



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573154 B

(45) 授权公告日 2021.06.15

(21) 申请号 201580038244.1

(22) 申请日 2015.07.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106573154 A

(43) 申请公布日 2017.04.19

(30) 优先权数据
62/024804 2014.07.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.01.13

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/040385 2015.07.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/011035 EN 2016.01.21

(73) 专利权人 免疫医疗有限责任公司
地址 美国马里兰州
专利权人 胡默波斯生物医学公司

(72) 发明人 大卫·柯蒂
安东尼奥·兰扎韦基亚
N.卡勒瓦德-勒莱 朱青
E.本加明 L.瓦奇特 袁清安
J.M.麦克奥利夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 周齐宏

(51) Int.Cl.
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2013132007 A1, 2013.09.12
CN 103906763 A, 2014.07.02
WO 2013086052 A2, 2013.06.13
Cyrille Dreyfus. Highly Conserved Protective Epitopes on Influenza B Viruses.《SCIENCE》.2012,第337卷(第6100期),第1343-1348页.

审查员 张智贤

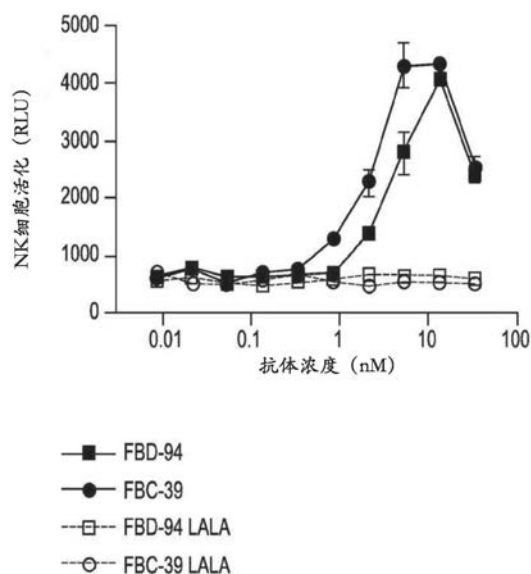
权利要求书2页 说明书51页
序列表57页 附图16页

(54) 发明名称

中和抗乙型流感抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及能够结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的抗体及其抗原结合片段。在一个实施例中,该抗体或抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素并且中和在山形和维多利亚两个世系中的乙型流感病毒。



1. 能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的一种分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO.:62 的 VH 和 SEQ ID NO.:67 的 VL。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体能够结合乙型流感病毒血球凝集素并且中和在山形和维多利亚世系两者中的乙型流感病毒。

3. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或其抗原结合片段能够结合选自 B/AA/94; B/YSI/98; B/SC/99; B/FL/06 的山形世系乙型流感病毒; 选自 B/BJ/97; B/HK/01; B/MY/04; B/BNE/08 的维多利亚世系乙型流感病毒; 选自 B/Lee/40; B/AA/66; B/HK/72 的预分歧乙型流感株; 及其组合。

4. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段以范围从 1ng/ml 至 50ng/ml 的抗体的 EC_{50} 结合乙型流感病毒。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段在微量中和测定中具有表示为 IC_{50} 的中和效力, 该 IC_{50} 的范围是从 0.001 μ g/ml 至 5 μ g/ml 的用于中和乙型流感病毒的抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体能够结合甲型流感病毒血球凝集素。

7. 根据权利要求 6 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体能够结合甲型流感病毒组 1 亚型 H9。

8. 根据权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段以范围从 1 μ g/ml 至 50 μ g/ml 的抗体的 EC_{50} 结合甲型流感 HA。

9. 根据权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段在微量中和测定中, 具有范围从 0.01 μ g/ml 至 5 μ g/ml 的用于中和甲型流感病毒的抗体的 IC_{50} 。

10. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括单克隆抗体。

11. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括嵌合抗体。

12. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括 CDR 移植抗体。

13. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括人源化抗体。

14. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括二硫键连接的 Fv。

15. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段包括多特异性抗体。

16. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段选自: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、以及双特异性抗体。

17. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 包含 Fc 区。

18. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体是 IgG1、IgG2 或 IgG4 或其片段。

19. 一种分离的核酸, 该分离的核酸编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段。

20. 一种载体, 该载体包含根据权利要求19所述的分离的核酸。

21. 一种宿主细胞, 包括根据权利要求19所述的核酸。

22. 一种用于制造能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的抗体或其抗原结合片段的方法, 该方法包括在适合用于表达该抗体或其片段的条件下培养根据权利要求21所述的宿主细胞。

23. 根据权利要求22所述的方法, 进一步包括从该宿主细胞培养物分离该抗体或其抗原结合片段。

24. 一种宿主细胞, 包括根据权利要求20所述的载体。

25. 一种用于制造能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的抗体或其抗原结合片段的方法, 该方法包括在适合用于表达该抗体或其片段的条件下培养根据权利要求24所述的宿主细胞。

26. 根据权利要求25所述的方法, 进一步包括从该宿主细胞培养物分离该抗体或其抗原结合片段。

27. 一种组合物, 该组合物包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

28. 一种组合物, 该组合物包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段、以及pH为6.0的25mM His和0.15M NaCl。

29. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其结合片段用于在预防或治疗受试者的乙型流感感染中使用。

30. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其结合片段用于在预防或治疗受试者的甲型流感和乙型流感感染中使用。

31. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段用于制造药剂的用途, 该药剂用于预防或治疗受试者的乙型流感感染。

32. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段用于制造药剂的用途, 该药剂用于预防或治疗受试者的甲型流感和乙型流感感染。

33. 根据权利要求1所述的抗体或其片段在制备试剂盒中的用途, 该试剂盒用于体外诊断受试者的乙型流感感染。

中和抗乙型流感抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及具有针对乙型流感病毒的广泛中和活性的抗体并且涉及这类抗体的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 流感病毒引起年度流感流行和偶然的大流行,这对全世界公共卫生构成显著威胁。季节性流感感染与每年200,000-500,000例死亡相关联,特别是在幼儿、免疫功能低下患者和老年人中。死亡率典型地在具有大流行性流感爆发的季节期间进一步增加。对于用于预防和治疗流感感染(特别是缺乏服务的群体中)的有效抗病毒治疗剂仍然存在显著未满足的医学需求。

[0004] 存在三种类型的流感病毒,甲型、乙型和丙型。大多数流感疾病是由甲型和乙型流感病毒引起(汤普森(Thompson)等人(2004) JAMA, 292:1333-1340;和周(Zhou)等人(2012) 临床传染病(Clin Infect. Dis.) 54:1427-1436)。流感病毒甲型、乙型和丙型的总体结构是相似的,并且包括围绕中心核的病毒包膜。病毒包膜包括两种表面糖蛋白,血球凝集素(HA)和神经氨酸苷酶(NA);HA介导病毒与靶细胞的结合并进入靶细胞,而NA参与后代病毒从感染细胞的释放。

[0005] HA蛋白是三聚体结构的并且包括单一多肽前体HA0的三个相同拷贝,该多肽前体在蛋白水解成熟时裂解成含有球状头部(HA1)和柄区(HA2)的pH依赖性、亚稳定的中间体(威尔逊(Wilson)等人,(1981) 自然(Nature), 289:366-373)。膜远侧球状头部构成HA1结构的大部分并且含有用于病毒进入的唾液酸结合口袋和主要抗原结构域。

