



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0108520  
(43) 공개일자 2014년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)  
A61P 17/06 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7012848  
(22) 출원일자(국제) 2012년10월15일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2014년05월13일  
(86) 국제출원번호 PCT/AU2012/001247  
(87) 국제공개번호 WO 2013/053021  
국제공개일자 2013년04월18일  
(30) 우선권주장  
2011904190 2011년10월14일 오스트레일리아(AU)  
61/547,307 2011년10월14일 미국(US)

(71) 출원인  
테바 파마슈티컬즈 오스트레일리아 퍼티와이 엘티  
디  
오스트레일리아 2113 뉴 사우스 웨일즈주 맥쿼리  
파크 에핑 로드 37 레벨 2  
(72) 발명자  
남비아르 조나단 칸난  
오스트레일리아 2075 뉴 사우스 웨일즈 세인트 이  
브스 본도우 로드 6  
폴톤 린 도로시  
오스트레일리아 2113 뉴 사우스 웨일즈 맥쿼리 파  
크 에핑 로드 37 레벨 2  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김성기, 김진희

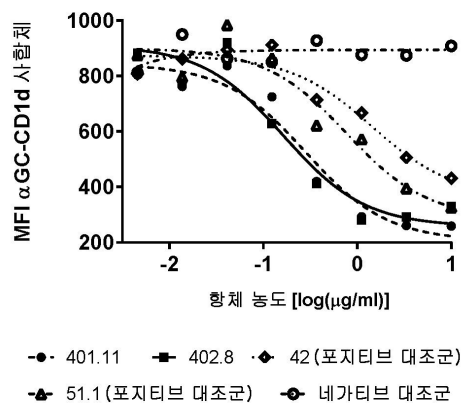
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 CD1d에 대한 항체

(57) 요약

본 발명은 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 이들 항체 및 그의 항원 결합 부  
분은 NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 치료시 적용된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**클라크 아담**

오스트레일리아 2131 뉴 사우스 웨일즈 파이프 독  
반스테이플 로드 29

**포우 앤드류 제임스**

오스트레일리아 3044 빅토리아 파스코 베일 헬스  
스트리트 1씨

**탐바키스 데브라**

오스트레일리아 3124 빅토리아 캠버웰 헤이즐 스트  
리트 15 유닛 1

**캡시다스 조지**

오스트레일리아 3072 빅토리아 프레스턴 크라머 스  
트리트 129

**도일 안소니 제라드**

오스트레일리아 2047 뉴 사우스 웨일즈 드럼모인  
집스 스트리트 100

**폴라드 매튜**

오스트레일리아 2158 뉴 사우스 웨일즈 두랄 밀스  
트럼 그로브 3

**무스타파 휘세인**

오스트레일리아 3040 빅토리아 에센튼 테니스 스트  
리트 126

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, CD1d에 대한 결합에 대해 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 경쟁하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 2

제1항에 있어서, CD1d에 대한 결합에 대해 항체 401.11.158과 경쟁하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 3

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체에 의해 결합된 것과 동일한 CD1d의 에피토프에 결합하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 116의 잔기 141 내지 143을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 에피토프는 서열 번호 116의 잔기 87 내지 93 및 141 내지 143을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 6

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 서열 번호 1, 3, 5, 7, 8, 9, 24, 25, 26, 30, 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44 및 45 및 이와 95% 이상 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 V<sub>H</sub> 도메인을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 V<sub>H</sub> 도메인의 서열은 서열 번호 148 또는 서열 번호 150인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 8

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 서열 번호 2, 4, 6, 46, 49 및 62 및 이와 95% 이상 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 V<sub>L</sub> 도메인의 서열은 서열 번호 149 또는 서열 번호 4인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

### 청구항 10

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 V<sub>H</sub> 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 DYAMH (서열 번호 124) 또는 GYYWS (서열 번호 125)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 CDR3의 서열은 DMCSSSGCPDGYFDS (서열 번호 126), DLCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 152), DMCSSGGCPDGYFDS (서열 번호 153), DMCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 154), GEIYDFWNSYMDV (서열 번호 127), GEIYDFWKS YMDV (서열 번호 128), GEIYDFYKSYLDV (서열 번호 155), GEIYDFYKSYMDV (서열 번호 156), GEIYDFWKS YLDV (서열 번호 129) 또는 GEIYDFYNSYMDV (서열 번호 130)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 CDR2의 서열은 TIIWNSAIIGYADSVKG (서열 번호 131), EINHSGSTNYPNPSLKS (서열 번호 132), EINPSGSTNYPNPSLKS (서열 번호 133) 또는 EINHAGSTNYPNPSLKS (서열 번호 134)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 13

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는  $V_H$  도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 GFTFDDY(서열 번호 135) 또는 GGSFSGY (서열 번호 136)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 CDR3의 서열은 DMCSSSGCPDGYFDS (서열 번호 126), DLCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 152), DMCSSGGCPDGYFDS (서열 번호 153), DMCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 154), GEIYDFWNSYMDV (서열 번호 127), GEIYDFWKS YMDV (서열 번호 128), GEIYDFYKSYLDV (서열 번호 155), GEIYDFYKSYMDV (서열 번호 156), GEIYDFWKS YLDV (서열 번호 129) 또는 GEIYDFYNSYMDV (서열 번호 130)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 CDR2의 서열은 IWNSAI (서열 번호 137), NHSGS (서열 번호 138), NPSGS (서열 번호 139) 또는 NHAGS (서열 번호 140)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 16

인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는  $V_L$  도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 RASQHISSWLA (서열 번호 141) 또는 ASSSGAVSSGNFPN (서열 번호 142)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 CDR3의 서열은 QQANRFPLT (서열 번호 143) 또는 LLYFGDTQLGV (서열 번호 144)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 CDR2의 서열은 AASSLQS (서열 번호 145) 또는 SASNKHS (서열 번호 146)인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 19

제6항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1 및 서열 번호 2, 서열 번호 23 및 서열 번호 46, 서열 번호 24 및 서열 번호 47, 서열 번호 5 및 서열 번호 6, 서열 번호 25 및 서열 번호 48, 서열 번호 26 및 서열 번호 49, 서열 번호 27 및 서열 번호 50, 서열 번호 28 및 서열 번호 51, 서열 번호 29 및 서열 번호 52, 서열 번호 30 및 서열 번호 53, 서열 번호 31 및 서열 번호 54, 서열 번호 32 및 서열 번호 55, 서열 번호 33 및 서

열 번호 56, 서열 번호 34 및 서열 번호 57, 서열 번호 35 및 서열 번호 58, 서열 번호 36 및 서열 번호 59, 서열 번호 37 및 서열 번호 60, 서열 번호 38 및 서열 번호 61, 서열 번호 40 및 서열 번호 62, 서열 번호 41 및 서열 번호 63, 서열 번호 42 및 서열 번호 64, 서열 번호 3 및 서열 번호 4, 서열 번호 7 및 서열 번호 4, 서열 번호 8 및 서열 번호 4, 서열 번호 9 및 서열 번호 4, 서열 번호 43 및 서열 번호 65, 서열 번호 44 및 서열 번호 66과, 서열 번호 45 및 서열 번호 67로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 기반 효능 검정법을 사용하여 측정하는 경우 0.5ng/ml 내지 20ng/ml의 EC50으로 CD1d에 결합되는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 카파 쇄 불변 영역을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 람다 쇄 불변 영역을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, S228P 돌연변이를 포함하는 IgG4 불변 영역을 포함하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, F(ab)2, scFv 또는 도메인 항체인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 개질하여 항체-의존성 세포의 세포독성, 보체-의존성 세포독성, 혈청 반감기, 생물학적 분류 및 Fc 수용체에 대한 결합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기능적 특성을 조절하는 것인 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 청구된 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 29

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 단리된 DNA 분자.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 상기 DNA 분자의 서열은 서열 번호 10 내지 18 및 68 내지 115, 또는 이와 95% 이상 동일한

서열 또는 중간 내지 고도로 엄격한 조건 하에 상기 서열에 하이브리드화되는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 DNA 분자.

#### 청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 생성하는 형질전환 세포.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포는 제29항 또는 제30항에서 청구한 바와 같은 DNA 분자로 형질전환되는 것인 형질전환 세포.

#### 청구항 33

인간 피험체에서 NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 또는 제28항에서 청구한 바와 같은 조성물을 상기 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 병태는 건선, 궤양성 대장염, 원발성 담즙성간경변, 아테롬성 동맥경화증, 비-알콜성 지방간, 자가면역성 간염, 허혈성-관류 손상, 겸상적혈구 질환과 관련된 폐 염증 또는 이상, 및 천식으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 35

NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태 치료용 약제의 제조에서의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 용도.

#### 청구항 36

샘플에서 인간 또는 사이노몰구스(cynomolgus) CD1d의 존재를 검출하는 방법으로서, CD1d에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용하는 조건 하에 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 CD1d를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 접촉시켜 복합체를 형성하는 단계 및 상기 샘플에서 상기 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 샘플 중 CD1d는 세포막 결합된 CD1d인 방법.

#### 청구항 38

NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

#### 청구항 39

세포 샘플에서 인간 CD1d-포지티브 세포의 존재를 검출하는 방법으로서, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에서 청구한 바와 같은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 세포 집단을 접촉시켜 CD1d-포지티브 세포에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용함으로써 복합체를 형성하는 단계 및 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분-세포 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 상기 세포 샘플은 말초혈액 샘플 또는 세포주 샘플인 방법.

#### 청구항 41

다수의 CD1d-결합 단백질로부터, 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및

401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,

뮤테인에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 서열 번호 116의 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번에 위치하는 아미노산이 이들 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 인간 CD1d 뮤테인에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-인간 CD1d 뮤테인 복합체 및 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d-결합 단백질은 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며, CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및 401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 것인 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 42

다수의 CD1d-결합 단백질로부터 인간 CD1d에 특이적으로 결합되는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,

hCD1dmu에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 인간 CD1d (서열 번호 116)의 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번에 위치한 아미노산이 이 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 hCD1dmu (서열 번호 119)에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-hCD1dmu 복합체 및 hCD1dmu에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 hCD1dmu에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d 결합 단백질은 인간 CD1d (서열 번호 116) 또는 mCD1dhu (서열 번호 118)에 특이적으로 결합되는 것인 단계를 포함하는 방법.

## 명세서

### 기술 분야

#### [0001] 출원 정보

[0002] 본 출원은 2011년 10월 14일자로 출원된 오스트레일리아 특허출원 제 2011904190호 및 2011년 10월 14일자로 출원된 미국 특허출원 제61/547,307호와 관련이 있고, 이들로부터 우선권을 청구하며, 이들 출원의 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

#### [0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 CD1d에 결합되어, 자연살해 T(natural killer T)(NKT) 세포인, CD1d-제한 T 세포의 활성화와 같은 CD1d-매개 생물학적 기능을 억제하는 항체에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 본 명세서의 저자가 언급한 문헌의 서지학적 상세내용은 설명의 마지막에 알파벳순으로 수집되어 있다.

[0006] 본 명세서에서 임의의 선행기술에 대한 참조는 이 선행기술이 임의의 국가에서 통상의 일반적인 지식의 일부를 형성하는 임의의 제한 형태 또는 지식이 아니며, 이로서 간주되어서도 안된다.

[0007] CD1d는 일부 염증 질환과 관련된 활성인, 높은 수준의 사이토킨을 방출하기 위하여, NKT 세포와 같이, 세포 집단을 트리거링(triggering)하는데 필수적인 카운터-수용체(counter-receptor)이다. 따라서, CD1d-매개 효과의 차단이 잠재적인 치료학적 이점이다.

[0008] CD1d 단백질은 랑게르한스(Langerhans) 세포 (피부에서 주요한 수지상 항원-제시 세포), 활성화된 B-세포, 림프 결의 수지상 세포, 및 활성화된 혈액 단백세포를 포함한 수많은 항원 제시 세포(APC) 서브셋에 나타난다. CD1d를 통해 자극된 한 세포 집단은 통상 NK 세포(예: CD161 및 NKG2D)와 관련된 다양한 분자 마커에 따라, 알파/베타( $\alpha\beta$ ) T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포 서브셋인, NKT 세포이다. NKT 세포는 CD1d-제시 지질 또는 당 지질을 통해 항원 제시 세포(APC)에 의해 자극된다. 인간 CD1d-제한 NKT 세포의 대부분은 V $\beta$ 11과 쌍을 이룬 V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18을 포함하는 반-불변(semi-invariant) TCR을 발현한다 (Brigl, M et al., 2004 Annu. Rev. Immunol., 22:817-890). CD1d-TCR 상호작용은 많은 Th1- 또는 Th2-유사 사이토킨(예: 인터페론(IFN)- $\gamma$  및 종양괴사인자(TNF)- $\alpha$ 와, 인터류킨(IL)-4, IL-5 및 IL-13)을 신속히 유도한다. Th1/Th2 사이토킨 반응의 밸런스는 면역반응 특성을 통합하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0009] 따라서, 지금까지 5개의 CD1 유전자가 인간에서 확인되었다: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d 및 CD1e. CD1 단백질은

$\beta$ 2-마이클로글로불린( $\beta$ 2M)과 비공유결합된 큰 서브유닛(중쇄)으로서 발현된다 (Van Agthoven, A., and Terhorst, C., 1982 J. Immunol. 128:426-432; Terhorst, C., et al., 1981 Cell 23:771-780). CD1d의 세포외 도메인은 3개의 도메인으로 이루어진다:  $\alpha$ 1 도메인(잔기 20-108),  $\alpha$ 2 도메인(잔기 109-201), 및  $\alpha$ 3 도메인(잔기 202-295) (Pellicci, D.G., et. al., 2009 Immunity 31: 47-59).

[0010] 상이한 구조를 갖는 다양한 지질이 CD1d 분자의 2개의 소수성 결합 포켓 (A' 및 F) 중 각각에 지방산 쇄를 수용하는 독특한 방식으로 CD1d 분자에 결합되는 것으로 나타났다. CD1d 분자를 결합할 수 있는 지질 그룹은 미콜산, 디아실글리세롤, 스펅고지질, 폴리이소프레노이드, 리포펩티드, 포스포미코케티드 및 작은 소수성 화합물을 포함한다 (Venkataswamy, M. M. and Porcelli, S.A., 2010 Semin Immunol 22: 68-78). 시험관내 및 생체내 NKT 세포 활성화를 연구하는데 사용되는 원형 화합물은 해상 해면 아젤라스 마우리티아누스(*Agelas mauritianus*)로부터 유래된  $\alpha$ -갈락토실세라미드("aGalCer"), KRN7000이다. 부가의 효능제는 이로써 제한되는 것은 아니지만, 미생물-유래  $\alpha$ -글리쿠로노실세라미드 그룹의 구성원 및 다양한 인간 당지질(예: 리소포파티딜 콜린 및 리소스핑고미엘린)뿐만 아니라, 내인성 글리코스핑고지질로 보고된 이소글로보트리헥소실세라미드("iGb3")를 포함한다 (Fox, L. M., et al., 2009 Plos Biol 7: e1000228).  $\beta$ -D-글루코피라노실세라미드의 C24:1 형태와 같은 특정한 천연으로 존재하는 베타-결합된 글리코스핑고지질도 또한 NKT 세포에 대한 약한 효능제이다 (Brennan, P. J., et al., 2011 Nat Immunol 12:1202-1211).

[0011] NKT 세포에 의한 지나친 사이토킨 생성은 특정한 자가면역 또는 염증 질환, 예를 들면, 중증 근무력증 (Reinhardt, C. et al., 1999 Neurology 52:1485-87), 건선 (Bonish, B.D., et al., 2000 J. Immunol. 165:4076-85), 췌양성 대장염 (Saubermann, L.J., et al., 2000 Gastroenterology 119:119-128), 원발성 담즙성간경변 (Kita, H., et al., 2002 Gastroenterology 123:1031-43), 대장염 (Heller, F., et al. 2002 Immunity 17, 629-638), 지방간염 (Syn, W., et al., (2010) Hepatology, 51(6):1998-2007), 자가면역성 간염 (Santodomingo-Garzon, T. and Swain, M.G. (2011) Autoimmunity Reviews 10:793-800), 아테롬성 동맥경화증 (Kyriakakis, E., et. al., Eur J Immunol 2010 40:3268-79) 및 겸상적혈구 질환과 관련된 폐 염증 또는 이상 (Wallace et al. 2009 Blood 114:667-676)의 병리학에 기여할 수 있다. NKT 세포가 천식에서 위험한 효과를 나타내는 증거가 증가되고 있다 (Iwamura, C. and Nakayama, T., 2010 Curr Opin Immunol 22:807-13).

[0012] 천식은 비특이적 자극에 반응하는 만성 국소 염증, 점액 폐색, 및 기관지경련으로부터 유발되는 가역적 기도 폐색을 특징으로 하는 만성 염증성 폐 장애이다 (Murdoch, J. R. and Lloyd, C. M. 2010 Mutat Res 690: 24-39). 발병 및 수많은 관련된 건강관리 비용을 증가시키는, 높은 천식 유병율은 천식을 주요한 공중보건 문제점으로서 자리매김한다 (Holgate, S. T. and Polosa, R. 2008 Nat Rev Immunol 8: 218-30; Bahadori, K., Doyle-Waters M. M., et al., 2009 BMC Pulm Med 9:24). 코르티코스테로이드-난치성 천식과 같은, 중증 형태의 천식으로 고생하는 환자 치료를 위해 충족되지 않은 상당한 의학적 요구가 존재한다. 중증 천식인 환자는 표준 케어 (standard-of-care)에 잘 반응하지 못하며, 전체 천식 인구의 대략 5 내지 10%를 나타낸다. 이는 미국 단독에서 대략 850,000명의 환자를 포함한다.

[0013] 알러지성 천식의 마우스 모델에서, NKT 세포는 질환을 악화시키는 것으로 나타났다 (Akbari, O., et. al. 2003 Nat Med 9: 582-8). NKT 세포는 CD1d-제한 당지질 항원에 의해 활성화될 수 있고, 사이토킨(예: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 및 IL-13)을 방출하는데, 이는 호산구 및 천식에 중요한 다른 세포 서브셋을 활성화시킨다 (Chuang, Y. H., et al., 2011 J Immunol 186: 4687-92). NKT 세포를 표적화함으로써, 항-CD1d 항체 또는 CD1d-의존성 길항제의 투여는 실험적으로 유발된 기도 염증을 억제한다 (Lisbonne, M., et. al. 2003 J Immunol 171: 1637-41; Pichavant, M., et al. 2008 J Exp Med, 205: 385-93). NKT 세포는 또한 천식의 비-인간 영장류 모델에서 유효하다 (Matangkasombut, P. et. al., 2008 J Allergy Clin Immunol 121: 1287-9). 상기 결과는 폐에 존재하는 적은 수의 NKT 세포가 인간 천식의 발병 및 지속에 중요할 수 있음을 제시한다.

[0014] 비알콜성 지방간 질환(NAFLD)은 지나친 지방이 알콜 남용의 히스토리가 없는 환자에 축적된 상태이다. NAFLD은 단순 지방증 및 비알콜성 지방간(NASH)으로 분류된다. NASH에서, 지방증, 소엽내 염증 및 간세포 투명팽대 (hepatocellular ballooning)가 종종 점진적 섬유증을 동반하여 나타난다. 장기-지속성 NASH는 간경변으로 진행될 수 있고, 간암(hepatocellular carcinoma)(HCC)은 결과일 수 있다. NAFLD는 대사증후군의 간 징후로서 간주된다. NAFLD는 비만, 제2형 당뇨병 및 고지혈증의 증가된 유병율에 상응하게 최근 수십년에 걸쳐 세계적으로 증가되어 왔다. NAFLD/NASH는 현재 세계적으로 가장 흔한 만성 간질환으로서 간주된다. 모든 성인의 약 20%가 NAFLD를 가지며, 성인의 2-3%는 NASH를 갖는 것으로 예상된다. 비알콜성 지방간 질환은 만성 간질환의 주요 원인이다. 그것은 간지방증(지방간) 및 비알콜성 지방간(NASH)을 포함한, 조직병리학의 스펙트럼을 포함한다.



[0015] 간은 선천성 면역반응을 조절할 수 있는 NKT 세포의 기숙 집단(resident population)을 하버링(harboring)한다. 예를 들면, 불변 T 세포 수용체를 갖는 NKT 세포는 쥐과동물의 간에서 T 세포의 20% 이하를 포함한다. 상기 세포는 또한 NKT 세포의 보다 상이한 레퍼토리를 하버링하는 인간의 간에 풍부하다(T 세포의 10% 이하). 두 종에서, NKT 세포는 주로 간 유동(hepatic sinusoid)에 잔류하고, 여기서 그들은 혈관내 면역 감시(immune surveillance)를 제공한다. NKT 세포는 당지질 항원을 특이적으로 인지하고, 활성화되는 경우에 사이토킨을 생성할 수 있다. 이 세포 서브셋은 NASH의 발병학에 기여할 수 있다 (참조예: Syn, W., et al., (2010) Hepatology, 51(6):1998-2007). 따라서, 생체내에서 NKT 세포의 기능을 차단하는 항-CD1d 항체의 전달은 치료학적 이점일 수 있다.

[0016] 자가면역성 간질환의 주요한 세 가지 광의의 범주는 자가면역성 간염(AIH), 원발성 담즙성간경변(PBC), 및 원발 경화성담관염(PSC)이다. 이들 질환은 각각 비교적 독특한 임상적, 혈청학적 및 조직학적 프로파일을 갖는다. 이들 세 가지 간질환은 또한 간손상의 조직병리학적 패턴이 상이하다. AIH는 공유영역 간염(interface hepatitis)으로서 공지된 간실질(hepatic parenchyma)의 점진적 파괴를 특징으로 한다. 한편, PBC는 작은 간내 담관(intrahepatic bile duct)의 특정 파괴에 의해 구분되는 반면에, PSC는 주로 큰 담관의 파괴를 포함한다. 이들 조건의 변화된 프로파일에도 불구하고, 모든 이들 자가면역성 간질환은 간 섬유아세포의 후속 발병과 함께, 간 세포를 인지하고 파괴하는 T 림프구의 간 보충(hepatic recruitment)에 관여하는 면역-매개 간손상의 통상적인 경로를 공유한다. NKT 세포는 자가면역성 간질환의 병리학에 기여할 수 있다 (Santodomingo-Garzon, T. and Swain, M.G. (2011) Autoimmunity Reviews 10:793-800). 활성화된 NKT 세포는 세포표면 FasL 발현의 상향-조절 및/또는 종양괴사인자 알파(TNF- $\alpha$ ) 및 퍼포린/그랜자임 B의 방출을 통해 직접 간세포 사멸을 유도할 수 있다. NKT 세포는 프로-염증성 사이토킨(예: IFN- $\gamma$ )의 방출을 통해 간세포 사멸을 간접적으로 유도할 수 있다. NKT 세포는 Th2 반응 및 혈장 세포에 의한 자가항체의 후속 생성을 유도하는, IL-4를 또한 생성할 수 있다. NKT 세포의 활성화는 간세포 파괴 및 궁극적으로 간경변의 발병을 유도할 수 있으므로, 항-CD1d 항체의 전달에 의한 NKT 세포 기능의 차단은 치료학적 이점일 수 있다. 사이토킨 방출 이외에, 세포 용해를 일으키는 NKT 세포 이펙터 기능(예: 퍼포린 방출 및 그랜자임 방출과 Fas-L 매개 세포 사멸), 및 다른 공지된 NKT 기능(예: IL-2 매개 방관자 효과(bystander effect))이 또한 NKT 세포가 연루된 병태에 관련될 수 있다. 예를 들면, 항-CD1d 항체의 투여를 통한 NKT 세포 활성화제 CD1d의 차단은 또한 이들 NKT 이펙터 기능을 조절할 수 있다.

### 발명의 내용

[0017] CD1d-매개 세포 활성화를 억제하고, 이어서 중증 코르티코스테로이드 난치성 천식과 같은 염증성 질환의 치료시 이점을 나타내는 치료법을 확인하기 위한 중대한 필요성이 존재한다. 완전 인간 항체는 치료학적 효능을 개선하는 인간 약제 개발의 목적을 다루는 몇가지 이점을 갖는다. 그들은 상당히 효능있는 중화 에피토프를 결합시키기 위해 표적이 될 수 있고, 인간에 투여되는 경우에 잘 용인된다. 쥐과동물 항체는 CD1d와 결합되어 상호작용한다고 당해 분야에 기술되어 왔지만, 현재 발명은 CD1d 매개 NKT 세포 활성화 및 생성된 이펙터 기능을 억제하는데 강한 효능을 나타내는 인간 항체를 기술하고 있다. 놀랍게도, 어떤 경우에, 이들 항체의 효능은 당해 분야 항체의 현재 상태보다 더 효능있는 크기 순서이다. 상당히 개선된 효능을 갖는 상기 항체는 CD1d-매개 질환의 치료를 허용해야 하고, 우수한 임상적 효능을 나타내어야 한다.

[0018] 따라서, 제1 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 경쟁하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0019] 제2 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체에 의해 결합된 것과 동일한 CD1d의 에피토프에 결합하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0020] 제3 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 서열 번호 1, 3, 5, 7, 8, 9, 24, 25, 26, 30, 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44 및 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 및 이와 95% 이상 상동성인 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0021] 제4 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 서열 번호 2, 4, 6, 46, 49 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 및 이와 95% 이상 상동성인 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0022] 제5 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크

서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 DYAMH (서열 번호 124) 또는 GYYWS (서열 번호 125)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0023] 제6 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 GFTFDDY (서열 번호 135) 또는 GGSFSGY (서열 번호 136)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0024] 제7 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 RASQHISSWLA (서열 번호 141) 또는 ASSSGAVSSGNFP (서열 번호 142)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0025] 제8 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 세포 기반 효능 검정법을 사용하여 측정하는 경우 20ng/ml 미만의 EC50으로 CD1d에 결합되는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 한 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 0.5ng/ml 내지 20ng/ml의 EC50으로 인간 CD1d에 결합된다.

[0026] 제9 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 단리된 DNA 분자를 제공한다.

[0027] 제10 측면에 있어서, 본 발명은 인간 피험체에서 NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 치료 방법으로서, 피험체에게 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0028] 제11 측면에 있어서, 본 발명은 샘플에서 CD1d 존재를 검출하는 방법으로서, CD1d에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용하는 조건 하에 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 CD1d를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 접촉시켜 복합체를 형성하는 단계, 및 상기 샘플에서 상기 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0029] 제12 측면에 있어서, 본 발명은 세포 샘플에서 CD1d-포지티브 세포의 존재를 검출하는 방법으로서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 세포 집단을 접촉시켜 CD1d-포지티브에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용함으로써 복합체를 형성하는 단계, 및 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분-세포 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0030] 제13 측면에 있어서, 본 발명은 다수의 CD1d-결합 단백질로부터, 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및 401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,

[0031] 뮤테인에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 서열 번호 116의 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번의 아미노산이 이들 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 인간 CD1d 뮤테인에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-인간 CD1d 뮤테인 복합체 및 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d-결합 단백질은 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며, CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및 401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0032] 제14 측면에 있어서, 본 발명은 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 CD1d에 특이적으로 결합되는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,

[0033] hCD1dmu에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번에 위치한 아미노산(서열 번호 116)이 이들 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 hCD1dmu에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-hCD1dmu 복합체 및 hCD1dmu에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 hCD1dmu에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d-결합 단백질은 인간 CD1d (서열 번호 116) 또는 mCD1dhu (서열 번호 118)에 특이적으로 결합되는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0034] 상기 측면중 임의의 한 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 또한 사이노물구스 원숭이 및 붉은털 원숭이(rhesus monkey) CD1d에 결합된다.

## 도면의 간단한 설명

[0035]

도 1: 항-CD1d 항체에 의한 사합체 결합의 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8은 NKT 세포 수용체로 안정하게 형질감염된 J.RT3-T3.5 세포에 대한  $\alpha$ -갈락토실세라미드( $\alpha$ -GalCer) 지질-부하 CD1d 사합체 결합을 사용하는 검정법에서, 시그널의 평균 형광감도의 감소에 의해 측정되는 바와 같이, 항체 42 및 51.1에 비하여 CD1d 사합체 결합의 개선된 억제를 나타냈다. 무관한 특이성(irrelevant specificity) 네가티브 대조군 항체는 억제를 나타내지 않았다. 표 2는 시험된 모든 항체의 EC50 값을 제시하고 있다.

도 2: 항-CD1d 항체에 의한 IL-2 방출의 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 항-CD1d 항체 402.8 및 401.11은  $\alpha$ -GalCer-부하 CD1d-포지티브 U-937 세포 및 NKT 세포 수용체-안정하게 형질감염된 J.RT3-T3.5 세포를 사용하는 검정법에서, 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여, ELISA로 결정되는 바와 같이, 24시간 후 IL-2 방출의 개선된 억제를 나타냈다. 모든 검정법에서, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 IL-2 방출의 억제를 나타내지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 3에 제시되어 있다.

도 3: 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 원발성 말초혈액 단핵세포(PBMC)에 대한 항-CD1d 항체의 결합을 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 본 명세서에 기술된 항체의 한 예이지만, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체가 아닌, 항-CD1d 항체 402.8은 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이, 원발성 인간 PBMC에서 CD1d-포지티브, CD11c-포지티브 집단에 결합했다.

도 4: 항원-제시 세포로서 THP-1 세포주를 사용하는 원발성 NKT 세포-기반 검정법에서 항-CD1d 항체에 의한 원발성 NKT 세포 기능의 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 항체 401.11 및 402.8은 항-CD1d 항체 42에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-5 (C) 및 IL-13 (D) 방출의 각각 114-배 이하 및 180-배 이하의 개선된 억제를 나타냈다. 이 결과는 CD1d-포지티브 세포로서  $\alpha$ -GalCer-확장된 NKT 세포 및  $\alpha$ -GalCer-부하 THP-1 세포를 사용하는 검정법으로부터의 것이었다. 모든 검정법에서, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 사이토킨 방출을 억제하지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 4에 제시되어 있다.

도 5: 항원-제시 세포로서 원발성 CD14+ 단핵세포를 사용하는 원발성 원발성 NKT 세포-기반 검정법에서 항-CD1d 항체에 의한 원발성 NKT 세포 기능의 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 항체 401.11 및 402.8은 CD1d-포지티브 세포로서  $\alpha$ -GalCer-확장된 NKT 세포 및  $\alpha$ -GalCer-부하 CD14+ 단핵세포-유래 수지상 세포를 사용하는 검정법에서 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-5 (C) 및 IL-13 (D) 방출의 상당히 개선된 억제를 나타냈다. 모든 검정법에서, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 사이토킨 방출을 억제하지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 5에 제시되어 있다.

도 6: 고효능 항-CD1d 항체가 보다 저-효능 선행분야 항체에 의해 보여진 에피토프와 상이한 유사한 중화 에피토프를 공유함을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 7에 따라, 항-CD1d 항체 402.8은 결합된 비오틴화 402.8의 수준(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 상응하게, 450 nm에서 흡광도 판독치에 의해 제시된 바와 같이, 경쟁 ELISA 기반 접근법을 사용하여 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 그 자체 및 401.11과 경쟁하지만, 항-CD1d 항체 42 및 51.1과는 경쟁하지 않았다.

도 7: 재조합 사이노몰구스 마카쿠(cynomolgus macaque) CD1d와의 교차-반응성을 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 8에 따라, 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8은 ELISA에 의해 인간 CD1d에 결합됐고(A), 사이노몰구스 마카쿠 CD1d와 교차-반응성이었다(B).

도 8: 사이노몰구스 마카쿠 세포-기반 CD1d와의 교차-반응성을 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 9에 따라, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 아닌, 항-CD1d 항체 402.8이 유세포 분석에 의해 제시된 바와 같이 두 개의 독립적인 사이노몰구스 마카쿠 도너로부터의 PBMC 상에 CD1d에 결합했다. 데이터는 히스토그램에서 경계 표시된 CD1d-포지티브 세포의 %를 갖는 게이트 생세포(gated live cells)의 유세포 분석 히스토그램으로서 나타내었다.

도 9: 사이노몰구스 CD1d-매개된 원발성 NKT 확장의 세포-기반 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 10에 따라, 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 아닌, 항-CD1d 항체 402.8이 유세포 분석에 의한 CD3+V $\alpha$  24+ 세포의 정량화에 의해 제시된 바와 같이,  $\alpha$ GalCer-부하 CD1d-포지티브 PBMC의 존재하에 사이노몰구스 NKT 세포의 확장을 억제했다.

도 10: 401.11의 가변 영역 서열을 나타내는 서열정렬. 박스 영역은 카바트(kabat) 넘버링 시스템 및 개선된 코티아(Chothia) 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같은)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 나타내었다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

도 11: 402.8의 가변 영역 서열을 나타내는 서열정렬. 박스 영역은 카바트 넘버링 시스템 및 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같은)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 나타내었다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

도 12: 401.11의 변이체 정렬. 실시예 11에 따라, IGHV3-9.01 및 401.11의 변이체에 대한 401.11의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열정렬이 제시되어 있다.

도 13: 401.11의 최적화된 변이체 정렬. 실시예 11에 따라, 401.11 및 그의 변이체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열정렬이 제시되어 있다.

도 14: 항-CD1d 항체 401.11의 개선된 변이체에 의한 원발성 NKT 세포 기능의 개선된 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 11에 따라, 401.11 및 그의 변이체는 1 $\mu$ g/mL로부터 적정했다. 401.11 항체 변이체는 CD1d-포지티브 세포로서  $\alpha$ -GalCer-확장된 NKT 세포 및  $\alpha$ -GalCer-부하 CD14+ 단핵세포-유래 수지상 세포를 사용하는 검정법에서, 401.11에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-4 (B) 방출의 유사하거나 개선된 억제 및, 10 $\mu$ g/mL로부터 적정된 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-4 (B) 방출의 상당히 개선된 억제를 나타냈다. 모든 검정법에서, 무관련 특이성 네가티브 대조군 항체는 사이토킨 방출을 억제하지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 13에 제시되어 있다.

도 15: 402.8의 최적화된 변이체의 정렬. 실시예 11에 따라, 402.8의 변이체에 대한 402.8의 중쇄의 아미노산 서열이 제시되어 있다.

도 16: 항-CD1d 항체 402.8의 개선된 변이체에 의한 원발성 NKT 세포 기능의 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 11에 따라, 402.8 및 그의 변이체는 10 $\mu$ g/mL로부터 적정했고, CD1d-포지티브 세포로서  $\alpha$ -GalCer-확장된 NKT 세포 및  $\alpha$ -GalCer-부하 CD14+ 단핵세포-유래 수지상 세포를 사용하는 검정법에서, 10 $\mu$ g/mL로부터 적정된 항-CD1d 항체 42에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-13 (B) 방출의 유사한 억제, 및 ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-13 (B) 방출의 상당히 개선된 억제를 나타냈다. 모든 검정법에서, 무관련 특이성 네가티브 대조군 항체는 사이토킨 방출을 억제하지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 18에 제시되어 있다.

도 17:  $\alpha$ -GalCer에 대한 대안적인 항원을 사용하는 원발성 NKT 세포-기반 검정법에서 항-CD1d 항체에 의한 원발성 NKT 세포 기능의 개선된 억제를 나타내는 검정 결과의 그래프 표시. 실시예 12에 따라, 1 $\mu$ g/mL로부터 적정된 항체 401.11.158, 401.11 및 402.8은 CD1d-포지티브 세포로서  $\alpha$ -GalCer-확장된 NKT 세포 및 C24:1  $\beta$ -D-글루코피라노실세라미드-부하 CD14+ 단핵세포-유래 수지상 세포를 사용하는 검정법에서, 10 $\mu$ g/mL로부터 적정된 항-CD1d 항체 42 및 51에 비하여, ELISA로 결정된 바와 같이, 24시간 후 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-4 (B) 방출의 상당히 개선된 억제를 나타냈다. 모든 검정법에서, 무관련 특이성 네가티브 대조군 항체는 사이토킨 방출을 억제하지 않았다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값이 표 20에 제시되어 있다.

도 18: 변경된 조건하에, 고효능 항-CD1d 항체가 선행분야 항체에 의해 보여진 에피토프와 상이한 유사한 중화 에피토프를 공유함을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 따라, 항체 402.8은 450 nm에서 흡광도 관독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 그 자체 및 401.11과 경쟁하지만, 항체 42 및 51.1과는 경쟁하지 않았다.

