CD168	CD169	CD170	CD171	CD172	CD173	CD174	CD175	CD176	CD177	CD178	CD179	CD180	CD181	CD182	CD183	CD184	CD185	CD186	CD187	CD188	CD189	CD190	CD191	CD192	CD193	CD194	CD195	CD196	CD197	CD198	CD199	CD200	CD201	CD202	CD203	CD204	CD205	CD206	CD207	CD208	CD209	CD210	CD211	CD212	CD213	CD214	CD215	CD216	CD217	CD218	CD219	CD220	CD221	CD222	CD223	CD224	CD225	CD226	CD227	CD228	CD229	CD230	CD231	CD232	CD233	CD234	CD235	CD236	CD237	CD238	CD239	CD240	CD241	CD242	CD243	CD244	CD245	CD246	CD247	CD248	CD249	CD250	CD251	CD252	CD253	CD254	CD255	CD256	CD257	CD258	CD259	CD260	CD261	CD262	CD263	CD264	CD265	CD266	CD267	CD268	CD269	CD270	CD271	CD272	CD273	CD274	CD275	CD276	CD277	CD278	CD279	CD280	CD281	CD282	CD283	CD284	CD285	CD286	CD287	CD288	CD289	CD290	CD291	CD292	CD293	CD294	CD295	CD296	CD297	CD298	CD299	CD300	CD301	CD302	CD303	CD304	CD305	CD306	CD307	CD308	CD309	CD310	CD311	CD312	CD313	CD314	CD315	CD316	CD317	CD318	CD319	CD320	CD321	CD322	CD323	CD324	CD325	CD326	CD327	CD328	CD329	CD330	CD331	CD332	CD333	CD334	CD335	CD336	CD337	CD338	CD339	CD340	CD341	CD342	CD343	CD344	CD345	CD346	CD347	CD348	CD349	CD350	CD351	CD352	CD353	CD354	CD355	CD356	CD357	CD358	CD359	CD360	CD361	CD362	CD363	CD364	CD365	CD366	CD367	CD368	CD369	CD370	CD371	CD372	CD373	CD374	CD375	CD376	CD377	CD378	CD379	CD380	CD381	CD382	CD383	CD384	CD385	CD386	CD387	CD388	CD389	CD390	CD391	CD392	CD393	CD394	CD395	CD396	CD397	CD398	CD399	CD400	CD401	CD402	CD403	CD404	CD405	CD406	CD407	CD408	CD409	CD410	CD411	CD412	CD413	CD414	CD415	CD416	CD417	CD418	CD419	CD420	CD421	CD422	CD423	CD424	CD425	CD426	CD427	CD428	CD429	CD430	CD431	CD432	CD433	CD434	CD435	CD436	CD437	CD438	CD439	CD440	CD441	CD442	CD443	CD444	CD445	CD446	CD447	CD448	CD449	CD450	CD451	CD452	CD453	CD454	CD455	CD456	CD457	CD458	CD459	CD460	CD461	CD462	CD463	CD464	CD465	CD466	CD467	CD468	CD469	CD470	CD471	CD472	CD473	CD474	CD475	CD476	CD477	CD478	CD479	CD480	CD481	CD482	CD483	CD484	CD485	CD486	CD487	CD488	CD489	CD490	CD491	CD492	CD493	CD494	CD495	CD496	CD497	CD498	CD499	CD500	CD501	CD502	CD503	CD504	CD505	CD506	CD507	CD508	CD509	CD510	CD511	CD512	CD513	CD514	CD515	CD516	CD517	CD518	CD519	CD520	CD521	CD522	CD523	CD524	CD525	CD526	CD527	CD528	CD529	CD530	CD531	CD532	CD533	CD534	CD535	CD536	CD537	CD538	CD539	CD540	CD541	CD542	CD543	CD544	CD545	CD546	CD547	CD548	CD549	CD550	CD551	CD552	CD553	CD554	CD555	CD556	CD557	CD558	CD559	CD560	CD561	CD562	CD563	CD564	CD565	CD566	CD567	CD568	CD569	CD570	CD571	CD572	CD573	CD574	CD575	CD576	CD577	CD578	CD579	CD580	CD581	CD582	CD583	CD584	CD585	CD586	CD587	CD588	CD589	CD590	CD591	CD592	CD593	CD594	CD595	CD596	CD597	CD598	CD599	CD600	CD601	CD602	CD603	CD604	CD605	CD606	CD607	CD608	CD609	CD610	CD611	CD612	CD613	CD614	CD615	CD616	CD617	CD618	CD619	CD620	CD621	CD622	CD623	CD624	CD625	CD626	CD627	CD628	CD629	CD630	CD631	CD632	CD633	CD634	CD635	CD636	CD637	CD638	CD639	CD640	CD641	CD642	CD643	CD644	CD645	CD646	CD647	CD648	CD649	CD650	CD651	CD652	CD653	CD654	CD655	CD656	CD657	CD658	CD659	CD660	CD661	CD662	CD663	CD664	CD665	CD666	CD667	CD668	CD669	CD670	CD671	CD672	CD673	CD674	CD675	CD676	CD677	CD678	CD679	CD680	CD681	CD682	CD683	CD684	CD685	CD686	CD687	CD688	CD689	CD690	CD691	CD692	CD693	CD694	CD695	CD696	CD697	CD698	CD699	CD700	CD701	CD702	CD703	CD704	CD705	CD706	CD707	CD708	CD709	CD710	CD711	CD712	CD713	CD714	CD715	CD716	CD717	CD718	CD719	CD720	CD721	CD722	CD723	CD724	CD725	CD726	CD727	CD728	CD729	CD730	CD731	CD732	CD733	CD734	CD735	CD736	CD737	CD738	CD739	CD740	CD741	CD742	CD743	CD744	CD745	CD746	CD747	CD748	CD749	CD750	CD751	CD752	CD753	CD754	CD755	CD756	CD757	CD758	CD759	CD760	CD761	CD762	CD763	CD764	CD765	CD766	CD767	CD768	CD769	CD770	CD771	CD772	CD773	CD774	CD775	CD776	CD777	CD778	CD779	CD780	CD781	CD782	CD783	CD784	CD785	CD786	CD787	CD788	CD789	CD790	CD791	CD792	CD793	CD794	CD795	CD796	CD797	CD798	CD799	CD800	CD801	CD802	CD803	CD804	CD805	CD806	CD807	CD808	CD809	CD810	CD811	CD812	CD813	CD814	CD815	CD816	CD817	