[0006] 甲型流感病毒可以基于血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)基因中的基因变异而分类为亚型。目前,在季节性流行病中,甲型流感H1和H3HA亚型主要与人类疾病相关,而编码H5、H7、H9和H10的病毒与由于来自动物的直接传播的分散性人类暴发相关。

[0007] 与甲型流感病毒形成对比,乙型流感病毒不基于两种表面糖蛋白分为亚型,直到20世纪70年代才被分类为一个同源组。在整个20世纪70年代,乙型流感病毒开始分歧为两个抗原性可区分的世系,其在它们的第一个代表之后分别被命名为维多利亚(Victoria)和山形(Yamagata)世系,B/维多利亚/2/87和B/山形/16/88。(比雷(Biere)等人,(2010) 临床微生物学杂志(J Clin Microbiol), 48(4):1425-7;doi:10.1128/JCM.02116-09,电子出版2010年1月27日)。乙型流感病毒限于人类感染,并且两个世系都促成每年的流行病。尽管由乙型流感病毒引起的发病率低于与甲型H3N2流感相关的发病率,但它高于与甲型H1N1流感相关的发病率(周(Zhou)等人(2012) 临床传染病(Clin Infect. Dis.) 54:1427-1436)。

[0008] 由流感病毒感染引发的中和抗体通常靶向可变HA1球状头部以便防止病毒受体结合且通常是毒株特异性的。中和一种或多种亚型或世系的广泛的交叉反应性抗体是罕见的。最近,已经发现几种人抗体可以中和两种世系的乙型流感病毒的多种亚型(德雷福斯(Dreyfus)等人(2012) 科学(Science), 337(6100):1343-8;和安来(Yasugi)等人(2013) PLoS病原体(PLoS Path.) 9(2):e1003150)。尽管这些抗体识别许多乙型流感病毒,但是它们具有有限的覆盖宽度和效力,并且不中和任何甲型流感病毒株。迄今为止,不存在广泛地

中和或抑制所有乙型流感病毒感染或减轻由乙型流感病毒引起的疾病的可得抗体。因此，需要鉴定防御多种流感病毒的新抗体。

[0009] 发明概述

[0010] 本文描述的本发明提供了能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的分离的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素并且中和在山形和维多利亚两个世系中的乙型流感病毒。山形世系包括 (但不限于)：B/AA/94 (ca B/安阿伯 (Ann Arbor)/2/94 (山形))；B/YSI/98 (ca B/山梨 (Yamanashi)/166/98 (山形))；B/JHB/99 (ca B/约翰尼斯堡 (Johannesburg)/5/99 (山形))；B/SC/99 (B/四川 (Sichuan)/379/99 (山形))；B/FL/06 (B/佛罗里达 (Florida)/4/2006 (山形))。维多利亚世系包括 (但不限于)：B/BJ/97 (ca B/北京 (Beijing)/243/97 (维多利亚))；B/HK/01 (B/香港 (HongKong)/330/2001 (维多利亚))；B/MY/04 (B/马来西亚 (Malaysia)/2506/2004 (维多利亚))；B/BNE/08 (ca B/布里斯班 (Brisbane)/60/2008 (维多利亚))。

[0011] 在另一个实施例中，本发明提供了能够结合乙型流感病毒血球凝集素并且中和在预分歧株中的乙型流感病毒的分离的抗体或其抗原结合片段。如在此使用，术语“预分歧”是指在乙型流感病毒分歧为山形和维多利亚世系之前被鉴定的乙型流感病毒株。预分歧乙型流感病毒株包括但不限于：B/Lee/40 (B/Lee/40)；B/AA/66 (ca B/安阿伯/1/66)；和B/HK/72 (B/香港/5/72)。

[0012] 在一个实施例中，该抗体或抗原结合片段以范围从约1 μ g/ml至约50 μ g/ml的抗体的EC₅₀结合乙型流感病毒。在另一个实施例中，该抗体或抗原结合片段在如实例3中所述的微量中和测定中具有中和效力，将该中和效力表示为范围从约0.001 μ g/ml至约5 μ g/ml的用于中和乙型流感病毒的抗体的50%抑制浓度 (IC₅₀ μ g/ml)。其他微量中和测定也描述于实例1中。

[0013] 在一个实施例中，该抗体能够结合甲型流感病毒血球凝集素。甲型流感病毒血球凝集素包括亚型1和亚型2血球凝集素。甲型流感病毒组1亚型包括：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16及其变体。甲型流感病毒组2亚型包括：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。在一个实施例中，该抗体能够结合一种或多种甲型流感病毒组1亚型。在另一个实施例中，该抗体能够结合一种或多种甲型流感病毒组2亚型。在一个实施例中，该抗体能够结合甲型流感病毒组1亚型H9。在一个实施例中，本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 和甲型流感病毒血球凝集素 (HA) 并且中和至少一种山形世系乙型流感病毒；至少一种维多利亚世系乙型流感病毒；至少一种甲型流感病毒亚型，或其组合。在一个实施例中，本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 和一种或多种甲型流感病毒亚型1血球凝集素 (HA) 并且中和至少一种山形世系乙型流感病毒或至少一种维多利亚世系乙型流感病毒和至少一种甲型流感病毒亚型1。在一个实施例中，本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素 (HA) 和甲型流感病毒亚型H9血球凝集素 (HA) 并且中和至少一种山形世系乙型流感病毒；至少一种维多利亚世系乙型流感病毒；甲型流感病毒亚型H9，或其组合。

[0014] 在一个实施例中，该抗体或抗原结合片段以范围从约1 μ g/ml至约50 μ g/ml的抗体

的EC₅₀结合甲型流感病毒HA。在另一个实施例中,该抗体或抗原结合片段在微量中和测定中具有范围从约0.01μg/ml至约5μg/ml的用于中和甲型流感病毒的抗体的IC₅₀。

[0015] 在一个实施例中,本发明的抗体或其片段结合HA的球状头部区域并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的感染。在另一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段结合HA的球状头部区域并且中和来自山形和维多利亚两个世系的乙型流感病毒的感染。本发明的抗体是抗乙型流感病毒HA球状头部结合抗体,与已知的抗乙型流感抗体相比展示了针对乙型流感病毒的更宽的气息覆盖范围或更好中和活性。

[0016] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含一组六个CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3,其中该组六个CDR选自:

[0017] (a) SEQ ID NO.:3的HCDR-1、SEQ ID NO.:4的HCDR-2、SEQ ID NO.:5的HCDR-3、SEQ ID NO.:8的LCDR-1、SEQ ID NO.:9的LCDR-2和SEQ ID NO.:10的LCDR-3;

[0018] (b) SEQ ID NO.:13的HCDR-1、SEQ ID NO.:14的HCDR-2、SEQ ID NO.:15的HCDR-3、SEQ ID NO.:18的LCDR-1、SEQ ID NO.:19的LCDR-2和SEQ ID NO.:20的LCDR-3;