도 19: 401.11의 변이체였던 고효능 항-CD1d 항체가 402.8과 유사한 중화 에피토프를 공유함을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 따라, 항-CD1d 항체 402.8은 450 nm에서 흡광도 관독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 그 자체와, 그리고 401.11 항체 변이체의 예로서 401.11.160, 401.11.161 및 401.11.165와 강력히 경쟁했다.

도 20: 402.8로부터 유래된 고효능 항-CD1d 항체가 402.8과 유사한 중화 에피토프를 공유함을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 따라, 항-CD1d 항체 402.8은 450 nm에서 흡광도 관독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 그 자체와 그리고 402.8 항체 변이체의 예로서 402.8.84, 402.8.86 및 402.8.87과 강력히 경쟁했다.



도 21: 모노클로날 항-인간 CD1d 항체가 402.8의 중화 에피토프와 경쟁하지 않음을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 기술된 바와 같이, 항-CD1d 항체 402.8은 흡광도 판독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 다른 모노클로날 항-인간 CD1d 항체와는 아니고, 그 자체와 강력히 경쟁했다.

도 22: 모노클로날 항-마우스 CD1d 항체가 402.8의 중화 에피토프와 경쟁하지 않음을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 기술된 바와 같이, 항-CD1d 항체 402.8은 450nm에서 흡광도 판독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 모노클로날 항-마우스 CD1d 항체(예: HB-321, HB-322 및 HB-323)와는 아니고, 그 자체와 강력히 경쟁했다.

도 23: 폴리클로날 항-인간 CD1d 항체가 402.8의 중화 에피토프와 경쟁하지 않음을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 기술된 바와 같이, 항-CD1d 항체 402.8은 450nm에서 흡광도 판독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 폴리클로날 항-인간 CD1d 항체의 예로서 C-19, H70 및 Ab9651과는 아니고, 그 자체와 강력히 경쟁했다.

도 24: 고효능 항-CD1d 항체가 다른 항-CD1d 항체에 의해 결합된 에피토프와 상이한 유사한 중화 에피토프를 공유함을 나타내는 경쟁 ELISA 결과의 그래프 표시. 실시예 13에 기술된 바와 같이, 항-CD1d 항체 401.11.158은 450 nm에서 흡광도 판독치(A) 및 전환된 경쟁도(%) 값(B)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해, 그 자체 및 402.8과는 강력히 경쟁하지만, 항-CD1d 항체 42 및 51.1과는 경쟁하지 않았다.

도 25: FAb 또는 전장 IgG의 형태인 402.8, 및 401.11.165가 인간 CD1d에 결합되었음을 나타내는 ELISA 결과의 그래프 표시.

도 26: 항-CD1d 항체가 결합되는 인간 CD1d 상에 위치를 설명하기 위하여 사용되는 CD1d 작제물의 서열정렬.

도 27: 항체 402.8 (A) 및 401.11.158 (B)의 적정이 인간 CD1d 및 인간 서열이 도입된 마우스 CD1d(mCD1dhu)에 결합됨을 나타내는 ELISA 결과의 그래프 표시. 두 항체는 마우스 CD1d 또는 마우스 서열이 도입된 인간 CD1d(hCD1dmu)에 결합되지 않았다.

도 28: 항-인간 CD1d 항체의 에피토프를 나타내는 수소-중수소 교환 맵핑 실험 결과의 그래프 표시. (A) 검은색으로 나타낸 아미노산 89-94 및 141-142를 갖는 인간 CD1d (회색). 주: X-선 구조는 표면 표시를 갖는 3HUJ이다. (B) NKT-세포 수용체 ( $\alpha$  및  $\beta$  쇄)와의 복합체인 인간 CD1d ( $\alpha$ -GalCer 결합된). 인간 CD1d 상에 항-CD1d 항체의 에피토프(아미노산 89-94 및 141-142) 원자는 암회색을 띤다. 항-CD1d 항체의 에피토프는 NKT-세포 수용체  $\beta$ -쇄의 결합 부위에 아주 근접하게 위치한다.

도 29a: 최적화된 401.11 항체의  $V_H$  영역의 정렬 및 컨센서스 서열. 박스 영역은 카바트 넘버링 시스템 및 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같이)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 제시되어 있다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

도 29b: 최적화된 401.11 항체의  $V_L$  영역의 정렬 및 컨센서스 서열. 박스 영역은 카바트 넘버링 시스템 및 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같이)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 제시되어 있다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

도 30a: 최적화된 402.8 항체의  $V_H$  영역의 정렬 및 컨센서스 서열. 박스 영역은 카바트 넘버링 시스템 및 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같이)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 제시되어 있다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

도 30b: 최적화된 402.8 항체의  $V_L$  영역의 정렬 및 컨센서스 서열. 박스 영역은 카바트 넘버링 시스템 및 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 바와 같은 CDR(제시된 바와 같이)을 함유한다. 카바트 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 굵게 제시되어 있다. 개선된 코티아 넘버링 시스템으로 정의된 CDR은 밑줄을 그었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036]

본 발명은 CD1d의 특별한 에피토프를 결합하는 인간 및 인간화 항체와 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 본 발명자는 CD1d의 이러한 에피토프를 결합하는 항체가 NKT 세포 상에서 CD1d의 효과를 감소시키는데 특히 효능이 있다고 밝혔다. 이러한 효과로 인하여, 이들 항체 및 그의 항원 결합 부분은 NKT 세포 이펙터 기능, 예를 들면,

NKT 세포에 의한 지나친 사이토킨의 방출이 작용하는 병태(예: 천식)의 치료시 유용할 것이라 여겨진다.

- [0037] 따라서, 제1 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 경쟁하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0038] 제2 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체에 의해 결합된 것과 동일한 CD1d의 에피토프에 결합하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0039] 제3 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 서열 번호 1, 3, 5, 7, 8, 9, 24, 25, 26, 30, 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44 및 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 및 이와 95% 이상 동일한 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0040] 제4 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 서열 번호 2, 4, 6, 46, 49 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 및 이와 95% 이상 동일한 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0041] 제5 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 DYAMH (서열 번호 124) 또는 GYYWS (서열 번호 125)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 이러한 측면의 실시양태에서, CDR3의 서열은 DMCSSSGCPDGYFDS (서열 번호 126), DLCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 152), DMCSSGGCPDGYFDS (서열 번호 153), DMCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 154), GEIYDFWNSYMDV (서열 번호 127), GEIYDFWKS YMDV (서열 번호 128), GEIYDFYKSYLDV (서열 번호 155), GEIYDFYKSYMDV (서열 번호 156), GEIYDFWKS YLDV (서열 번호 129) 또는 GEIYDFYNSYMDV (서열 번호 130)이다. 추가의 실시양태에서, CDR2의 서열은 TIIWNSAIIGYADSVKG (서열 번호 131), EINHSGSTNYNPSLKS (서열 번호 132), EINPSGSTNYNPSLKS (서열 번호 133) 또는 EINHAGSTNYNPSLKS (서열 번호 134)이다.
- [0043] 제6 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 GFTFDDY (서열 번호 135) 또는 GGSFSGY (서열 번호 136)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 제6 측면의 실시양태에서, CDR3의 서열은 DMCSSSGCPDGYFDS (서열 번호 126), DLCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 152), DMCSSGGCPDGYFDS (서열 번호 153), DMCSSGGCPEGYFDS (서열 번호 154), GEIYDFWNSYMDV (서열 번호 127), GEIYDFWKS YMDV (서열 번호 128), GEIYDFYKSYLDV (서열 번호 155), GEIYDFYKSYMDV (서열 번호 156), GEIYDFWKS YLDV (서열 번호 129) 또는 GEIYDFYNSYMDV (서열 번호 130)이다. 추가의 실시양태에서, CDR2의 서열은 IWNSAI (서열 번호 137), NHSGS (서열 번호 138), NPSGS (서열 번호 139) 또는 NHAGS (서열 번호 140)이다.
- [0045] 제7 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 인간 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, CDR1의 서열은 RASQHISSWLA (서열 번호 141) 또는 ASSSGAVSSGNFP (서열 번호 142)인, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 제7 측면의 실시양태에서, CDR3의 서열은 QQANRFPLT (서열 번호 141) 또는 LLYFGDTQLGV (서열 번호 142)이다. 추가의 실시양태에서, CDR2의 서열은 AASSLQS (서열 번호 145) 또는 SASNKHS (서열 번호 146)이다.
- [0047] 제8 측면에 있어서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 세포 기반 효능 검정법을 사용하여 측정하는 경우 20ng/ml 미만의 EC50으로 CD1d에 결합되는, 인간 CD1d에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 본 발명의 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 세포 기반 효능 검정법을 사용하여 측정하는 경우 0.5 내지 20ng/ml의 EC50으로 인간 CD1d에 결합된다.
- [0048] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 1 및 서열 번호 2의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0049] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 23 및 서열 번호 46의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0050] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 24 및 서열 번호 47의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의

항원 결합 부분이 제공된다.

- [illegible]

원 결합 부분이 제공된다.

- [0072] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 9 및 서열 번호 4의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0073] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 43 및 서열 번호 65의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0074] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 44 및 서열 번호 66의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0075] 본 발명의 실시양태에서, 서열 번호 45 및 서열 번호 67의 VH 및 VL 서열쌍을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0076] 상기 측면 중 어느 하나의 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 CD1d (서열 번호116)에는 결합되지만, hCD1dmu (서열 번호119)에는 결합되지 않는다. 상기 측면 중 어느 하나의 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 mCD1dhu (서열 번호118)에는 결합되지만, mCD1d (서열 번호117)에는 결합되지 않는다.
- [0077] 제9 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 단리된 DNA 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 단리된 DNA 분자는 서열 번호 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 중 어느 하나 또는 이와 95% 이상 동일한 서열 또는 중간 내지 고도로 엄격한 조건 하에 상기 서열에 하이브리드화되는 서열로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 단리된 DNA 분자는 서열 번호 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 또는 115 중 어느 하나로부터 선택된다.
- [0078] 제10 측면에 있어서, 본 발명은 인간 피험체에서 NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 피험체에게 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0079] 제11 측면에 있어서, 본 발명은 샘플에서 CD1d의 존재를 검출하는 방법으로서, CD1d에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용하는 조건 하에 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 CD1d를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 접촉시켜 복합체를 형성하는 단계, 및 상기 샘플에서 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0080] 제12 측면에 있어서, 본 발명은 세포 샘플에서 CD1d-포지티브 세포의 존재를 검출하는 방법으로서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 세포 집단을 접촉시켜 CD1d-포지티브에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합을 허용함으로써 복합체를 형성하는 단계, 및 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분 세포 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0081] 제13 측면에 있어서, 본 발명은 다수의 CD1d-결합 단백질로부터, 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및 401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,
- [0082] 뮤테인에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 서열 번호 116의 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번 아미노산이 이들 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 인간 CD1d 뮤테인에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-인간 CD1d 뮤테인 복합체 및 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 인간 CD1d 뮤테인에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d-결합 단백질은 인간 CD1d에 특이적으로 결합되며, CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 402.8 및 401.11.158로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항체와 경쟁하는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0083] 제14 측면에 있어서, 본 발명은 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 CD1d에 특이적으로 결합되는 CD1d-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,
- [0084] hCD1dmu에 대한 CD1d-결합 단백질의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 위치 87 내지 93 및 141 내지 143번



에 위치한 아미노산 (서열 번호 116)이 이 위치에서 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 hCD1dmu (서열 번호 119)에 다수의 CD1d-결합 단백질을 접촉시켜 CD1d-결합 단백질-hCD1dmu 복합체 및 hCD1dmu에 결합되지 않은 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질을 형성하는 단계, 및 고갈된 다수의 CD1d-결합 단백질로부터 hCD1dmu에 결합되지 않은 CD1d-결합 단백질을 수집하는 단계로서, 이때 수집된 CD1d-결합 단백질은 인간 CD1d (서열 번호 116) 또는 mCD1dhu (서열 번호 118)에 특이적으로 결합되는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0085] 본 발명의 항-CD1d 항체는 혈액으로부터 CD1d-포지티브 세포 집단을 확인하거나 선택하기 위하여 사용될 수 있다. 항-CD1d 항체는 골수세포(예: 단핵세포), 또는 림프세포(예: B 세포)를 포함한, 인간 환자의 말초 혈액 내에 CD1d-포지티브 세포 집단을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 상기 CD1d-포지티브 세포가 질환, 예를 들면, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한 특정 백혈병에 기여하는 상태에서 이들 세포를 검출하기 위하여 사용될 수 있었다 (Metelitsa et al., Leukemia (2003) 17, 1068-1077.; Kotsianidis et al., 2011; Am J Clin Path 136, 400-408.).
- [0086] 항-인간 CD1d 항체는 또한 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용한 면역조직화학을 위해 조직 섹션을 염색하기 위해 사용될 수 있었다.
- [0087] 본 발명의 특정 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 카파 쇠 불변 영역 또는 인간 람다 쇠 불변 영역을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함한다. 항체가 IgG4 불변 영역을 포함하는 경우에, 이는 S228P 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0088] 본 발명은 또한 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 DNA 분자를 제공한다. 특정 실시양태에서, DNA 분자의 서열은 서열 번호 10 내지 18, 서열 번호 68 내지 115 또는 이와 95% 이상 동일한 서열 또는 중간 내지 고도로 엄격한 조건하에 상기 서열에 하이브리드화되는 서열로 이루어진 군 중 임의의 것으로부터 선택된다.
- [0089] 본 발명은 또한 피험체에게 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여함을 포함하는 인간 피험체에서 NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 치료 방법을 제공한다. 치료될 수 있는, NKT 세포에 의한 지나친 사이토킨 생성과 같은, NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 예는 건선, 궤양성 대장염, 원발성 담즙성간염, 자가면역성 간염, 비알콜성 지방간, 아테롬성 동맥경화증, 허혈성 관류 손상, 천식 및 겸상적혈구 질환과 관련된 폐 염증 또는 이상을 포함한다.
- [0090] 하기 실시예에 기술되는 바와 같이, 본 발명자는 CD1d의 특별한 에피토프에 결합되는 효능성 항체를 개발했다. 이 에피토프의 특성 결정은 항체 및 항원 모두를 갖춘 이 분야의 숙련가에게 통상적이다. 항체 401.11 및 402.8가 결합되는 CD1d 에피토프를 결정하기 위하여 사용될 수 있는 이 분야의 숙련가에게 잘 알려진 방법들은 CD1d 알라닌 스캐닝 돌연변이유발, 수소/중수소 교환 맵핑, X-선 결정학, 핵자기 공명 및 광친화성 표지를 포함한다.
- [0091] 알라닌-스캐닝 돌연변이유발 (참조 예: Ausubel in: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987), Chapters 8 and 15; 또는 Cunningham et al. 1989 Science 244 1081-5)은 CD1d 분자의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 그 다음에, 생성된 돌연변이체 분자는 401.11 및/또는 402.8 항체를 결합하는 그들의 능력에 대해 시험한다. 손실 결합은 알라닌으로 바뀐 특별한 잔기가 에피토프에 포함될 수 있음을 의미한다.
- [0092] 수소 중수소 교환을 사용하는 에피토프 맵핑에서, CD1d의 수소는 용액에서 중수소로 교환된다. 이어서, 401.11 및/또는 402.8 항체가 CD1d에 결합되고, 이는 이어서 H<sub>2</sub>O로 다시 교환된다. 이 공정에서, 에피토프에 존재하는 중수소는 항체의 결합에 의해 보호된다. 교환된 패턴과 항체 결합에 의해 보호 및 비보호된 CD1d의 비교는 에피토프를 CD1d 잔류 중수소의 아미노산 잔기로서 밝힌다.
- [0093] X-선 결정학에서, 401.11 및/또는 402.8 항체가 결합되는 CD1d를 결정화하고, 결정은 X-선 회절에 의해 검사했다. 이 방법론은 항체가 결합되는 CD1d 영역에 대한 확실한 정보를 제공한다. 핵자기 공명 또는 광친화성 표지도 또한 문헌(de Vos et al. 1992 Science 255 306-12; 및 Smith et al. 1992 J Mol Biol 224 899-904)에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다.
- [0094] 이 분야의 숙련가가 이해하게 되는 바와 같이, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의해 인지되는 에피토프는 선형 시리즈의 아미노산을 포함할 수 있거나, 형태학적 에피토프일 수 있다.
- [0095] 한 측면에 있어서, 본 발명은 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하

나 이상의 항체와 경쟁하는 항체에 관한 것이다.

- [0096] 본원에 사용된 바와 같이, "경쟁하다"는 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 농도 의존 방식으로 401.11, 401.11.28, 402.8, 402.8.45, 402.8.53 및 402.8.60으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 항체의 결합을 감소시킴을 의미한다. 평가될 수 방법의 예가 하기 제시되는 실시예 7에 제공된다. 특히, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 동일한 농도로 사용된 항체 42 또는 51.1보다 시험 항체와 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 항체의 결합에서 더 큰 감소가 존재하는 경우에 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11 및 402.8로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 "경쟁한다"고 말한다 [선행분야 항체 42 및 51.1은 문헌(Exley *et al.* 1997 J Exp Med 186, 109-120) 및 제W003/092615호에 기재되어 있다].
- [0097] 본원에 기술된 바와 같이, "CD1d에 대한 결합에 대해 경쟁"하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 40 $\mu$ g/mL의 비-비오틴화 시험 항체가 고체 기질 상에 고정화된 1.0 $\mu$ g/mL 재조합 인간 CD1d에 결합된 0.2 $\mu$ g/mL 비오틴화 항-CD1d 항체 402.8 또는 401.11 또는 401.11.158과 경쟁하는, 경쟁 ELISA의 정규화 결과에서 적어도 50% 경쟁을 입증한다.
- [0098] 특정 실시양태에서, 본 발명은 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 세포 기반 효능 검정법을 사용하여 측정된 바와 같이, 20ng/ml 미만의 EC50으로 CD1d에 결합됨을 제공한다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 0.5ng/ml 내지 20ng/ml의 EC50으로 CD1d에 결합된다. 본원에 사용된 바와 같이, 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 EC50은 하기 제시되는 실시예 4에서와 같이 평가되는 것이다.
- [0099] 상기 언급한 바와 같이, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 특이적으로 CD1d를 결합한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로"는 CD1d에 대한 결합이 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 VH 및 VL 도메인을 통해서 이루어지며, Fc 영역을 통해 일어날 수 있는 비-특이적 결합은 아님을 의미한다.
- [0100] 하기 실시예에 기술되는 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 및 사이노몰구스 또는 레서스 CD1d에 모두 결합된다. 이는 선행분야의 항체 42 및 51.1과 대조적이다.
- [0101] 인간 CD1d의 아미노산 서열은, 예를 들면, 다음일 수 있다:
- ```
MGCLLFLLWALLQAWGSAEVPQRLFPLRCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTH
SWSNDSDTVRSCLKPWSQGTFSDDQWETLQHIFRVYRSSFTRDVKFAKMLRLSYPLE
LQVSAGCEVHPGNASNNFFHVAFAFGKDILSFQGTSWPTQEAPLWVNLAIQVLNQD
KWTRETQVQWLLNGTCPQFVSGLLESGKSELKKQVKPKAWLSRGPSPGPRLLLVCH
VSGFYPPKPVVWKWMRGEQEQQGTQPGDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSCR
VKHSSLEGQDIVLYWGGSYTSMGLIALAVLACLLFLLVGFSTRFKRQTSYQGVL
(서열 확인 번호:157)
```
- [0102]
- [0103] 인간 CD1d에 대한 유니프로트(UniProt) 수탁번호는 P15813이다.
- [0104] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 401.11 및 402.8 (및 일부 실시양태에서는 40.11.158)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항체에 의해 결합된 것과 동일한 CD1d의 에피토프를 결합하는 항체에 관한 것이다. 상기 기술한 바와 같이, 특별한 항체에 의해 결합된 CD1d의 에피토프는 수많은 방법론에 의해 평가할 수 있으며, 이어서 이는 특정 항체에 의해 결합된 에피토프와 비교할 수 있다.
- [0105] 한 실시양태에서, 에피토프는 서열 번호 116의 잔기 141 내지 143 또는 서열 번호 116의 잔기 87 내지 93 및 141 내지 143을 포함한다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 광범위하게 4개의 폴리펩티드 쇄, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄로 구성된 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특성을 유지하는, 그의 임의의 기능적 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 의미한다. 상기 돌연변이체, 변이체 EH는 유도체 항체 포맷은 당해 분야에 공지되어 있다. 이의 비-제한적 실시양태는 하기에 논의된다.
- [0107] 전장 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(HCVR 또는 VH로서 본원에서 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(LCVR 또는 VL로 본원에서 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 다시 프레임워크 영역(FR)으로 불리우는 보다 보존성인 영역과 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리우는 초가변성 영역으로 다시 나눌 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단까지 배열되는, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 형태 (예: IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 그룹(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1

및 IgA2) 또는 서브그룹일 수 있다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 항체의 "항원 결합 부분"은 항원(예: CD1d)에 특이적으로 결합되는 능력을 보유한 항체 또는 단백질의 하나 이상의 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행할 수 있다고 제시되었다. 상기 항체 실시양태는 또한 이중특이적(bispecific), 이중특이적(dual specific), 또는 다중-특이적(multi-specific) 포맷일 수 있고; 둘 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합될 수 있다. 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역(hinge region)에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 단일 항체 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 단일 가변 도메인을 포함하는, 도메인 항체 (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341 544-6, Winter et al., PCT publication WO 90/05144, 모두 본원에 참조로 인용됨), 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH가 별도의 유전자에 의해 암호화됨에도 불구하고, 그들은 그들을 VL 및 VH 영역이 1가 분자를 형성하기 위하여 쌍을 이루는 단백질 단쇄(단쇄 FV(scFv)로서 공지됨)로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 사용하여 결합될 수 있다 (참조예: Bird et al. 1988 Science 242 423-6; Huston et al. 1988 Proc Natl Acad Sci U S A 85 5879-83). 상기 단쇄 항체도 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분" 내에 포함시키고자 한다. 디아바디(diabody)와 같은 단쇄 항체의 다른 형태가 또한 포함된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄 상에 발현되지만, 동일한 쇄 상에 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루도록 하기엔 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루도록 강제하여, 2개의 항원 결합 부위를 생성하는, 2가, 이중특이적 항체이다 (참조예: Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123). 상기 항체 결합 부분이 당해 분야에 공지되어 있다 (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering 2001 Springer-Verlag, New York. 790 pp., ISBN 3-540-41354-5).

[0109] 본원에 기술된 항체는 인간화 항체일 수 있다. 용어 "인간화 항체"는 인간 항체로부터의 FR로 그래프트되거나 이에 삽입된 비-인간 중(예: 마우스 또는 래트나, 비-인간 영장류)의 항체로부터의 CDR을 포함하는, 인간-유사 가변 영역을 포함하는 단백질을 의미하는 것으로 이해해야 할 것이다(이러한 형태의 항체는 또한 "CDR-그래프트된 항체"로서 언급됨). 인간화 항체는 또한 인간 단백질의 하나 이상의 잔기가 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 개질되고/되거나, 인간 단백질의 하나 이상의 FR 잔기가 상응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된 단백질을 포함한다. 인간화 항체는 또한 인간 항체에서도 비-인간 항체에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 단백질의 임의의 부가 영역(예: Fc 영역)은 일반적으로 인간이다. 인간화는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다(예: US5225539, US6054297, US7566771 또는 US5585089). 용어 "인간화 항체"는 또한, 예를 들면, US7732578호에 기술된 바와 같은 초-인간화 단백질을 포함한다.

[0110] 본원에 기술된 항체는 인간일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 인간에서, 예를 들면, 인간의 생식계열 세포 또는 체세포에서 발견되는 가변 및 임의로, 불변 항체 영역을 갖는, 또는 상기 영역을 사용하여 제조한 라이브러리로부터의 단백질을 의미한다. "인간" 항체는 인간 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기, 예를 들면, 시험관내에서 랜덤 또는 부위 유도 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이(특히, 단백질 잔기의 작은 번호에서, 예를 들면, 단백질 잔기의 1, 2, 3, 4 또는 5에서 보존적 치환 또는 돌연변이를 포함하는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 이들 "인간 항체"는 반드시 인간의 면역반응의 결과로서 생성될 필요는 없으며, 오히려 그들은 재조합 방법[예: 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝]을 사용하고/하거나, 인간 항체 불변 및/또는 가변 영역을 암호화하는 핵산을 포함하고/하거나 지침 선택(예: US5565332에 기술된 바와 같은)을 사용하여 형질전환 동물(예: 마우스)에 의해 생성할 수 있다. 이 용어는 또한 상기 항체의 친화성 성숙 형태를 포함한다. 본 기술을 목적으로, 인간 단백질은 또한 인간 항체로부터의 FR 또는 인간 FR의 컨센서스 서열로부터의 서열을 포함하는 FR을 포함하는 단백질을 포함하는 것으로 여겨질 것이고, 여기서 하나 이상의 CDR은, 예를 들면, US6300064 및/또는 US6248516에 기술된 바와 같은, 랜덤 또는 반-랜덤이다.

[0111] CDR 및 FR에 부여된 아미노산 위치는 면역학적 관심있는 단백질의 카바트 서열(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest)(미국 국립보건원(National Institutes of Health), Bethesda, Md., 1987 and 1991)에 따라 정의할 수 있다(본원에서 "카바트 넘버링 시스템"으로서 또한 언급함). 다른 실시양태에서, CDR 및 FR에 부여된 아미노산 위치는 개선된 코티아 넘버링 도식(Enhanced Chothia Numbering Scheme)(<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)에 따라 정의된다. 카바트 넘버링 시스템에 따라, VH FR 및 CDR은 다음과 같이 위치할 수 있다: 잔기 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) 및 103- 113 (FR4). 카바트 넘버링 시스템에 따라, VL FR 및 CDR은 다음과 같이 위치한다: 잔기



1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) 및 98-107 (FR4). 본 기술은 카바트 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 FR 및 CDR로 제한되지 않지만, 코티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)(J. Mol Biol. 196:901-917, 1987); 코티아 등(Nature 342, 877-883, 1989); 및/또는 알-라지카니 등(Al-Lazikani et al.)(J Mol Biol 273, 927-948, 1997)의 정규 넘버링 시스템; 호네거(Honnegher) 및 플뤼튼(Plukthun)의 넘버링 시스템(J. Mol. Biol., 309: 657-670, 2001); 또는 문첸(Giudicelli et al., Nucleic Acids Res., 25: 206-211 1997)에 논의된 IMGT 시스템을 포함한다. 한 실시예에서, CDR은 카바트 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 임의로, 카바트 넘버링 시스템에 따라 정의된 중쇄 CDR2는 본원에 제시된 5개의 C-말단 아미노산을 포함하지 않거나, 그들 아미노산 중 임의의 하나 이상이 다른 천연으로-존재하는 아미노산에 의해 치환된다. 부가의 또는 대안적 옵션으로, 경쇄 CDR1은 본원에 제시된 4개의 N-말단 아미노산을 포함하지 않거나, 그들 아미노산 중 임의의 하나 이상이 다른 천연으로-존재하는 아미노산에 의해 치환된다. 이와 관련하여, 파들란(Padlan) 등(FASEB J., 9: 133-139, 1995)은 중쇄 CDR2의 5개 C-말단 아미노산 및/또는 경쇄 CDR1의 4개 N-말단 아미노산이 일반적으로 항원 결합에 관여하지 않음을 성립했다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체 작제물"은 링커 폴리펩티드 또는 면역글로불린 불변 도메인에 결합되는 본 발명의 하나 이상의 항원 결합 부분을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 링커 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 결합된 둘 이상의 아미노산 잔기를 포함하며, 하나 이상의 항원 결합 부분을 결합하기 위하여 사용된다. 상기 링커 폴리펩티드는 당해 분야에 잘 공지되어 있다 (참조예: Holliger et al. 1993 Proc Natl Acad Sci U S A 90 6444-8).

[0113] 면역글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 의미한다. 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열이 당해 분야에 공지되어 있고, 그 예는 하기에 제시된다.

[0114] 인간 중쇄 IgG1 불변 도메인(또는 NCBI 수탁번호: P01857과 같은 이의 유도체)

ASTKNPDVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTQYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPCAP  
ELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 확인  
번호:158)

[0115] 인간 중쇄 IgG4 불변 도메인(NCBI 수탁번호: P01861과 같은)  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG  
GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL  
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 확인 번호:159)

[0118] S228P 돌연변이가 포함된 인간 중쇄 IgG4 불변 도메인

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG  
GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL  
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 확인 번호:160)

[0120] US 제7,083,784호에 기술된 바와 같은 S228P 돌연변이 및 YTE 돌연변이가 포함된 인간 중쇄 IgG4 불변 도메인이 또한 사용될 수 있다.

[0121] 인간 경쇄 카파 불변 도메인(NCBI 수탁번호: P01834와 같은)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 확인  
번호:161)

[0123] 인간 경쇄 람다 불변 도메인(NCBI 수탁번호: P01842와 같은)

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS  
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTCS (서열 확인  
번호: 162)

[0124]

- [0125] 이해되는 바와 같이, 본 발명에서 개발되고 기술된 서열은, 예를 들면, 친화성 돌연변이에 의해 결합을 증가시키거나, 예상되는 MHC 그룹 II-결합 모티프를 제거함으로써 면역원성을 감소시키기 위해 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용하여 개질시킬 수 있다. 본원에서 개발되고 기술된 서열의 치료학적 유용성은 그들의 기능적 특성, 예를 들면, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 보체-의존성 세포독성(CDC), 혈청 반감기, 생물학적 분류 및 Fc 수용체에 대한 결합 또는 이들 중 임의 것의 조합을 조절함으로써 추가로 개선시킬 수 있다. 이 조절은 단백질-공학, 당쇄-공학 또는 화학적 방법에 의해 성취할 수 있다. 필요한 치료학적 적용에 따라, 이들 활성 중 임의의 것을 증가시키거나 감소시키는데 유용할 수 있다.
- [0126] 항체의 친화성 돌연변이를 위한 수많은 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 이들 중 많은 것은 개선된 친화성을 위해 돌연변이유발에 이어서, 선택 및/또는 스크리닝에 의해 변이체 단백질의 패널 또는 라이브러리를 생성하는 일반적인 전략을 기반으로 한다. 돌연변이유발은 종종, 예를 들면, 실수유발 PCR(error prone PCR) (Thie H 2009 Methods Mol Biol. 525:309-22)에 의해, 유전자 셔플링(Kolkman and Stemmer 2001 Nat Biotechnol. May;19(5):423-8)에 의해, 돌연변이원(mutagenic chemicals) 또는 조사의 사용에 의해, 실수유발 복제 기계에 의한 '뮤테이터(mutator)' 균주의 사용(Greener 1996)에 의해 또는 자연 친화성 돌연변이 기구를 이용하는 (harness) 체세포 과돌연변이 접근법(Peled, Kuang et al. 2008)에 의해 DNA 수준에서 수행한다. 돌연변이유발은 또한, 예를 들면, Q $\beta$  레플리카제의 사용((Kopsidas, Roberts et al. 2006)에 의해 RNA 수준에서 수행할 수 있다. 개선된 변이체 단백질을 위한 스크리닝을 허용하는 라이브러리-기반 방법은 파지, 효모, 리보솜, 세균 또는 포유동물 세포와 같은 다양한 디스플레이 기술을 기반으로 할 수 있으며, 당해 분야에 잘 공지되어 있다 (Benhar 2007). 친화성 돌연변이는 보다 직접적/예상되는 방법에 의해, 예를 들면, 3D 단백질 모델링으로부터의 발견에 의해 지시된 부위-지시 돌연변이유발 또는 유전자 합성에 의해 성취할 수 있다 (참조예: Queen, Schneider et al. 1989 또는 미국 특허 제6,180,370호 또는 미국 특허 제5,225,539호).
- [0127] 항체 혈청 반감기 및 생물학적 분류를 조절하는 수많은 방법들은 항체 및, 이화작용으로부터 IgG를 보호하고, 높은 혈청 항체 농도를 유지하는데 주요 역할을 하는 수용체인, 신생아 Fc 수용체(FcRn) 사이에 상호작용의 개질을 기반으로 한다. Dall'Acqua 등은 FcRn에 대한 결합 친화성을 개선함으로써, 혈청 반감기를 증가시키는 IgG1의 Fc 영역의 치환을 기술하고 있으며 (Dall'Acqua, Woods et al., 2002), M252Y/S254T/T256E의 삼중 치환(YTE 돌연변이)에 의해 ADCC 활성의 개선된 생체이용 가능성 및 조절을 추가로 입증하고 있다 (Dall'Acqua, Kiener et al., 2006). 또한 미국 특허 제6,277,375호; 제6,821,505호; 및 제7,083,784호를 참조한다. 힌톤(Hinton) 등은 증가된 생체내 반감기를 부여하는 250번 및 428번 위치에서 불변 도메인 아미노산 치환을 기술하였다 (Hinton, Johlfis et al. 2004). (Hinton, Xiong et al. 2006). 또한 미국 특허 제7,217,797호를 참조한다. 페트코바(Petkova) 등은 증가된 생체내 반감기를 부여하는 307, 380 및 434번 위치에서 불변 도메인 아미노산 치환을 기술하였다 (Petkova, Akilesh et al. 2006). 또한 실즈(Shields) 등의 문헌 (Shields, Namuk et al. 2001) 및 제WO 2000/42072호를 참조한다. 항체 불변 영역은 또한 이펙터 기능을 제거하기 위하여 개질시킬 수 있다. 글루타민 (Q)에 대한 297번 위치에서 아스파라긴 (N)의 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc의 결합을 매개하는 N-결합된 탄수화물을 제거한다. 상기 비글리코실화 항체는 인간 Fc 감마 RI에 결합되지 않고, 보체 경로를 활성화하지 않는다 (Tao and Morrison 1989). FcRn 결합 및 혈청 반감기를 포함한, Fc 수용체에 대한 결합 및 이들 수용체에 의해 매개되는 후속 기능을 조절하는 불변 도메인 아미노산 치환의 다른 예가 미국 특허출원 제20090142340호; 제20090068175호; 및 제20090092599호에 기술되어 있다.
- [0128] 일부 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자에서, 문헌(Lund, Winter et al (1991) J Immunology 147: 2657-2662 and Alegre et al. (1992) J Immunology 148: 3461-3468)에 기술된 바와 같이, Fc 결합 및 Fc-관련 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하기 위하여 치환 L235E로 조작하는 것이 유용할 수 있다. 항체는 IgG1, 및 IgG3 또는 IgG4일 수 있다.
- [0129] 일부 실시양태에서, Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자에서, C-말단 리신이 결실된(K447) Fc를 위해 조작하거나 달리 선택하는 것이 유용할 수 있다. 바람직하게는, 이 개질은 발현된 분자의 이종성을 감소시킴으로써 제조역량을 개선한다.
- [0130] 항체 분자에 결합된 글리신은 Fc 수용체 및 글리칸 수용체를 갖는 항체의 상호작용에 영향을 줌으로써, 혈청 반감기를 포함한, 항체 활성에 영향을 주는 것으로 공지되어 있다 (Kaneko, Nimmerjahn et al. 2006; Jones, Papac et al. 2007; and Kanda, Yamada et al. 2007). 따라서, 원하는 항체 활성을 조절하는 특정 글리코형은 치료학적 이점을 부여할 수 있다. 조작된 글리코형의 생성 방법이 당해 분야에 공지되어 있고, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 미국 특허 제6,602,684호; 제7,326,681호; 제7,388,081호; 및 제WO 2008/006554호에 기술된 것

을 포함한다.