CD818	CD819	CD820	CD821	CD822	CD823	CD824	CD825	CD826	CD827	CD828	CD829	CD830	CD831	CD832	CD833	CD834	CD835	CD836	CD837	CD838	CD839	CD840	CD841	CD842	CD843	CD844	CD845	CD846	CD847	CD848	CD849	CD850	CD851	CD852	CD853	CD854	CD855	CD856	CD857	CD858	CD859	CD860	CD861	CD862	CD863	CD864	CD865	CD866	CD867	CD868	CD869	CD870	CD871	CD872	CD873	CD874	CD875	CD876	CD877	CD878	CD879	CD880	CD881	CD882	CD883	CD884	CD885	CD886	CD887	CD888	CD889	CD890	CD891	CD892	CD893	CD894	CD895	CD896	CD897	CD898	CD899	CD900	CD901	CD902	CD903	CD904	CD905	CD906	CD907	CD908	CD909	CD910	CD911	CD912	CD913	CD914	CD915	CD916	CD917	CD918	CD919	CD920	CD921	CD922	CD923	CD924	CD925	CD926	CD927	CD928	CD929	CD930	CD931	CD932	CD933	CD934	CD935	CD936	CD937	CD938	CD939	CD940	CD941	CD942	CD943	CD944	CD945	CD946	CD947	CD948	CD949	CD950	CD951	CD952	CD953	CD954	CD955	CD956	CD957	CD958	CD959	CD960	CD961	CD962	CD963	CD964	CD965	CD966	CD967	CD968	CD969	CD970	CD971	CD972	CD973	CD974	CD975	CD976	CD977	CD978	CD979	CD980	CD981	CD982	CD983	CD984	CD985	CD986	CD987	CD988	CD989	CD990	CD991	CD992	CD993	CD994	CD995	CD996	CD997	CD998	CD999	CD1000
CD1001	CD1002	CD1003	CD1004	CD1005	CD1006	CD1007	CD1008	CD1009	CD1010	CD1011	CD1012	CD1013	CD1014	CD1015	CD1016	CD1017	CD1018	CD1019	CD1020	CD1021	CD1022	CD1023	CD1024	CD1025	CD1026	CD1027	CD1028	CD1029	CD1030	CD1031	CD1032	CD1033	CD1034	CD1035	CD1036	CD1037	CD1038	CD1039	CD1040	CD1041	CD1042	CD1043	CD1044	CD1045	CD1046	CD1047	CD1048	CD1049	CD1050	CD1051	CD1052	CD1053	CD1054	CD1055	CD1056	CD1057	CD1058	CD1059	CD1060	CD1061	CD1062	CD1063	CD1064	CD1065	CD1066	CD1067	CD1068	CD1069	CD1070	CD1071	CD1072	CD1073	CD1074	CD1075	CD1076	CD1077	CD1078	CD1079	CD1080	CD1081	CD1082	CD1083	CD1084	CD1085	CD1086	CD1087	CD1088	CD1089	CD1090	CD1091	CD1092	CD1093	CD1094	CD1095	CD1096	CD1097	CD1098	CD1099	CD1100	CD1101	CD1102	CD1103	CD1104	CD1105	CD1106	CD1107	CD1108	CD1109	CD1110	CD1111	CD1112	CD1113	CD1114	CD1115	CD1116	CD1117	CD1118	CD1119	CD1120	CD1121	CD1122	CD1123	CD1124	CD1125	CD1126	CD1127	CD1128	CD1129	CD1130	CD1131	CD1132	CD1133	CD1134	CD1135	CD1136	CD1137	CD1138	CD1139	CD1140	CD1141	CD1142	CD1143	CD1144	CD1145	CD1146	CD1147	CD1148	CD1149	CD1150	CD1151	CD1152	CD1153	CD1154	CD1155	CD1156	CD1157	CD1158	CD1159	CD1160	CD1161	CD1162	CD1163	CD1164	CD1165	CD1166	CD1167	CD1168	CD1169	CD1170	CD1171	CD1172	CD1173	CD1174	CD1175	CD1176	CD1177	CD1178	CD1179	CD1180	CD1181	CD1182	CD1183	CD1184	CD1185	CD1186	CD1187	CD1188	CD1189	CD1190	CD1191	CD1192	CD1193	CD1194	CD1195	CD1196	CD1197	CD1198	CD1199	CD1200																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
CD1201	CD1202	CD1203	CD1204	CD1205	CD1206	CD1207	CD1208	CD1209	CD1210	CD1211	CD1212	CD1213	CD1214	CD1215	CD1216	CD1217	CD1218	CD1219	CD1220	CD1221	CD1222	CD1223	CD1224	CD1225	CD1226	CD1227	CD1228	CD1229	CD1230	CD1231	CD1232	CD1233	CD1234	CD1235	CD1236	CD1237	CD1238	CD1239	CD1240	CD1241	CD1242	CD1243	CD1244	CD1245	CD1246	CD1247	CD1248	CD1249	CD1250	CD1251	CD1252	CD1253	CD1254	CD1255	CD1256	CD1257	CD1258	CD1259	CD1260	CD1261	CD1262	CD1263	CD1264	CD1265	CD1266	CD1267	CD1268	CD1269	CD1270	CD1271	CD1272	CD1273	CD1274	CD1275	CD1276	CD1277	CD1278	CD1279	CD1280	CD1281	CD1282	CD1283	CD1284	CD1285	CD1286	CD1287	CD1288	CD1289	CD1290	CD1291	CD1292	CD1293	CD1294	CD1295	CD1296	CD1297	CD1298	CD1299	CD1300	CD1301	CD1302	CD1303	CD1304	CD1305	CD1306	CD1307	CD1308	CD1309	CD1310	CD1311	CD1312	CD1313	CD1314	CD1315	CD1316	CD1317	CD1318	CD1319	CD1320	CD1321	CD1322	CD1323	CD1324	CD1325	CD1326	CD1327	CD1328	CD1329	CD1330	CD1331	CD1332	CD1333	CD1334	CD1335	CD1336	CD1337	CD1338	CD1339	CD1340	CD1341	CD1342	CD1343	CD1344	CD1345	CD1346	CD1347	CD1348	CD1349	CD1350	CD1351	CD1352	CD1353	CD1354	CD1355	CD1356	CD1357	CD1358	CD1359	CD1360	CD1361	CD1362	CD1363	CD1364	CD1365	CD1366	CD1367	CD1368	CD1369	CD1370	CD1371	CD1372	CD1373	CD1374	CD1375	CD1376	CD1377	CD1378	CD1379																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													