[0019] (c) SEQ ID NO.:23的HCDR-1、SEQ ID NO.:24的HCDR-2、SEQ ID NO.:25的HCDR-3、SEQ ID NO.:28的LCDR-1、SEQ ID NO.:29的LCDR-2和SEQ ID NO.:30的LCDR-3;

[0020] (d) SEQ ID NO.:33的HCDR-1、SEQ ID NO.:34的HCDR-2、SEQ ID NO.:35的HCDR-3、SEQ ID NO.:38的LCDR-1、SEQ ID NO.:39的LCDR-2和SEQ ID NO.:40的LCDR-3;

[0021] (e) SEQ ID NO.:43的HCDR-1、SEQ ID NO.:44的HCDR-2、SEQ ID NO.:45的HCDR-3、SEQ ID NO.:48的LCDR-1、SEQ ID NO.:49的LCDR-2和SEQ ID NO.:50的LCDR-3;

[0022] (f) SEQ ID NO.:53的HCDR-1、SEQ ID NO.:54的HCDR-2、SEQ ID NO.:55的HCDR-3、SEQ ID NO.:58的LCDR-1、SEQ ID NO.:59的LCDR-2和SEQ ID NO.:60的LCDR-3;

[0023] (g) SEQ ID NO.:63的HCDR-1、SEQ ID NO.:64的HCDR-2、SEQ ID NO.:65的HCDR-3、SEQ ID NO.:68的LCDR-1、SEQ ID NO.:69的LCDR-2和SEQ ID NO.:70的LCDR-3;

[0024] (h) SEQ ID NO.:75的HCDR-1、SEQ ID NO.:76的HCDR-2、SEQ ID NO.:77的HCDR-3、SEQ ID NO.:83的LCDR-1、SEQ ID NO.:84的LCDR-2和SEQ ID NO.:85的LCDR-3;

[0025] (i) SEQ ID NO.:91的HCDR-1、SEQ ID NO.:92的HCDR-2、SEQ ID NO.:93的HCDR-3、SEQ ID NO.:99的LCDR-1、SEQ ID NO.:100的LCDR-2和SEQ ID NO.:101的LCDR-3;

[0026] (j) SEQ ID NO.:107的HCDR-1、SEQ ID NO.:108的HCDR-2、SEQ ID NO.:109的HCDR-3、SEQ ID NO.:115的LCDR-1、SEQ ID NO.:116的LCDR-2和SEQ ID NO.:117的LCDR-3;

[0027] (k) SEQ ID NO.:121的HCDR-1、SEQ ID NO.:122的HCDR-2、SEQ ID NO.:123的HCDR-3、SEQ ID NO.:124的LCDR-1、SEQ ID NO.:125的LCDR-2和SEQ ID NO.:126的LCDR-3;

[0028] (l) SEQ ID NO.:127的HCDR-1、SEQ ID NO.:128的HCDR-2、SEQ ID NO.:129的HCDR-3、SEQ ID NO.:130的LCDR-1、SEQ ID NO.:131的LCDR-2和SEQ ID NO.:132的LCDR-3;

[0029] (m) SEQ ID NO.:133的HCDR-1、SEQ ID NO.:134的HCDR-2、SEQ ID NO.:135的HCDR-3、SEQ ID NO.:136的LCDR-1、SEQ ID NO.:137的LCDR-2和SEQ ID NO.:138的LCDR-3;

[0030] (n) SEQ ID NO.:139的HCDR-1、SEQ ID NO.:140的HCDR-2、SEQ ID NO.:141的HCDR-3、SEQ ID NO.:142的LCDR-1、SEQ ID NO.:143的LCDR-2和SEQ ID NO.:144的LCDR-3;

[0031] (o) SEQ ID NO.:145的HCDR-1、SEQ ID NO.:146的HCDR-2、SEQ ID NO.:147的HCDR-3、SEQ ID NO.:148的LCDR-1、SEQ ID NO.:149的LCDR-2和SEQ ID NO.:150的LCDR-3;

[0032] (p) SEQ ID NO.:78的HCDR-1、SEQ ID NO.:79的HCDR-2、SEQ ID NO.:80的HCDR-3、SEQ ID NO.:86的LCDR-1、SEQ ID NO.:87的LCDR-2和SEQ ID NO.:88的LCDR-3;

[0033] (q) SEQ ID NO.:94的HCDR-1、SEQ ID NO.:95的HCDR-2、SEQ ID NO.:96的HCDR-3、SEQ ID NO.:102的LCDR-1、SEQ ID NO.:103的LCDR-2和SEQ ID NO.:104的LCDR-3;

[0034] (r) SEQ ID NO.:110的HCDR-1、SEQ ID NO.:111的HCDR-2、SEQ ID NO.:112的HCDR-3、SEQ ID NO.:118的LCDR-1、SEQ ID NO.:119的LCDR-2和SEQ ID NO.:120的LCDR-3;
并且

[0035] (s) 根据(a)至(r)中任一项的一组六个CDR包含一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。

[0036] 在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段具有分别对于选自以下各项VH和/或VL,具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH和/或具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL:

[0037] (a) SEQ ID NO.:2的VH和SEQ ID NO.:7的VL,

[0038] (b) SEQ ID NO.:12的VH和SEQ ID NO.:17的VL,

[0039] (c) SEQ ID NO.:22的VH和SEQ ID NO.:27的VL,

[0040] (d) SEQ ID NO.:32的VH和SEQ ID NO.:37的VL,

[0041] (e) SEQ ID NO.:42的VH和SEQ ID NO.:47的VL,

[0042] (f) SEQ ID NO.:52的VH和SEQ ID NO.:57的VL,

[0043] (g) SEQ ID NO.:62的VH和SEQ ID NO.:67的VL,

[0044] (h) SEQ ID NO.:74的VH和SEQ ID NO.:82的VL,

[0045] (i) SEQ ID NO.:90的VH和SEQ ID NO.:98的VL,并且

[0046] (j) SEQ ID NO.:106的VH和SEQ ID NO.:114的VL。

[0047] 在一个更具体的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含选自以下各项的VH和VL:

[0048] (a) SEQ ID NO.:2的VH和SEQ ID NO.:7的VL,

[0049] (b) SEQ ID NO.:12的VH和SEQ ID NO.:17的VL,

[0050] (c) SEQ ID NO.:22的VH和SEQ ID NO.:27的VL,

[0051] (d) SEQ ID NO.:32的VH和SEQ ID NO.:37的VL,

[0052] (e) SEQ ID NO.:42的VH和SEQ ID NO.:47的VL,

[0053] (f) SEQ ID NO.:52的VH和SEQ ID NO.:57的VL,

[0054] (g) SEQ ID NO.:62的VH和SEQ ID NO.:67的VL,

[0055] (h) SEQ ID NO.:74的VH和SEQ ID NO.:82的VL,

[0056] (i) SEQ ID NO.:90的VH和SEQ ID NO.:98的VL,并且

[0057] (j) SEQ ID NO.:106的VH和SEQ ID NO.:114的VL。

[0058] 在一个实施例中,本发明提供能够结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有SEQ ID NO:71的VH氨基酸序列,其中SEQ ID NO:71的Xaa₁是Val或Glu;Xaa₂SEQ ID NO:71是Leu或Phe;Xaa₃SEQ ID NO:71是Ser或Thr;Xaa₄SEQ ID NO:71是Leu或Ser;Xaa₅SEQ ID NO:71是Ser或Thr;Xaa₆SEQ ID NO:71是Met或Thr;Xaa₇SEQ ID NO:71是Phe或Tyr;Xaa₈SEQ ID