- [0131] 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 첨가에 의한 반감기의 연장이, 예를 들면, Fishburn 2008에 의해 검토된 바와 같이, 단백질의 혈청 반감기를 연장하기 위하여 광범위하게 사용되어 왔다.
- [0132] 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 조성물을 제공한다. 이 조성물은 통상 멸균수, 멸균 완충수로부터 선택된 적어도 하나의 제형화제, 및/또는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 보존제를 임의로 수성 희석제에 포함할 것이고(여기서 단백질의 농도는 약 0.1 내지 약 200mg/ml임), 적어도 하나의 등장제(isotonicity agent) 또는 적어도 하나의 생리학적으로 허용되는 완충제를 추가로 포함한다.
- [0133] 본 발명의 항체 조성물은 임의로 항-감염성 약물, 심혈관(CV)계 약물, 중추신경계(CNS) 약물, 자율신경계(ANS) 약물, 기도 약물, 위장(GI)관 약물, 호르몬 약물, 유체 또는 전해질 밸런스용 약물, 혈액작용 약물, 항종양제(antineoplastic), 면역조절 약물, 안구, 귀 또는 코용 약물, 국소용 약물 또는 영양제 등 중 적어도 하나로부터 선택된 적어도 하나의 화합물 또는 단백질을 유효량으로 추가로 포함할 수 있다. 본원에 제시된 각각에 대한 제형, 지시서, 용량 및 투여를 포함한, 상기 약물이 당해 분야에 잘 공지되어 있다 (참조예: Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, Pa., 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, N.J.; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, Conn., 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨).
- [0134] 본 발명의 조성물은 이로써 제한되는 것은 아니지만, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제 또는 보조제 등과 같은 임의의 적합한 보조제 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 보조제가 바람직하다. 상기 멸균액의 비-제한적 예 및 제조 방법은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 문헌(Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990)과 같이 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 당해 분야에 잘 공지되었거나 본원에 기술된 바와 같이 항체 조성물의 투여 형태, 용해도 및/또는 안정성에 적합한 약학적으로 허용되는 담체가 통상 선택될 수 있다.
- [0135] 본 조성물에 유용한 약학적 부형제 및 첨가제는 중량 또는 용적 기준 1 내지 99.99%를 단독으로 혼합되어 포함하는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질 및 탄수화물(예: 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당류를 포함한 당; 알디톨, 알도산 및 에스테르화 당 등과 같은 유도체화된 당; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하며, 이는 단독으로 또는 혼합되어 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 혈청 알부민, 예를 들면, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴 및 카제인 등을 포함한다. 완충능에서 또한 작용할 수 있는 대표적인 아미노산은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이솔류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌 및 아스파르트산 등을 포함한다. 한 바람직한 아미노산은 히스티딘이다. 두 번째로 바람직한 아미노산은 아르기닌이다.
- [0136] 본 발명에 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는, 예를 들면, 단당류(예: 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스 및 소르보스 등); 이당류(예: 락토스, 수크로스, 트레할로스 및 셀로비오스 등); 다당류(예: 라피노스, 펠레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란 및 전분 등); 및 알디톨(예: 만니톨, 크실리톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨 소르비톨 (글루시톨) 및 미로이노시톨 등)을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스 및 라피노스이다.
- [0137] 항체 조성물은 또한 완충제 또는 pH 조절제를 포함할 수 있으며; 통상 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 유기산염(예: 시트르산, 글루콘산, 카본산, 타르타르산, 석신산, 아세트산 또는 프탈산의 염); 트리스, 트로메타민 하이드로클로라이드 또는 포스페이트 완충제를 포함한다. 본 조성물에 사용하기에 바람직한 완충제는 유기산염(예: 시트레이트)이다.
- [0138] 또한, 본 발명의 조성물은 중합체성 부형제/첨가제, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈, 피콜 (중합체성 당류), 텍스트레이트(예: 사이클로덱스트린, 예를 들면, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향미제, 향미생물제, 감미제, 향산화제, 대전방지제, 계면활성제(예: 폴리소르베이트, 예를 들면, "TWEEN® 20" 및 "TWEEN® 80"), 지질(예: 인지질, 지방산), 스테로이드(예: 코콜레스테롤), 및 킬레이트화제(예: EDTA)를 포함할 수 있다.
- [0139] 본 발명에 따르는 항체 조성물에 사용하기에 적합한 이들 및 부가의 공지된 약학적 부형제 및/또는 첨가제는, 예를 들면, 문헌("Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams,



(1995), 및 "Physician's Desk Reference" 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), 이의 기술들은 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 제시된 바와 같이, 당해 분야에 공지되어 있다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물(예; 사카라이드 및 알디톨) 및 완충제(예: 시트레이트) 또는 중합체성 제제이다.

[0140] 본 발명은 또한 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여함을 포함하는, NKT 세포 이펙터 기능과 관련된 병태의 치료 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "NKT 세포 이펙터 기능"은 NKT 세포의 CD1d-제한된 당지질 활성화로부터 유발되는 NKT 세포 기능을 포함하고자 한다. 상기 기능은, 이로써 반드시 제한되는 것은 아니지만, NKT 세포에 의한 임의의 하나 이상의 종양괴사인자 알파 (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 또는 IL-13 방출, NKT 세포표면 FasL 발현의 상향-조절, 퍼포린의 방출 및 NKT 세포에 의한 그랜자임 B의 방출을 포함한다.

[0141] 투여 경로는 비경구, 근육내, 정맥내, 볼루스, 복강내, 피하, 호흡기관, 흡입, 국소, 코, 질내, 직장내, 구강내, 설하, 비내, 피하 및 경피를 포함한 광범위한 투여 경로로부터 선택될 수 있다. 그러나, 통상 가장 적절한 경로는 비경구 또는 흡입일 것이라 여겨진다. 단백질의 흡입에 관한 부가 정보는 문헌(Borish LC, et al 1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160(6), 1816-1823)에서 확인할 수 있다.

[0142] 비경구 투여의 경우, 항체 또는 그의 항체 결합 부분은 약학적으로 허용되는 비경구용 비히클과 함께 또는 별도로 제공되는 용액, 현탁액, 에멀전 또는 동결건조 분말로서 제형화될 수 있다. 상기 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 1-10% 인간 혈청 알부민이다. 리포솜 및 비수성 비히클(예: 비휘발성 오일)이 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조 분말은 등장성(예: 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예: 완충제 및 보존제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형은 공지되거나 적절한 기술에 의해 멸균시킨다.

[0143] 본 발명의 단리된 핵산 분자는, 예를 들면, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 각각 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3과 같은 적어도 하나의 CDR의 적어도 하나의 명시된 부분에 임의로 하나 이상의 인트론을 갖는, 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 핵산 분자; 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 위한 암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 유전 암호의 변성으로 인하여, 본원에 기술된 바와 같이 및/또는 당해 분야에 공지된 바와 같이 여전히 하나 이상의 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 암호화하는 상기 기술된 것과 실질적으로 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전 암호는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 따라서, 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 특정 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 암호화하는 변성 핵산 변이체를 생성하는 것이 통상적이고 (참조예: 앞서 언급한 바와 같은 Ausubel 등), 상기 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다.

[0144] 본원에 제시된 바와 같이, 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 암호화하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 부가 서열, 예를 들면, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 전사, 스플라이싱을 포함하는 mRNA 프로세싱 및 폴리아데닐화 시그널(예 - RNA의 리보솜 결합 및 안정성)에서 역할을 하는 전사된, 비-번역 서열과 같은, 비-암호화 5' 및 3' 서열을 포함하는 부가의 비-암호화 서열과 함께, 상기 언급한 부가의 암호화 서열(예: 적어도 하나의 인트론)의 존재 또는 부재하에, 적어도 하나의 시그널 리더 또는 융합 펩티드의 암호화 서열; 부가의 기능성을 제공하는 것과 같은 부가 아미노산을 암호화하는 부가의 암호화 서열뿐만 아니라, 항체 또는 그의 항체 결합 부분 자체의 아미노산 서열을 암호화하는 것; 전체 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 위한 암호화 서열; 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 위한 암호화 서열을 포함할 수 있다.

[0145] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 선택적인 하이브리드화 조건하에 하이브리드화되는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 본 실시양태의 폴리뉴클레오타이드는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 단리, 검출 및/또는 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장 클론을 확인, 단리 또는 증폭시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된 게놈 또는 cDNA 서열이거나, 인간 또는 포유동물 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 상보적인 것들이다.

[0146] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80% 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90% 전장 서열, 및 보다 바람직하게는 적어도 95% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희소 서열의 재현을 증가시키기 위하여 규정화할 수 있다. 낮게 또는 중간적 엄격한 하이브리드화 조건은 통상적이지만, 전적으로는 아니게, 상보성 서열에 대해 서열 동일성이 감소된 서열과 함께 사용된다. 중간 내지 고도로 엄격한 하이브리드화 조건은 임의로 더 큰 동일성의 서열에 대해 사용될 수 있다. 낮게 엄격한 조건은 약 70% 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적 하이브리드화를 허용하고, 병렬상동 또는 직렬상동 서열을 확인하기 위하여 사용될 수 있다.

[0147] 임의로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본원에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 항체 또는 그의 항

원 결합 부분의 적어도 일부를 암호화할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 선택적 하이브리드화하기 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다 (참조 예: 앞서 언급한 Ausubel).

[0148] 본 발명의 단리된 핵산은 당해 분야에 잘 공지된 바와 같이, (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, 및 (c) 정제 기술이나, 이들의 조합을 사용하여 제조할 수 있다.

[0149] 핵산은 편의상 본 발명의 폴리뉴클레오티드 이외에 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위를 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위하여 핵산으로 삽입시킬 수 있다. 또한, 번역 가능한 서열이 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위하여 삽입될 수 있다. 예를 들면, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 암호화 서열을 제외한, 본 발명의 핵산은 임의로 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터, 또는 링커이다.

[0150] 부가 서열은 클로닝 및/또는 발현시 그들의 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕거나, 세포로 폴리뉴클레오티드의 도입을 개선하기 위하여 상기 클로닝 및/또는 발현 서열에 부가할 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커는 당해 분야에 잘 공지되어 있다 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel).

[0151] 본 발명의 단리된 핵산 조성물(예: RNA, cDNA, 게놈성 DNA, 또는 이들의 조합)은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 수의 클로닝 방법론을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 엄격한 조건하에 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈성 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하기 위해 사용된다. RNA의 단리 및 cDNA 및 게놈성 라이브러리의 작제가 당해 분야의 통상의 숙련가에게 잘 공지되어 있다 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel).

[0152] cDNA 또는 게놈성 라이브러리는 본원에 기술된 것과 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 서열을 기반으로 하는 프로브를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 프로브는 동일하거나 상이한 유기체에서 상동 유전자를 단리시키기 위해 게놈성 DNA 또는 cDNA 서열과 하이브리드화시키기 위해 사용될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 다양한 하이브리드화의 엄격함 정도가 검정에서 사용될 수 있고; 하이브리드화 또는 세척 매질은 엄격할 수 있음을 이해할 것이다. 하이브리드화를 위한 조건이 보다 엄격한 경우, 프로브와 발생될 듀플렉스(duplex) 형성을 위한 표적 사이에 더 큰 정도의 상보성이 존재해야 한다. 엄격함의 정도는 온도, 이온 강도, pH 및 부분 변성 용매(예: 포름아미드)의 존재 중 하나 이상에 의해 제어될 수 있다. 예를 들면, 하이브리드화의 엄격함은 편의상, 예를 들면, 0 내지 50% 범위 내로 포름아미드 농도의 조작을 통해 반응물 용액의 극성을 변화시킴으로써 변화된다. 검출 가능한 결합에 필요한 상보성 정도[서열 동일성]은 하이브리드화 매질 및/또는 세척 매질의 엄격함에 따라 변할 것이다. 상보성 정도는 최적으로는 100%, 또는 90-100%나, 그 안에 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머에서 소수의 서열 변형은 하이브리드화 및/또는 세척 매질의 엄격함을 감소시킴으로써 보상될 수 있음을 이해해야 한다.

[0153] RNA 또는 DNA의 증폭 방법이 당해 분야에 잘 공지되어 있고, 본원에 제시된 기술 및 지침을 기반으로, 적합치 못한 실험없이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 공지된 DNA 또는 RNA 증폭 방법은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 및 관련 증폭 방법들 (참조예: Mullis 등에 대한 미국 특허 제4,683,195호; 제4,683,202호; 제4,800,159호; 제4,965,188호; Tabor 등에 대한 미국 특허 제4,795,699호 및 제4,921,794호; Innis에 대한 미국 특허 제5,142,033호; Wilson 등에 대한 미국 특허 제5,122,464호; Innis에 대한 미국 특허 제5,091,310호; Gyllensten 등에 대한 미국 특허 제5,066,584호; Gelfand 등에 대한 미국 특허 제4,889,818호; Silver에 대한 미국 특허 제4,994,370호; Biswas에 대한 미국 특허 제4,766,067호; Ringold에 대한 미국 특허 제 4,656,134호) 및 이중사 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 안티-센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭 (Malek 등에 대한 미국 특허 제5,130,238호, 상표명 NASBA를 가짐)을 포함하며, 이의 전문들은 본원에 참조로 인용된다 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel).

[0154] 예를 들면, PCR 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 및 게놈성 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 관련된 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. PCR 및 시험관내 다른 증폭 방법, 예를 들면, 발현된 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 클론화하거나, 샘플에서 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하기 위해 핵산을 제조하거나, 핵산 시퀀싱을 위해, 또는 다른 목적을 위해 또한 유용할 수 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 숙련가가 유도하기에 충분한 기술의 예는 Mullis 등의 미국 특허 제4,683,202호 (1987); 및 Innis 등의 문헌(PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990))뿐만 아니라, 앞서 언급한 Ausubel에서 확인된다. 게놈성 PCR 증폭을 위한 시판용 키트가 당해 분야에



공지되어 있다 (참조예: Advantage®-GC Genomic PCR Kit (Clontech)). T4 유전자 32 단백질(Boehringer Mannheim)이 긴 PCR 생성물의 수율을 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

[0155] 본 발명의 단리된 핵산은 또한 공지된 방법에 의해 직접 화학적 합성에 의해 제조할 수 있다 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel 등). 화학적 합성은 일반적으로 단일사 올리고뉴클레오타이드를 생성하며, 이는 상보성 서열과의 하이브리드화에 의해, 또는 주형으로서 단일사를 사용하는 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중사 DNA로 전환시킬 수 있다. 당해 분야의 한 숙련가는 DNA의 화학적 합성이 약 100개 이상 염기의 서열로 제한될 수 있지만, 보다 긴 서열이 보다 짧은 서열의 결합에 의해 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 중복 올리고뉴클레오타이드의 어셈블리에 의해 보다 긴 서열의 합성은 당해 분야에 통상적이다.

[0156] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 재조합 발현 카세트를 추가로 제공한다. 본 발명의 핵산 서열, 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 cDNA 또는 게놈성 서열이 적어도 하나의 원하는 숙주 세포로 도입될 수 있는 재조합 발현 카세트를 작성하기 위하여 사용될 수 있다. 재조합 발현 카세트는 통상 의도하는 숙주 세포에 폴리뉴클레오타이드의 전사를 지시할 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 이중성 및 비-이중성(즉, 내인성) 프로모터가 모두 본 발명의 핵산의 발현을 지시하기 위하여 사용될 수 있다.

[0157] 일부 실시양태에서, 프로모터, 인핸서 또는 다른 요소로서 작용하는 단리된 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 상향 또는 하향 조절하기 위하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 비-이중성 형태의 적절한 위치(상류, 하류 또는 인트론에)로 도입될 수 있다. 예를 들면, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내 또는 시험관내에서 변화시킬 수 있다.

[0158] 본 발명은 또한 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 재조합 벡터와 유전자 조작된 숙주 세포, 및 당해 분야에 잘 알려진 바와 같은 재조합 기술에 의한 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 제조에 관한 것이다 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel 등). 폴리뉴클레오타이드는 임의로 숙주에서 증식을 위한 선택성 마커를 함유하는 벡터에 결합될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물(예: 인산칼슘 침전물)로, 또는 하전된 지질과의 복합체로 도입된다. 벡터가 바이러스라면, 적절히 포장된 세포주를 사용하여 시험관내에서 포장한 다음, 숙주 세포로 형질도입시킬 수 있다.

[0159] DNA 삽입체는 적절한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 작제물은 전사 개시, 종결 및, 전사 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사물의 암호화 부분은 바람직하게는 번역할 mRNA의 말단에 적절히 위치하는 개시 및 종결 코돈(예: UAA, UGA 또는 UAG)에서 개시되는 번역을 포함할 것이고, UAA 및 UAG가 포유동물 또는 진핵생물 세포 발현을 위해 바람직하다.

[0160] 발현 벡터는 바람직하지만 임의로, 적어도 하나의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는, 예를 들면, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 진핵세포 배양에 대해 메토타렉세이트(MTX), 디하이드로폴레이트 리덕타제 (DHFR, 미국 특허 제4,399,216호; 제4,634,665호; 제4,656,134호; 제4,956,288호; 제5,149,636호; 및 제5,179,017호), 암피실린 네오마이신 (G418), 미코페놀산, 또는 글루타민 신테타제 (GS, 미국 특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 및 제5,827,739호) 내성, 및 이. 콜라이(E. coli) 및 다른 세균 또는 진핵생물에서 배양에 대해 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함한다 (상기 특허들은 전문이 본원에 참조로 인용된다). 상기 기술된 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건이 당해 분야에 공지되어 있다. 적절한 벡터는 숙련가에게 용이하게 확실할 것이다. 숙주 세포로 벡터 작제물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질-매개 형질감염, 일렉트로포레이션(electroporation), 형질도입, 감염 또는 다른 방법들에 의해 영향을 받을 수 있다. 상기 방법들은 당해 분야에 기술되어 있다(예: 앞서 언급한 Ausubel, Chapters 1, 9, 13, 15, 16).

[0161] 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 용합 단백질과 같은, 개질된 형태로 발현될 수 있고, 단지 분비 시그널뿐만 아니라, 부가의 이중성 기능성 영역을 포함할 수 있다. 예를 들면, 부가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 정제 도중, 또는 후속 취급 및 저장 도중 숙주 세포에 안정성 및 지속성을 개선하기 위하여 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 N-말단에 부가될 수 있다. 또한, 펩티드 잔기가 정제를 용이하게 하기 위하여 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 부가될 수 있다. 상기 영역은 항체 또는 적어도 하나의 그의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 상기 방법이 많은 표준 실험실 매뉴얼에 기술되어 있다(예: 앞서 언급한 Ausubel, Chapters 16, 17 및 18). 당해 분야의 통상의 숙련가들은 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산의 발현에 유용한 수많은 발현 시스템을 많이 알고 있다.

- [0162] 이와 달리, 본 발명의 핵산은 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 암호화하는 내인성 DAN를 함유하는 숙주 세포에서 시도하여(조작에 의해) 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 상기 방법들은 전문이 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호 및 제5,733,761호에 기술된 바와 같이, 당해 분야에 잘 공지되어 있다.
- [0163] 항체, 그의 명시된 부분 또는 변이체의 제조에 유용한 세포 배지의 예시는 포유동물 세포이다. 포유동물 세포 시스템은 종종 포유동물 세포 현탁액 또는 바이오리액터(bioreactor)가 또한 사용될 수 있음에도 불구하고, 세포의 단층 형태로 존재할 것이다. 완전 글리코실화 단백질을 발현할 수 있는 수많은 적절한 숙주 세포주가 당해 분야에서 개발되어 왔고, 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, V)로부터 용이하게 이용가능한, COS-1 (예: ATCC CRL 1650), COS-7 (예: ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (예: ATCC CRL-10), CHO (예: ATCC CRL 1610) 및 BSC-1 (예: ATCC CRL-26) 세포주, COS-7 세포, CHOK1SV 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포 및 HeLa 세포 등을 포함한다. 바람직한 숙주 세포는 림프성 기원의 세포(예: 골수종 및 림프종 세포)를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 CHOK1 (ATCC: CRL-9618) 또는 CHOK1SV (예: Lonza Biologics)이다.
- [0164] 이들 세포를 위한 발현 벡터는 이로써 제한되는 것은 아니지만, 복제 기원과 같은 하나 이상의 하기의 발현 제어 서열을 포함할 수 있다: 프로모터 [예: 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 제 5,168,062호; 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파프로모터 (미국 특허 제5,266,491호), 적어도 하나의 인간 면역글로불린 프로모터]; 인핸서 및/또는 프로세싱 정보 부위[예: 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스(splince) 부위, 폴리아데닐화 부위(예: SV40 라지 T Ag 폴리 A 부가 부위)] 및 전사 종결 서열 (참조예: 앞서 언급한 Ausubel 등). 본 발명의 핵산 또는 단백질의 제조에 유용한 다른 세포가 공지되어 있고/있거나, 예를 들면, 세포주 및 하이브리도마의 ATCC(American Type Culture Collection) 카탈로그([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) 또는 다른 공지되거나 시판중인 공급원으로부터 이용가능하다.
- [0165] 진핵생물 숙주 세포가 사용되는 경우에, 폴리아데닐화 또는 전사 종결인자 서열이 통상 벡터로 내포된다. 종결인자 서열의 예는 소 성장호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사물의 정확한 스플라이싱을 위한 서열이 또한 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40으로부터의 VP1 인트론이다(Sprague et al. 1983 J Virol 45 773-81). 또한, 숙주 세포에서 복제를 제어하는 유전자 서열이 당해 분야에 공지된 바와 같이, 벡터로 내포될 수 있다.
- [0166] 보여지는 바와 같이, 현 명세서는 서열의 번호를 기술하기 위하여 용어 "% 동일함"을 사용한다. 이해되는 바와 같이, 용어 "% 동일함"은 명시된 영역에 대해 두 서열의 비교시, 두 서열은 동일한 위치에서 동일한 잔기의 명시된 번호를 가짐을 의미한다. 동일성 수준은 디폴트 파라미터와 함께 CLUSTALW를 사용하여 결정할 수 있다.
- [0167] 서열이 컴퍼레이터 서열(comparator sequence)과 "적어도 95% 동일함"을 또한 알 수 있을 것이다. 특정 실시양태에서, 서열은 컴퍼레이터 서열과 적어도 96% 또는 적어도 97%나, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 것이 바람직하다.
- [0168] 본원에 사용된 바와 같이 하이브리드화 조건과 관련하여 용어 "적절히 엄격함"은 45℃ 내지 65℃ 범위의 온도에서 2 x SSC 완충액, 0.1%(w/v) SDS, 또는 동등한 조건에서 수행되는 하이브리드화 및/또는 세척을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 하이브리드화 조건과 관련하여 용어 "고도로 엄격함"은 0.1 x SSC 완충액, 0.1%(w/v) SDS, 또는 보다 낮은 염 농도 및 적어도 65℃의 온도, 또는 동등한 조건에서 수행되는 하이브리드화 및/또는 세척을 의미한다. 엄격함의 특별한 수준에 대한 본원의 참조문헌은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 SSC와 다른 세척/하이브리드화 용액을 사용하는 동등한 조건을 포함한다. 예를 들면, 이중사 핵산의 스트랜드가 해리될 온도(융점 또는 T<sub>m</sub>으로서 또한 공지됨)를 계산하는 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 핵산의 T<sub>m</sub>과 유사하거나(예: 5℃ 이내 또는 10℃ 이내) 동일한 온도가 고도로 엄격한 것으로 여겨진다. 중간 엄격함은 핵산의 계산된 T<sub>m</sub>의 10 내지 20℃ 또는 10 내지 15℃ 이내로 고려되어야 한다.
- [0169] 이 명세서를 통해, 단어 "포함하다" 또는 "포함하는"과 같은 변형이 언급된 요소, 정수 또는 단계나, 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 포함하나, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계나, 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 배제하는 것은 아님을 암시하는 것으로 이해하게 될 것이다.
- [0170] 이 명세서에 언급된 모든 출판물은 본원에 참조로 내포된다. 본 명세서에 포함된 문서, 작용, 물질, 장치, 기사 등의 임의 논의는 오로지 본 발명에 대한 내용을 제공할 목적이다. 이들 문제중 임의 것 또는 모두가 선행분야 기반의 부분을 형성하거나, 그것이 본 출원의 각 청구의 우선일 전에 오스트레일리아 또는 그 밖의 나라에

존재한 것과 같이 본 발명과 관련된 분야에서 통상의 일반적인 지식이었다는 승인으로서 간주되어서는 안된다.

[0171] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 내용이 달리 명확히 제시되지 않는 한, 복수 측면을 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 예를 들면, "a"에 대한 기준은 둘 이상뿐만 아니라, 하나를 포함하고; "an"에 대한 기준은 둘 이상뿐만 아니라, 하나를 포함하며; "the"에 대한 기준은 둘 이상 등뿐만 아니라, 하나를 포함한다.

[0172] 본 발명을 일반적으로 기술하였지만, 이는 하기의 실시예를 참조로 보다 쉽게 이해하게 될 것이고, 이는 예시로 제공된 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다.

## [0173] 발명의 실시예

### [0174] 일반적인 방법

#### [0175] HEK293/pTT5 발현 시스템

[0176] HEK293E/pTT5 발현 시스템을 포함하는 모든 형질감염의 경우, HEK293E 세포는 완전 세포 성장 배지 [50  $\mu$ L/100 mL 배양액으로 제네티신(50mg/mL, Invitrogen)과 함께 1L의 F17 배지 (Invitrogen), 9mL의 Pluronic F68 (Invitrogen), 20% (w/v) 트립톤 NI를 함유하는 2mM 글루타민 (Organotechnie)]에서 배양하였다. 형질감염 전 날에, 세포는 원심분리로 하베스트하였고, 제네티신 없는 새로운 배지에 재현탁시켰다. 다음날, DNA는 상용 형질감염 시약과 혼합하여, DNA 형질감염 혼합물을 배양액에 적가했다. 배양액을 제네티신 없이 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 120rpm에서 밤새 배양했다. 다음날, 12.5mL의 트립토포판 및 250  $\mu$ L의 제네티신을 500mL 배양액에 대해 가했다. 배양액은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 120rpm으로 7일 동안 배양한 다음, 상등액을 하베스트하여 정제했다.

#### [0177] CD1d/ $\beta$ 2M 단백질

[0178] 인간 CD1d/ $\beta$ 2M은  $\beta$ 2M을 암호화하는 DNA 발현 작제물(서열 번호 20)로 공-형질감염된, C-말단 위치한 HIS 태그가 있는 CD1d의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 발현 작제물(서열 번호 19)을 사용하여 포유동물 HEK293E/pTT5 발현 시스템에서 제조했다. 분비된 CD1d/ $\beta$ 2M 단백질을 함유하는 배양 상등액은 10분 동안 2000g에서 원심분리로 하베스트하여 세포를 제거했다. CD1d/ $\beta$ 2M 단백질 복합체는 HisTrap<sup>TM</sup> HP 칼럼 (GE Healthcare)을 사용하여 His8 친화성 태그를 통해 상등액으로부터 정제했다. 용출된 단백질은 HiLoad 16/60 Superdex 200 prep 등급 칼럼 (GE Healthcare)을 사용하여 PBS로 완충액-교환시키고, ~50 kDa 분획은 HiLoad 26/60 Superdex 200 prep 등급 칼럼 (GE Healthcare) 상에서 겔 투과에 의해 분리했다. 인간  $\beta$ 2M을 단독으로 제조하고, 유사한 방법으로 정제했다. 유사한 정제 방법이 다른 종 CD1d(예: 쥐과동물 CD1d) 및 CD1d의 합성 작제물(예: hCD1dmu 및 mCD1dmu)의 정제를 위해 채택되었다.

[0179] 사이노물구스 원숭이 Cd1d의 서열을 결정하기 위하여, 원숭이 비장으로부터의 cDNA는 바이오체인(Biochain)으로부터 입수했다. 하기 프라이머가 레서스(rhesus) CD1d mRNA를 기반으로 하는 CD1d DNA를 증폭시키기 위하여 사용되었다(PubMed 수탁번호: NM\_001033114):

[0180] F1 - GTGCCTGCTGTTTCTGCTG (서열 번호 120)

[0181] R1 - TGCCCTGATAGGAAGTTTGC (서열 번호 121)

[0182] 1kb DNA 생성물을 증폭하는 PCR을 셋업했다. 이 DNA는 pGEM-T Easy (Promega)로 결찰시켰고, M13 포워드 및 리버스 프라이머를 사용하여 서열화했다. 서열은 레서스 CD1d (UniProt 수탁번호: Q4AD67)의 것과 함께 정렬했고, 동일한 것으로 밝혀졌다. 그 다음에, 유전자 서열을 합성하고, C-말단 HIS 태그를 가하여, pTT5 벡터로 서브클론화시키며, HEK-293E/pTT5 시스템을 사용하여 발현시켰다. 단백질은 도입된 HIS 태그를 통한 Ni 크로마토그래피를 사용하여 정제했다.

[0183] 파지 디스플레이 실험의 경우, 재조합 인간 CD1d/ $\beta$ 2M은 3:1 비의 비오틴:CD1d/ $\beta$ 2M에서 EZ-링크 설포-NHS-LC-비오틴 키트 (Pierce)를 사용하여 비오틴화시켰다. 유리 비오틴은 3.5kDa 분자량 컷-오프를 갖는 슬라이드-A-레이저 투석 카세트를 사용하여 PBS에 대한 투석에 의해 단백질 제제로부터 제거했다. 캠페인 2의 경우, 비오틴화 재조합 사이노물구스 CD1d/ $\beta$ 2M도 또한 상기 기술한 바와 같이 제조하였다.

#### [0184] 항체를 발현하는 벡터의 작제

[0185] VH 아미노산 쇄는 인간 불변 영역(인간 IgG4 중쇄 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 도메인 (예: S228P에서 치환된 NCBI 수탁번호 P01861))을 사용하여 발현시켰다. 이는 DNA 서열로 아미노산 서열의 역-번역에 이어서, 합성 올리고뉴

클레오티드의 드 노보(*de novo*) 합성 및 어셈블리에 의해 성취했다. 유전자 합성에 이어서, 전체 서열은 pTT5 중쇄 백터의 다중 클로닝 부위로 서브클론화시켰다 (Durocher, Y. et al., 2002, Nucleic Acids Res, 30, E9). VL 아미노산 쇠는 pTT5 경쇄 백터의 다중 클로닝 부위로 서열을 서브클로닝시켜 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역 (예: NCBI 수탁번호 AAI10395 및 C6KXN3)을 사용하여 발현시켰다.

[0186] 항체의 발현 및 정제

[0187] 중쇄 및 경쇄 DNA 백터는 HEK293/pTT5 발현 시스템으로 공-형질감염시키고, 7일 동안 배양시켰다. 이들 형질감염으로부터 유래된 상등액은 HiTrap 단백질 A 칼럼 (5mL, GE Healthcare)으로 부하하기 전에 pH 7.4로 조절했다. 칼럼은 50 mL 1X PBS (pH 7.4)로 세척했다. 용출은 0.1M 시트르산 pH 2.5를 사용하여 수행했다. 용출된 항체는 제바 디솔팅 칼럼(Zeba Desalting columns) (Pierce)을 사용하여 1X PBS(pH 7.4)로 탈염시켰다. 항체는 SDS-PAGE를 사용하여 분석했다. 항체의 농도는 BCA 검정 키트 (Pierce)를 사용하여 결정했다.

[0188] 실시예 1 - 항-CD1d 항체의 생성

[0189] 파지 디스플레이

[0190] 인간 및 사이노몰구스 CD1d/β2M이 모두 결합된 FAb는 천연 파지미드 라이브러리로부터 단리시켰다.

[0191] 항-CD1d/β2M FAb는 2개의 패닝 '캠페인'(panning campaign) (즉, 상이한 시약 또는 패닝 조건을 사용하는 별개의 파지 디스플레이 실험) 과정에 걸쳐 파지 디스플레이 라이브러리로부터 분리했다. 일반적인 방법은 막스 등이 제시한 방법을 따랐다 (Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, Methods Mol Biol, 248, 161-76).

[0192] 각각의 파지 디스플레이 캠페인은 3개의 패닝 라운드를 포함했다. 각 라운드의 경우,  $\sim 1 \times 10^{13}$  파지 입자는 차단 완충액(포스페이트 완충 염수 중 5% 스킵 밀크, pH 7.4)과 1:1 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 배양하여 차단시켰다. 그 다음에, 차단된 파지 라이브러리는 라이브러리에 대해 기술한 바와 같이 차단된, 100 μL 스트렙타비딘-결합 다이아비이드(Dynabead) (Invitrogen)를 사용하여 45분 동안 배양시킴으로써 스트렙타비딘 결합체를 위해 미리-고갈시켰다. 비이드 (및 그들에 결합된 스트렙타비딘 결합체)는 배양 단계 후 폐기했다.

[0193] 재조합 CD1d/β2M 항원은 스트렙타비딘-결합 다이아비이드 (Invitrogen)의 표면 위로 포획함으로써 패닝을 위해 준비했다. 이를 성취하기 위하여, 10-100pmol의 비오틴화 CD1d/β2M은 실온에서 45분 동안 100 μL 비이드와 함께 배양시켰다. 생성된 CD1d/β2M-비이드 복합체는 PBS로 세척하여 유리 CD1d/β2M을 제거한 다음, 후속 패닝 반응에 사용했다.

[0194] 라이브러리 패닝은 1.5mL 마이크로원심분리기 튜브에서 CD1d/β2M-비이드 복합체와 차단되고 미리-고갈된 라이브러리를 혼합하고, 실온에서 2시간 동안 회전시켜 수행했다. 비-특이적으로 결합된 파지는 일련의 세척을 사용하여 제거했다. 각각의 세척은 자기 랙(magnetic rack)을 사용하여 용액으로부터 비이드를 튜브 벽 위로 당기고, 상등액을 탈기시킨 다음, 새로운 세척 완충액에 재현탁시킴을 포함했다. 이는 PBS 세척 완충액 (0.5% 스킵 밀크와 함께 PBS) 또는 PBS-T 세척 완충액 (0.05% TWEEN-20 (Sigma) 및 0.5% 스킵 밀크와 함께 PBS)을 사용하여 여러번 반복했다. 세척 공정후 결합되어 잔류하는 파지는 실온에서 20분 동안 0.5mL의 100 mM 트리에틸 아민(TEA)(Merck)과 함께 배양시켜 CD1d/β2M-비이드 복합체로부터 용출시켰다. 용출된 '아웃풋(output)' 파지는 0.25mL 1M Tris-HCl pH 7.4 (Sigma)을 가하여 중화시켰다.

[0195] 패닝의 제1 및 제2 라운드의 마지막에, 아웃풋 파지는 기하급수적으로 성장하는 TG1 이. 콜라이(*E. coli*)(효모-트립톤(YT) 성장 배지)의 10mL 배양액에 가하고, 진탕없이 37°C에서 30분 동안, 이어서 30분 동안 250rpm으로 진탕하에 배양시켜 세포를 감염시켰다. 그 다음에, 파지 디스플레이 아웃풋을 암호화하는 파지미드는 표준 방법에 따라 파지 입자로서 구조(rescued)했다 (Marks, J.D. & Bradbury, A., 2004, Methods Mol Biol, 248, 161-76). 제3 패닝 라운드의 마지막에, TG1 세포는 아웃풋 파지로 감염시켰지만, 세포는 별도의 이. 콜라이 콜로니를 생성하기에 충분한 희석으로 고체 YT 성장 배지(2% 글루코즈 및 100mg/mL 카르베니실린으로 보충된) 위로 플레이트팅시켰다. 이들 콜로니는 스크리닝 실험에 사용하기 위한 FAb 단편의 발현을 허용하기 위하여 1mL 액체 배양액을 접종시키기 위하여 사용되었다.

[0196] CD1d 결합을 위한 FAbs의 ELISA-기본 스크리닝

[0197] 각각 개별 이. 콜라이 콜로니는 CD1d/β2M 결합 활성을 위해 스크리닝된 FAb를 발현하기 위하여 사용되었다. 콜로니는 96-웰 딥웰(well deepwell) 플레이트 (Costar)에 1mL YT 스타터 배양액(100mg/mL 카르베니실린 및 2% 글루코즈로 보충된)으로 접종시키고, 650rpm에서 진탕하에 30°C에서 밤새 배양했다. 이들 스타터 배양액은 1mL



발현 배양액(100mg/mL 카르베니실린 만이 보충된 YT)으로 1:50 희석시키고, 600nm에서 0.8-1.0의 광학 밀도로 성장시켰다. FAb 발현은 이소프로필-베타-D-티오갈락토피라노시드를 1mM의 최종 농도로 가함으로써 유도하였다. 배양액은 16시간 동안 20℃에서 배양했다.

[0198] FAb 샘플은 원심분리(2500g, 10분)에 의해 세포를 하베스트하고, 주변세포질 추출을 수행하여 제조하였다. 세포 펠렛은 75  $\mu$ L 추출 완충액(30mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 20% 수크로스)에 재현탁시키고, 4℃에서 10분 동안 1000rpm으로 진탕시켰다. 추출 제제는 225  $\mu$ L H<sub>2</sub>O를 가하고, 1000rpm에서 1시간 동안 진탕시키며, 10분 동안 2500g로 원심분리시켜 추출물을 청소함으로써 완성하였다. 상등액을 회수하고, Acroprep 100kDa 분자량 컷오프 플레이트 (Pall Corporation)를 통해 여과하여, 추가 실험이 필요할 때 까지 4℃에서 저장하였다.