图 29B

402.8.40	QVLLDSGQVLEVPSTLSTQNT	SSSESTLWS	WLPDPDEWIS	EVHDEETNPSLSLS	EVTSITSTHDSFSLKLSVATATATVTCSE	SEIYFNNHLY	KSGSTVTVNS
402.8.41	Y	E	E	F	A	E	A
402.8.42	Y	E	E	A	A	Y	R
402.8.43	E	E	E	A	A	Y	R
402.8.44	E	E	E	A	A	Y	R
402.8.45	E	E	E	A	A	Y	R
402.8.46	E	E	E	A	A	Y	R
402.8.47	E	E	E	A	A	Y	R
共有序列	QVLLDSGQVLEVPSTLSTQNT	SSSESTLWS	WLPDPDEWIS	EVHDEETNPSLSLS	EVTSITSTHDSFSLKLSVATATATVTCSE	SEIYFNNHLY	KSGSTVTVNS
	F			IR		WN M	
	E			PA		YE L	

图30A

402.8	QTVVTEPSLITWSPGTVTLTC	ASSGQNTSSNPEH	WFOQPSQSPHALIF	WTPAPASGLLASHAVITLSQNP	LIYENFTQLAY	PGSGSTVTVNS
402.8.48	Y	E	E	A	A	A
402.8.49	Y	E	E	A	A	A
402.8.50	Y	E	E	A	A	A
402.8.51	Y	E	E	A	A	A
402.8.52	Y	E	E	A	A	A
402.8.53	Y	E	E	A	A	A
402.8.54	Y	E	E	A	A	A
402.8.55	Y	E	E	A	A	A
402.8.56	Y	E	E	A	A	A
402.8.57	Y	E	E	A	A	A
共有序列	QTVVTEPSLITWSPGTVTLTC	ASSGQNTSSNPEH	WFOQPSQSPHALIF	WTPAPASGLLASHAVITLSQNP	LIYENFTQLAY	PGSGSTVTVNS
			SSSNH3			

图30B

共有序列