N0:71是His或Gln;Xaa₉SEQ ID N0:71是Ser或Asn;Xaa₁₀SEQ ID N0:71是Arg或Lys;和Xaa₁₁SEQ ID N0:71是Ala或Thr;并且具有SEQ ID N0:72的VL氨基酸序列,其中SEQ ID N0:72的Xaa₁是Phe或Tyr。在一个实施例中,SEQ ID N0:71的Xaa₉是Ser。在另一个实施例中,SEQ ID N0:71的Xaa₄是Leu。在又一个实施例中,SEQ ID N0:71的Xaa₁是Glu;SEQ ID N0:71的Xaa₅是Thr;SEQ ID N0:71的Xaa₆是Thr;SEQ ID N0:71的Xaa₇是Tyr;SEQ ID N0:71的Xaa₈是Gln;SEQ ID N0:71的Xaa₁₀是Lys;SEQ ID N0:71的Xaa₁₁是Thr,或其组合。在另一个实施例中,SEQ ID N0:71的Xaa₁是Glu;SEQ ID N0:71的Xaa₅是Thr;SEQ ID N0:71的Xaa₆是Thr;SEQ ID N0:71的Xaa₇是Tyr;SEQ ID N0:71的Xaa₈是Gln;SEQ ID N0:71的Xaa₉是Ser;SEQ ID N0:71的Xaa₁₀是Lys;SEQ ID N0:71的Xaa₁₁是Thr。

[0059] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段是选自:一种免疫球蛋白分子、一种单克隆抗体、一种嵌合抗体、一种CDR移植的抗体、一种人化抗体、一种Fab、一种Fab'、一种F(ab')₂、一种Fv、一种二硫键联结的Fv、一种scFv、一种单域抗体、一种双抗体、一种多特异性抗体、一种双重特异性抗体、以及一种双特异性抗体。在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含Fc区。在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段是IgG1、IgG2或IgG4或其片段。

[0060] 在一个实施例中,本发明提供了针对乙型流感病毒的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒并且中和至少一个山形世系和至少一个维多利亚世系的乙型流感病毒,其中该抗体或其抗原结合片段结合在至少一个山形世系和至少一个维多利亚世系的乙型流感病毒中为保守的表位。在一个实施例中,一个或多个表位的接触残基位于乙型流感HA的头部区域。在一个实施例中,该表位包括一个或多个选自以下各项的氨基酸:HA的头部区域的序列的128、141、150和235作为接触残基(王(Wang)等人(2008)病毒学杂志(J.Virol.),82(6):3011-20)。

[0061] 在另一个实施例中,本发明提供了针对乙型流感病毒的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段能够结合乙型流感病毒血球凝集素并且中和在两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒,该抗体或其抗原结合片段结合与本发明的抗体相同的表位或与本发明的抗体竞争结合乙型流感病毒血球凝集素。在一个实施例中,该抗体或抗原结合片段结合与具有选自以下各项的氨基酸序列的抗体相同的表位或与具有选自以下各项的氨基酸序列的抗体竞争结合甲型流感病毒血球凝集素:

[0062] (a) SEQ ID NO.:2的VH和SEQ ID NO.:7的VL,

[0063] (b) SEQ ID NO.:12的VH和SEQ ID NO.:17的VL,

[0064] (c) SEQ ID NO.:22的VH和SEQ ID NO.:27的VL,

[0065] (d) SEQ ID NO.:32的VH和SEQ ID NO.:37的VL,

[0066] (e) SEQ ID NO.:42的VH和SEQ ID NO.:47的VL,

[0067] (f) SEQ ID NO.:52的VH和SEQ ID NO.:57的VL,

[0068] (g) SEQ ID NO.:62的VH和SEQ ID NO.:67的VL,

[0069] (h) SEQ ID NO.:74的VH和SEQ ID NO.:82的VL,

[0070] (i) SEQ ID NO.:90的VH和SEQ ID NO.:98的VL,并且

[0071] (j) SEQ ID NO.:106的VH和SEQ ID NO.:114的VL。

[0072] 本发明还提供了编码本发明的抗体或其抗原结合片段的分离的核酸,连同包括这

样的分离的核酸的载体和包括这样的核酸或载体的宿主细胞。在一个实施例中,该载体是表达载体。在另一个实施例中,该载体是非天然存在的重组载体。在一个实施例中,该载体是质粒。在一个实施例中,该载体或质粒包括可操作地连接到一个或多个表达控制元件(例如,启动子、增强子、转录终止子、聚腺苷酸化位点、等)的编码本发明的抗体分子、或其抗原结合片段、本发明的抗体分子的重链或轻链、本发明的抗体的重链或轻链的可变域、或其一部分、或重链或轻链CDR的核苷酸序列、可选择的标记基因、或它们的组合。在一个实施例中,该载体或质粒包括至少一种异源表达控制元件、可选择的标记、或其组合。

[0073] 在一个实施例中,本发明提供了用于通过在适合于抗体或其片段的表达的条件下培养在此描述的宿主细胞,制造抗体或其抗原结合片段的方法。在一个实施例中,该方法包括从该宿主细胞培养物中分离该抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中,该宿主细胞是从其中天然发现该细胞的组织中分离。例如,宿主细胞可以从有机体中分离,并且在细胞培养中离体保持。

[0074] 本发明还提供了包括本发明的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的组合物。在一个实施例中,该组合物包括本发明的抗体或其抗原结合片段以及25mM His和0.15M NaCl (pH6.0)。

[0075] 在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被用于预防或治疗受试者中的乙型流感感染。在另一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段被用于预防或治疗受试者中的甲型流感和乙型流感感染。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被用于制造用于预防或治疗受试者中的乙型流感感染的药物。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被用于制造用于预防或治疗受试者中的甲型流感和乙型流感感染的药物。

[0076] 在一个实施例中,本发明提供了用于预防或治疗受试者中的乙型流感感染的方法,该方法包括向受试者给予有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段。在另一个实施例中,本发明提供了用于预防或治疗受试者中的甲型流感和乙型流感感染的方法,该方法包括向受试者给予有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0077] 在一个实施例中,本发明的抗体或其片段被用于体外诊断受试者中乙型流感感染。在另一个实施例中,本发明的抗体或其片段被用于体外诊断受试者中的甲型流感感染。在又一个实施例中,本发明的抗体或其片段被用于体外诊断受试者中的甲型流感感染和乙型流感感染。

[0078] 附图简要说明

[0079] 图1示出了在与B/香港/330/2001(维多利亚世系)和抗-HA抗体FBD-94和FBC-39,连同缺乏Fc-效应子功能的变体(FBD-94 LALA和FBC-39LALA)的连续稀释一起孵育之后,如通过NK细胞激活测量的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0080] 图2示出了在感染致死剂量的B/四川/379/99(山形)(A和B)或B/香港/330/2001(维多利亚)(C和D)流感病毒之前4小时给予了不同浓度的FBC-39(A和C)、FBD-94(B和D)和非相关对照抗体的存活动物的百分比。