[0199] ELISA에 의한 파지 디스플레이에 의해 수득된 잠재적인 인간 CD1d-결합체를 스크리닝하기 위하여, 인간 CD1d/ $\beta$  2M (HEK 293E 세포에서 생성되고, 상기 기술한 바와 같이 비오틴화됨)은 1 $\mu$ g/mL로 스트렙타비딘-코팅된 ELISA 플레이트 (Pierce) 상에 포획했다. 그 다음에, 플레이트를 세척했고, 별도의 FAb 샘플(상기 기술한 바와 같이 제조된)은 ELISA 플레이트 상에 개별 웰로 가했다. FAb는 실온에서 2시간 동안 포획된 CD1d/ $\beta$  2M을 결합하도록 허용한 다음, PBS-T로 3회 및 PBS로 3회 세척했다. 결합된 FAb는 FAb 중쇄의 C-말단에 융합된 V5 친화성 태그에 대해 지시된 HRP-접합된 항체 (Sigma)를 사용하여 검출했다. 검출 항체는 실온에서 1.5시간 동안 배양했다. 플레이트는 비결합 항체를 제거하기 위하여 세척했고, 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(KPL)과 함께 배양시켜 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl을 사용하여 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (Bio-Tek)를 사용하여 A450nm에서 판독했다. 결과는 A450nm 원값(raw value)으로서 나타냈고, 여기서 평균 검정 백그라운드보다 2배 더 큰 임의의 시그널을 "포지티브"로서 정의했다.

[0200] 이후 검정에서, 비-비오틴화 인간 CD1d/ $\beta$  2M, 사이노몰구스 CD1d/ $\beta$  2M 또는  $\beta$  2M만으로 코팅된 Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 FAb 샘플의 결합을 시험하기 위하여 제조했다. 세척 및 검출 단계는 상기 기술한 바와 같았다.

[0201] *CD1d/ $\beta$  2M 결합을 위한 FAbs의 SPR-기반 스크리닝*

[0202] SPR 스크리닝은 단일 농도 분석물 패스 검정에서 BIAcore 4000 Biosensor (GE Healthcare)를 사용하여 수행하였다. 대략 10,000 RU의 항V5 항체 (Invitrogen cat#R960CUS)는 스팟(spot) 3은 비개질된 채로 남은 4개 유동 셀 각각의 스팟 1, 2, 4 & 5에 대해 pH 5.5에서 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 CM5 시리즈 S 센서 칩 위에 고정시켰다. 사용된 수행용 완충액은 HBS-EP+ (GE Healthcare)였고, 모든 상호작용은 25℃에서 측정했으며, 데이터 수집 속도는 10Hz로 조정했다. V5-태그된 FAb의 조질의 주변세포질 제제는 각각의 유동 셀의 스팟 1 또는 5 위에 100초 동안(통상 대략 200RU의 FAb가 포획됐다) 100  $\mu$ L/min의 유량으로 포획하기 전에 수행용 완충액 중 2배로 희석했다. 짧은 안정화 기간에 이어서, 인간 또는 사이노몰구스 CD1d/ $\beta$  2M은 100초 동안 30  $\mu$ L/min의 유량으로 동시에 4개 유동 셀 모두의 모든 스팟 위로 통과시켰다. 상호작용의 해리는 100mM 인산의 30초 펄스를 사용하여 항-V5 항체로 다시 재생되기 전에 100초 동안 측정했다. 생성된 센서그램은 각각의 유동 셀에 대한 인접한 항-V5 항체에 대해 참조했고,  $k_a$ ,  $k_d$  및 KD를 결정하기 위하여 1:1 랑뮈에 식(Langmuir equation)을 사용하여 피팅했다.

[0203] *파지 디스플레이 캠페인의 결과*

[0204] 4400개 클론에 대해 SPR 검정에 의해 인간 및 사이노몰구스 CD1d/ $\beta$  2M에 대한 결합에 대해 스크리닝했다. 총 51개 FAb가 인간 및 사이노몰구스 CD1d에 대해 높은 선택성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0205] **실시예 2 - CD1d에 대한 IgG 결합의 확인**

[0206] 인간-사이노몰구스 CD1d 반응성 FAb는 일반적인 방법에 기술된 바와 같이 IgG4 포맷으로 전환시키고, 발현 및 정제시켰다. 정제된 항체는 실시예 1에 기술된 검정의 변형된 버전을 사용하여 ELISA 및 SPR에 의해 인간 및 사이노몰구스 CD1d에 대한 결합에 대해 시험했다. 간단히, ELISA 검정의 경우, Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 1mg/mL의 적절한 항원으로 코팅시켰다. 그 다음에, 플레이트를 세척하고, 정제된 IgG 샘플을 ELISA 플레이트 상에 개별 웰로 가했다. IgG는 실온에서 1시간 동안 포획된 CD1d/ $\beta$  2M을 결합하도록 허용한 다음, PBS-T로 3회 및 PBS로 3회 세척했다. 결합된 IgG는 인간 Fc에 대해 지시된 HRP-접합된 항체 (Sigma)를 사용하여 검출했다. 검출 항체는 실온에서 130분 동안 배양했다. 플레이트는 비결합 항체를 제거하기 위하여 세척했고, 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(KPL)과 함께 배양시켜 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl을 사용하여 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (Bio-Tek)를 사용하여 A450nm에서 판독했다. 결과는 A450nm 원값으로서 나타냈

고, 여기서 평균 검정 백그라운드보다 2-배 더 큰 임의의 시그널을 "포지티브"로서 정의했다.

[0207]

정제된 항체는 또한 Biacore T100 biosensor (GE Healthcare)를 사용하여 전체 운동학적 특성 분석에 적용시켰다. 대략 10,000 RU의 항-인간 IgG (Invitrogen cat#H10500)는 Biacore T100 Biosensor의 유동 셀(FC) 1 및 FC2 (또는 달리 FC3 및 FC4)에서 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 CM5 시리즈 S 센서 칩 위에 고정시켰다. 사용된 수행용 완충액은 HBS-EP+ (GE Healthcare)였고, 상호작용은 25℃에서 측정했다. 최대 정제된 IgG는 수행용 완충액 중 10nM로 희석했고, 50-80 RU의 IgG를 포획하기 위하여 10 µL/min의 유량으로 FC2 (또는 달리 FC4) 위에 포획했다. 적절한 안정화 기간 후, 표적인 인간 또는 사이노몰구스 CD1d/β2M은 33.3 내지 0.4nM 범위의 농도에서(CD1d/β2M의 3배 희석을 사용함) 60 µL/min의 유량으로 FC1 및 FC2 (또는 달리 FC3 및 FC4) 위로 통과시켰다. 해리를 위한 접촉 시간은 120초였고, 해리는 최고 농도에 대해 20분 및 시리즈로 모든 다른 농도에 대해 240초 동안 측정했다. FC2로부터의 센서그램을 FC1 및 완충액만의 대조군으로부터 뺐다. 커브는  $k_a$ ,  $k_d$  및  $K_D$  값을 생성하기 위하여 1:1 랑위에 식을 사용하여 피팅했다(표 1).

표 1

파지 디스플레이 항체에 대한 ELISA 및 SPR 결과

| IgG    | ELISA<br>hCD1d | ELISA<br>cCD1d | SPR 인간 CD1d  |             |           |
|--------|----------------|----------------|--------------|-------------|-----------|
|        |                |                | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (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  |

[0208]

### 실시예 3 - 세포-기반 CD1d 사합체 억제 효능 검정법

[0209]

#### 안정한 NKTCR-발현 세포주의 생성

[0210]

항-CD1d 항체의 생물학적 효능을 특성 분석하기 위한 세포-기반 검정을 개발하기 위하여, NKT 세포 수용체 (NKTCR)를 발현하는 안정한 세포주가 필요했다. 세포주 J.RT3-T3.5 (ATCC: TIB-153)가 안정한 NKT 세포 수용체-발현 세포주의 생성을 위해 선택되었다. J.RT3-T3.5는 T 세포 항원 수용체의 β쇄가 결합된 Jurkat의 E6-1 클론 (ATCC: TIB 152)으로부터 유래된다. 세포는 표면 위에 CD3 또는 T 세포 수용체 αβ 이중 이합체를 발현하지 못한다. J.RT3-T3.5 세포는 하나는 J3N.5 NKTCR의 α쇄를 함유하는 것(서열 번호 21)이고, 다른 것은 J3N.5 NKTCR의 β쇄를 함유하는 것(서열 번호 22)인, 두 벡터와 함께 공-일렉트로포레이트시켰다 (Brigl, M., et al., 2006 J Immunol 176: 3625-34.). 이 NKT 세포 수용체는 당지질 항원 α-GalCer에 대해 반응성이다. NKTCR의 α 및 β쇄를 암호화하는 이들 벡터는 또한 제네티신 및 블라스티시딘에 대한 내성 유전자를 각각 발현한다. 이들 벡터의 안정한 내포는 소정 농도의 제네티신 및 블라스티시딘을 함유하는 배양 배지에서 이들 세포의 증식에 의

[0211]

해 성취하였다.

[0212] 클론 세포주를 유도하기 위하여, 형질감염된 J.RT3-T3.5 세포는 제네티신 및 블라스티시딘 선택하에 RPMI 1640 (Gibco)에서 대수기(log phase)로 성장시켰고, 96-웰 평저 플레이트 (Corning)에서 웰당 평균 1개 세포로 제한되게 희석했다. 형질감염된 NKTCR의 안정한 발현을 결정하기 위하여, 생존 가능한 클론은 24-웰 플레이트에서 보다 큰 용적으로 서브클론화했고, 다중-파라미터 유세포 분석에 의해 스크리닝했다. 클론은 CD1d 사합체 (ProImmune)에 대한 결합, Va24J  $\alpha$  18의 발현, 인간 iNKTCR의 접합영역 및 TCR을 위한 공-수용체인, CD3의 발현에 대해 스크리닝했다. 이들 마커의 높은 발현을 갖는 클론은 각각의 마커의 높은 평균 형광강도(MFI)에 의해 선택되었다. 안정성은 T25 플라스크로 다중 통과 후 클론의 유세포 분석에 의해 확인되었고, 동결 배지 (90% 열-비활성화 태소 혈청 및 10% DMSO)에서 -180℃에서 주정되는 클론을 줄지어 늘어놓은(banking down) 후 회복된다. 안정한 클론은 항-CD1d 항체의 기능적 효능을 특성 분석하기 위하여 세포-기반 검정법으로 확인하고 사용되었다.

[0213] *CD1d 사합체 억제 효능 검정법*

[0214] 항-CD1d 항체의 효능을 특성 분석하기 위한 세포-기반 검정법은 유세포 분석-기반 CD1d 사합체 억제 검정법에 상기 기술한 클론 NKT 세포주를 사용했다. 이 검정은 J.RT3-T3.5 세포로 안정하게 형질감염된 NKTCR을 결합하는  $\alpha$ -GalCer가 부하된 CD1d-사합체의 능력에 따라 좌우되었다. 항-CD1d 항체의 효능은 안정하게 형질감염된 J.RT3-T3.5 세포주에 존재하는 NKTCR에 대한 CD1d 사합체 결합을 억제하는 항체의 능력에 의해 결정되었다. 억제 항체는 J.RT3-T3.5 세포 상에서 CD1d 사합체와 안정하게 형질감염된 NKTCR의 상호작용을 방지하는 사합체 내에서 CD1d 분자 상에 특정 에피토프에 결합된다. 검정의 관독은 형광물질-접합된 CD1d 사합체의 평균 형광강도(MFI)의 감소였다. 대략 EC50 값은 CD1d 사합체 농도를 일정하게 유지하면서 항-CD1d 항체의 적정에 의해 생성되었다. 검정의 재생성 및 신뢰도를 보장하기 위하여, 상이한 CD1d 사합체 농도에서 최적화 실험은 최상 역학적 범위를 결정하기 위하여 수행하였다. CD1d 사합체의 최적 농도는 대략 10nM에 상응하게, 1:1000 희석으로 결정되었다.

[0215] 검정을 수행하기 위하여, 항체는 pH 7.4의 냉 1X PBS 중 0.1% 소혈청 알부민(BSA)에 10 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 제조하였다. 이들 항체는 최대 40분 동안 10nM의 최종 농도에서 항-CD1d 사합체와 1:1 비로 어둡게 실온에서 함께 배양했다. 이 CD1d-사합체/항-CD1d 항체 혼합물은 96-웰 평저 플레이트에서 웰당 1 x 10<sup>5</sup> 세포로 플레이트팅된 J.RT3-T3.5 세포의 NKTCR-안정한 형질감염체를 염색하기 위하여 사용되었다. 세척 단계는 1X PBS 중 0.1% BSA로 수행했다. 데이터는 유세포 분석에 의해 수득했고, 유세포 분석 소프트웨어 (FlowJo)를 사용하여 분석했다.

[0216] 항-CD1d 항체 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 및 402.18이 이 검정에서 시험되었다. 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체 (인간 IgG1)가 네가티브 대조군으로서 선택되었다. 항-CD1d 항체 42 (BD Biosciences) 및 51.1 (eBioscience)가 포지티브 대조군으로서 선택되었다. 이들 항체 중, 단지 401.11, 401.28, 402.1, 402.6, 402.7, 402.8, 402.16 및 402.18만이 이 검정에서 항체 42와 유사하거나 우수한 효능을 입증하였다(표 2). 비교로, 네가티브 대조군 항체는 세포주에 대한 사합체 결합의 무시할만한 억제를 입증했다. 다중 실험으로부터의 대표적인 데이터가 도 1에 제시되어 있다. 이 결과는 CD1d에 대한 항체의 직접 결합을 측정하는 검정에 의해 예상할 수 없었다. 이는 CD1d- NKT 상호작용을 기능적으로 억제할 수 있는 항체를 위해 선택하고 스크리닝할 필요성을 입증한다.

표 2

사합체 억제 검정에 대한 EC50 값

| 항체 이름    | 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   | 무시할만한 억제     |
| 402.18   | 88.2         |
| 42       | 1435.0       |
| 51.1     | 775.4        |
| 네가티브 대조군 | 무시할만한 억제     |

[0217]

[0218] 실시예 4 - NKT 세포주 IL-2 방출 검정법

[0219] 항-CD1d 항체는 세포주 기반 기능적 효능 검정법을 사용하여 추가로 특성 분석하였다. U-937 세포주(ATCC: CRL 1593.2)는 CD1d-포지티브인 골수단구성 세포주이다. αGalCer가 부하된 U-937 세포는 실시예 3에 기술된 안정한 NKTCR 세포주에 의해 IL-2의 생성을 유도할 수 있다. 억제성 항-CD1d 항체는 이들 αGalCer-부하 U-937 세포에 대한 반응으로 NKTCR 세포주에 의한 IL-2의 방출을 감소시킨다. IL-2 수준은 표준 ELISA 기술 (R&D Systems)에 의해 측정했다.

[0220] 검정을 수행하기 위하여, 대략  $1.5 \times 10^5$  U-937 세포는 RPMI 1640 (Gibco)에서 96-웰 평저 플레이트에 100ng/mL의 최종 농도로 αGalCer와 함께 부하했다. αGalCer를 부가한 후 60분에, 항-CD1d 항체를 세포에 10μg/mL로부터 출발하여 감소되는 농도로 세포에 가했다. 항체 부하한 지 60분 후,  $1.5 \times 10^5$ 개의 안정한 NKTCR-형질감염된 J.RT3-T3.5 세포를 각각의 웰에 가했다. NKTCR-형질감염된 J.RT3-T3.5 세포를 부가한 지 24시간 후, IL-2 수준은 세포-유리 배양 상등액을 사용하여 ELISA (R&D Systems)에 의해 시험했다.

[0221] 항-CD1d 항체 401.1, 401.9, 401.11, 401.12, 401.14, 401.28, 402.1, 402.6, 402.7, 402.8, 402.16 및 402.18이 이 검정에서 시험되었다. 항-CD1d 항체 42 및 51.1이 포지티브 대조군으로서 선택되었다. 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체 (인간 IgG1)가 네가티브 대조군으로서 선택되었다. 이들 항체 중, 단지 401.11, 402.1, 402.6, 402.7, 402.8 및 402.16만이 EC50 값에 의해 결정된 바와 같이, 항체 42에 비하여 IL-2 방출의 동등하거나 더 강한 억제를 입증하였다(표 3 및 도 2에 대표적인 데이터). 또한, 401.11 및 402.8은 항체 51.1에 비하여 IL-2 방출의 우수한 억제를 입증하였다(도 2). 비교로, 네가티브 대조군 항체는 IL-2 방출의 무시할만한 억제를 입증했다. 놀랍게도, 401.11은 항체 42보다 대략 20배 더 효능있고, 51.1보다 대략 15배 더 효능있었다. 유사하게, 402.8은 항체 42보다 대략 25배 더 효능있고, 51.1보다 대략 17배 더 효능있었다(도 2). 함께, 이들 데이터는 당해 분야에 기술된 것에 비하여 유의하게 개선된 생물학적 효능을 갖는 신규한 완전 인간 항-CD1d 항체를 밝힌 것이다.



표 3

EC50 값 - NKT 세포주 IL-2 검정

| 항체 이름      | EC50 (ng/mL) |
|------------|--------------|
| 401.1      | 무시할만한 억제     |
| 401.9      | 286.0        |
| 401.11     | 5.3          |
| 401.12     | 576.3        |
| 401.14     | 무시할만한 억제     |
| 401.28     | 112.4        |
| 401.30     | 무시할만한 억제     |
| 402.8      | 4.5          |
| 42         | 110.7        |
| 51.1       | 77.3         |
| (네가티브 대조군) | 무시할만한 억제     |

[0222]

[0223]

실시예 5 - 원발성 PBMC에 대한 항-CD1d 항체의 결합 시험

[0224]

항-CD1d 항체는 원발성 인간 체세포 상에 나타난 바와 같은 CD1d에 결합하는 능력에 대해 특성 분석하였다. 항-CD1d 항체 402.8, 401.11.158 및 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체는 제조업자의 지시에 따라 2mg/mL의 농도로 조절하고, 형광물질 Pacific Blue에 접합시켰다 (Invitrogen).

[0225]

CD1d는 혈액에 존재하는 특정 인간 세포 집단에서 발현한다고 알려져 있으므로, 말초 혈액 단핵세포(PBMC)는 원발성 CD1d+ 세포에 대한 항-CD1d 항체 402.8의 결합을 확인하기 위해 사용되었다. PBMC는 표준 프로토콜에 따라 림포프랩 구배(lymphoprep gradient) (Nycomed)에 대한 밀도 원심분리에 의해 버피 코트(buffy coat)로부터 분리시켰다. 그 다음에, 세포는 1X PBS로 수회 세척하여, 항-CD1d 항체 402.8(10mg/mL) 또는 네가티브 대조군 인간 IgG1(10mg/mL)로 염색했고, 항-인간 CD11c (Biolegend)로 함께 염색했다. 항-CD1d 항체 402.8은 CD11c-포지티브였던 독특한 CD1d-포지티브 집단에 결합했다 (도 3). 대조적으로, 네가티브 대조군 항체는 무시할만한 결합을 입증하였다 (도 3). 항-CD1d 항체 401.11.158(10 $\mu$ g/mL)도 또한 이 CD1d-포지티브 집단에 결합했다(제시되지 않음). 이들 데이터는 402.8 및 401.11로부터 유래된 항-CD1d 항체가 원발성 인간 세포의 CD1d+ 집단에 결합했음을 확실히 나타낸다.

[0226]

실시예 6 - 원발성 NKT 세포-기반 검정에서 항-CD1d 항체의 효능 시험

[0227]

인간 NKT 세포는 CD1d에 관해 존재하는 지질 또는 당지질 항원에 대한 반응으로 신속한 이펙터 기능을 나타낼 수 있다. 이러한 신속한 이펙터 기능은 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, 및 IL-13과 같은 사이토킨의 방출에 의해 입증될 수 있다. 억제성 항-CD1d 항체는 세포 상에 존재하는 CD1d에 결합하여, NKT 세포와 그들의 CD1d 및 당지질의 동족 복합체 사이에 상호작용을 방지함으로써 이들 NKT 세포의 기능을 억제할 수 있다. 세포에 존재하는 적절한 항원은 불멸화 골수 세포주 또는 원발성 인간 수지상 세포를 포함할 수 있다. 인간 도너의 말초 혈액 내에 NKT 세포의 회귀성이 제공되지만, 성공적인 검정법은 처음 경우에 상기 원발성 NKT 세포의 분리 및 확장을 필요로 한다.

[0228]

NKT 세포의 분리 및 확장

[0229]

PBMC는 림포프랩 (Nycomed) 구배에 대해 버피 코트로부터 분리시켰다. 그 다음에, NKT 세포는 표준 자기-관련 세포 분류(MACS) 방법에 의해 강화시켰다 (Exley et al., 2010 Curr Protoc Immunol, Chapter 14, Unit 14:11). 간단히, NKT 세포는 Va24-Ja18 iNKT 마커에 대한 MACS 마이크로비이드와 함께 배양했다 (Miltenyi Biotec). 과량의 마이크로비이드는 세포 현탁액을 냉 PBS로 2회 세척하여 제거하였다. 그 다음에, 세포 현탁액은 MACS 칼럼을 통해 통과시켰고, 풍부한 NKT 세포를 함유하는 포지티브 분획은 유지하였다. 네가티브 분획으로부터의 세포는 CD1d-포지티브 세포(예: 단핵세포 및 수지상 세포)를 함유할 수 있고, 풍부한 NKT 세포

를 자극하는 피더(feeder)로서 사용될 수 있다. 피더 세포는 먼저 37℃에서 30분 동안 유사분열 억제제인, 미토마이신 C로 처리한다. 그 다음에, 이들 세포는 조직 배양 배지로 수회 세척한 다음, 100ng/mL의 최종 농도로  $\alpha$ -GalCer와 함께 부하하여, 96-웰 평저 플레이트에서 웰당  $1 \times 10^4$  개 NKT 세포와 1:1 비로 함께 배양했다. 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양한 지 16시간 후, IL-2를 10ng/mL의 최종 농도로 배지에 가했다. 세포는 대략 14일 동안 배양시키기 위하여 방치해 두었다. NKT 세포 집단의 순도는 형광물질-접합 CD1d 사합체 (ProImmune), 형광물질-접합 항-V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (Miltenyi Biotec) 및 형광물질-접합 항-CD3 (BD Biosciences)을 사용하여, 다중-파라미터 유세포 분석에 의해 결정했다. 세포-기반 검정에 사용하기에 적합한 NKT 집단의 순도는 통상 유세포 분석에 의해 70% 초과 NKT 세포였다.

[0230] *검정 방법*

[0231] 모든 원발성 세포-기반 검정은 달리 언급되지 않는 한, 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 수행했다. THP-1 세포는 웰당  $2 \times 10^4$  개 세포의 농도로 96-웰 평저 플레이트로 분배되었다. 10분 후,  $\alpha$ -GalCer를 100ng/mL의 최종 농도로 세포에 부하했다.  $\alpha$ -GalCer를 부가한 지 45분 후에, 항-CD1d 억제성 항체를 10  $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 가했다. 항체를 부가한 지 30분 후에, 이어서 NKT 세포를 웰당  $2 \times 10^4$  개 세포로 가했다. 세포-유리 배양 상등액을 배양한 지 24시간 후 수집했다. 인간 사이토킨에 대한 ELISA를 배양 상등액에 대해 수행했다: 인간 IFN- $\gamma$  IL-4, IL-5 및 IL-13 (모두 R&D Systems).

[0232] *원발성 NKT 세포를 사용한 기능적 검정 결과*

[0233] 항-CD1d 항체 401.1, 401.9, 401.11, 401.12, 401.14, 및 402.8를 이 검정에서 시험했다. 무관련 특이성 네가티브 대조군 항체(인간 IgG1)가 네가티브 대조군으로서 사용되었다. 항체 42 및 51.1이 포지티브 대조군으로서 사용되었다. 실시예 4에 기술된 IL-2 세포주 검정의 결과와 유사하게, 단지 항체 401.11 및 402.8만이 세포성 CD1d와 관련하여 원발성 인간 NKT 세포에 의한 당지질-항원 유도 사이토킨의 강한 억제를 나타냈다 (도 4 및 표 4; 참조 IFN- $\gamma$  검정 EC50 값). 비교로, 네가티브 대조군 항체는 무시할만한 억제를 입증했다. 항체 42는 고용량(10  $\mu$ g/mL)에서 NKT 세포에 의한 사이토킨 방출의 억제를 나타냈지만, 이 효과는 저농도에서는 유지되지 않았다 (도 4). 항체 42는 시험관내 NKT 세포 활성의 강한 중화제인 것으로 여겨지고, 그 자체로 광범위하게 공개되어 있다 (Exley, M. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:109-120; WO 03/092615). 항체 42에 비하여, 항체 401.11 및 402.8은 114배 이하 및 180배 이하의 개선된 효능을 각각 입증했다.

[0234] 비-불멸화 인간 세포에 존재하는 CD1d에 대한 항체 401.11 및 402.8의 억제성 효능을 정립하기 위하여, 기능적 검정이 원발성 인간 단핵세포-유래 수지상 세포를 사용하여 개발되었다. 검정의 역학적 범위는 CD1d 항원을 발현하는 세포의 비율을 확대시킴으로써, CD1d-반응성 NKT 세포에 대한 항원 제시 수준을 증가시켜 증가시킬 수 있다. 단핵세포는 CD14+ 세포의 자기 활성화 세포 분류(MACS) 분리 및 표준 프로토콜에 따라 GM-CSF 및 IL-4 중 이들 세포의 배양에 의해 PBMC로부터 단리시켰다. 수지상 세포는 웰당  $2 \times 10^4$  개 세포로 96-웰 평저 플레이트에서 배양시켰고, 1시간 동안 100ng/mL에서  $\alpha$ -GalCer로 부하했다. 억제성 항체는 수지상 세포와 1:1 비로 확장된 NKT 세포의 부가 전에, 1시간 동안 배양액에 가했다. 24시간 후, 세포-유리 상등액은 IFN- $\gamma$  IL-4, IL-5 및 IL-13 방출에 대해 검정했다. 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8을 이 검정에서 시험했고; 무관련 특이성 인간 IgG1은 네가티브 대조군으로서 사용되었으며, 항체 42 (BD Biosciences) 및 51.1 (eBioscience)은 포지티브 대조군으로서 사용되었다. 단지 항체 401.11 및 402.8만이 이러한 원발성 세포-기반 검정에서 원발성 인간 NKT 세포에 의한 당지질-항원 유도 사이토킨의 강한 억제를 입증했다 (도 5 및 표 5). 비교로, 네가티브 대조군 항체는 무시할만한 억제를 입증했다. 항-CD1d 항체 42 및 51.1은 고용량(10  $\mu$ g/mL)에서 NKT 세포에 의한 사이토킨 방출의 일부 억제를 나타냈지만, 이 효과는 저농도에서는 유지되지 않았다. 항체 42에 비하여, 항체 401.11 및 402.8은 200배 이하 및 50배 이하의 개선된 효능을 각각 입증했다 (도 5 및 표 5; 참조 IFN- $\gamma$  검정 EC50 값). 항체 51.1에 비하여, 항체 401.11 및 402.8은 유의적으로 개선된 효능을 입증했다. 따라서, 이 결과는 항-CD1d 항체가 CD1d 항원을 자연적으로 발현하는 인간 체세포와 관련하여 효능있는 중화 활성을 나타냄을 입증하고 있다.

[0235] 요약하면, 완전 인간 항-CD1d 항체 402.8 및 401.11은 NKT 세포 활성의 상당히 효능있는 억제를 확인하고 입증하였다. 이들 항체는 항-CD1d 항체 42 및 51.1와 비교하는 경우에 100배 개선된 효능을 나타냈다.

표 4

EC50 값 - THP-1 세포주를 사용한 원발성 NKT 세포주 검정

| 항체 이름    | IFN- $\gamma$ EC50<br>(ng/mL) | IL-4 EC50<br>(ng/mL) | IL-5 EC50<br>(ng/mL) | IL-13 EC50<br>(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                 |
| 네가티브 대조군 | 무시할만한<br>억제                   | 무시할만한<br>억제          | 무시할만한<br>억제          | 무시할만한<br>억제           |

[0236]

표 5

EC50 값 - 원발성 CD14+ 세포를 사용한 원발성 NKT 세포주 검정

| 항체 이름    | IFN- $\gamma$ EC50<br>(ng/mL) | IL-4 EC50<br>(ng/mL) | IL-5 EC50<br>(ng/mL) | IL-13 EC50<br>(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                 |
| 네가티브 대조군 | 무시할만한<br>억제                   | 무시할만한<br>억제          | 무시할만한<br>억제          | 무시할만한<br>억제           |

DNI - 항체의 억제 활성이 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만인 경우에 억제하지 않았음.

[0237]

[0238] 항체 401.11 및 402.8의 VH 및 VL 도메인의 서열은 다음과 같다:

[0239] 401.11 VH 서열 번호 1

[0240] 401.11 VL 서열 번호 2

[0241] 402.8 VH 서열 번호 3

[0242] 402.8 VL 서열 번호 4

[0243] 실시예 7 - 402.8 및 401.11은 CD1d 상에 통상의 에피토프를 공유한다

[0244] 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 파지 디스플레이 캠페인은 선행분야 항-CD1d 항체에 비하여 우수한 생물학적 효능을 나타내는 항-Cd1d 항체 401.11 및 402.8을 생성했다. 이러한 유의적으로 개선된 효능은 항-CD1d 항체에 의해 결합된 경우에, CD1d 분자와 그의 동족 수용체, 예를 들면, NKT 세포 상에 존재하는 NKT 세포 수용체 사이에 상호작용을 방지하는 고 중화 에피토프의 인지에 기인한다고 가정했다. 따라서, CD1d와 이러한 상호작용의 차단은 NKT 세포의 활성화 및 프로-염증성 사이토킨의 방출과 같은 하류 생물학적 효과를 억제하는데 필요하고 충분했다. 생성된 상당히 효능있는 항-CD1d 항체가 중화 항-CD1d 항체에 비하여 상이한 에피토프 특이성을 갖는 지를 조사하기 위하여, 경쟁 결합 ELISA를 개발했다.

[0245] 검정 방법

[0246] 항-CD1d 항체 402.8은 3:1 비의 비오틴: 402.8로 EZ-결합 설포-NHS-LC-비오틴 키트 (Pierce)를 사용하여 비오틴화시켰다. 유리 비오틴은 PBS에 의한 다중 세척 및 30kDa 컷오프를 갖는 원심분리 필터 유닛 (Millipore)을 통한 원심분리(3000rpm)로 농축에 의해 단백질 제제로부터 제거했다. Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 0.5 $\mu$ g/mL 인간 CD1d로 코팅하여, 4°C에서 밤새 배양했다. 그 다음에, 플레이트는 실온에서 1시간 동안 플레이트를 1%

BSA로 차단시키기 전에 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 이어서, 비오틴화 402.8은 비-비오틴화 항-CD1d 항체 (402.8, 401.11, 42 및 51.1)와 함께 1:1 비로 5분 동안 함께 평형화시켰다. 이들 항체를 50 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했다 (즉, 0.1 $\mu$ g/mL 비오틴화 402.8에 비하여 최대 500배 과량). 그 다음에, 플레이트는 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 스트렙타비딘 서양고추냉이 퍼옥시다제 접합체 (BD Biosciences)를 어둡게 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했다. 플레이트는 비결합 스트렙타비딘-서양고추냉이 퍼옥시다제를 제거하기 위하여 세척했다. 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (KPL)과 함께 배양하여 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl로 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (FluoStar Galaxy)를 사용하여 A450nm에서 판독하였다. 결과는 A450nm 원값으로서 나타냈고, 원 데이터로부터 0% 억제에 상응하는 판독치를 빼서 경쟁도(%) 값으로 전환시켰다.

[0247] 상기 기술된 방법을 사용하여, 401.11 및 402.8은 450nm에서 흡광도 값 (도 6a) 및 402.8과의 경쟁도 (도 6b)로 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 서로 경쟁하고, 이에 따라 중복 또는 통상의 에피토프를 공유함을 입증하였다. 대조적으로, 402.8은 42 또는 51.1과 중복 또는 통상의 에피토프를 공유하지 않는다. 함께 고려해 보면, 이들 데이터는 상당히 효능있는 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8이 항-CD1d 항체 42 및 51.1이 공유하지 않는 유사한 고친화성 중화 에피토프에 결합됨을 입증하고 있다.

#### [0248] 실시예 8: 사이노몰구스 마카쿠 CD1d와의 교차-반응성

[0249] 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8은 실시예 1에 기술된 검정의 변형된 버전을 사용하여 ELISA에 의해 사이노몰구스 CD1d에 대한 결합에 대해 시험했다. Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 1 $\mu$ g/mL의 인간 또는 사이노몰구스 CD1d로 코팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양했다. 그 다음에, 플레이트는 실온에서 1시간 동안 플레이트를 1% BSA로 차단시키기 전에 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 이어서, 플레이트를 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 그 다음에, 항-CD1d 항체는 10 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 부가됐다. 이어서, 플레이트는 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. HRP-접합된 Fc-특이적 항체 (Sigma)를 사용하여 비결합 항체를 검출할 수 있었다. 그 다음에, 플레이트는 비결합 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-Fc를 제거하기 위하여 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (KPL)과 함께 배양하여 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl로 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (FluoStar Galaxy)를 사용하여 A450nm에서 판독하였다. 결과는 인간 CD1d를 결합하는(도 7a) 항체 401.11 및 402.8이 또한 사이노몰구스 CD1d와 교차-반응성임 (도 7b)을 나타낸다. 비-인간 영장류 CD1d와의 교차-반응성은 인간 질환의 비-인간 영장류 모델에서 시험할 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

#### [0250] 실시예 9: 사이노몰구스 CD1d와의 세포-기반 교차-반응성

[0251] 세포-기반 포맷에서 비-인간 영장류 CD1d와의 교차-반응성을 입증하기 위하여, 인간 및 사이노몰구스 마카쿠 PBMC는 교차-반응성 항-CD1d 항체 402.8을 사용하여 염색했다. 이 항체는 실시예 8에 기술된 바와 같이 비오틴화 대 IgG의 3:1배 비로 비오틴화시켰다. 네가티브 대조군 항체 (인간 IgG1)은 유사한 방법으로 비오틴화시켰다. 결합된 비오틴화 항-CD1d 항체의 검출은 피코에리트린-접합 스트렙타비딘과 세포를 배양시켜 성취하였다. 항-CD1d 항체는 인간 (도 3) 및 사이노몰구스 마카쿠 중 (도 8)에서 모두 CD1d-포지티브 원발성 단핵세포-유래 DC를 결합했다. 이들 결과는 402.8이 세포-기반 상황에서 인간 및 사이노몰구스 마카쿠 교차-반응성을 나타내고, 이는 인간 질환의 비-인간 영장류 모델에서 시험하는데 중요함을 제시한다.

#### [0252] 실시예 10: 사이노몰구스 CD1d-매개 원발성 NKT 기능의 세포-기반 기능적 억제

[0253] 세포 기반 효능 검정을 위해, 사이노몰구스 PBMC는 0일째  $\alpha$ GalCer (100 ng/mL)와 함께, 항-CD1d 항체의 존재 또는 부재하에 부하했다. 배양액은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>의 가습 배양기에서 24-웰 플레이트에서 제조했다. 7일에, IL-2 (10 U/mL)를 7일째에 가했고, 배양액은 다시 96시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하도록 두었다. 최종 판독은 항-CD3 및 항-T 세포 수용체 V $\alpha$ 24 항체 (BD Biosciences)를 사용한 NKT 세포의 열거였다. 항-CD1d 항체의 부재하에, 또는 이소타입 대조군 항체의 부가하에, NKT 세포는 대략 10배만큼  $\alpha$ GalCer의 존재하에 확장되었다. 항-CD1d 항체 401.11 및 402.8은 항체가 없거나 인간 IgG 네가티브 대조군 항체의 존재하에 배양액의 처리에 비하여, CD1d-제한 사이노몰구스 NKT 세포의  $\alpha$ GalCer-매개 확장을 강력하게 차단했다 (도 9).

#### [0254] 실시예 11: 401.11 및 402.8의 최적화된 변이체

[0255] 401.11 및 402.8 항체는 항체의 생물물리학적 특성에 대한 포지티브 효과를 수득하는 한편, 그들의 효능에 대한 무시할만하거나 포지티브한 영향을 가질 목적으로 항체의 서열에 대한 변화를 통해 추가로 최적화할 수 있다.