[0081] 图3示出了用致死剂量的B/四川/379/99(山形)(A和B)或B/香港/330/2001(维多利亚)(C和D)感染并且在感染后第2天用不同剂量的FBC-39(A和C)或FBD-94(B和D)或非相关对照抗体治疗的存活动物的百分比。

[0082] 图4示出了用致死剂量的B/香港/330/2001(维多利亚)感染并在感染后1、2、3或4天用3mg/kg的FBC-39(A)或FBD-94(B)或非相关对照抗体治疗的存活动物的百分比。

[0083] 图5示出了使用卡巴特(Kabat)和IMGT编号系统的抗乙型流感抗体FBD-56、FBD-94、FBC-39、FBC-39 LSL、FBC-39 FSL、FBC-39 LTL、FBC-39 FTL、FBC-39 FSS、FBC-39 LTS、和FBC-39 FTS的VH和VL序列内的CDR(加框的)。VH和VL序列内的修饰的氨基酸用粗体和下划线表示。

[0084] 图6示出了基于FBC-39的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:22),通用化抗乙型流感抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:71),其中Xaa₁可以是Val或Glu;Xaa₂可以是Leu或Phe;Xaa₃可以是Thr或Ser;Xaa₄可以是Ser或Leu;Xaa₅可以是Thr或Ser;Xaa₆可以是Thr或Met;Xaa₇可以是Tyr或Phe;Xaa₈可以是Gln或His;Xaa₉可以是Asn或Ser;Xaa₁₀可以是Lys或Arg;Xaa₁₁可以是Thr或Ala。

[0085] 图7示出了基于FBC-39的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:27),通用化抗乙型流感抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:72),其中Xaa₁可以是Phe或Tyr。

[0086] 图8示出了来自在单克隆抗体抗性突变体(MARM)分离中使用的病毒的HA1蛋白的比对。通过MARM选择发现为接触残基的氨基酸位置被加框。

[0087] 详细说明

[0088] 引言

[0089] 本发明提供了如本文所述,结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)并且中和两个系统发生的不同世系中的乙型流感病毒的抗体(包括人类形式)连同抗原结合片段、衍生物/衍生物及其组合物。在一个实施例中,如本文所述,这些抗体或其抗原结合片段结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)并且中和山形和维多利亚世系中的乙型流感病毒;这样的抗乙型流感抗体及其片段在本文称为本发明的抗体。在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)和甲型流感病毒血球凝集素(HA)并且中和至少一种山形世系乙型流感病毒;至少一种维多利亚世系乙型流感病毒;至少一种甲型流感病毒亚型,或其组合。此类抗乙型流感病毒抗体及其片段在本文也称为本发明的抗体。

[0090] 如在此使用,术语“中和”是指抗体或其抗原结合片段结合传染因子(如甲型流感病毒和/或乙型流感病毒)且降低该传染因子的生物活性(例如,毒力)的能力。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合甲型流感病毒;乙型流感病毒,或它们的组合的至少一个特定表位或抗原决定簇。在一个更具体的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合乙型流感病毒血球凝集素(HA)的至少一个特定表位或抗原决定簇。在另一个更具体的实施例中,本发明的抗体或其结合片段免疫特异性地结合乙型流感病毒HA球状头部的至少一个特定表位或抗原决定簇。

[0091] 抗体能够在病毒的生命周期过程中的不同点中和传染因子(如甲型流感病毒和/或乙型流感病毒)的活性。例如,抗体可以通过干扰病毒与一种或多种细胞表面受体的相互作用来干扰该病毒附着至靶细胞。可替代地,抗体可以例如通过干扰经由受体介导的内吞作用进行的病毒内化来干扰该病毒与其受体的一种或多种附着后相互作用。

[0092] 如在此使用,术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”(也被称为免疫球蛋白)涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、单结构域抗体、结构域抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、展现出所希望

的生物活性的抗体片段(例如,抗原结合部分)、二硫键连接的Fv(dsFv)、以及抗独特型(抗Id)抗体(包括(例如)针对本发明的抗体的抗Id抗体)、胞内抗体、以及任何以上的表位结合片段。具体地说,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即,含有至少一个抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以具有任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、亚同种型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或同种异型(例如,Gm,如G1m(f、z、a或x)、G2m(n)、G3m(g、b、或c),Am,Em,以及Km(1、2或3))。

[0093] 人抗体通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,包括两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规律性间隔的链间二硫桥。每条重链在一端具有一个可变结构域(VH),之后跟随多个恒定结构域(CH)。每条轻链在一端具有一个可变结构域(VL)并且在其另一端具有一个恒定结构域(CL);轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,并且轻链的可变结构域与重链的可变结构域对准。基于该轻链恒定区的氨基酸序列,轻链被分类为λ链或κ链。κ轻链的可变结构域在此还可以表示为VK。

[0094] 本发明的抗体包括全长或完整抗体、抗体片段(包括抗原结合片段)、天然序列抗体或氨基酸变体,人、人源化、翻译后修饰、嵌合或融合抗体,免疫轭合物、以及其功能性片段。抗体可以在Fc区中被修饰以便提供所希望的效应子功能或血清半衰期。如在以下部分中更详细地论述,在具有适当的Fc区的情况下,在细胞表面上结合的裸抗体可以诱导细胞毒性:例如经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或通过补体依赖性细胞毒性(CDC)中募集补体,或通过募集表达一个或多个效应子配体的非特异性细胞毒性细胞,这些效应子配体识别甲型流感病毒和/或乙型流感病毒上的结合的抗体并且随后在抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中引起该细胞的吞噬作用;或一些其他机制。可替代地,在希望消除或减少效应子功能以便于最小化副作用或治疗并发症的情况下,可以使用某些其他Fc区。在此描述了用于增强连同减少或消除Fc效应子功能的方法。可替代地,本发明的抗体的Fc区可以被修饰来提高对FcRn的结合亲和力并且因此增加血清半衰期。可替代地,Fc区可以轭合至PEG或白蛋白以便增加血清半衰期,或可以是产生所希望的作用的一些其他轭合作用。

[0095] 在一个实施例中,抗体适用于诊断、预防、治疗和/或减轻哺乳动物中的乙型流感病毒感染的一种或多种症状。在另一个实施例中,抗体适用于诊断、预防、治疗和/或减轻动物中的甲型流感病毒和乙型流感病毒感染的一种或多种症状。如在此使用,术语“动物”是指哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物、狗、猫、马、兔、小鼠、和大鼠;和非哺乳动物物种,包括但不限于鸟类物种,例如鸡、火鸡、鸭、和鹌鹑。

[0096] 本发明提供了包括本发明的抗体和载体的组合物。出于预防或治疗乙型流感病毒感染的目的,组合物可以被给予至需要这种治疗的患者。在一个实施例中,可以向患者给予该组合物用于预防或治疗甲型流感病毒感染;乙型流感病毒感染;和它们的组合。本发明还提供了包括本发明的抗体和载体的配制品。在一个实施例中,该配制品是包括药学上可接受的载体的治疗性配制品。

[0097] 在某些实施例中,本发明提供适用于预防或治疗哺乳动物中的乙型流感感染的方法,这些方法包括向该哺乳动物给予治疗有效量的抗体。在其他实施例中,本发明提供适用于预防或治疗哺乳动物中的甲型流感病毒感染;乙型流感病毒感染;和它们的组合的方法,

这些方法包括向该哺乳动物给予治疗有效量的抗体。可以如医师所指导进行短期(急性地)、慢性地、或间歇性地给予抗体治疗性组合物。

[0098] 在某些实施例中,本发明还提供了包括至少一种本发明的抗体的制品,如无菌剂型和试剂盒。可以提供含有用于例如在ELISA或蛋白质印迹中体外检测和定量流感病毒的抗体的试剂盒。适用于检测的这种抗体可以提供有标记,如荧光或放射性标记。

[0099] 术语

[0100] 在详细描述本发明之前,应当了解的是,本发明并不限于特定的组合物或方法步骤,因为这些组合物或方法步骤可以改变。必须注意的是,除非上下文中另外清楚地指出,如在本说明书及所附权利要求中所使用,单数形式“一种/一个(a/an)”和“该”包括复数指示物。

[0101] 除非另外定义,在此所用的所有技术和科学术语具有与本发明所涉及领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。例如,生物医学与分子生物学简明词典(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology),Juo,Pei-Show,(2002),第二版,CRC出版社;细胞与分子生物学词典(The Dictionary of Cell and Molecular Biology),第三版,(1999),学术出版社(Academic Press);以及生物化学与分子生物学牛津词典(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology),修订版,(2000),牛津大学出版社(Oxford University Press)为技术人员提供在本发明中使用的许多术语的常用词典。

[0102] 氨基酸可以在此通过它们的通常已知的三字母符号或通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来提及。同样地,核苷酸可以通过它们的普遍公认的单字母代码而被提及。

[0103] 抗乙型流感病毒抗体

[0104] 在某些实施例中,这些抗体是分离的和/或纯化的和/或无热原的抗体。如在此使用的术语“纯化”是指已经从其天然环境的组分中鉴别和分离和/或回收的其他分子,例如多肽、核酸分子。因此,在一个实施例中,本发明的抗体是纯化的抗体,其中它们已经与其天然环境的一种或多种组分分离。如在此使用的术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体分子的抗体(例如,特异性地结合乙型流感病毒的分离的抗体基本上不含特异性地结合不同于乙型流感病毒HA抗体的抗原的抗体)。因此,在一个实施例中,本发明的抗体是分离的抗体,它们已经与具有不同特异性的抗体分离。典型地,分离的抗体是单克隆抗体。此外,本发明的分离抗体可以是基本上不含一种或多种其他细胞材料和/或化学品的并且在此被称为分离和纯化抗体。在本发明的一个实施例中,“分离的”单克隆抗体的组合涉及具有不同特异性且组合在明确定义的组合物中的抗体。在下文更详细地描述产生和纯化/分离抗体的方法。

[0105] 本发明的分离抗体包含在此披露的由任何适合的多核苷酸编码的抗体氨基酸序列,或任何分离的或配制的抗体。

[0106] 本发明的抗体免疫特异性地结合对乙型流感病毒HA蛋白特异的至少一个特定表位。如在此使用的术语“表位”是指能够结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常包括如氨基酸或糖侧链的分子的化学活性表面基团,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于:在变性溶剂存在下,与前者的结合丧失但与后者的结

合不丧失。

[0107] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于至少两个系统发生的不同乙型流感世系中的表位。在更具体的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于至少一种乙型流感山形株和至少一种乙型流感维多利亚株中的表位。在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于山形世系和维多利亚世系两者的乙型流感病毒中的表位。在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合在山形世系和维多利亚世系两者的乙型流感中为保守的表位。

[0108] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至少一种乙型流感山形株和至少一种乙型流感维多利亚株,其中半最大有效浓度(EC_{50})为在约1ng/ml与约500ng/ml之间、或在约1ng/ml与约250ng/ml之间、或在约1ng/ml与约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、40ng/ml、30ng/ml、20ng/ml、或15 μ g/ml。在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合山形和维多利亚世系的乙型流感病毒,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml与约500ng/ml之间、或在约1ng/ml与约250ng/ml之间、或在约1ng/ml与约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、40ng/ml、30ng/ml、20ng/ml、或15 μ g/ml。在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于山形世系和维多利亚世系两者的乙型流感病毒中的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml与约500ng/ml之间、或在约1ng/ml与约250ng/ml之间、或在约1ng/ml与约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、40ng/ml、30ng/ml、20ng/ml、或15 μ g/ml。

[0109] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于乙型流感山形世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约100ng/ml之间、在1ng/ml至约50ng/ml之间、或在约1ng/ml至约25ng/ml之间、或小于约50ng/ml或25ng/ml;并且结合存在于乙型流感维多利亚世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约500ng/ml之间、或在约1ng/ml至约250ng/ml之间、或在约1ng/ml至约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml或50ng/ml。

[0110] 在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于乙型流感山形世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约100ng/ml之间、在1ng/ml至约50ng/ml之间、或在约1ng/ml至约25ng/ml之间、或小于约50ng/ml或25ng/ml;结合存在于乙型流感维多利亚世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约500ng/ml之间、或在约1ng/ml至约250ng/ml之间、或在约1ng/ml至约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml或100ng/ml;并且结合甲型流感HA上的表位,其中 EC_{50} 为在约1 μ g/ml至约50 μ g/ml之间、或小于约50 μ g/ml、25 μ g/ml、15 μ g/ml或10 μ g/ml。在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合存在于乙型流感山形世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约100ng/ml之间、在1ng/ml至约50ng/ml之间、或在约1ng/ml至约25ng/ml之间、或小于约50ng/ml或25ng/ml;结合存在于乙型流感维多利亚世系上的表位,其中 EC_{50} 为在约1ng/ml至约500ng/ml之间、或在约1ng/ml至约250ng/ml之间、或在约1ng/ml至约50ng/ml之间、或小于约500ng/ml、250ng/ml或100ng/ml;并且结合甲型H9流感HA上的表位,其中 EC_{50} 为在约1 μ g/ml至约50 μ g/ml之间、或小于约50 μ g/ml、25 μ g/ml、15 μ g/ml或10 μ g/ml。

[0111] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段识别为线性表位抑或连续表位的表位。在另一个实施例中,抗体或其抗原结合片段识别非线性或构象表位。在一个实施例中,表位位于乙型流感的血球凝集素(HA)糖蛋白上。在更具体的实施例中,表位位于乙型流感的HA

糖蛋白的头部区域。在一个实施例中,表位包括在乙型流感HA的头部区域中的位置128、141、150或235处作为接触残基的一个或多个氨基酸,这些氨基酸是根据如在王(Wang)等人(2008)病毒学杂志(J.Virol.) 82(6):3011-20中所述的H3编号系统来编号的。在一个实施例中,表位包括乙型流感HA的头部区域的序列中的氨基酸128作为接触残基。在另一个实施例中,表位包括乙型流感HA的头部区域的序列中的氨基酸141、150和235作为接触残基。