첫째로, 부수적으로 증가되는 생성 수준과 함께 항체의 발현 수준을 개선하는 변화가 바람직할 수 있다. 둘째로, 아미노산 치환을 통한 용매-노출된 시스테인 잔기 또는 N-결합된 글리코실화 부위와 같은, 효능적으로 바람직하지 않은 서열 특성의 제거는 잠재적인 생성물 이종성을 감소시킬 수 있고, 이는 추가로 이들 항체를 개선할 수 있다. 셋째로, 정제 또는 저장 도중 산화 또는 이성체화를 통해 항체의 안정성에 잠재적으로 영향을 주는 아미노산 잔기의 치환은 상기 변화를 겪지 않은 아미노산에 의해 치환될 수 있고 (Wang et al. 2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1-26), 이는 추가로 이들 항체를 개선할 수 있다. 마지막으로, 면역원성에 잠재적으로 기여할 수 있는 회귀하거나 비-생식계열 401.11 및 402.8 아미노산 잔기는 예상되는 면역원성을 저하시킬 목적으로 다른 아미노산에 의해 치환시킬 수 있고, 이는 추가로 이들 항체를 개선할 수 있다. 다음은 항체 401.11 및 402.8에 대한 이들 최적화 전략의 실행을 기술한다.

[0256] 개선된 항체 401.11

[0257] 401.11의 가변 중쇄 및 경쇄 서열은 MegAlign (DNASTAR)을 통해 상응하는 인간 생식계열(germline) 서열과 비교했다. 가장 상동성인 생식계열 중쇄 가변 영역 -IGHV3-9\*01 -은 7개의 프레임워크 아미노산에 의해 401.11과 상이하다. IGKV1-12\*01은 401.11 경쇄와 최고의 서열 상동성을 공유했고, 2개의 프레임워크 아미노산 차이 밖에 없다 (도 12). 이 정보는 상응하는 생식계열 프레임워크 잔기에 의해 치환된 프레임워크 잔기를 함유하는 401.11 변이체의 패넬을 생성하기 위하여 사용되었다 (도 12).

[0258] 항체 401.11 및 401.11.15 내지 401.11.28 (도 12)은 HEK-293E 세포로 중쇄 및 경쇄의 공-형질감염에 의해 생성하였다. SPR (Biacore)은 평형해리상수(KD)에 의해 측정된 바와 같이 각 항체의 상대적인 발현 수준 및 인간 CD1d에 대한 그의 상응하는 결합을 측정하기 위하여 사용되었다. 생성된 데이터는 표 6에 제시되어 있다.

표 6

| IgG       | 발현수준<br>(단백질 A<br>포획) SPR | KD<br>(pM) | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(THP-1) | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(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                                       |

주: DNE - 발현되지 않았음; DNB - 결합되지 않았음; N/D - 측정되지 않았음; THP-1 - 항원 제시 세포로서 사용된 THP-1 세포; moDC - 항원 제시 세포로서 사용된 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포. 데이터는 3 개의 독립적인 실험을 대표함.

[0259]

[0260] 이 실험에서 시험된 15개의 항체 중에, 13개는 형질감염된 HEK-293E 세포의 상등액 중 측정 가능한 항체 수준을 가졌다. 이들 13개 항체 중 10개는 1nM 미만의 평형해리상수(KD)로 CD1d에 결합되었다 (표 6).

[0261] 항체 401.11, 401.11.24, 401.11.26 및 401.11.28은 세포-기반 효능 검정을 사용하여 CD1d 매개 NKT 세포 사이 토킨 방출의 기능적 억제를 위해 생성하고 시험했다 (표 6). 항체 401.11.24, 401.11.26 및 401.11.28은 THP-1 세포 또는 원발성 CD14+ 수지상 세포가 CD1d-포지티브 항원 제시 세포(APC)로서 사용된 경우, 401.11에 비하여 유사하거나 개선된 효능을 나타냈다.

[0262] 401.11 중쇄의 CDR3의 97 내지 (100B)번 위치는 서열 CSSSGC로 이루어진다. CDR3에 존재하는 시스테인의 역할을 결정하기 위하여, 각각의 시스테인은 상이한 그룹의 아미노산 측쇄를 나타내는 9개 아미노산 중 1개에 의해 치환시켰다 (Rajpal et al PNAS 2005 102: 8466-8471). HEK293E 세포로 형질감염에 이어서, 항체 발현이 이들 변이체 중 어떠한 것에서도 검출되지 않았고, SPR에 의해 측정된 바와 같이 CD1d에 대해 검출 가능한 결합은 없었

다. 세린 잔기에 대한 두 시스테인의 치환(401.11.164)은 발현됐지만, 401.11에 비하여 낮은 친화성으로 인간 CD1d에 결합된 항체를 생성했고, 401.11 중쇄의 CDR3의 시스테인이 항체 발현 및 CD1d에 대한 높은 친화성을 위해 바람직하다고 제시하였다 (표 7).

표 7

| IgG        | 가변 중쇄에서<br>401.11로부터의<br>치환 | 경쇄     | KD (M)    |
|------------|-----------------------------|--------|-----------|
| 401.11 WT  | N/A                         | 401.11 | 9.97 E-10 |
| 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       |
| 401.11.164 | C97S &<br>C(100B)S          | N45K   | 6.56E-08  |

N/D - 측정되지 않음

[0263]

[0264]

401.11의 중쇄 CDR3 서열은 401.11의 발현 수준 및 친화성을 개선하기 위한 시도로 추가의 변형을 위해 표적이 되었다. 이 분석을 위해, 401.11 중쇄의 CDR3에서 각각의 아미노산은 상이한 그룹의 아미노산 측쇄를 나타내는 9개의 아미노산 중 1개로 치환되었다. 각각의 생성된 항체의 발현 수준 및 CD1d에 대한 그의 결합이 표 9 및 표 9에 제시되어 있다.



표 8

| IgG       | 치환 VH | 발현 수준 | KD (M)    |
|-----------|-------|-------|-----------|
| 401.11    | N/A   | 36    | <0.1E-10* |
| 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  |
| 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  |

카바트에 따른 잔기 넘버링. <0.1E-10\*은 작제물의 KD 가 검출 범위 미만임을 나타냄. DNE – 발현되지 않았음 (10RU 미만); DNB – 결합되지 않았음; N/A – 적용가능하지 않음

[0265]

표 9

| IgG        | 치환 VH    | 발현 수준 | KD (M)    |
|------------|----------|-------|-----------|
| 401.11     | N/A      | 103   | 1.75E-10  |
| 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* |
| 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  |

카바트에 따른 잔기 넘버링. <0.1E-10\*은 작제물의 KD 가 기계의 검출 범위 미만임을 나타냄. DNE  
- 발현되지 않았음 (10RU 미만); DNB - 결합되지 않았음; N/A - 적용가능하지 않음

[0266]

[0267]

항체 401.11.86은 401.11의 수준의 3배 보다 높게 발현됐고, 401.11에 비하여 CD1d에 대한 더 높은 친화성을 가졌다. 이 항체를 정제하고, 세포-기반 효능 검정을 사용하여 CD1d 매개 NKT 세포 사이토킨 방출의 기능적 억제에 대해 시험했다 (표 10). 검정은 CD1d-포지티브 항원 제시 세포의 공급원으로서 원발성 인간 단핵세포-유래 수지상 세포 또는 THP-1 세포 및 αGalCer-확장된 NKT 세포를 사용했다. 프로토콜은 실시예 6에 기술된 바와 같았다.

표 10

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

주: THP-1 - 항원 제시 세포로서 사용된 THP-1 세포; moDC - 항원 제시 세포로서 사용된 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포. 데이터는 5 개의 독립적인 실험을 대표함.

[0268]

[0269]

100번 위치에서 글리신에 대한 세린 치환에 의해 401.11과 상이한 401.11.86은 401.11에 비하여 보다 효능이 있



었다. 이어서, 상기 기술한 가장 효능있는 항체로부터 확인된 치환을 함유한 항체를 생성하였다 (도 13).

[0270]

401.11의 가변 중쇄 서열의 아미노산 분석으로 잠재적으로 산화 또는 이성체화될 수 있는 몇 개의 아미노산을 확인했다. 이들 아미노산에 대한 임의의 변화가 시간에 따라 항체의 결합 프로우필에 영향을 줄 수 있기 때문에 항체의 CDR 서열에 존재하는 아미노산이 특별히 강조되었다. 가변 중쇄에서, M96은 잠재적인 산화 부위로서 확인되었고, D(100D)는 잠재적인 이성체화 부위로서 확인되었다. 반보존적 또는 보존적 아미노산 치환이 이들 잠재적으로 문제가 되는 아미노산 잔기를 제거하기 위한 시도로 사용되었다 (도 13). 생성된 항체의 결합 친화성에 대한 이들 치환의 영향이 표 11에 제시되어 있다.

표 11

| 항체         | 친화성 $K_D$<br>(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                   |

[0271]

시험된 항체 중 많은 것이 본래 항체 401.11에 비하여 개선된 친화성을 가졌다. 이어서, 이들 항체는 CD1d 매개된 NKT 세포 사이토킨 방출의 기능적 억제를 측정하는 세포-기반 효능 검정으로 시험하였다. 프로토콜은 실시예 6에 기술된 것과 같았다. 시험된 19개 항체 중, 14개 항체가 401.11 항체에 비하여 유사하거나 개선된 효능을 일관되게 입증했다. 이들 항체 변이체는 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여 유의적으로 개선된 효능을 가졌고, 이들 모두는 10 $\mu$ g/mL의 최고 농도에서 일부 억제 활성을 나타냈지만, 보다 낮은 항체 농도에서는 억제를 나타내지 못했다. 대표적인 실험으로부터의 EC50 값은 하기 표 12 내지 16에 제시되어 있다.

표 12

| 항체         | NKT IL-4 EC50<br>(ng/mL) (moDC) | NKT IL-4<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-13<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-13<br>EC50 (ng/mL)<br>(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                               |
| 네가티브 대조군   | DNI                             | DNI                                | DNI                                 | DNI                                 |

N/D - 측정되지 않았음; 네가티브 대조군 - 무관한 특이성의 IgG1; moDC - 항원 제시 세포로서 사용되는 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음

[0273]

표 13

| 항체         | NKT IFN- $\gamma$ 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                         |

주: moDC - 항원 제시 세포로서 사용되는 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음

[0274]

표 14

| 항체         | NKT IFN- $\gamma$ 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                        |
| 이소타입 대조군   | DNI                                    | DNI                           | DNI                           | DNI                            | DNI                          |

주: 이소타입 대조군 - 무관련 특이성 IgG4; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음; THP-1 - 항원 제시 세포로서 사용된 THP-1 세포; moDC - 항원 제시 세포로서 사용되는 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포.

[0275]

표 15

| 항체         | NKT IFN- $\gamma$ 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                           |
| 이소타입 대조군   | DNI                                   | DNI                          | DNI                          | DNI                           |

주: 이소타입 대조군 - 무관련 특이성 IgG4; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음; THP-1 - 항원 제시 세포로서 사용된 THP-1 세포; moDC - 항원 제시 세포로서 사용되는 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포.

[0276]

표 16

| 항체          | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50<br>(ng/mL)<br>(moDC) | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(THP-1) | NKT IL-4<br>EC50<br>(ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-4<br>EC50<br>(ng/mL)<br>(THP-1) | NKT IL-13<br>EC50<br>(ng/mL)<br>(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                                     |
| 이소타입<br>대조군 | DNI                                            | DNI                                          | DNI                                   | DNI                                    | DNI                                     |

주: 이소타입 대조군 - 무관련 특이성 IgG4; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은  
 통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음; THP-1 - 항원 제시  
 세포로서 사용된 THP-1 세포; moDC - 항원 제시 세포로서 사용된 원발성 단핵세포-유래 수지상  
 세포.

[0277]

[0278]

항원-제시 세포로서 CD14+ 단핵세포 유래 수지상 세포를 사용하는 원발성 NKT 세포-기반 효능 검증에서, 401.11로부터 유래된 항체는 모 항체 401.11에 비하여 개선된 억제 활성을 나타냈다. 이는 억제 곡선에서 좌측-이동에 의해 확실히 보이며, 여기서 401.11로부터 유래된 항체는 NKT-세포 매개된 사이토킨 방출의 동일한 억제를 성취하기 위하여 더 낮은 농도가 필요했다 (도 14). 예를 들면, 1  $\mu$ g/mL로부터 적정된, 항체 401.11.156 및 401.11.158은 1  $\mu$ g/mL로부터 적정된, 항체 401.11에 비하여 대략 5.1배 개선 및 4.8배 개선을 각각 나타냈다 (도 14 및 표 13, 참조 IFN- $\gamma$  EC50 값). 7개 실험에서, 항-CD1d 항체 42 및 51.1은 실제 EC50 값을 계산할 수 없을 정도로 최소 억제를 나타냈다. EC50 값이 결정될 수 있는 실험에서, 1  $\mu$ g/mL로부터 적정된, 항체 401.11로부터 유래된 항체는 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여 유의적으로 개선된 효능을 나타냈다. 이들 항체는 10  $\mu$ g/mL의 최고 농도에서 억제 활성을 나타냈지만, 보다 낮은 항체 농도에서는 억제를 나타내지 못했다 (도 14 및 표 13; 참조 IFN- $\gamma$  EC50 값).

[0279]

요약하면, 401.11로부터 유래된 완전 인간 최적화된 항-CD1d 항체가 확인되었고, CD1d 항원을 자연스럽게 발현하는 원발성 인간 세포와 관련하여 NKT 세포 활성의 상당히 효능있는 억제를 입증했다. 이들 항체는 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여 유의적으로 개선된 효능을 나타냈다.

[0280]

#### 402.8 항체의 최적화

[0281]

402.8의 가변 중쇄 및 경쇄 서열의 아미노산 분석으로 잠재적으로 중쇄에 존재하는 산화, 이성체화 또는 탈아미드화를 수행할 수 있는 몇 개의 아미노산을 확인했다 (Wang et al. 2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1-26). 이들은 중쇄에서 N(100B)에 잠재적인 탈아미드화 부위, D101에 잠재적인 이성체화 부위 및 W(100A) 및 M(100E)에 잠재적인 산화 부위를 포함한다. 잠재적인 탈아미드화, 산화 및 이성체화 부위를 제거하기 위하여, 아미노산 치환을 수행하였다: W(100A)Y, N(100B)K, M(100E)L, D(101)E. 잠재적인 N-결합된 글리코실화 부위는 N-결합된 글리코실화 모티프 NX(S/T)를 방해하는 N54A를 도입시켜 제거하였고, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. 항체는 도 15에 제시된 바와 같이 가변 중쇄에 이들 아미노산 치환의 조합으로 제조되었다. 각각의 항체 중쇄는 HEK-293 세포로 402.8 경쇄 (서열 번호 4)와 함께 공-형질감염시켰고, 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하여, 각 항체의 친화성을 SPR을 사용하여 측정하였다 (표 17). 그 다음에, 이들 항체는 원발성 인간 단핵세포-유래 수지상 세포 및 자가유래  $\alpha$ GalCer-확장된 NKT 세포를 사용하여 세포-기반 효능 검증으로 시험하였다 (표 18 및 19).

표 17

| IgG      | K <sub>D</sub> (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                 |

[0282]

표 18

| IgG         | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-13<br>EC50 (ng/mL)<br>(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                               |
| 네가티브<br>대조군 | DNI                                         | DNI                                 |

주: 네가티브 대조군 - 무관련 특이성 IgG1; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은  
통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음; moDC - 항원 제시  
세포로서 사용된 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포.

[0283]

표 19

| 항체          | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-4<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IFN- $\gamma$<br>EC50 (ng/mL)<br>(moDC) | NKT IL-4 EC50<br>(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                             |
| 네가티브<br>대조군 | DNI                                         | DNI                                | ND                                          | ND                              |

주: 네가티브 대조군 - 무관련 특이성 IgG1; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은  
통상 1  $\mu$ g/mL 에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음; moDC - 항원 제시  
세포로서 사용된 원발성 단핵세포-유래 수지상 세포.

[0284]

[0285]

402.8로부터 유래된 이들 변이체 항체는 원발성 NKT 세포에 의한  $\alpha$ GalCer-매개 사이토킨 방출의 강한 억제를 입증했다. 변이체 항체 중 일부는 402.8에 비하여 감소된 효능을 나타낸 반면에, 다른 항체는 NKT 세포-유도 사이토킨 방출의 용량-의존성 억제에 의해 측정된 것과 유사한 효능을 유지했다. 몇몇 실험에서, 항-CD1d 항체 42 및 51.1은 실제 EC50 값이 계산될 수 없는 정도로 최소한의 억제를 나타냈다 (표 19). EC50 값이 측정될 수 있는 실험에서, 402.8로부터 유래된 항체는 항-CD1d 항체 42에 비하여 유의적으로 개선된 효능으로 존재하고, 이는 10  $\mu$ g/mL의 최고 농도에서 일부 억제 활성을 나타냈지만, 보다 낮은 항체 농도에서는 억제 활성을 유지하지 못했다 (도 16 및 표 18). 따라서, 이 결과는 어버이 항체 402.8을 기반으로 하는 최적화된 항-CD1d 항체가 항-CD1d 항체 42 및 51.1에 비하여 효능있는 중화 활성 및 CD1d 항원을 자연스럽게 발현하는 원발성 인간 세포와 관련하여 402.8에 비하여 유사한 중화 활성에 있어서의 유의적인 개선을 나타냄을 입증하고 있다.

[0286]

**실시예 12:  $\alpha$ -갈락토실세라미드에 대한 대안 항원을 사용하는 원발성 NKT 세포-기반 검정에서 항-CD1d 항체의 효능 시험**

[0287]

실시예 6에 기술된 세포-기반 효능 검정법은 당지질 항원으로서  $\alpha$ GalCer를 사용했다. 항-CD1d 항체가  $\alpha$ GalCer에 대한 대안적인 당지질 항원과 관련하여 억제 활성을 가짐을 입증함은 이러한 상당히 효능있는 중화 항-CD1d 항체가 지질 및/또는 당지질이 제시될 수 있는 영역으로부터 먼 위치에서 CD1d를 결합한다는 개념을 지지한다. 자연에서 발견되는 CD1d-제한된 지질 및 당지질 항원은 화학적 구조면에서  $\alpha$ GalCer와 상이할 수 있고, 결론적으로 본 발명에 기술된 항-CD1d 항체는 상이한 화학 구조식을 갖는 당지질 항원과 관련하여 억제 활성을 유지함을 입증하는데 사용될 수 있다. 또한, 잠재적인 자가 항원, 즉 포유동물 맥락에서 발견되는 것들의 억제 활성을 특성 분석하는데 유용하다.

- [0288] 인간 NKT 세포에 대한 활성을 갖는 단지 소수의 당지질 항원을 특성 분석하였다. 이들은 iGb3 및 리소포스파티딜콜린을 포함하지만, 상기 항원은 NKT 세포의 단지 약한 활성화만을 갖는다. 내인성 지질의 C24:1 N-아실 변이체,  $\beta$ -D-글루코피라노실세라미드 (이후에 C24:1  $\beta$ -GluCer로서 공지됨)는 인간 NKT 세포에 대한 활성을 갖는 것으로 기술되었다. 세포-기반 효능 검정은  $\alpha$ GalCer에 대한 이러한 대안적 항원과 관련하여 등록된 항-CD1d 항체의 억제 활성을 특성 분석하기 위해 개발되었다 (Brennan, P. J., et al., 2011 Nat Immunol 12:1202-1211).
- [0289] **검점 방법 및 결과**
- [0290]  $\beta$ -D-글루코피라노실세라미드의 C24:1 N-아실 변이체 (Avanti; D-글루코실- $\beta$ -1,1' N-(15Z-테트라코세노일)-D-에리트로-스핑고신 N-(15Z-테트라코세노일)-1- $\beta$ -글루코실-스핑-4-엔)를 작은 모액으로 저장하기 전에 2시간 동안 37°C에서 5mg/mL로 DMSO에 가용화시켰다.
- [0291] C24:1  $\beta$ -GluCer를 사용하여 세포-기반 효능 검정을 수행하기 위하여, NKT 세포는 실시예 6에 기술된 바와 같이  $\alpha$ GalCer와 함께 확장시켰다.  $\alpha$ GalCer의 존재하에 자극됨에도 불구하고, 이들 NKT 세포는 C24:1  $\beta$ -GluCer에 대한 기능적 활성을 유지했으며, 생성된 NKT 세포주의 TCR 특이성이 또한 인간 CD1d와 관련한 C24:1  $\beta$ -GluCer 인지에 대해 허용되었음을 제시한다. NKT 세포는 유세포 분석에 의해 표현형이었고, NKT 세포의 순도가 70%를 초과한다면 세포-기반 효능 검정에 단지 사용되었다.
- [0292] 단핵세포-유래 수지상 세포는 실시예 6에 기술된 바와 같이 생성했다. 이들 세포는 웰당  $2 \times 10^4$  개 세포로 96-웰 평저 플레이트에서 배양하고, 24시간 동안 10 $\mu$ g/mL로 C24:1  $\beta$ -GluCer를 부하였다. 억제성 항-CD1d 항체 401.11.158, 401.11 및 402.8은 1 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 제조했고, 42, 51.1 및 네가티브 대조군 항체는 10 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 제조한 다음, 1시간 동안 C24:1  $\beta$ -GluCer-부하된 수지상 세포 배양액에 가했다. 그 후, NKT 세포는 수지상 세포와 함께 1:1 비로 가했다. 24시간 후, 세포-유리 상등액은 IFN- $\gamma$  IL-4, IL-5 IL-13 및 TNF 방출에 대해 검정했다. 한 예로서, 401.11, 401.11.158 및 402.8을 이 검정에서 시험하였다. 무관한 특이성 네가티브 대조군 항체가 네가티브 대조군으로서 사용되었고, 항-CD1d 항체 42 (BD Biosciences) 및 51.1 (eBioscience)은 포지티브 대조군으로서 사용되었다. 42 및 51.1 항체와 항체 401.11, 401.11.158 및 402.8은 이러한 원발성 세포-기반 검정에서 원발성 NKT 세포에 의한 C24:1  $\beta$ -GluCer-유도 사이토킨 방출의 억제를 입증했다 (IFN- $\gamma$  및 IL-4 곡선이 도 17에 제시되어 있다). 비교로, 네가티브 대조군 항체는 NKT 세포에 의한 사이토킨 방출의 무시할만한 억제를 입증했다.
- [0293] 항체 42 및 51.1은 고용량(10 $\mu$ g/mL)에서 NKT 세포에 의한 사이토킨 방출의 일부 억제를 나타냈지만, 이 효과는 저용량에서 유지되지 못했다. 항체 42에 비하여, 항체 401.11.158, 401.11, 및 402.8은 216배 이하, 58배 이하 및 139배 이하의 개선된 효능을 각각 입증했다 (도 17 및 표 20). 항체 51.1에 비하여, 항체 401.11.158, 401.11, 및 402.8은 175배 이하, 47배 이하 및 112배 이하의 개선된 효능을 각각 입증했다 (도 17 및 표 20; 참조 IFN- $\gamma$  검정 EC50 값).

**표 20**

|             | IFN- $\gamma$ EC50<br>(ng/mL) | IL-4 EC50<br>(ng/mL) | IL-5 EC50<br>(ng/mL) | IL-13 EC50<br>(ng/mL) | TNF- $\alpha$ EC50<br>(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                         |
| 네가티브<br>대조군 | DNI                           | DNI                  | DNI                  | DNI                   | DNI                           |

네가티브 대조군: CD1d 가 아닌 다른 표적으로 유도되는 IgG4 이소타입의 항체; DNI - 억제되지 않았음, 여기서 항체의 억제 활성은 통상 1 $\mu$ g/mL에서 인간 NKT 세포에 의한 최대 반응의 50% 미만이었음.

[0294]

- [0295] 실시예 13: 402.8 및 401.11로부터 유래된 항체는 항-CD1d 항체에 의해 공유되지 않은 CD1d 상에 통상의 에피토프를 공유한다



- [0296] 402.8 및 401.11의 변이체, 및 상용 공급되는 항-CD1d 항체를 실시예 7을 근거로 하는 경쟁-기반 ELISA로 시험하였다. 먼저, 402.8의 비오틴화 버전이 비-비오틴화 항체 401.11과 경쟁하지만, 항체 42 및 51.1과는 경쟁하지 않는 것으로 제시되었다. 이 작업은 하기에 기술되어 있다.
- [0297] **검정 방법**
- [0298] 항-CD1d 항체 402.8은 3:1 비의 비오틴:402.8에서 EZ-결합 설포-NHS-LC-비오틴 키트 (Pierce)를 사용하여 비오틴화시켰다. 유리 비오틴은 PBS에 의한 다중 세척 및 30kDa 컷오프를 갖는 원심분리 필터 유닛 (Millipore)을 통한 원심분리(3000rpm)로 농축에 의해 단백질 제제로부터 제거했다. Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 1.0 $\mu$ g/mL 인간 CD1d로 코팅하여, 4°C에서 밤새 배양했다. 그 다음에, 플레이트는 실온에서 1시간 동안 플레이트를 1% BSA로 차단시키기 전에 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 이어서, 비오틴화 402.8은 비-비오틴화 항-CD1d 항체와 함께 1:1 비로 5분 동안 함께 평형화시켰다. 이들 항체를 40 $\mu$ g/mL로부터 2배 감소되는 농도로 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했고 (즉, 0.2 $\mu$ g/mL 비오틴화 402.8에 비하여 최대 200배 과량), 최종 희석액은 블랭크 웰이다 (즉, 단지 비오틴화 402.8 항체만을 함유함). 그 다음에, 플레이트는 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 스트렙타비딘 서양고추냉이 퍼옥시다제 접합체 (BD Biosciences)를 어렵게 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했다. 플레이트는 비결합 스트렙타비딘-서양고추냉이 퍼옥시다제를 제거하기 위하여 세척했다. 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (KPL)과 함께 배양하여 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl로 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (FluoStar Galaxy)를 사용하여 A450nm에서 판독하였다. 결과는 A450nm 원값으로서 나타냈고, 원 데이터로부터 0% 억제에 상응하는 판독치를 빼서 경쟁도(%) 값으로 전환시켰다.
- [0299] 이 방법이 실시예 7에 기술된 것과 유사한 결과를 생성함을 정립하기 위하여, 비오틴화 항체 402.8은 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 401.11, 및 항-CD1d 항체 42 및 51.1과 경쟁시켰다. 이들 검정 조건하에, 402.8 및 401.11은 450nm에서 흡광도 값 (도 18a) 및 402.8과의 경쟁도 (도 18b)로 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 경쟁했고, 결론적으로 이들 항체는 hCD1d 상의 중복 또는 통상의 에피토프를 공유함이 분명해졌다. 대조적으로, 402.8은 42 또는 51.1과 중복 또는 통상의 에피토프를 공유하지 않았다. 함께 고려해 보면, 이 검정은 상당히 효능있는 항-CD1d 항체 402.8 및 401.11이 항체 42 및 51.1이 공유하지 않는 CD1d 상의 유사한 고친화성 중화 에피토프에 결합됨을 입증했다.
- [0300] 이러한 변형된 검정을 사용하여, 비오틴화 항체 402.8은 재조합 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 (실시예 11에 기술된) 하기 항체들과 경쟁했다: 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 및 402.8.87. 이들 항체는 모두 450nm에서 흡광도 값 및 402.8과의 전환된 %경쟁으로 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 비오틴화 402.8과 경쟁했다. 특히, 항체 401.11.160, 401.11.161 및 401.11.165는 450nm에서 흡광도 값 (도 19a) 및 경쟁도 (도 19b)를 나타내는 도면에 의해 입증된 바와 같이, 항체 402.8.84, 402.8.86 및 402.8.87이 한 바와 같이, 450nm에서 흡광도 값 (도 20a) 및 경쟁도 (도 20b)를 나타내는 도면에 의해 입증된 바와 같이, 비오틴화 402.8과 강력히 경쟁했다.
- [0301] **부가의 항-CD1d 항체와 경쟁 시험**
- [0302] 402.8 또는 401.11로부터 유래된 항체가 다른 항-CD1d 항체와 경쟁하는 지를 조사하기 위하여, 총 23개의 상용-공급되는 항-CD1d 항체를 시험했다. 이들 항체는 항-인간 CD1d 모노클로날 항체, 항-마우스 CD1d 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항-인간 CD1d 항체를 포함했다. 이들 항체의 상세가 표 21에 기술되어 있다. 래트 항-마우스 항체 하이브리도마 HB-321, HB-322, HB-323, HB-326 및 HB-327은 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 공급되었고, 공급업자의 지시에 따라 통과시켰다. 이들 세포주로부터 유래된 항체는 단백질 G 친화성 크로마토그래피에 의해 정제했고, 마우스 CD1d에 대한 결합에 대해 입증했다 (제시되지 않음).
- [0303] 표 21에 기술된 23개 항-CD1d 항체 중 어떠한 것도 450nm에서 흡광도 값 및 402.8과의 %경쟁에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8 과 경쟁하지 않았다. 이들 결과의 예가 도 21 내지 23에 제시되어 있다. 항-인간 CD1d 항체 AD58E7, C3D5 및 C-9는 450nm에서 흡광도 값 (도 21a) 및 전환된 경쟁도 값 (도 21b)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8과 경쟁하지 않았다. 이들 결과의 다른 예로서, 항-마우스 CD1d 항체 HB-321, HB-322 및 HB-323은 450nm에서 흡광도 값 (도 22a) 및 전환된 경쟁도 값 (도 22b)에 의해 입증된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8과 경쟁하지 않았다. 유사하게, 한 예로서, 폴리클로날 항-인간 CD1d 항체 C-19, H70 및 Ab96515가 450nm에서 흡광도 값 (도 23a) 및 전환된 경쟁도

값 (도 23b)에 의해 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8과 경쟁하지 않았다. 시험된 폴리클로날 항-인간 CD1d 항체 중 어떠한 것도 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8과 경쟁하지 않았음이 주목할만하다. 이들 데이터는 시험된 상당히 효능있는 신규 항-CD1d 항체의 한 예로서, 상당히 효능있는 항-CD1d 항체 402.8이 시험된 항-CD1d 항체의 확장된 리스트가 공유하지 않는 유사한 고친화성 중화 에피토프에 결합됨을 입증하고있다.

표 21

| 항체 번호 | 클론 또는 카탈로그 번호       | 이소타입      | 특이성                 | 공급처                              |
|-------|---------------------|-----------|---------------------|----------------------------------|
| 1     | NOR3.2              | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Pierce                           |
| 2     | AD5-8E7             | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Miltenyi Biotec                  |
| 3     | C3D5                | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Santa Cruz Biotechnology         |
| 4     | C-9                 | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Santa Cruz Biotechnology         |
| 5     | G10                 | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Santa Cruz Biotechnology         |
| 6     | 3H649               | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Santa Cruz Biotechnology         |
| 7     | LS-C122839          | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Lifespan Biosciences, Inc.       |
| 8     | LS-C4448            | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Lifespan Biosciences, Inc.       |
| 9     | LS-C4449            | 마우스 모노클로날 | 인간 CD1d             | Lifespan Biosciences, Inc.       |
| 10    | LS-C122840          | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | LifeSpan Biosciences, Inc.       |
| 11    | 1B1                 | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | BD Biosciences                   |
| 12    | HB-321<br>(클론 19F8) | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | American Type Culture Collection |
| 13    | HB-322<br>(클론 15F7) | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | American Type Culture Collection |
| 14    | HB323<br>(클론 20H2)  | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | American Type Culture Collection |
| 15    | HB-326<br>(클론 15C6) | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | American Type Culture Collection |
| 16    | HB-327<br>(클론 4C4)  | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | American Type Culture Collection |
| 17    | 3C11                | 레트 모노클로날  | 마우스 CD1d            | BD Biosciences                   |
| 18    | K253                | 마우스 모노클로날 | 마우스 CD1d            | Biolegend                        |
| 19    | C-19                | 염소 폴리클로날  | 인간 CD1a, CD1b, CD1d | Santa Cruz Biotechnology         |
| 20    | H70                 | 토끼 폴리클로날  | 인간 CD1d             | Santa Cruz Biotechnology         |
| 21    | Ab96515             | 토끼 폴리클로날  | 인간 CD1d             | AbCam                            |
| 22    | GTX104898           | 토끼 폴리클로날  | 인간 CD1d             | GeneTex                          |
| 23    | 1401052             | 마우스 폴리클로날 | 인간 CD1d             | Sigma Aldrich                    |

상기 실시예에 대한 부가로서, 401.11로부터 유래된 항체의 비오틴화 버전을 사용하여 확장된 실험을 수행했다. 이 실험은 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 402.8과 경쟁하는 항체가 또한 수정된 검정에서 비오틴화 시약으로서 사용될 수 있으며, 동일한 결과를 나타냄을 입증하기 위하여 수행하였다. 하기 설명에서, 검정은 401.11-유래 항체의 예인, 401.11.158이 비오틴화되어, 402.8 및 다른 항-CD1d 항체 42 및 51.1과 경쟁하도록 수정했다.

#### 검정 방법

항-CD1d 항체 401.11.158은 3:1 비의 비오틴:401.11.158에서 EZ-결합 세포-NHS-LC-비오틴 키트 (Pierce)를 사용하여 비오틴화시켰다. 유리 비오틴은 PBS에 의한 다중 세척 및 30kDa 컷오프를 갖는 원심분리 필터 유닛 (Millipore)을 통한 원심분리(3000rpm)로 농축에 의해 단백질 제제로부터 제거했다. 항-CD1d 항체 Maxisorp ELISA 플레이트 (Nunc)는 1.0 $\mu$ g/mL 인간 CD1d로 코팅하여, 4°C에서 밤새 배양했다. 그 다음에, 플레이트는 실온에서 1시간 동안 플레이트를 1% BSA로 차단시키기 전에 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 이어서, 비오틴화 401.11.158은 비-비오틴화 항-CD1d 항체와 함께 1:1 비로 5분 동안 함께 평형화시켰다. 이들 항체를 40 $\mu$ g/mL로부터 감소되는 농도로 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했다 (즉, 0.2 $\mu$ g/mL 비오틴화 401.11.158에 비하여 최대 200배 과량). 그 다음에, 플레이트는 0.1% Tween20을 함유하는 PBS로 3회 세척했다. 스트렙타비딘 서양고추냉이 퍼옥시다제 접합체 (BD Biosciences)를 어둡게 실온에서 1시간 동안 플레이트에 가했다. 플레이트는 비결합 스트렙타비딘-서양고추냉이 퍼옥시다제를 제거하기 위하여 세척했다. 검정 시그널은 50  $\mu$ L 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (KPL)과 함께 배양하여 전개시키고, 50  $\mu$ L 1M HCl로 급냉시켰다. 검정 시그널은 마이크로플레이트 리더 (FluoStar Galaxy)를 사용하여 A450nm에서 판독하였다. 결과는 A450nm 원값으로서 나타냈고, 원 데이터로부터 0% 억제에 상응하는 판독치를 빼서 경쟁도(%) 값으로 전환시켰다.

상기 기술된 방법을 사용하여, 401.11.158 및 402.8은 450nm에서 흡광도 값 (도 24a) 및 401.11.158과의 경쟁

도 (도 24b)로 제시된 바와 같이, 인간 CD1d에 대한 결합에 대해 경쟁했고, 이에 따라 중복 또는 통상의 에피토프를 공유한다. 대조적으로, 401.11.158은 42 또는 51.1과 중복 또는 통상의 에피토프를 공유하지 않는다. 함께 고려해 보면, 이들 데이터는 상당히 효능있는 항-CD1d 항체 401.11.158 및 402.8이 덜 효능있는 선행분야 항체 42 및 51.1이 공유하지 않는 유사한 고친화성 중화 에피토프에 결합될 수 있음을 입증했다.

[0309] 실시예 14: 에피토프 맵핑(mapping) 실험

[0310] 방법

[0311] Fab의 제조

[0312] 항-CD1d 항체 402.8 및 401.11.165의 Fab는 제조업자의 지시에 따라 Fab 체제 키트 (Pierce)를 사용하여 파파인 분해(Papain digest)에 의해 제조했다. 완전한 Fab는 포스페이트 완충 염수(1X PBS) pH 7.0로 평형화된 단백질 A 칼럼 위로 샘플을 진행시키고, 통과액을 수집하여 단백질을 함유하는 Fc (결정화 가능한 단편)로부터 제거했다. 그 다음에, Fab는 수행용 완충액으로서 1X PBS에 의해 0.5ml/min으로 TSK 겔 G3000SWx1 칼럼 (TOSO)을 사용하여 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석했다. 결과는 Fab가 >95% 순도임을 제시하였다.

[0313] Fab -CD1d 결합 ELISA

[0314] 인간 CD1d에 대한 Fab의 결합을 확인하기 위하여, ELISA를 수행했는데, 여기서 인간 CD1d는 4℃에서 밤새 PBS 중 1.0μg/mL로 Maxisorp 플레이트 (NYNC) 위로 피복시켰다. 그 다음에, 웰은 0.05% Tween-20 (Sigma)을 함유하는 1X PBS와 3개의 별도 세척물로 세척했다. 웰은 실온에서 1시간 동안 플레이트를 PBS 중 1% BSA로 차단시켰다. 이어서, 웰은 상기 기술한 바와 같이 1X PBS로 세척했다. 그 다음에, Fab 또는 전장 항체의 적정은 10μg/mL의 농도로부터 시작하여 수행했고, 플레이트에 대해 1:4로 희석을 수행했다. PBS만의 대조군이 포함되었다. 플레이트는 실온에서 1시간 동안 배양한 다음, 웰을 앞서 기술한 바와 같이 세척했다. 웰당 100 μL의 2차 항체 (염소 항-인간 카파 F+B HRP 접합체, Invitrogen)를 1X PBS 중 1:2000의 희석액으로 가하고, 실온에서 1시간 동안 배양한 다음, 웰은 전술한 바와 같이 세척했다. 50 μL의 TMB (Sigma)를 가하고, 플레이트는 색상 발현까지 배양시켰다. 반응은 각각의 웰에 50 μL의 1M HCl을 가하여 정지시켰다. 흡광도는 450 nm에서 판독하였다 (620 nm에서 참조).

[0315] H/D 교환 실험

[0316] 인간 CD1d는 12.8 μM의 농도로 1X PBS (pH 7)로 희석시켰다. 그 다음에, 14.1 μM의 농도로 402.8 또는 401.11.165의 Fab 단편과 혼합했다. 이 용액 14 μL를 26 μL의 D2O 중 50mM 포스페이트 pH 7과 혼합했다 (여기서, D는 중수소임). 별도의 용액을 제조하고, 23℃에서 30, 100, 300 또는 1000초 동안 배양시켰다. 배양 기간이 끝날 무렵, 20 μL의 2M 우레아, 1M TCEP pH 3.0를 각각의 용액에 가했다. 이어서, 샘플은 H2O 중 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA)으로 200 μL/min으로 고정화 펌프를 통과시켰다. 펌프 단편을 역상 트랩 칼럼 위로 부하하고, 3분 동안 H2O 중 0.05% TFA로 탈염시켰다. 펩티드는 23분에 걸쳐 95% 아세토니트릴, 5% H2O, 0.0025% TFA를 포함하는 13% 내지 35% 완충액의 선형 구배로 C18 칼럼에 의해 분리시켰다. 그 다음에, 펩티드는 프로파일 형태로 질량분석법에 의해 분석했다. 완전히 중수소화된 대조군 샘플은 D2O에서 32.2 μL의 0.615mg/mL CD1d와 59.8 μL의 100mM TCEP를 혼합하여 제조하였고, 3시간 동안 60℃에서 배양시킨다.

[0317] CD1d 뮤테인 ELISA

[0318] 모든 용액은 50 μL/웰로 가했다. CD1d (야생형) 및 관련 작제물(예: 아미노산 치환된 뮤테인 또는 CD1d)을 4℃에서 밤새 PBS 중 1μg/mL로 96-웰 Maxisorp ELISA 플레이트 (NUNC) 위로 피복시켰다. 그 다음에, 웰은 세척용 완충액(PBS + 0.05% Tween-20)으로 3회 세척했다. 플레이트는 3회 세척하기 전에 차단용 완충액(PBS + 1% BSA)으로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 항체 희석제 중 항체(PBS + 1% BSA + 0.05% Tween-20)는 10μg/ml로부터 시작하여 1/2 로그 적정으로 웰에 가했고, 어떠한 항체 (0μg/ml)도 네가티브 대조군으로서 포함되지 않았다. 그 다음에, 플레이트는 1시간 동안 실온에서 배양했다. 이어서, 플레이트는 상기 기술한 바와 같이 세척했다. 2차 항체 (HRP-염소 항 인간 IgG (H+L), Invitrogen)는 항체 희석제 중 1:2000의 희석액으로 가하고, 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 세척한 후, 50 μL의 TMB (Sigma)를 각각의 웰에 가했다. 50 μL의 1M HCl을 색상 발색 후 가하여 반응을 정지시켰다. 플레이트의 각 웰의 흡광도는 450 nm에서 판독하였다(620 nm에서 참조).

[0319] 결과:

[0320] 402.8 및 401.11.165의 FAb의 제조

[0321] 파파인 분해를 사용하여, 402.8 및 401.11.165의 FAb를 단리시켰다. 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC)로 측정 한 바와 같이, 작제물은 >95%의 순도를 가졌다. ELISA로 시험한 경우에, FAb는 인간 CD1d에 대한 결합을 유지했다 (도 25).

[0322] H/D 교환 실험

[0323] 상기 기술한 H/D 교환에 대한 방법을 사용하여, FAb로서 항체 402.8 및 401.11.165는 인간 CD1d와 복합체화시킨 다음, D20에서 배양시켰다. 이는 항체가 CD1d에 결합됐고 D20가 접근하지 못하는 위치를 제외하고는, CD1d 분자 상에 중수소가 수소로 교환된다. 별도로, 인간 CD1d는 항체의 부재하에 D2)와 배양시켰다. 두 샘플로부터의 CD1d는 트립신 분해를 한 다음, 질량분석법을 통해 분석했다. FAb 402.8 및 401.11.165의 존재 및 부재하에 교환 실험에서 CD1d의 각 절편 중 중수소화 수준의 차이가 하기 표 22 및 23에 각각 제시되어 있다. 이들 실험에 사용된 CD1d의 세포의 도메인의 서열이 하기 제시되어 있다:

EVQRLFLRLCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTHSWSNDSDTVRSCLKPWSQGTF  
SDQQWETLQHIFRVYRSSFTRDVKEFAKMLRLSYPLELQVSAGCEVHPGNASNNFFH  
VAFQKGDILSFQGTSWPTQEAPLWVNLAIQVLNQDKWTRETQVWLLNGTCTPQFVS  
GLLESGKSELKKQVKPKAWLSRGPSGPGRLLLVCHVSGFYKPKVWVYKWMRGEQE  
QQGTQPGDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSRVKHSSLEGQDIVLYWGGSYT  
SGSLVPRGSGSKRVHHHHHHHHH (서열 확인 번호: 19)

[0324]

## 표 22

FAb 402.8의 존재 및 부재하에 교환 실험에 대한 CD1d의 각 절편 중 중수소화 수준의 차이

| 펩티드 |     | 배양 시간 (s) |      |      |       |      |  | 펩티드 |     | 배양 시간 (s) |     |     |       |     |  |
|-----|-----|-----------|------|------|-------|------|--|-----|-----|-----------|-----|-----|-------|-----|--|
| 시작  | 끝   | 30        | 100  | 300  | 1,000 | 평균   |  | 시작  | 끝   | 30        | 100 | 300 | 1,000 | 평균  |  |
| 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%   |  |     |     |           |     |     |       |     |  |

[0325]

[0326] 평균 ± 표준편차(S.D.) % 중수소 차이는 최저 % 중수소 차이를 갖는 펩티드의 50%에 대해 계산했다. 평균 - 3 S.D.보다 낮은 값이 유의한 것으로 고려되었다. 데이터 세트에 대한 평균(50%) - 3 S.D. % 중수소 차이는 0%였다. 402.8과 복합체 형성시 가장 크게 보호된 영역을 갖는 CD1d 서열은 다음과 같았다:

[0327] 서열 번호 116의 89-95 - LSYPLEL



[0328] 서열 번호 116의 141-142 - NL

표 23

FAb 401.11.165의 존재 및 부재하에 교환 실험에 대한 CD1d의 각 절편 중 중수소화 수준의 차이

| 펩티드 |     | 배양 시간 (s) |      |      |       |      |  | 펩티드 |     | 배양 시간 (s) |     |     |       |     |  |
|-----|-----|-----------|------|------|-------|------|--|-----|-----|-----------|-----|-----|-------|-----|--|
| 시작  | 끝   | 30        | 100  | 300  | 1,000 | 평균   |  | 시작  | 끝   | 30        | 100 | 300 | 1,000 | 평균  |  |
| 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%  |  |

[0329]

[0330] 401.11.165에 대한 것과 유사하게, 평균  $\pm$  표준편차(S.D.) % 중수소 차이는 최저 % 중수소 차이를 갖는 펩티드의 50%에 대해 계산했다. 평균 - 3 S.D.보다 낮은 값이 유의한 것으로 고려되었다. 데이터 세트에 대한 평균 (50%) - 3 S.D. % 중수소 차이는 -5%였다. 401.11.165와 복합체 형성시 가장 크게 보호된 영역을 갖는 CD1d 서열은 다음과 같았다:

[0331] 서열 번호 116의 89-94 - LSYPLE

[0332] 서열 번호 116의 141-142 - QGTSWEPTQEAPLWVNL

[0333] 상이한 1급 아미노산 서열을 가짐에도 불구하고, 401.11.165 및 402.8은 인간 CD1d에 결합된 경우에, 분자의 유사한 영역을 보호한다. 에피토프로서 총괄적으로 공지된 이들 영역은 서열 LSYPLE (서열 번호 116의 89-94) 주위에 CD1d의 영역을 포함한다. 영역 QGTSWEPTQEAPLWVNL (서열 번호 116의 126-142)도 또한 상기 H/D 교환 실험에서 보호되며, 이러한 보다 큰 영역 내에 몇몇 아미노산, NL (서열 번호 116의 141-142)이 상당히 보호된다.

[0334] 인간 CD1d 상에 서열 LSYPLE (서열 번호 116의 89-94) 및 NL (서열 번호 116의 141-142)이 기술된 항-CD1d 항체의 결합에 대해 중요한 지를 확인하기 위하여, 일련의 CD1d 작제물을 생성했다. 이들 작제물이 도 26에 제시되어 있고, 하기에 기술되어 있다:

[0335] · hCD1dmu (서열 번호 119) - 위치 87 내지 93번 (LRLSYPL)과 141 내지 143번 (NLA) 사이에 위치한 아미노산이 인간 CD1d에 따라 넘버링된 위치를 갖는 쥐과동물 CD1d 서열 (각각 MSPKEDYPI 및 DLP) (서열 번호 116)로 치환된 인간 CD1d.

[0336] · mCD1dhu (서열 번호 118) - 위치 85 내지 93번 (MSPKEDYPI)과 141 내지 143번 (DLP) 사이에 위치한 아미노산이 쥐과동물 CD1d에 따라 넘버링된 위치를 갖는 인간 CD1d 서열 (각각 LRLSYPL 및 NLA) (서열 번호 117)로 치환된 쥐과동물 CD1d.

[0337] 모든 CD1d 작제물은 HEK-293E 세포에서 발현되었고, ELISA 포맷으로 인간 또는 마우스 CD1d에 대한 폴리클로날



항체에 의해 검출되었다. 인간 CD1d, 마우스 CD1d, mCD1dhu 및 hCD1dmu를 ELISA 플레이트 위로 코팅시키고, 이들 CD1d 작제물에 대한 항체 402.8 및 401.11.158의 결합을 측정했다. 두 항체는 인간 CD1d에 결합했지만, 마우스 CD1d에는 결합되지 못했다 (도 27). 그들은 모두 인간 서열이 도입된 마우스 (mCD1dhu)에 결합되었고, 이들 인간 서열 아미노산은 인간 CD1d에 대한 항체의 결합에 대해 중대함을 나타낸다 (도 27). 마찬가지로, 인간 CD1d 상에 이들 아미노산이 상응하는 위치에서 마우스 서열에 의해 치환된 경우 (hCD1dmu), 항체는 더이상 이 CD1d 작제물에 결합되지 못했다 (도 27). 함께 고려해 보면, 이들 결과는 89-95번과 141-143번 사이에 인간 CD1d의 서열이 이들 항-CD1d 항체가 결합되는 에피토프 내에 존재함을 나타낸다.

[0338] 총괄적으로 이들 영역은 항-CD1d 항체가 인간 CD1d에 결합되는 가능한 결합 부위 또는 에피토프를 형성한다. 이 영역을 인간 CD1d의 X-선 결정 구조에 대해 분석하는 경우에 (예: 3HJ: PDB 데이터베이스), 이들 개개 영역이 1차 아미노산 서열 면에서 멀지라도, 그들은 단백질의 3차 구조로 서로 아주 근접하게 위치함을 알 수 있다 (도 28a). LSYPLE (89-94) 및 NL (141-142)은 모두 CD1d 내에 존재하고, NKT 세포 수용체에 대한 지질의 제시를 용이하게 하는 알파 나선형 위에 또는 그에 대해 위치한다. 이 에피토프는 인간 CD1d에 대한 NKT 세포 수용체  $\beta$ -쇄의 결합 부위와 아주 근접하게 위치한다 (도 28b). CD1d 상의 이 위치에 결합하는 항체는 CD1d-NKT 세포 수용체  $\beta$ -쇄 상호작용을 경쟁하고 억제할 수 있다. 상기 억제는 CD1d 및 NKT 세포 수용체 복합체의 형성을 방지하므로, NKT 세포의 하루 활성화를 방지한다.

[0339] **실시예 15: 사이노물구스 원숭이에서 천식의 돼지 회충(*Ascaris suum*) 모델**

[0340] 항-CD1d 항체의 효능은 천식인 사이노물구스 마카쿠 모델에서 검사했다. 이 프로토콜에서, 동물은 선충류 기생충 돼지 회충으로 감염화시키고, 에어로솔화된 돼지 회충 추출물로 챌린지하여 인간에서 급성 천식 악화의 병인론을 근사하게 모의하는 방법으로 급성 기관지 수축, 폐 호산구성 염증 및 기도 과반응성을 유도했다. 상기 프로토콜은 기술되어 왔다 (Hart, T. et al., (2001) J Allergy Clin Immunol 108:250-257). 이 모델은 점막세포 과형성, 상피하부 섬유증, 기저 세포막 비후화(basement cell membrane thickening) 및 메타콜린에 대한 지속적인 기준 과반응성을 포함한, 많은 만성 인간 천식의 특성을 특징으로 한다. 항체 치료는 돼지 회충 추출물로 챌린지하기 전에 제공되고, 기도 저항 및 폐탄성(compliance)에 대한 치료 효과, PC50, PC02 및 O2 수준, 혈청 IgE 및 기관지폐포세척요법(BAL) 측정치, 예를 들면, IL-4, IL-5 & IL-13 농도 및 백혈구 서브셋(예: 호중구, 호산구, 비만세포 호염기구 및 림프구)의 빈도를 평가할 수 있다.

[0341] **실시예 16: 폐 염증의 대안적 동물 모델**

[0342] *기도 과-반응성의 레서스 마카쿠(Rhesus Macaque) 모델*

[0343] 항-CD1d 항체의 효능 및 안전성은 기도 과반응 모델에서 시험할 수 있다. 예를 들면, 기도 과반응성은 집먼지 진드기 항원 [큰다리먼지진드기(*Dermatophagoides farninae*)로부터]을 이용한 순차적 챌린지에 의해 레서스 마카쿠 (*Macaca mulatta*)에서 유도할 수 있다 (Seshasayee, D., et al., 2007 J Clin Invest 117, 3868-78). 기침, 빠른 얹은 호흡 및 증가된 기도 저항을 특징으로 하는 천식 악화는 집먼지 진드기 추출물을 이용한 챌린지에 의해 유도한다. 증상은 약물학적 개입, 예를 들면, 알부테롤 에어로솔 치료에 의해 반전될 수 있다. 폐 기능, 예를 들면, 메타콜린 챌린지에 대한 반응으로 기도 저항 및 동적 폐저항을 측정할 수 있다. 항체 치료는 집먼지 진드기 항원에 의한 재-챌린지 전에 제공되며, 메타콜린 챌린지에 의해 측정되는 바와 같이 폐 기능을 평가한다.

[0344]  *$\alpha$ GalCer에 의해 유도되는 기도 과-반응성의 사이노물구스 마카쿠 모델에서 항-CD1d 항체의 평가*

[0345] 항-CD1d 항체의 효능 및 안전성은 기술된 기도 과반응성의 사이노물구스 마카쿠 모델을 사용하여 시험할 수 있다 (Matangkasombut, P., et al., 2008 J Allergy Clin Immunol, 121, 1287-9). 이 모델에서, 돼지 회충으로 감염시킨 사이노물구스 마카쿠에 폐 분무기를 통해 특정 NKT 세포 효능제  $\alpha$ -갈락토실세라미드( $\alpha$ -GalCer)를 투여했다.  $\alpha$ GalCer 치료는 상기 기술된 바와 같은 메타콜린 챌린지에 의해 측정된 바와 같이, 기도 과반응성을 유도한다.

[0346] 항체 치료는  $\alpha$ GalCer에 의한 재-챌린지 전에 제공되며, 폐 기능은 메타콜린 챌린지에 의해 평가한다. 또한, 기관지폐포세척요법(BAL) 유체 샘플은 기도 염증과 관련된 매개체의 존재에 대해 분석하며, 예를 들면, BAL 중 IL-4, IL-5 및 IL-13의 농도를 평가할 수 있다. 더욱이, BAL 중 세포 침윤물은 표준 임상 병리학 기술, 예를 들면, 자동화 혈액학 분석기 (예: Advia systems)를 사용하는 세포 분석에 의해 검사하여 주요 백혈구 서브셋(예: 호중구, 림프구, 호산구, 비만 세포 및 호염기구)의 상대적인 빈도를 측정한다.

[0347] **실시예 17: NKT 세포에 의해 유도된 대장염 동물 염증 모델**

[0348] *케양성 대장염*

[0349] 항-CD1d 항체의 효능 및 안전성은 다양하게 기술된 인간 염증성 장 질환의 모델에서 시험한다 (Wirtz et al., Nat Protoc 2: 541-546, 2007). 예를 들면, 옥사졸론의 직장내 투여는 조직학적으로 인간 케양성 대장염을 닮았고, 또한 설사, 잠혈, 체중 손실 및 경우에 따라 직장 탈출증을 특징으로 하는 국부 케양화 및 염증을 유도한다. 옥사졸론-유도 대장염의 병리학은 NKT 세포에 의해, 특히 IL-13의 NKT-세포 유도 분비를 통해 매개될 수 있으므로, 질환은 항-CD1d 항체를 사용한 치료에 의해 완화시킬 수 있다 (Heller, F., et al. 2002 Immunity 17, 629-638). 이 모델에서, 항체 치료는 대장염 유도의 시작에 수행하고, 체중, 대변 농도(stool consistency), 잠혈 및 결장 모양에 대한 효과를 평가한다.

[0350] 또한, 항-CD1d 항체는 활성화된 ((CD4+CD45RB<sup>high</sup>) T 세포의 입양 전달(adoptive transfer)에 의해 유도되는 쥐과동물 대장염 모델에서 시험한다 (Ostanin, D.V., et al (2009) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296:G135-G146). 이 모델에서, CD4+CD45RB<sup>high</sup> T 세포를 면역결핍 마우스로 전달하여, 체중 손실 및 설사, 전반적인 결장 침윤과 염증, 배상세포 손실 및 결장 상피 증식증을 일으킨다. 항체는 체중 손실 및 설사를 감소시키고, 결장 염증 및 조직학적 변화를 완화하는 그들의 능력에 대해 시험한다.

[0351] 또한, 항-CD1d 항체는 음료수 중 텍스트란 셀레이트 나트륨(DSS)의 투여에 의해 유도된 쥐과동물의 대장염 모델에서 시험한다 (Wirtz et al., Nat Protoc 2: 541-546, 2007). DSS 투여는 부식성 병변 및 염증성 침윤을 특징으로 하는 위장관의 만성화된 전반적인 염증을 유도한다. 증상은 대개 설사, 잠혈, 체중 손실 및 경우에 따라 직장 탈출증을 포함한다. DSS-유도 대장염 모델은 7일 동안 DSS의 투여를 포함하는 급성, 또는 보다 긴 시간 동안 DSS의 투여를 포함하는 만성일 수 있다.

[0352] 항체는 예방학적으로 또는 치료학적으로 시험한다. 예방학적 모델에서, 항체 치료는 DSS 투여 시작시 수행한다. 치료학적 모델에서, 항체 치료는 유도 시행한 지 7일 후 수행한다. 상피 보전성 및 염증성 침윤 정도에 대한 미시적 효과뿐만 아니라, 체중 및 대변 농도에 대한 치료 효과를 측정한다.

[0353] *비알콜성 지방간*

[0354] 항-CD1d 항체는 또한, 예를 들면, 문헌(Takahashi et al (2012) World Journal of Gastroenterology 18(19): 2300-2308)에 기술된 설치류의 비-알콜성 지방간(NASH) 모델에서 시험한다. 예를 들면, C57BL/6 마우스에서, 간 독성 화합물인, 스트렙토조토신(STZ)의 신생아 투여에 이어서, 고-지방 식이로 NASH의 주요 증상의 발병을 유도한다. 다른 예로서, C57BL/6 또는 ob/ob 마우스에 고지방 식이의 제공은 NASH의 유도 및 유지를 유도할 수 있다. 또 다른 예로, NASH가 고지방 식이 + 반복적이고 간헐적인 혈중 산소 감소 스트레스에 의해 래트에서 생성될 수 있다. 이들 모델 중 하나 또는 몇 개에서, 치료한 설치류 중 항-CD1d 항체의 효능은 전체 간 중량, 혈청 아미노트랜스퍼라제 수준, 혈청 트리글리세리드 수준, 혈당 수준에 대한 효과, 간 조직병리학의 개선 및 유전자 발현 패턴에 대한 변화에 의해 결정한다.

[0355] *자가면역성 간 질환*

[0356] 항-CD1d 항체는 또한 동물의 자가면역성 간 질환 모델에서 시험한다. 예를 들면, 마우스에서, 콘카나발린 A(conA)에 의한 정맥내 주사로 유도된 간염이 기술되어 왔다 (Takeda, K. et al. (2000) PNAS 97(10):5498-5503). ConA는 꼬리 정맥을 통해 마우스로 주사한다. 혈청 샘플은 Con A 주사한 지 20시간 후 수득한다. 혈청 아미노트랜스퍼라제 [알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)] 수준은 표준 광도측정 기술을 사용하여 측정한다. 또한, 간 병리학은 간 형태학의 거시적 및 미시적 검사에 의해 평가한다. 항체는 혈청 ALT 및 AST에 대한 효과, 및 간 조직병리학에 대해 평가한다.

[0357] **실시예 18: 결합 단백질의 생성 방법**

[0358] *402.8 또는 401.11 항체를 사용하는 항체 라이브러리로부터 선택*

[0359] 제1 패닝 라운드가 약 100pmol의 항원 밀도 (즉, 비오틴화 CD1d) 및 앞서 기술한 바와 같은 TEA-기본 용출 단계를 사용하여 수행되는 파지 디스플레이 프로토콜이 사용된다. 제2 및 제3 라운드는 감소된 항원 밀도(예: 약 50pmol)를 사용한다. 파지는 10-배 물 과량으로 402.8 또는 401.11 (또는 관련 항체) IgG를 가하고, 실온에서 2, 5, 10 또는 20분 동안 반응물을 배양시켜 용출시킨다. IgG는 402.8/401.11 에피토프에 결합된 FAB를 발현하는 파지를 특이적으로 대체하고 용출시키리라 예상된다. CD1d 표면 위에 다른 영역에 결합된 비-특이적 결합제

및 파지는 이들 조건하에서 덜 용출될 것 같다.

[0360] 세척 방법은 라운드 1 및 2를 위해 M-PBS에 의한 6회 세척을 포함한다. 라운드 3의 경우, 세척은 PBST로 3회 세척한 다음, PBS로 3회 세척한다.

[0361] 용출된 파지는 다른 파지 디스플레이 실험에 대해 기술된 바와 같이 스크리닝을 위한 콜로니의 파지미드 구조 또는 생성을 위해 TG1 이. 콜라이를 감염시키는데 사용된다.

[0362] 합성 CD1d 작제물을 사용한 항체의 선택/생성

[0363] 파지 디스플레이를 위한 패닝 시약으로서 합성 CD1d 작제물(예: hCD1dmu 또는 mCD1dhu)을 사용하여, 402.8 및 401.11에 유사한 에피토프를 인지하는 항체를 수득할 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리는 hCD1dmu (서열 번호 119) (에피토프를 포함하는 주요 아미노산이 그들의 상응하는 쥐과동물 아미노산으로 치환된 인간 CD1d)와 같은 작제물에 의해 CD1d를 인지하는 항체가 고갈될 수 있다. 그 다음에, 라이브러리는 인간 CD1d에 대해 패닝시킬 수 있다. 생성된 단리된 항체는 인간 CD1d의 89 내지 94와 141 및 142 사이의 아미노산 (서열 번호 116)에 결합될 것 같다.

[0364] 면역화 접근법

[0365] CD1d 상에 402.8/401.11 항체 에피토프의 펩티드 또는 단백질 모의가 라이브러리 디스플레이 기술 또는 면역화/하이브리도마 접근법에서 CD1d 대신에 항원으로 사용된다. 예를 들면, 키메릭 CD1d 분자는 다른 마우스 CD1d인 프레임워크에 인간 CD1d의 402.8/401.11 에피토프를 함유하도록 작제된다(예: mCD1dhu) (서열 번호 118). 상기 작제물이 마우스에서 면역원으로서 사용되는 경우에, 면역 반응은 비-쥐과동물 서열 쪽으로 집중되리라 예상된다.

항체 서열 ID 일치도

| 항체         | VH 아미노산<br>(서열 번호) | VH 뉴클레오타이드<br>(서열 번호) | VL 아미노산<br>(서열 번호) | VL 뉴클레오타이드<br>(서열 번호) |
|------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 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                   |
| 402.8      | 3                  | 12                    | 4                  | 13                    |
| 402.8.45   | 7                  | 16                    | 4                  | 110                   |
| 402.8.53   | 8                  | 17                    | 4                  | 111                   |

[0366]

| 항체       | VH 아미노산<br>(서열 번호) | VH 뉴클레오타이드<br>(서열 번호) | VL 아미노산<br>(서열 번호) | VL 뉴클레오타이드<br>(서열 번호) |
|----------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 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                   |

[0367]

다른 서열 설명

| 서열 번호 | 설명                    |
|-------|-----------------------|
| 19    | 인간 CD1d 합성 작제물        |
| 20    | 인간 베타-2-마이크로글로불린      |
| 21    | TCR 알파 채 클론 J3N.5     |
| 22    | TCR 베타 채 클론 J3N.5     |
| 117   | 쥐과동물 CD1d 세포의 도메인 작제물 |
| 118   | mCD1dhu CD1d 합성 작제물   |
| 119   | hCD1dmu CD1d 합성 작제물   |
| 120   | 포워드 프라이머              |
| 121   | 리버스 프라이머              |
| 122   | CD1d 의 89-94          |
| 123   | CD1d 의 126-142        |
| 124   | VH CDR1 (401.11)      |
| 125   | VH CDR1 (402.8)       |
| 126   | VH CDR3 (401.11)      |
| 127   | VH CDR3 (402.8)       |
| 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)       |

[0368]

| 서열확인번호 | 설명                        |
|--------|---------------------------|
| 143    | VL CDR3 (401.11)          |
| 144    | VL CDR3 (402.8)           |
| 145    | VL CDR2 (401.11)          |
| 146    | VL CDR2 (402.8)           |
| 147    | 89-95 of CD1d             |
| 148    | 401.11 VH 컨센서스 서열         |
| 149    | 401.11VL 컨센서스 서열          |
| 150    | 402.8 VH 컨센서스 서열          |
| 151    | 402.8 VL 컨센서스 서열          |
| 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)           |
| 157    | Human CD1d                |
| 158    | 인간 중쇄 IgG1 불변 도메인         |
| 159    | 인간 중쇄 IgG4 불변 도메인         |
| 160    | 인간 중쇄 IgG4 불변 도메인 (S228P) |
| 161    | 인간 경쇄 카파 불변 도메인           |
| 162    | 인간 경쇄 람다 불변 도메인           |

[0369]

# 참조문헌

- 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" OKT3 monoclonal antibody. *J Immunol*, 148, 3461-8.
- AL-LAZIKANI, B., LESK, A. M. & CHOTHIA, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 273, 927-48.
- ANGULO, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346, 1221-31.
- AUSUBEL IN: CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. WILEY INTERSCIENCE, ISBN 047 150338, 1987; CHAPTERS 8 AND 15
- 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-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 9, 582-8.
- 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.
- BENHAR, I. (2007) Design of synthetic antibody libraries. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 763-79.
- 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.
- 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-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol*, 165, 4076-85.
- BORISH, L. C., NELSON, H. S., LANZ, M. J., CLAUSSEN, L., WHITMORE, J. B., AGOSTI, J. M. & GARRISON, L. (1999) Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, 1816-23.
- BRENNAN, P. J., TATTITURI, R. V., BRIGL, M., KIM, E. Y., TULL, 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.
- BRIGL, M. & BRENNER, M. B. (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*, 22, 817-90.
- BRIGL, M., VAN DEN ELZEN, 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.
- CHOTHIA, C. & LESK, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 196, 901-17.
- 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.

[0370]



- 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.
- CUNNINGHAM, B. C. & WELLS, J. A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244, 1081-5.
- 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.
- DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24.
- 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.
- 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.
- 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.
- EXLEY, M. A., WILSON, B. & BALK, S. P. (2010) Isolation and functional use of human NKT cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 11.
- FISHBURN, C. S. (2008) The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *J Pharm Sci*, 97, 4167-83.
- 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.
- GENNARO, ED., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 TH EDITION, MACK PUBLISHING CO. (EASTON, PA.) 1990.
- 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.
- 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.
- HEALTH PROFESSIONAL'S DRUG GUIDE 2001, ED., SHANNON, WILSON, STANG, PRENTICE-HALL, INC, UPPER SADDLE RIVER, N.J.;
- HELLER, F., FUSS, I. J., NIEUWENHUIS, E. E., BLUMBERG, R. S. & STROBER, W. (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*, 17, 629-38.
- 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. &

[0371]

- TSURUSHITA, N. (2004) Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem*, 279, 6213-6.
- HOLGATE, S. T. & POLOSA, R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 8, 218-30.
- HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.
- 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.
- 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. & ET AL. (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 U S A*, 85, 5879-83.
- INNIS, ET AL., PCR PROTOCOLS A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, EDS., ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CALIF. (1990).
- IWAMURA, C. & NAKAYAMA, T. (2010) Role of NKT cells in allergic asthma. *Curr Opin Immunol*, 22, 807-13.
- 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.
- KANDA, Y., YAMADA, T., MORI, K., OKAZAKI, A., INOUE, M., KITAJIMA-MIYAMA, K., KUNI-KAMACHI, R., NAKANO, R., YANO, K., KAKITA, S., SHITARA, K. & SATOH, 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.
- KANEKO, Y., NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313, 670-3.
- 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.
- KOLKMAN, J. A. & STEMMER, W. P. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat Biotechnol*, 19, 423-8.
- KONTERMANN AND DUBEL EDS., ANTIBODY ENGINEERING 2001 SPRINGER-VERLAG. NEW YORK. 790 PP., ISBN 3-540-41354-5
- KOPSIDAS, 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.
- KOTSIANIDIS, I., NAKOU, E., SPANOUDAKIS, E., BOUCLIOU, 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.
- KYRIAKAKIS, E., CAVALLARI, M., ANDERT, J., PHILIPPOVA, M., KOELLA, C., BOCHKOV, V., ERNE, P., WILSON, S. B., MORI, L., BIEDERMANN, B. C.,

[0372]

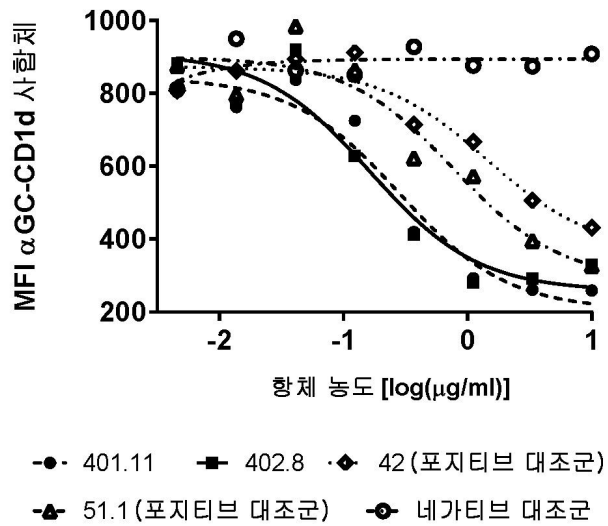
- RESINK, T. J. & DE LIBERO, G. (2010) Invariant natural killer T cells: Linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis. *Eur J Immunol*.
- LISBONNE, M., DIEM, S., DE CASTRO KELLER, A., LEFORT, J., ARAUJO, L. M., HACHEM, P., FOURNEAU, J. M., SIDOBRE, S., KRONENBERG, M., TANIGUCHI, M., VAN ENDERT, P., DY, M., ASKENASE, P., RUSSO, M., VARGAFTIG, B. B., HERBELIN, A. & LEITE-DE-MORAES, M. C. (2003) Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol*, 171, 1637-41.
- 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. & ET AL. (1991) Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J Immunol*, 147, 2657-62.
- MARKS, J. D. & BRADBURY, A. (2004) Selection of human antibodies from phage display libraries. *Methods Mol Biol*, 248, 161-76.
- 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.
- 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.
- MORRISON, S. L. (1985) Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science*, 229, 1202-7.
- MURDOCH, J. R. & LLOYD, C. M. (2010) Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*, 690, 24-39.
- NURSING 2001 HANDBOOK OF DRUGS, 21 ST 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.
- PADLAN, E. A., ABERGEL, C. & TIPPER, J. P. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies. *Faseb J*, 9, 133-9.
- 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.
- 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 beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity*, 31, 47-59.
- PETKOVA, S. B., AKILESH, S., SPROULE, T. J., CHRISTIANSON, G. J., AL KHABBAZ, 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.
- PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 52 ND ED., MEDICAL ECONOMICS, MONTVALE, N.J. (1998)

[0373]

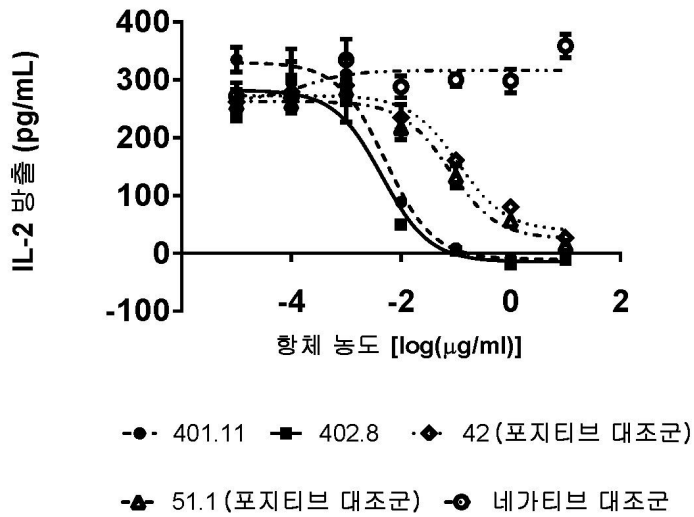
- PICHAVANT, M., GOYA, S., MEYER, E. H., JOHNSTON, R. A., KIM, H. Y., MATANGKASOMBUT, P., ZHU, M., IWAKURA, Y., SAVAGE, P. B., DEKRUYFF, R. H., SHORE, S. A. & UMETSU, D. T. (2008) Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med*, 205, 385-93.
- POLJAK, R. J. (1994) Production and structure of diabodies. *Structure*, 2, 1121-3.
- 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 interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 10029-33.
- REINHARDT, C. & MELMS, A. (1999) Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis. *Neurology*, 52, 1485-7.
- SANTODOMINGO-GARZON, T. & SWAIN, M. G. Role of NKT cells in autoimmune liver disease. *Autoimmun Rev*, 10, 793-800.
- SAUBERMANN, L. J., BECK, P., DE JONG, 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
- 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., SEEGER, S., FUENTES, M. E., LABRIUN, A. F., GRAUS, Y. M., MILLER, L. A., SCHEGLE, E. S., HYDE, D. M., WU, L. C., HYMOWITZ, S. G. & MARTIN, F. (2007) In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest*, 117, 3868-78.
- 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.
- SMITH, L. J., REDFIELD, C., BOYD, J., LAWRENCE, G. M., EDWARDS, R. G., SMITH, R. A. & DOBSON, C. M. (1992) Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein. *J Mol Biol*, 224, 899-904.
- 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.
- SYN, W. K., OO, Y. H., PEREIRA, T. A., KARACA, G. F., JUNG, Y., OMENETTI, A., WITEK, R. P., CHOL, 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.
- TAKAHASHI, Y., SOEJIMA, Y. & FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18, 2300-8.
- TAKEDA, K., HAYAKAWA, Y., VAN KAER, 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 U S A*, 97, 5498-503.
- 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
- TERHORST, C., VAN AGTHOVEN, A., LECLAIR, K., SNOW, P., REINHERZ, E. & SCHLOSSMAN, S. (1981) Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10. *Cell*, 23, 771-80.
- THIE, H., VOEDISCH, B., DUBEL, S., HUST, M. & SCHIRRMANN, T. (2009) Affinity maturation by phage display. *Methods Mol Biol*, 525, 309-22, xv.
- VAN AGTHOVEN, A. & TERHORST, C. (1982) Further biochemical characterization of the human thymocyte differentiation antigen T6. *J Immunol*, 128, 426-32.
- VENKATASWAMY, M. M. & PORCELLI, S. A. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol*, 22, 68-78.
- 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-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood*, 114, 667-76.
- WANG, W., SINGH, S., ZENG, D. L., KING, K. & NEMA, S. (2007) Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci*, 96, 1-26.
- 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.
- WELLS et al., ed., 1990; Pharmacotherapy Handbook, Appleton & Lange, Stamford, Conn.,
- WILLIAMS & WILLIAMS, (1995), Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed.,
- WIRTZ, S., NEUFERT, C., WEIGMANN, B. & NEURATH, M. F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2, 541-6.