[0112] 由本发明的抗体或其抗原结合片段识别的一个或多个表位可以具有多种用途。例如,呈纯化或合成形式的表位可以用于产生免疫应答(即,作为疫苗,或用于产生用于其他用途的抗体)或用于针对与该表位发生免疫反应的抗体筛选血清。在一个实施例中,由本发明的抗体或其抗原结合片段识别的表位或具有这种表位的抗原可以用于产生免疫应答的疫苗。在另一个实施例中,本发明的抗体和抗原结合片段可以用于例如通过测定疫苗中的抗原是否含有呈正确构象的正确免疫原性表位来监测疫苗的质量。

[0113] 可变区

[0114] 如在此使用,术语“亲本抗体”是指由用于制备在此定义的变体或衍生物的氨基酸序列编码的抗体。亲本多肽可以包含天然抗体序列(即,天然存在的,包括天然存在的等位基因变体)或天然存在序列的具有事先存在的氨基酸序列修饰(如其他插入、缺失和/或取代)的抗体序列。亲本抗体可以是人源化抗体或人抗体。在一个实施例中,本发明的抗体是亲本抗体的变体。如在此使用,术语“变体”是指借助在亲本抗体序列中添加、缺失和/或取代一个或多个氨基酸残基而在氨基酸序列上不同于“亲本”抗体氨基酸序列的抗体。

[0115] 抗体的抗原结合部分包含抗体的保留了特异性地结合抗原的能力的一个或多个片段。已经示出抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的抗原结合片段的实例包括:(i) Fab片段,其是包含VL结构域、VH结构域、CL结构域、以及CH1结构域的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其是在铰链区包含由二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,其包含VH结构域和CH1结构域;(iv) Fv片段,其包含抗体的单臂的VL结构域和VH结构域;(v) dAb片段(华德(Ward)等人,(1989)自然(Nature) 341:544-546),其包含VH结构域;以及(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH是由单独的基因编码的,但是它们可以使用重组方法通过合成连接子来接合,该合成连接子使它们能够被制备为单一蛋白链,其中VL区和VH区配对以便形成单价分子(被称为单链Fv(scFv);参见例如,博尔德(Bird)等人(1988)科学(Science) 242:423-426;和休斯顿(Huston)等人(1988)美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 85:5879-5883)。这类单链抗体还旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段是使用本领域的技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用来筛选这些片段。可以通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶裂解或化学裂解来产生抗原结合部分。

[0116] 本发明的抗体包含至少一个抗原结合结构域,该抗原结合结构域包含本文所述的VH和VL结构域。示例性VH和VL结构域示于下表1中。

[0117] 表1.VH和VL结构域

[0118]

	VH (DNA) SEQ ID NO:	VL (DNA) SEQ ID NO:	VH (AA) SEQ ID NO:	VL (AA) SEQ ID NO:
FBD-56	1	6	2	7
FBD-94	11	16	12	17
FBC-39	21	26	22	27
FBC-39 LSL	31	36	32	37
FBC-39 FSL	41	46	42	47
FBC-39 LTL	51	56	52	57
FBC-39 FTL	61	66	62	67
FBC-39-FSS	73	81	74	82
FBC-39-LTS	89	97	90	98
FBC-39-FTS	105	113	106	114

[0119] 在某些实施例中,纯化抗体包含与本文披露的VH和/或VL序列中的至少一个具有给定一致性百分比的VH和/或VL。如在此使用,术语“序列一致性百分比(%)”(还包括“同源性”)被定义为在比对序列并且(必要时)引入空位以便获得最大的序列一致性百分比并且不将任何保守取代视为序列一致性的部分之后,在候选序列中的氨基酸残基或核苷酸与在参考序列(如亲本抗体序列)中的氨基酸残基或核苷酸一致的百分比。除了手动之外,用于比较的最佳序列比对可以通过以下各项来产生:史密斯(Smith)和沃特曼(Waterman)的局部同源性算法,(1981),应用数学进展(AdApp.Math.) 2:482;尼德曼(Needleman)和翁施(Wunsch)的局部同源性算法,(1970),分子生物学杂志48:443;皮尔森(Pearson)和利普曼(Lipman)的相似性搜索方法,(1988),美国科学院院刊85:2444;或使用这些算法的计算机程序(威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package),遗传学计算机组,575大学道,麦迪逊,威斯康星州中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLASTP、BLASTN和TFASTA)。

[0120] 本发明的抗体可以包含与在此所述的VH氨基酸序列具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH氨基酸序列。在另一个实施例中,本发明的抗体可以具有与本文所述的VH氨基酸序列的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VH氨基酸序列。

[0121] 本发明的抗体可以包含与在此所述的VL氨基酸序列具有具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL氨基酸序列。在另一个实施例中,本发明的抗体可以具有与本文所述的VL氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VL氨基酸序列。

[0122] 互补决定区(CDR)

[0123] 当可变域(VH和VL)包含抗原结合区时;变异性不是通过抗体的可变域均匀分布的。它被集中在轻链(VL或VK)和重链(VH)可变结构域两者中的称为互补决定区(CDR)的区段中。这些可变结构域的更高保守性的部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含由三个CDR连接的四个FR,这四个FR大体上采用 β -片层构型,这三个CDR形成连接 β -片层结构的环并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每个链中的CDR由FR紧密靠近地保持在一起,与来自另一个链的CDR促成了抗体的抗原结合位点的形成。重链的三个CDR被指定为HCDR-1、HCDR-2和HCDR-3,而轻链的三个CDR被指定为LCDR-1、LCDR-2和LCDR-3。

[0124] 在一个实施例中,可以鉴定抗体的可变结构域、互补决定区(CDR)和框架区(FR)中的氨基酸,遵循卡巴特(Kabat)等人(1991)免疫学目的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)第5版,公共卫生服务,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入该FR或CDR中的较少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据卡巴特(Kabat)的残基52a)以及在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据卡巴特(Kabat)的残基82a、82b、以及82c等)。可以通过抗体序列与“标准”卡巴特(Kabat)编号序列在同源区的比对而针对给定的抗体确定残基的卡巴特(Kabat)编号。构架残基的最大比对常常需要在编号系统中插入“间隔”残基。另外,由于种间或等位基因差异,在任何给定的卡巴特(Kabat)位点编号处的某些单独残基的身份可以从抗体链变化到抗体链。

[0125] 根据卡巴特(Kabat)等人的编号系统,HCDR-1在大致氨基酸31处(即,在第一个半胱氨酸残基之后大致9个残基处)开始,包括大致5-7个氨基酸,并且在下一个酪氨酸残基处结束。HCDR-2在CDR-H1末端之后的第十五个残基处开始,包括大致16-19个氨基酸,并且在下一个精氨酸或赖氨酸残基处结束。HCDR-3在HCDR-2末端之后的大致第三十三个氨基酸残基处开始;包括3-25个氨基酸;并且在序列W-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。LCDR-1在大致残基24(即,在半胱氨酸残基之后)处开始;包括大致10-17个残基;并且在下一个酪氨酸残基处结束。LCDR-2在LCDR-1末端之后大致第十六个残基处开始,并且包括大致7个残基。LCDR-2在LCDR-2末端之后的大致第三十三个残基处开始;包括大致7-11个残基并且在序列F-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。注意CDR从抗体到抗体相当不同(并且通过限定将不展现与卡巴特(Kabat)共有序列的同源性)。使用卡巴特(Kabat)系统来编号的本发明的抗体的CDR重链和轻链序列示于下表2和表3中。