도면

도면1



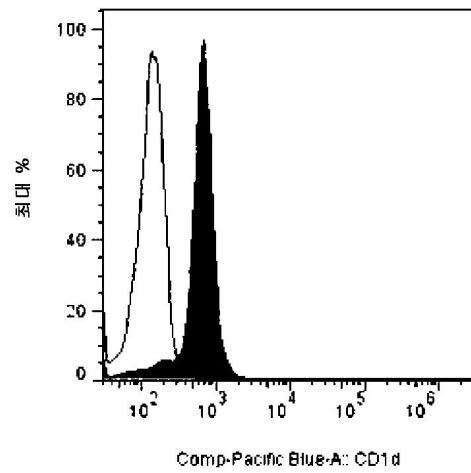
도면2





도면3

## 인간 CD11c-포지티브 PBMC



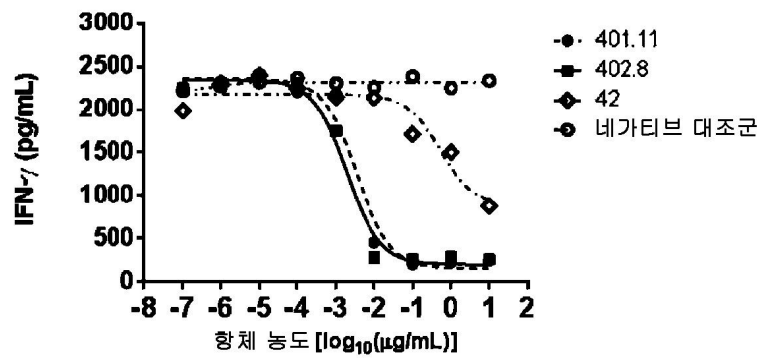
□ 네가티브 대조군

■ 항-CD11c 402.8

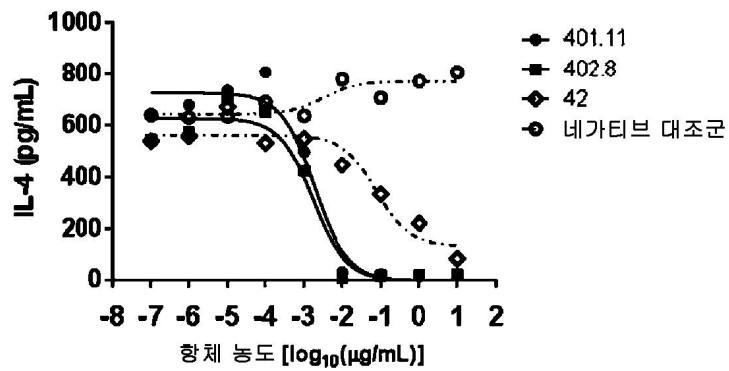
도면4a

(패널 A 및 B)

**A**

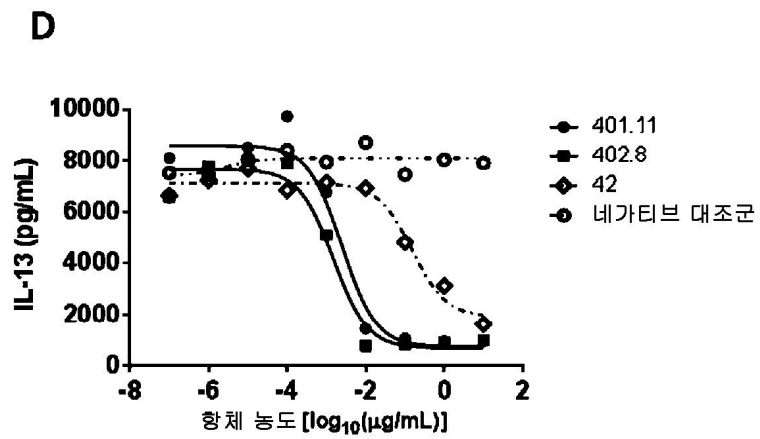
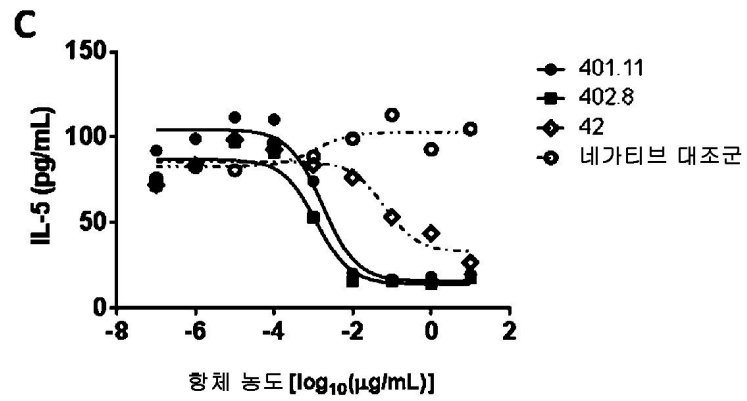


**B**



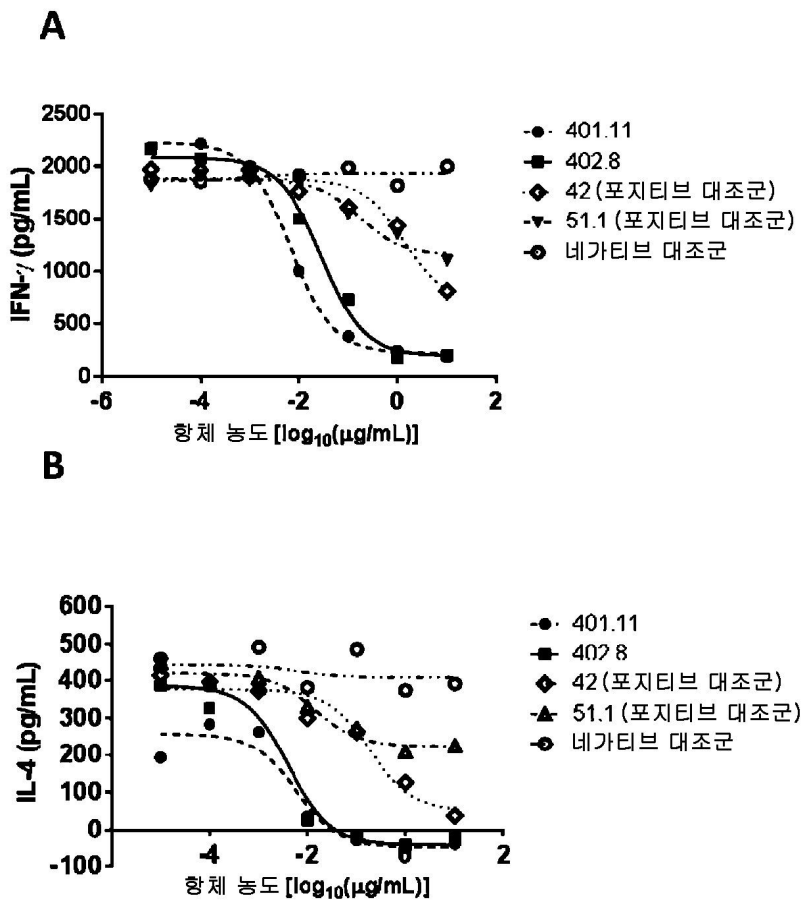
도면4b

(패널 C 및 D)



도면5a

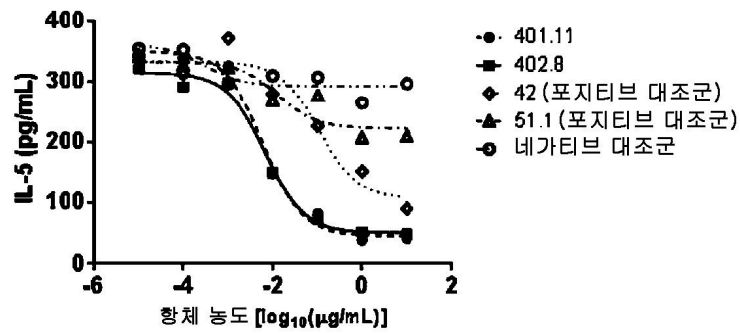
(패널 A 및 B)



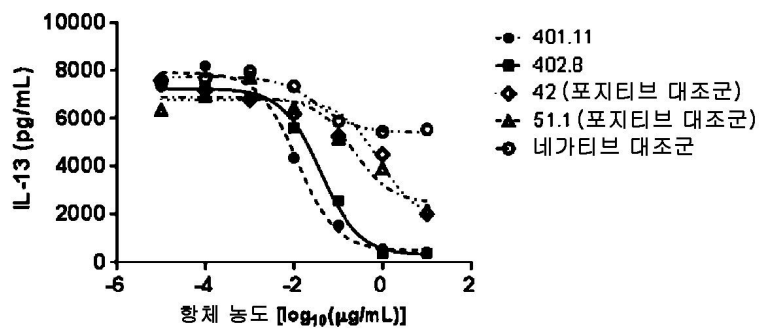
도면5b

(패널 C 및 D)

C



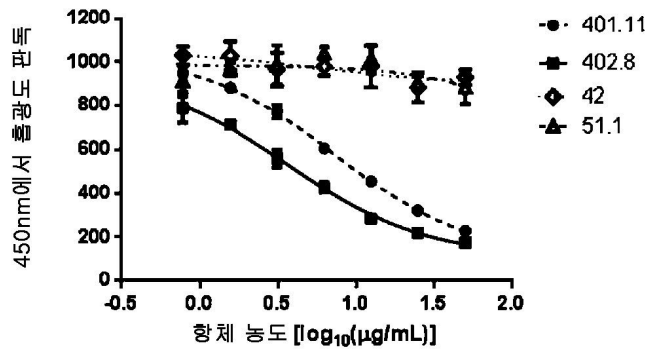
D



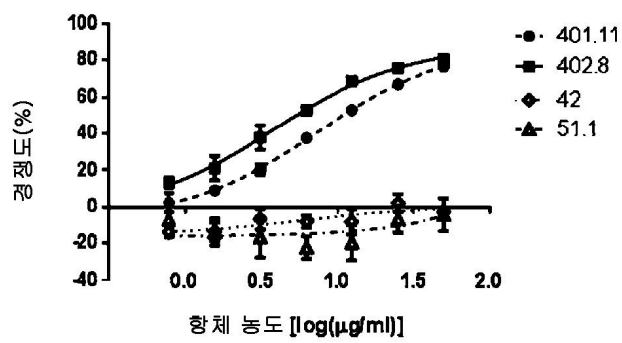


도면6

A

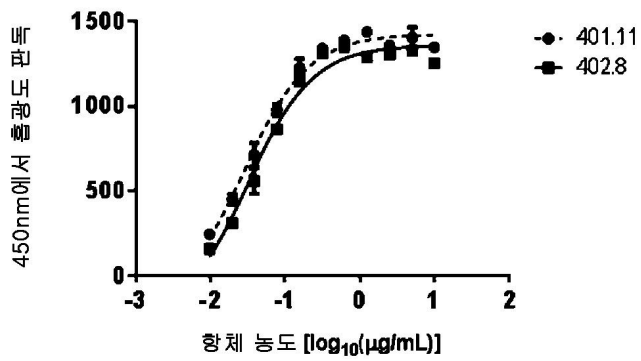


B

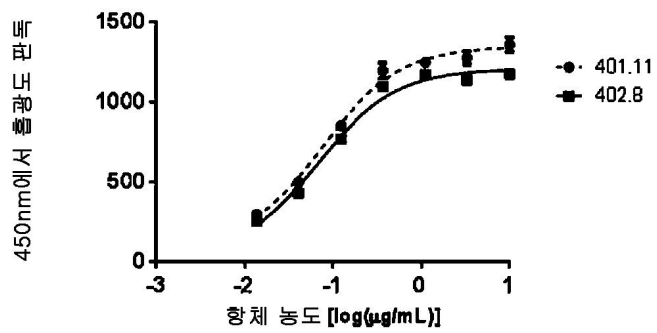


도면7

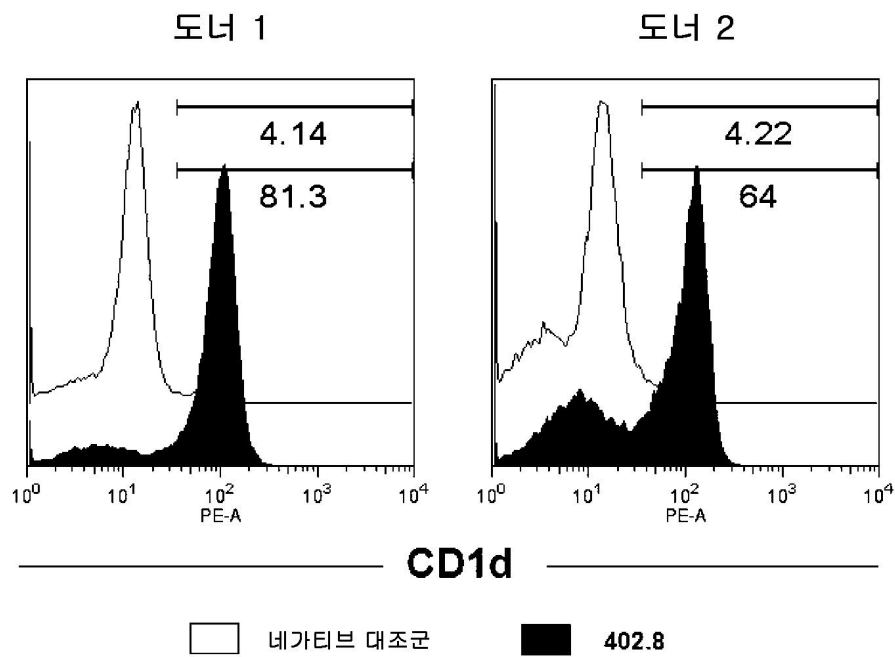
A



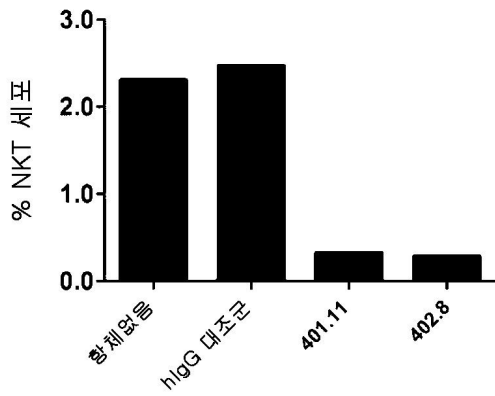
B



도면8



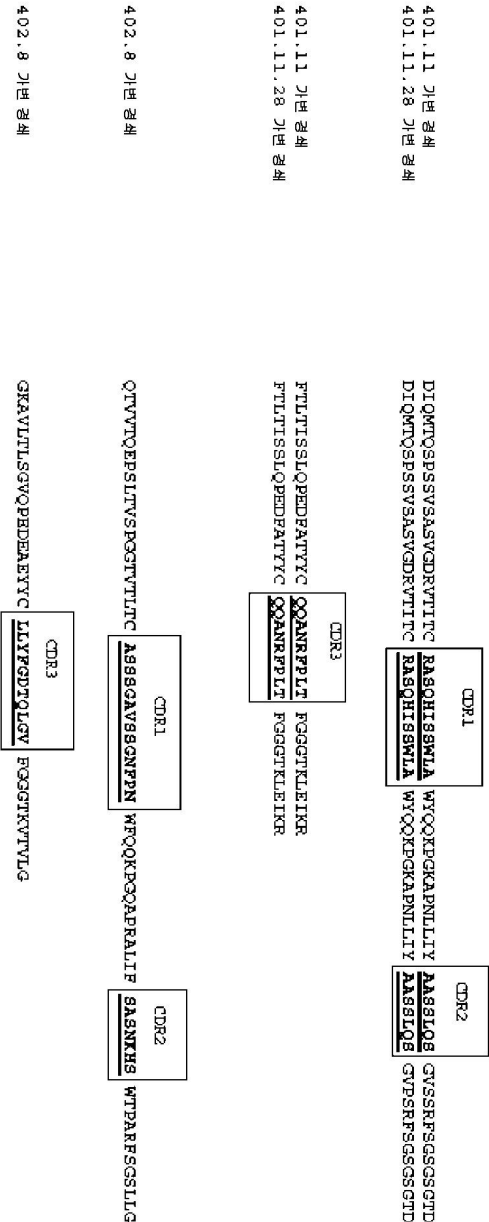
도면9



도면10

|                 |                              |                  |                 |                    |       |
|-----------------|------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|-------|
| 402.8 가변 중쇄     | QVQLQESGPGGLVPRSETLSLTCAVY   | GSGFSEGYWYS      | WIROPKPGKLEWIG  | EINHGSGNNYPSLKS    | RVTIS |
| 402.8-45 가변 중쇄  | QVQLQESGPGGLVPRSETLSLTCAVY   | GSGFSEGYWYS      | WIROPKPGKLEWIG  | EINHGSGNNYPSLKS    | RVTIS |
| 402.8-53 가변 중쇄  | QVQLQESGPGGLVPRSETLSLTCAVY   | GSGFSEGYWYS      | WIROPKPGKLEWIG  | EINHGSGNNYPSLKS    | RVTIS |
| 402.8-60 가변 중쇄  | QVQLQESGPGGLVPRSETLSLTCAVY   | GSGFSEGYWYS      | WIROPKPGKLEWIG  | EINHGSGNNYPSLKS    | RVTIS |
| 402.8 가변 중쇄     | VDTSKNQSFSLKLSVTADPAVYYCAR   | GEIYIDPWSYNDVY   | WKGKTTVWSS      |                    |       |
| 402.8-45 가변 중쇄  | VDTSKNQSFSLKLSVTADPAVYYCAR   | GEIYIDPWSYNDVY   | WKGKTTVWSS      |                    |       |
| 402.8-53 가변 중쇄  | VDTSKNQSFSLKLSVTADPAVYYCAR   | GEIYIDPWSYNDVY   | WKGKTTVWSS      |                    |       |
| 402.8-60 가변 중쇄  | VDTSKNQSFSLKLSVTADPAVYYCAR   | GEIYIDPWSYNDVY   | WKGKTTVWSS      |                    |       |
| 401.11 가변 중쇄    | QVQLVSGGGGLVPRKRSILTSCAAS    | GETFEDYDYAMH     | WYRQAPKPGKLEWYA | TIINNSALITIGADSYNG | RFTVY |
| 401.11-28 가변 중쇄 | QVQLVSGGGGLVPRKRSILTSCAAS    | GETFEDYDYAMH     | WYRQAPKPGKLEWYA | TIINNSALITIGADSYNG | RFTVY |
| 401.11 가변 중쇄    | SRDIAKNSIYLQNNMSLRADPAIYYCAK | DMGSSSGGPGPGTSDS | WQGGTIVTVSS     |                    |       |
| 401.11-28 가변 중쇄 | SRDIAKNSIYLQNNMSLRADPAIYYCAK | DMGSSSGGPGPGTSDS | WQGGTIVTVSS     |                    |       |

도면11



도면12

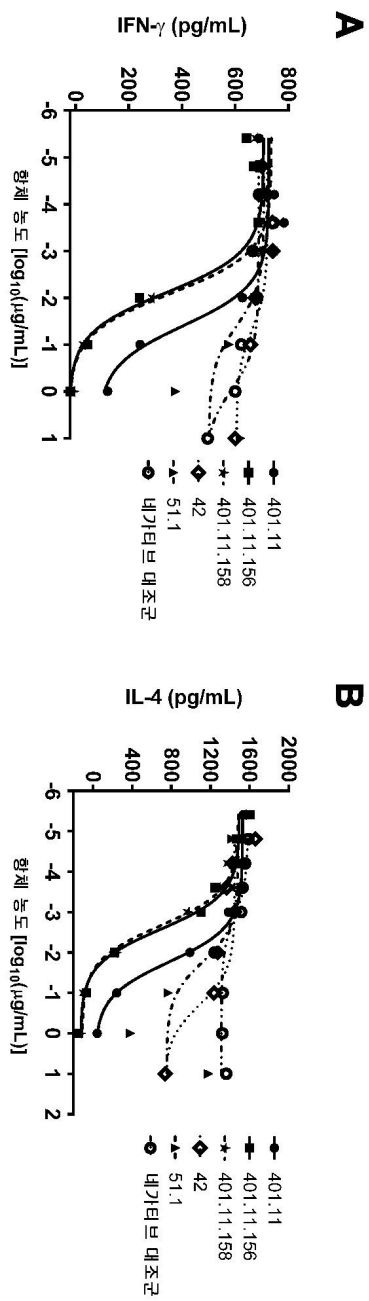
|             |                                                                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 중세          |                                                                                                                        |
| 401.11      | QYQYVSGSGLVYKGRSLRLSCASGFTFYDYAMHTFQAPKAKLEMYVATITNSXITGJNDSYKGRFTYSDNARKSLITLQNNSLRANEMALYCAKMGSSGCTPDJIFDSWQOSTLYTSS |
| IGRV9-9.01  | E...E...Q...SG.S...GS...TI...T...                                                                                      |
| 401.11.15   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.16   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.17   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.18   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.19   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.20   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.21   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.22   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.23   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.24   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.25   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.26   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.27   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 401.11.28   | E...E...Q...TI...                                                                                                      |
| 경색          |                                                                                                                        |
| 401.11      | DIQWQSPSASAEVDRVTITTCFASQHSWLAWYQCKPKAPMLTYAASLSQGVSRFSRSGSGTDFTLHLSIQPEDFATYVYQQANFPPLTRGGGRRLIK                      |
| IGRV1-12.01 | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.15   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.16   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.17   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.18   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.19   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.20   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.21   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.22   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.23   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.24   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.25   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.26   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.27   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |
| 401.11.28   | ...G...K...P...S...-----                                                                                               |



도면13

|    |            |                                                                                                                             |
|----|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 중해 | 401.11     | QVQIVS939ELVFKRSILRLSCAS9FTTDDYAMHWYQAPGKGLBMVATIIWNSAII3YADSVKGRFIVSRDANKNSLYIQNNISJPAEDNALLYCANDKCSS9GCPDXYPDSWQ9TTLVTVSS |
|    | 401.11.151 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.152 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.153 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.154 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.155 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.156 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.157 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.158 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.159 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.160 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.161 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.165 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.166 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.167 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.177 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.178 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.179 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.180 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
|    | 401.11.181 | B...B...Q.....T.....                                                                                                        |
| 경해 | 401.11     | DICMTQSPBSVSASVGDENVTLITGRASCHISSWLAWYQCKFKAPPLILYVASSIQSGVSRPSGSGTDPITLITISLQPEDFATYQOQANRPLTPG99TILRLK                    |
|    | 401.11.151 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.152 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.153 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.154 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.155 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.156 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.157 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.158 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.159 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.160 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.161 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.165 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.166 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.167 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.177 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.178 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.179 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.180 | .....K.....P.....                                                                                                           |
|    | 401.11.181 | .....K.....P.....                                                                                                           |

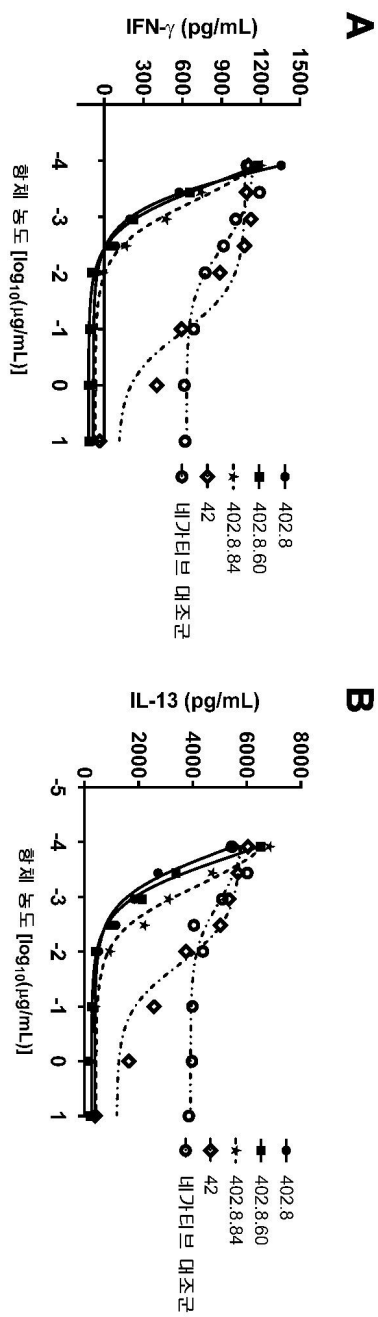
도면14



도면15

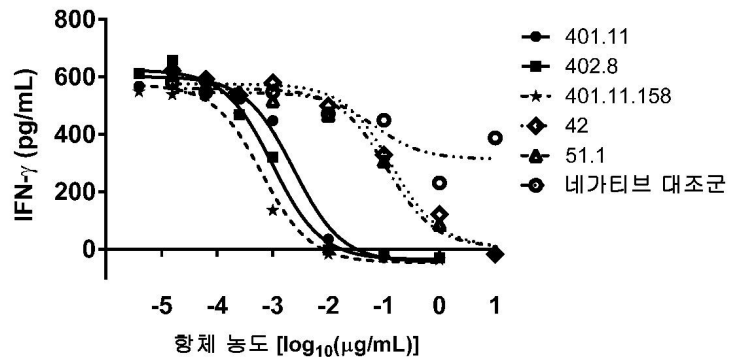
|          |                                                                                                                     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 402.8    | QVQLOBSGPELVRPSFTLSLITCAVYGSPSGYWMIRQPPGKLEMLGIBINSGSTNYPNPKSRPTISVDTSKNQPSLKLSTVTAADTAVYCARGHIYDPWNSYMDWNGKGTIVTWS |
| 402.8.53 | .....K.....A.....K.L.....                                                                                           |
| 402.8.54 | .....K.....A.....K.R.....                                                                                           |
| 402.8.55 | .....K.....A.....K.LB.....                                                                                          |
| 402.8.60 | .....K.....A.....Y.....                                                                                             |
| 402.8.84 | .....K.....A.....YK.L.....                                                                                          |
| 402.8.86 | .....K.....A.....Y.....                                                                                             |
| 402.8.87 | .....K.....A.....YK.....                                                                                            |

도면16

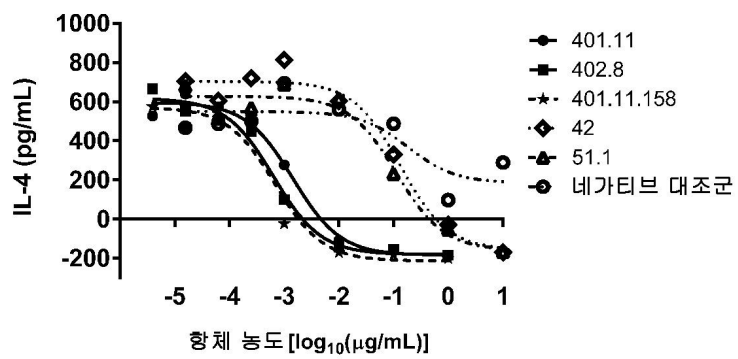


도면17

A

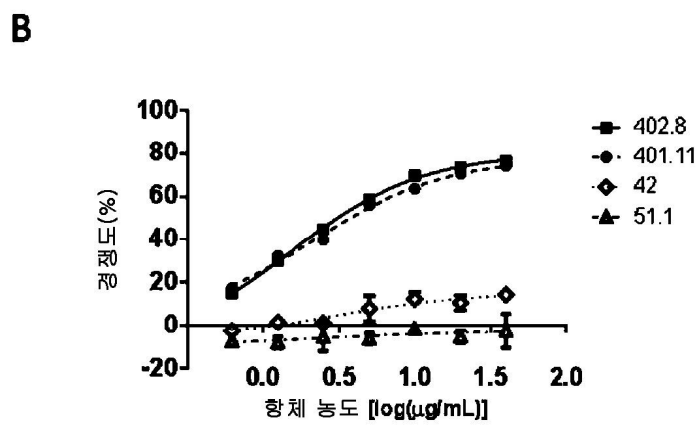
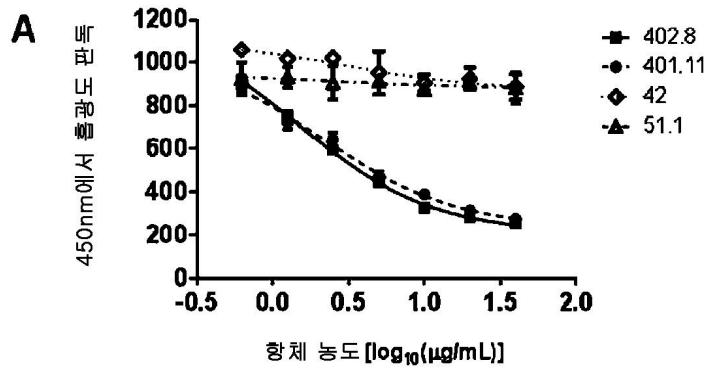


B



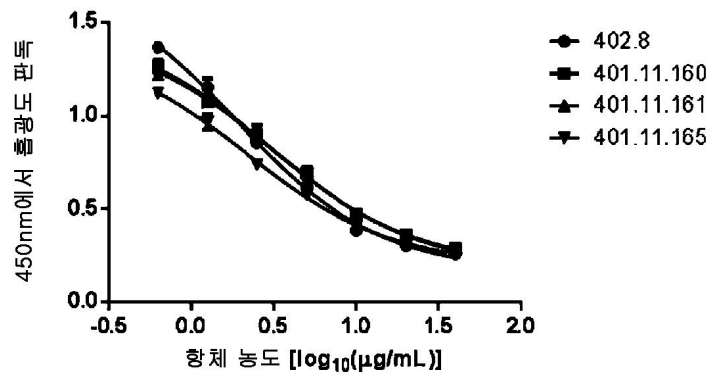


도면18

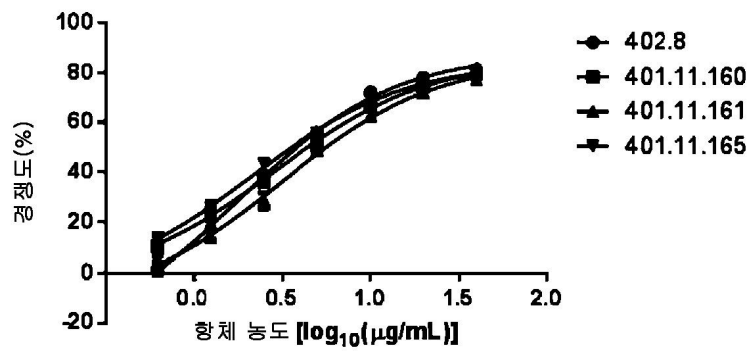


도면19

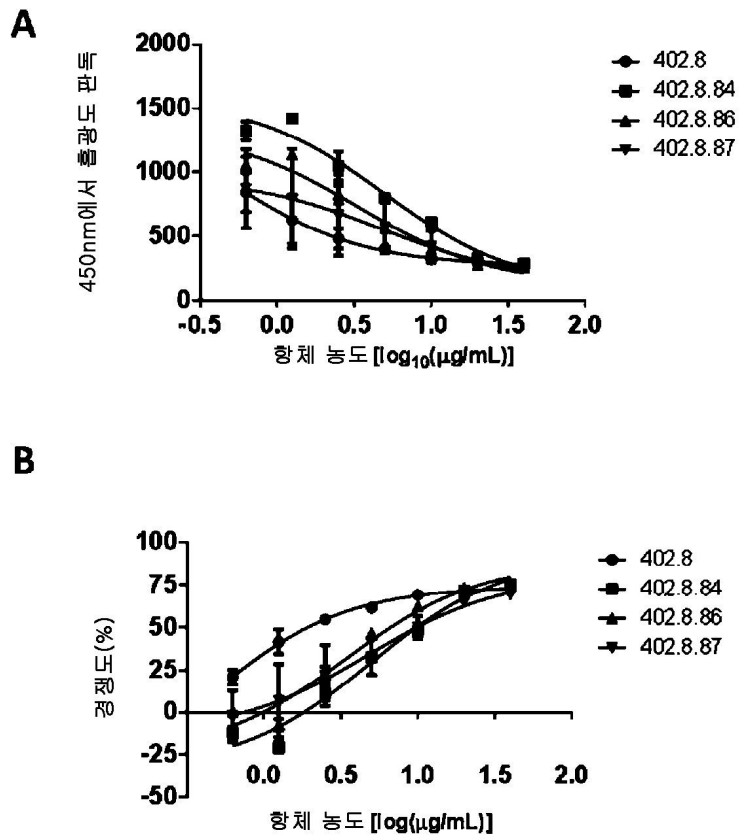
**A**



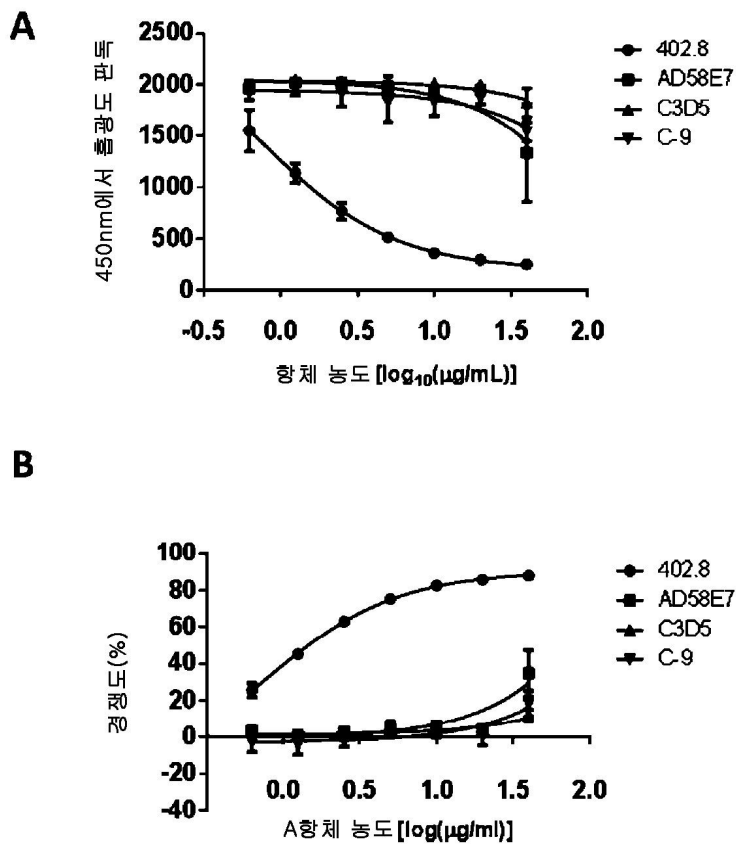
**B**



도면20

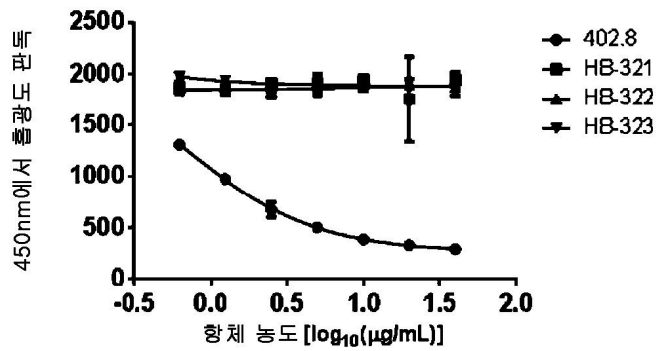


도면21

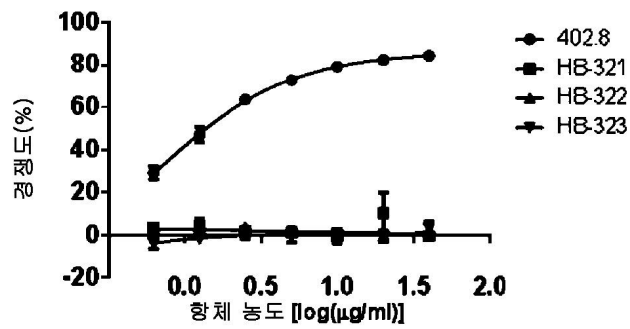


도면22

A

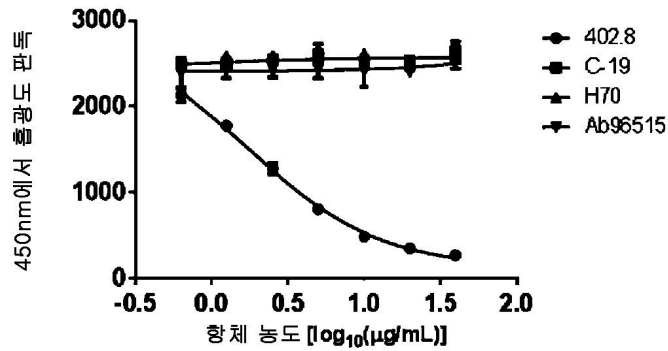


B

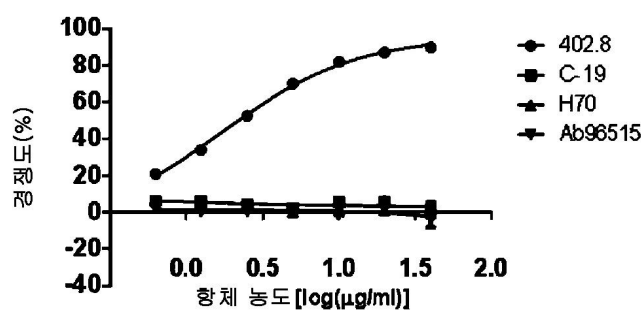


도면23

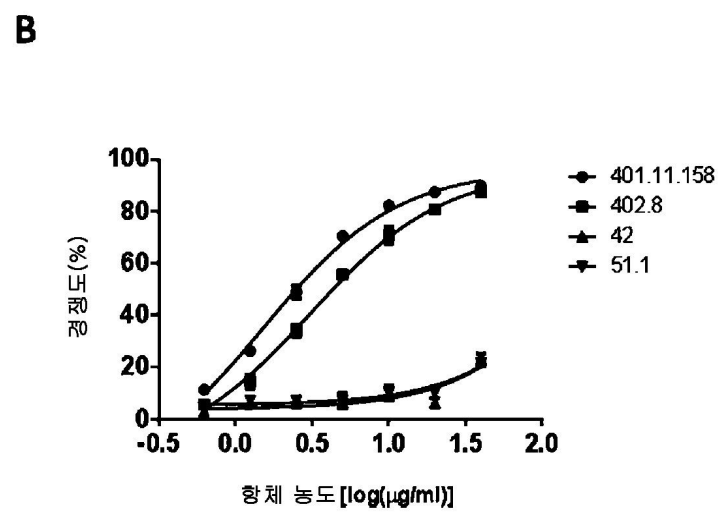
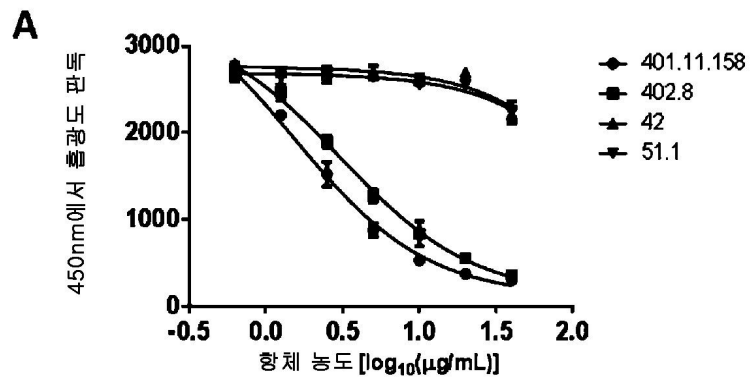
A



B

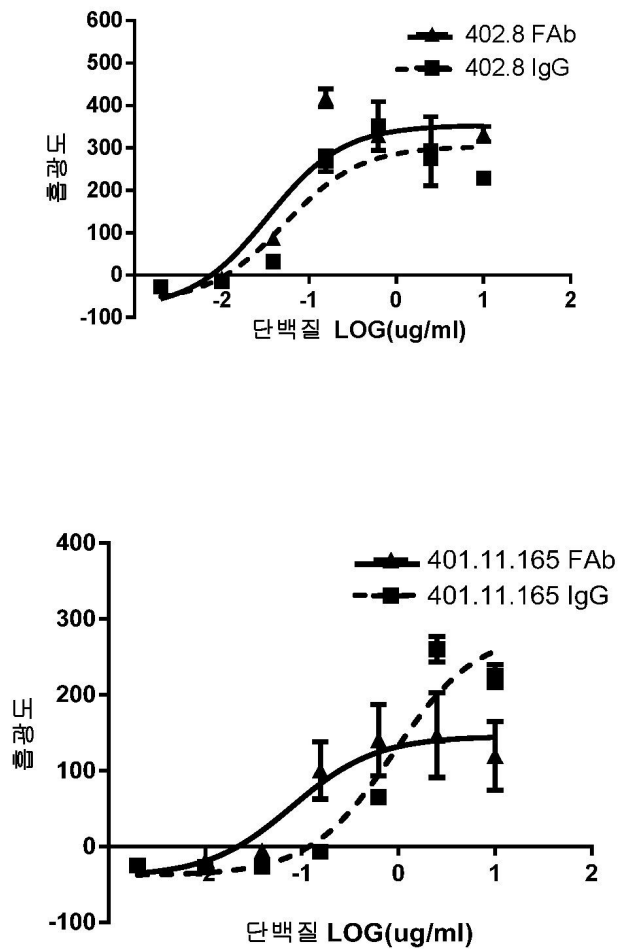


도면24





도면25

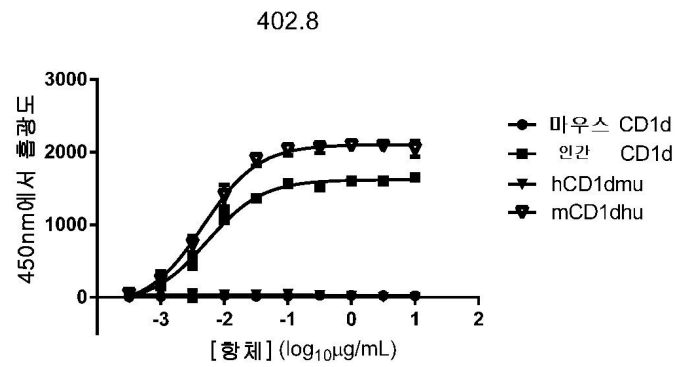


도면26

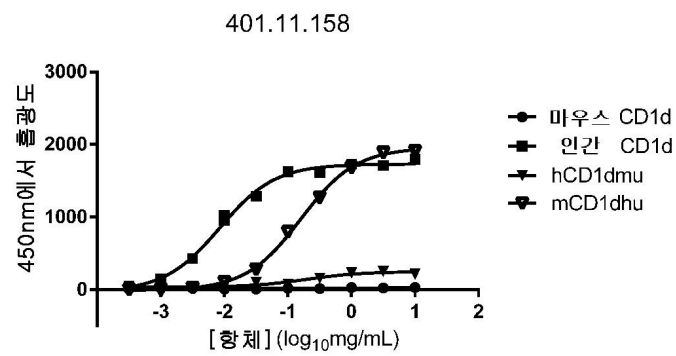
|          |                                                                                      |                    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 인간 CD1d  | EVPQRLPEPLRCIQISSFFANSWTRTDGLAMLGELQTHSWSNDSDTVRSCLKPWSQGTFSQDQWETLIQHIFFRVYRSSFTEDV |                    |
| 마우스 CD1d | --Q.KNYTF...M...R.S...SVV...D...R...A.ISFT...KL.N...K...M.Q...V...I                  |                    |
| mCD1dhu  | -Q.KNYTF...M...R.S...SVV...D...R...A.ISFT...KL.N...K...M.Q...V...I                   |                    |
| hCD1dnu  | .....                                                                                |                    |
| 인간 CD1d  | KEPAKM IRLS--YPL ELQVSAGCEVHPGNASNPFHVAFOGKDILSFQGTSMWPTQEAPLWV NLA IOVLNODKWTRETVO  |                    |
| 마우스 CD1d | MSPKED.I I.L...MY...ES.L...YVVR.W...QTVPQ.S.L D.P K...A.OG.SA...                     | D.P K...A.OG.SA... |
| mCD1dhu  | Q.LV...I.L...MY...ES.L...YVVR.W...QTVPQ.S... ..                                      |                    |
| hCD1dnu  | MSPKED.I .....                                                                       |                    |
| 인간 CD1d  | WLNNGTCPOFVSGLSGSKSELKKQVKPKAMLSRGSPDPGRLLLVCHVSGFYPKPVWVKMMRGQEQQGTQPDILPNA         |                    |
| 마우스 CD1d | M...D...L...R...A...D.E...E...V...SV...SAD.HRQ...M...D...D...HR...F...               |                    |
| mCD1dhu  | M...D...L...R...A...D.E...E...V...SV...SAD.HRQ...M...D...D...HR...F...               |                    |
| hCD1dnu  | .....                                                                                |                    |
| 인간 CD1d  | DETWYLRATLDVAVAGEAAGLSGCRVXKHSLSLEGQDILVLYWGGSYTS                                    |                    |
| 마우스 CD1d | .....Q...E...E...A...G...I...DARQAPVG                                                |                    |
| mCD1dhu  | .....Q...E...E...A...G...I...DARQAPVG                                                |                    |
| hCD1dnu  | .....                                                                                |                    |

도면27

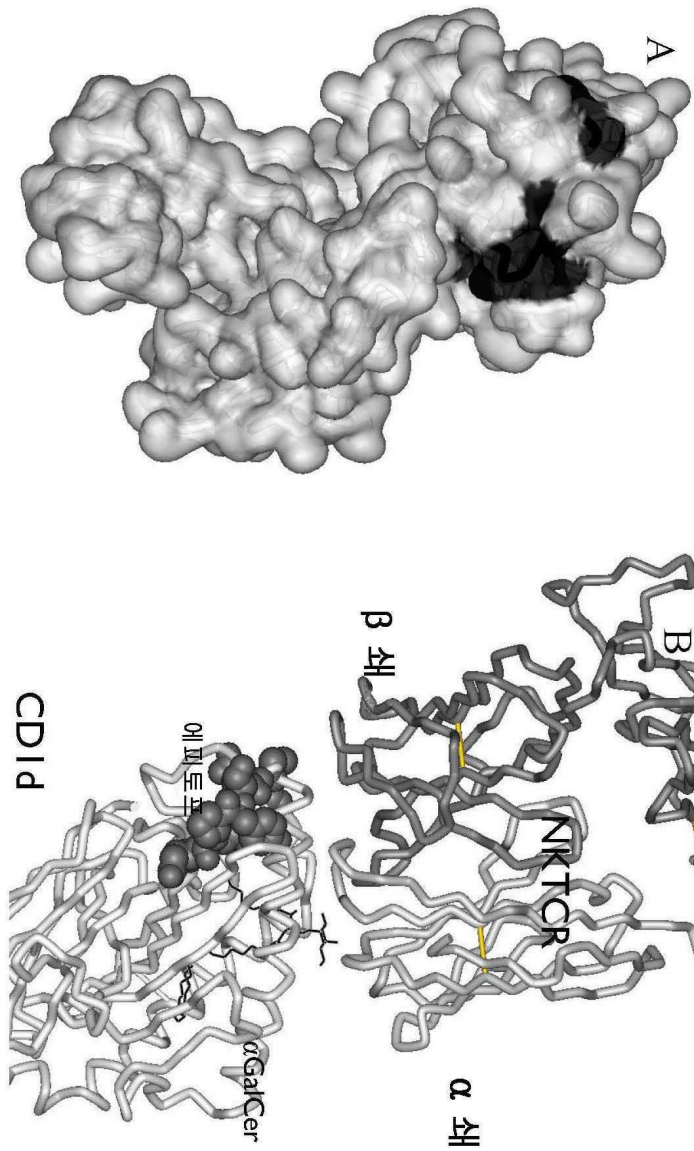
A



B



도면28



도면29a

[illegible]

도면29b

|            |                        |                   |                         |                |                                            |                  |             |
|------------|------------------------|-------------------|-------------------------|----------------|--------------------------------------------|------------------|-------------|
| 401.11     | DIQMTQSPSSVSASVDGVITTC | CDR1<br>RAQHISWLA | WYQQRKRAKPLLY           | CDR2<br>AASLSQ | GVASRFSGSGSGTDFTLTISLSQPEDFATYYC           | CDR3<br>QANRPFLT | FGSGTKLEIKR |
| 401.11.24  | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....                                      | .....            | .....       |
| 401.11.26  | .....                  | .....             | .....                   | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.28  | .....                  | .....             | .....                   | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.86  | .....                  | .....             | .....                   | .....          | .....                                      | .....            | .....       |
| 401.11.151 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.152 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....                                      | .....            | .....       |
| 401.11.154 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.155 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.156 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.157 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.158 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.159 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.160 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.161 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.165 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.166 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.167 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.179 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.180 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 401.11.181 | .....                  | .....             | .....K.....             | .....          | .....P.....                                | .....            | .....       |
| 컨센서스       | DIQMTQSPSSVSASVDGVITTC | RAQHISWLA         | WYQQRKRAKPLLY<br>N<br>K | AASLSQ         | GVASRFSGSGSGTDFTLTISLSQPEDFATYYC<br>S<br>P | QANRPFLT         | FGSGTKLEIKR |



도면30a

|          |                            |           |               |                 |                                  |                |                |             |
|----------|----------------------------|-----------|---------------|-----------------|----------------------------------|----------------|----------------|-------------|
| 402.8    | QVQLQESGPGLVYPSPFTLSLTCAVY | QPS1      | WIRQPPKQLEWIG | QPS2            | RTTISVDTSHNQPSIKLSVTAAADTAIVYCAH | QPS3           | GEIYDINQSHMDY  | NQKGTIVTVSS |
| 402.8.45 | .....K.....                | .....     | .....         | .....P.....     | .....                            | .....K.....    | .....K.....    | .....       |
| 402.8.53 | .....K.....                | .....     | .....         | .....A.....     | .....                            | .....YK.L..... | .....YK.L..... | .....       |
| 402.8.60 | .....K.....                | .....     | .....         | .....A.....     | .....                            | .....YK.L..... | .....YK.L..... | .....       |
| 402.8.84 | .....K.....                | .....     | .....         | .....A.....     | .....                            | .....YK.....   | .....YK.....   | .....       |
| 402.8.86 | .....K.....                | .....     | .....         | .....A.....     | .....                            | .....YK.....   | .....YK.....   | .....       |
| 402.8.87 | .....K.....                | .....     | .....         | .....A.....     | .....                            | .....YK.....   | .....YK.....   | .....       |
| 컨센서스     | QVQLQESGPGLVYPSPFTLSLTCAVY | GSSESGYWS | WIRQPPKQLEWIG | EINXXGSTNYPNLKS | RTTISVDTSHNQPSIKLSVTAAADTAIVYCAH | EIYDFXSHYDV    | MN M YK L      | NQKGTIVTVSS |
|          | R                          |           |               | HS PA           |                                  |                |                |             |

도면30b

|          |                       |               |                                  |             |            |
|----------|-----------------------|---------------|----------------------------------|-------------|------------|
| 402.8    | QTWTQEPRLTWSPGQTVTLTC | CDR1          | WTPTAFSGSLIOCKAVLTLSGVQPEDEAEYTC | CDR3        | PGSGTKVTLG |
| 402.8-45 | .....                 | ASSGAVSSGNFPN | .....                            | ILTYGDTOLGV | .....      |
| 402.8-53 | .....                 | .....         | .....                            | .....       | .....      |
| 402.8-60 | .....                 | .....         | .....                            | .....       | .....      |
| 402.8-94 | .....                 | .....         | .....                            | .....       | .....      |
| 402.8-86 | .....                 | .....         | .....                            | .....       | .....      |
| 402.8-87 | .....                 | .....         | .....                            | .....       | .....      |
| 컨센서스     | QTWTQEPRLTWSPGQTVTLTC | ASSGAVSSGNFPN | WTPTAFSGSLIOCKAVLTLSGVQPEDEAEYTC | ILTYGDTOLGV | PGSGTKVTLG |

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <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> Antibodies to CD1d

<130> 35115153/WJP

<150> AU 2011904190

<151> 2011-10-14

<150> US 61/547,307

<151> 2011-10-14

<160> 156

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 401.11 variable heavy chain

<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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 401.11 variable light chain

<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

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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8 variable heavy chain

<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  
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8 variable light chain

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.28 variable heavy chain

<400> 5

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> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.28 variable light chain

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

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.45 variable heavy chain

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.53 variable heavy chain

<400> 8

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 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.60 variable heavy chain

<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

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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 401.11 variable heavy chain

<400> 10

caggtgcagc tggtaggggtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgccca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccaggaagg gcctggagtg ggtcgcaact attatttga atagtctat catagctat 180

gcggactctg tgaaggccg attcatcgtc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agcagaggac atggccttgt attactgtgc aaaagatatg 300

tgtagtagta gtggttggcc tgatggctac ttgactcct ggggccaggg aaccctgggtg 360

acagtgtcct ca 372

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11 variable light chain

<400> 11

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc | 60  |
| atcacttgtc gggcgagtc gcatattagc agctggtag cctggtagc gcagaaacca    | 120 |
| gggaaagccc ctaatctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca | 180 |
| aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct  | 240 |
| gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaggt tcccgtcac ttccggcgga  | 300 |
| gggaccaagc tggagatcaa acgg                                        | 324 |

<210> 12

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8 variable heavy chain

<400> 12

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgagge cttcgagac cctgtccctc  | 60  |
| acctgcgctg tctatggtag gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |
| ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg | 240 |
| aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt | 300 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| tacgattttt ggaactccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc | 360 |
| tca                                                               | 363 |

<210> 13

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8 variable light chain

<400> 13

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagc agtcactctc  | 60  |
| acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggttaact ttccaaactg gttccagcag | 120 |

aaacctggac aagcaccctg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcctggacc 180

cctgccccgt tttcaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcagggtgtg 240

cagccagagg acgaggetga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg 300

gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336

<210> 14

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.28 variable heavy chain

<400> 14

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60

agctgtgccg ccagcggttt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac 180

gccgacagcg tgaaggcggt gttcatctgt tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg 300

tgcagcagct ctggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

accgtgtcct ca 372

<210> 15

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.28 variable light chain

<400>

15

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtggcgga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaacctgt gatctacgc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggtc cggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 16

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.45 variable heavy chain

<400> 16

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |
| ccaggaagg ggcctggagtg gattggggaa atcaatccca gtggaagcac caactacaac | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg | 240 |
| aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt  | 300 |
| tacgattttt ggaagtccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc | 360 |
| tca                                                               | 363 |

<210> 17

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.53 variable heavy chain

<400> 17

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |
| ccaggaagg ggcctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg | 240 |
| aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt  | 300 |
| tacgattttt ggaagtccta cctggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc | 360 |
| tca                                                               | 363 |

<210> 18

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.60 variable heavy chain

<400> 18

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcggagac cctgtccctc | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |



ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt 300  
 tacgattttt acaactccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc 360  
 tca 363

<210> 19

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; human CD1d synthetic construct

<400>

19

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 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

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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> human beta-2-microglobulin

<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

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met  
115

<210> 21

<211> 276

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> TCR alpha chain clone 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

<210> 22

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> TCR beta chain clone 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  
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                    240  
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  
 <210> 23  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic; 401.11.24 variable heavy chain protein sequence  
  
 <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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.26 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> 401.11.86 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.151 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic; 401.11.152 variable heavy chain protein sequence  
 <400> 27

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> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic; 401.11.154 variable heavy chain protein sequence  
 <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  
 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.155 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.156 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.157 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable heavy chain protein sequence

<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

<210> 33

<

211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.159 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.160 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.161 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.165 variable heavy chain protein sequence

<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  
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> 37

<

211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.166 variable heavy chain protein sequence

<400> 37

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 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> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.167 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.179 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.180 variable heavy chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.181 variable heavy chain protein sequence

<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                      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> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.84 variable heavy chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.86 variable heavy chain protein sequence

<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  |     |
| 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.87 variable heavy chain protein sequence

<400> 45

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 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 |

[illegible]

### <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.24 variable light chain protein sequence

&lt;400&gt; 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 |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 47

 $\angle$ 

211&gt; 108



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.26 variable light chain protein sequence

<400> 47

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> 48

<

211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 401.11.26 variable light chain protein sequence

<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  
 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.151 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.152 variable light chain protein sequence

<400> 50

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> 51

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.154 variable light chain protein sequence

<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  
 <210> 52  
 <  
 211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic; 401.11.155 variable light chain protein sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic; 401.11.156 variable light chain protein sequence  
 <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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.157 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.159 variable light chain protein sequence

<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  
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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.160 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.161 variable light chain protein sequence

<400> 58

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.165 variable light chain protein sequence

<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

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

<210> 60

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.166 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.167 variable light chain protein sequence

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.179 variable light chain protein sequence

<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

<210> 63

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.180 variable light chain protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.181 variable light chain protein sequence

<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

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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.84 variable light chain protein sequence

<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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.86 variable light chain protein sequence

<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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.87 variable light chain protein sequence

<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  
 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.24 variable heavy chain nucleotide

<400> 68

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60  
 agctgtgccg ccagcggtt caccctcgac gactacgcca tgactgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac 180  
 gccgacagcg tgaaggcg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300

tgcagcagct ctggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 69

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.26 variable heavy chain nucleotide

<400> 69

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60  
 agctgtgccg ccagcggtt caccctcgac gactacgcca tgactgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagca gcggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 70

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.86 variable heavy chain nucleotide

<400> 70

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagcg gcggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 71

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.151 variable heavy chain nucleotide

<400> 71

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60  
agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacagcg tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagca gcggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

accgtgtcct ca 372

<210> 72

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.152 variable heavy chain nucleotide

<400> 72

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc  | 120 |
| cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac  | 180 |
| gccgacacgc tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg   | 300 |
| tgcagcagca gcggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc  | 360 |
| accgtgtcct ca                                                      | 372 |

<210> 73

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.154 variable heavy chain nucleotide

<400> 73

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg | 60  |
| agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc | 120 |
| cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac | 180 |
| gccgacacgc tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac | 240 |
| ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg  | 300 |
| tgcagcagct ctggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc | 360 |
| accgtgtcct ca                                                     | 372 |

<210> 74

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.155 variable heavy nucleotide

<400> 74

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc  | 120 |



cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacacgc tgaaggccg gttcatctg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagca gcggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 75

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.156 variable heavy chain nucleotide

<400> 75

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60  
agctgtgccg ccagcggctt caccitcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacacgc tgaaggccg gttcatctg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300  
  
tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 76

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.157 variable heavy chain nucleotide

<400> 76

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60  
agctgtgccg ccagcggctt caccitcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
  
gccgacacgc tgaaggccg gttcatctg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 77

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable heavy chain nucleotide

<400> 77

caggtgcagc tcgtgggctc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcagaag cctgcggctg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac 180

gccgacagcg tgaaggcggt gtccatctgt tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg 300

tcgacagcgt gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

accgtgtcct ca 372

<210> 78

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.159 variable heavy chain nucleotide

<400> 78

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggtac 180

gccgacagcg tgaaggcggt gtccatctgt tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300

tcgacagcgt gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

accgtgtcct ca 372

<210> 79

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.160 variable heavy chain nucleotide

<400> 79

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggttt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacacgc tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 80

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.161 variable heavy chain nucleotide

<400> 80

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60  
agctgtgccg ccagcggttt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacacgc tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac atggccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360  
accgtgtcct ca 372

<210> 81

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.165 variable heavy chain nucleotide

<400> 81

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60  
agctgtgccg ccagcggttt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgacaggcc 120  
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
gccgacacgc tgaagggccg gttcatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac 240  
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg 300  
tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggg caccctggtc 360

accgtgtcct ca 372

<210> 82

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.166 variable heavy chain nucleotide

<400> 82

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc | 120 |
| cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac  | 180 |
| gccgacagcg tgaaggcggt gtccatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga acagcctcgc ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg  | 300 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggc caccctggtc | 360 |
| accgtgtcct ca                                                     | 372 |

<210> 83

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.167 variable heavy chain nucleotide

<400> 83

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgtgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcaactgggt ccgacaggcc | 120 |
| cctggcaagg gcctggaatg ggtggccacc atcatctgga acagcgccat catcggctac  | 180 |
| gccgacagcg tgaaggcggt gtccatcgtg tcccgggata acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga acagcctcgc ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg  | 300 |
| tgcagcagcg gtggctgccc cgacggctac ttcgattctt ggggccaggc caccctggtc  | 360 |
| accgtgtcct ca                                                      | 372 |

<210> 84

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable heavy chain nucleotide

<400> 84

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgggtgggctc tggcggcgga ctggtgaaac ccggcagaag cctgagactg | 60  |
|                                                                    |     |
| agctgcgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc  | 120 |
| cctggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggtac   | 180 |
| gccgacagcg tgaagggccg gttcatctgt tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg   | 300 |
| tgcagcagcg ggggctgccc cgacggctac ttgatagct ggggccaggg caccctggtg   | 360 |
| acagtgtcct ca                                                      | 372 |

<210> 85

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.179 variable heavy chain nucleotide

<400> 85

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgggtgggctc tggcggcgga ctggtgaaac ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgcgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc  | 120 |
| cctggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggtac   | 180 |
| gccgacagcg tgaagggccg gttcatctgt tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgcgc caaggacatg   | 300 |
| tgcagcagcg ggggctgccc cgaaggctac ttgatagct ggggccaggg caccctggtg   | 360 |
| acagtgtcct ca                                                      | 372 |

<210> 86

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.180 variable heavy chain nucleotide

<400> 86

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgggtgggctc tggcggcgga ctggtgaaac ccggcagaag cctgagactg | 60  |
| agctgcgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc  | 120 |
| cctggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggtac   | 180 |
| gccgacagcg tgaagggccg gttcatctgt tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacctg 300  
 tgcagcagcg ggggctgccc cgaaggctac ttgatagct ggggccaggg caccctgggtg 360  
 acagtgtcct ca 372

<210> 87

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.181 variable heavy chain nucleotide

<400> 87

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgaaac cggcagaag cctgagactg 60  
 agctgcgccg ccagcggctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt ccgccaggcc 120

cttggcaagg gactggaatg ggtggcaacc atcatctgga acagcgccat catcggctac 180  
 gccgacagcg tgaagggccg gttcatctg tccagagaca acgccaagaa cagcctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caaggacatg 300  
 tgcagcagcg ggggctgccc cgacggctac ttgatagct ggggccaggg caccctgggtg 360  
 acagtgtcct ca 372

<210> 88

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.84 variable heavy chain nucleotide

<400> 88

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60  
 acctgcgtg tctatgtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc 120  
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac 180  
 ccgtccctca agagtgcagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtctccctg 240  
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt 300  
 tacgatTTTT acaagtccta cctggacgtc tggggcaaag ggaccacgt gacagtgtcc 360  
 tca 363

<210> 89

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.86 variable heavy chain nucleotide

<400> 89

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |
| ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg | 240 |
| aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggtgagatt | 300 |
| tacgatTTTT acaactccta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt gacagtgtcc | 360 |
| tca                                                               | 363 |

<210> 90

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 402.8.87 variable heavy chain nucleotide

<400> 90

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc | 60  |
| acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat tcgccagccc | 120 |
| ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatg ccggaagcac caactacaac | 180 |
| ccgtccctca agagtcgagt caccatatca 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.24 variable light chain nucleotide

<400> 91

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc  | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc | 180 |

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 92

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.26 variable light chain nucleotide

<400> 92

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 93

<211> 324

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.86 variable light chain nucleotide

<400> 93

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtca gcatattagc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaatctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagggt tcccgctcac tttcgcgga 300  
gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

<210> 94

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.151 variable light chain nucleotide



<400> 94

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc | 180 |
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc  | 240 |
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt | 324 |
|----------------------------|-----|

<210> 95

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.152 variable light chain nucleotide

<400> 95

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc | 180 |
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc  | 240 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |
|-------------------------------------------------------------------|-----|

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt | 324 |
|----------------------------|-----|

<210> 96

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.154 variable light chain nucleotide

<400> 96

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc | 180 |

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc | 240 |
|------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |
|-------------------------------------------------------------------|-----|

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt | 324 |
|----------------------------|-----|

<210> 97

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.155 variable light chain nucleotide

<400> 97

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttgcgga 300

ggcaccaagc tggaatcaa gcgt 324

<210> 98

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.156 variable light chain nucleotide

<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 cggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttgcgga 300

ggcaccaagc tggaatcaa gcgt 324

<210> 99

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.157 variable light chain nucleotide

<400> 99

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 100

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.158 variable light chain nucleotide

<400> 100

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 101

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.159 variable light chain nucleotide

<400> 101

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaacgggt tccccctgac ctttggcgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt 324

<210> 102

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.160 variable light chain nucleotide

<400> 102

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc  | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaagc | 180 |
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc  | 240 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                        | 324 |

<210> 103

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.161 variable light chain nucleotide

<400> 103

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc  | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc | 180 |
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc  | 240 |
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                        | 324 |

<210> 104

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.165 variable light chain nucleotide

<400> 104

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc  | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc | 180 |
| agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc  | 240 |
| gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga | 300 |
| ggcaccaagc tggaaatcaa gcgt                                        | 324 |

<210> 105

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.166 variable light chain nucleotide

<400> 105

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgtccagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga 300

ggcaccaagc tggaatcaa gcgt 324

<210> 106

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.167 variable light chain nucleotide

<400> 106

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac ctttggcgga 300

ggcaccaagc tggaatcaa gcgt 324

<210> 107

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.179 variable light chain nucleotide

<400> 107

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggatatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg 324

<210> 108

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.180 variable light chain nucleotide

<400> 108

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg 324

<210> 109

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; 401.11.181 variable light chain nucleotide

<400> 109

gacatccaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gcacatcagc agctggctgg cctggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctcct gatctacgcc gccagctctc tgcagtctgg cgtgccaagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaaccggt tccccctgac cttcggcgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgg 324

<210> 110

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.45 variable light chain nucleotide

<400> 110

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc  | 60  |
| acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag | 120 |
| aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc  | 180 |
|                                                                   |     |
| cctgccccgt tttcaggtc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcaggtgtg  | 240 |
| cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg | 300 |
| gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt                           | 336 |

<210> 111

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.53 variable light chain nucleotide

<400> 111

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc  | 60  |
| acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag | 120 |
|                                                                   |     |
| aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc  | 180 |
| cctgccccgt tttcaggtc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcaggtgtg  | 240 |
| cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg | 300 |
| gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt                           | 336 |

<210> 112

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.60 variable light chain nucleotide

<400> 112

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc  | 60  |
|                                                                   |     |
| acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag | 120 |
| aaacctggac aagcaccccg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc  | 180 |
| cctgccccgt tttcaggtc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcaggtgtg  | 240 |

cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg 300  
 gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336

<210> 113  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> 402.8.84 variable light chain nucleotide

<400> 113

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc 60  
 acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag 120  
 aaacctggac aagcaccocg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc 180  
 cctgccccgt tttcaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcaggtgtg 240  
 cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg 300  
 gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336

<210> 114  
 <211> 336  
 <212> DNA

<213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> 402.8.86 variable light chain nucleotide

<400> 114

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggac agtcactctc 60  
 acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag 120  
 aaacctggac aagcaccocg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc 180  
 cctgccccgt tttcaggctc cctccttggg ggcaaagctg tcctgacact gtcaggtgtg 240  
 cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg 300  
 gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336

<210> 115  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens



<220><221> misc\_feature

<223> 402.8.87 variable light chain nucleotide

<400> 115

cagactgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggaggagac agtcactctc 60

acctgtgctt ccagctctgg agcagtcagc agtggtaact ttccaaactg gttccagcag 120

aaacctggac aagcaccocg ggcactaatt tttagtgcga gcaacaaaca ttcttgacc 180

cctgccccgt tttcaggctc cctccttggg ggcaaagctg tccigacact gtcaggtgtg 240

cagcctgagg acgaggctga atattactgc ctgctctact ttggtgatac tcaactaggg 300

gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336

<210> 116

<211> 303

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; human CD1d extracellular domain construct

<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

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  
<210> 117  
<211> 305  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic; murine CD1d extracellular domain construct  
<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; mCD1dhu CD1d synthetic construct

<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

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; hCD1dmu CD1d synthetic construct

<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  
 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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; F1

<400> 120

gtgcctgctg tttctgctg 19

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic; R1

<400> 121

tgccctgata ggaagtttgc 20

<210> 122

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

122

Leu Ser Tyr Pro Leu Glu

1 5

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 124

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 125

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 135

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

1 5

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

1 5

<210> 137

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Ile Trp Asn Ser Ala Ile

1 5

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Asn His Ser Gly Ser

1 5

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Asn Pro Ser Gly Ser

1 5

<210> 140

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Asn His Ala Gly Ser

1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Ala Ser Gln His Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 142

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 143

Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Leu Leu Tyr Phe Gly Asp Thr Gln Leu Gly Val

1 5 10

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ser Ala Ser Asn Lys His Ser

1 5

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Leu

1 5

<210> 148  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X is Q or E  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X is G or E  
  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> X is K or Q  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (91)..(91)  
 <223> X is M or T  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (100)..(100)  
 <223> X is M or L  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (104)..(104)  
 <223> X is S or G  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (108)..(108)  
 <223> X is D or 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> Homo sapiens  
<220><221> misc\_feature

<222> (45)..(45)  
<223> X is N or K  
<220><221> misc\_feature

<222> (59)..(59)  
<223> X is S or 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> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

<223> X is R or K

<220><221> misc\_feature

<222> (53)..(53)

<223> X is H or P

<220><221> misc\_feature

<222> (54)..(54)

<223> X is S or A

<220><221> misc\_feature

<222> (104)..(104)

<223> X is W or Y

<220><221> misc\_feature

<222> (105)..(105)

<223> X is N or K

<220><221> misc\_feature

<222> (108)..(108)

<223> X is M or 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> Homo sapiens

<400> 151

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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 154

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

1 5 10 15

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 156

Gly Glu Ile Tyr Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Met Asp Val

1 5 10

Document3-5/03/2014

- 1 -