[0126] 表2.HCDR-1-3,如由卡巴特(Kabat)等人所鉴定的

	HCDR-1 SEQ ID NO:	HCDR-2 SEQ ID NO:	HCDR-3 SEQ ID NO:
FBD-56	3	4	5
FBD-94	13	14	15
FBC-39	23	24	25
FBC-39 LSL	33	34	35
FBC-39 FSL	43	44	45
FBC-39 LTL	53	54	55
FBC-39 FTL	63	64	65
FBC-39-FSS	75	76	77
FBC-39-LTS	91	92	93
FBC-39-FTS	107	108	109

[0128] 表3.LCDR-1-3,如由卡巴特(Kabat)等人所鉴定的

[0129]

	LCDR-1 SEQ ID NO:	LCDR-2 SEQ ID NO:	LCDR-3 SEQ ID NO:
FBD-56	8	9	10
FBD-94	18	19	20
FBC-39	28	29	30
FBC-39 LSL	38	39	40
FBC-39 FSL	48	49	50
FBC-39 LTL	58	59	60
FBC-39 FTL	68	69	70
FBC-39-FSS	83	84	85
FBC-39-LTS	99	100	101
FBC-39-FTS	115	116	117

[0130] 尽管卡巴特 (Kabat) 编号方案被广泛使用,但是它具有一些缺点。首先,由于从序列数据开发了编号方案,所以在结构信息不存在的情况下,在LCDR-1和HCDR-1中发生插入的位置不总是匹配结构插入位置。因此,这些环中的拓扑等同残基可能不接收相同的数字。第二,编号系统是严格的,仅允许有限数量的插入。如果存在比分配的编号系统更多的残基用于插入,则没有对它们进行编号的标准方式。

[0131] 在另一个实施例中,可以使用免疫遗传学 (IMGT) 数据库 (<http://imgt.cines.fr>) 来鉴定抗体的可变结构域、互补决定区 (CDR) 和框架区 (FR) 中的氨基酸。勒弗朗 (Lefranc) 等人 (2003) 发展与比较免疫学 (DevCompImmunol) 27 (1):55-77。使用免疫球蛋白 (IgG)、T细胞受体 (TcR) 和主要组织相容性复合体 (MHC) 分子的序列信息开发了IMGT数据库,该IMGT数据库统一了跨越抗体 λ 和 κ 轻链、重链和T细胞受体链的编号并且避免对除了不常见的长插入之外的所有使用插入代码。IMGT还考虑并且结合了来自卡巴特 (Kabat) 等人的对框架 (FR) 和互补决定区 (CDR) 的定义,来自乔西亚 (Chothia) 等人的对高变环的表征连同来自X射线衍射研究的结构数据。使用IMGT系统编号的本发明抗体的CDR重链和轻链序列示于下表4和5中。图5提供了示出由卡巴特 (Kabat) 和IMGT鉴定的CDR序列的FBD-56、FBD-94和FBC-39序列的比对。

[0132] 表4.HCDR-1-3,如通过IMGT鉴定的

[0133]

	HCDR-1 SEQ ID NO:	HCDR-2 SEQ ID NO:	HCDR-3 SEQ ID NO:
FBC-39	121	122	123
FBC-39 LSL	127	128	129
FBC-39 FSL	133	134	135
FBC-39 LTL	139	140	141
FBC-39 FTL	145	146	147
FBC-39-FSS	78	79	80
FBC-39-LTS	94	95	96
FBC-39-FTS	110	111	112

[0134] 表5.LCDR-1-3,如通过IMGT鉴定的

		LCDR-1 SEQ ID NO:	LCDR-2 SEQ ID NO:	LCDR-3 SEQ ID NO:
[0135]	FBC-39	124	125	126
	FBC-39 LSL	130	131	132
	FBC-39 FSL	136	137	138
	FBC-39 LTL	142	143	144
	FBC-39 FTL	148	149	150
	FBC-39-FSS	86	87	88
	FBC-39-LTS	102	103	104
[0136]	FBC-39-FTS	118	119	120

[0137] 本发明涵盖中和抗乙型流感抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:32;SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:52;SEQ ID NO:62;SEQ ID NO:74;SEQ ID NO:90;或SEQ ID NO:106的VH的氨基酸序列一致至少75%、80%、85%、90%、95%或100%;和/或与SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:27;SEQ ID NO:37;SEQ ID NO:47;SEQ ID NO:57;SEQ ID NO:67;SEQ ID NO:82;SEQ ID NO:98;或SEQ ID NO:114的VL的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的序列中的氨基酸。在另一个实施例中,本发明涵盖中和抗乙型流感抗体,该抗体包括与SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:32;SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:52;SEQ ID NO:62;SEQ ID NO:74;SEQ ID NO:90;或SEQ ID NO:106的VH的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致;和/或与SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:27;SEQ ID NO:37;SEQ ID NO:47;SEQ ID NO:57;SEQ ID NO:67;SEQ ID NO:82;SEQ ID NO:98;或SEQ ID NO:114的VL的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的序列中的氨基酸。

[0138] 在另一个实施例中,发明提供了包含一组六个CDR的多个抗体及其抗原结合片段:HCDCR-1、HCDCR-2、HCDCR-3、LCDR-1、LCDR-2、LCDR-3,其中CDR选自表2至5中所示的HCDCR和LCDR。在另一个实施例中,本发明提供了包含一组六个CDR的多个抗体及其抗原结合片段:HCDCR-1、HCDCR-2、HCDCR-3、LCDR-1、LCDR-2、LCDR-3,其中CDR包括与表2至5中所示的HCDCR和LCDR的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的序列中的氨基酸。在另一个实施例中,本发明提供了包含一组六个CDR的多个抗体及其抗原结合片段:HCDCR-1、HCDCR-2、HCDCR-3、LCDR-1、LCDR-2、LCDR-3,其中CDR包括与表2至5中所示的HCDCR和LCDR的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的序列中的氨基酸。

[0139] 框架区

[0140] 重链和轻链的可变结构域各自包含四个框架区(FR1、FR2、FR3、FR4),这些框架区是可变结构域的更高保守性的部分。重链的四个FR被指定为FR-H1、FR-H2、FR-H3、以及FR-H4,并且轻链的四个FR被指定为FR-L1、FR-L2、FR-L3、以及FR-L4。

[0141] 在一个实施例中,该卡巴特(Kabat)编号系统可以用来鉴定这些框架区。根据卡巴特(Kabat)等人,FR-H1开始于位置1并且在大致氨基酸30处结束,FR-H2大致是从氨基酸36至49,FR-H3大致是从氨基酸66至94,并且FR-H4大致是氨基酸103至113。FR-L1开始于氨基酸1并且在大致氨基酸23处结束,FR-L2大致是从氨基酸35至49,FR-L3大致是从氨基酸57至88,并且FR-L4大致是从氨基酸98至107。在某些实施例中,框架区可以含有根据卡巴特

(Kabat) 编号系统的取代,例如在FR-L1中106A处的插入。除了天然存在的取代之外,FR残基的一种或多种改变(例如,取代)也可以被引入本发明的抗体中,只要它保留中和能力。在某些实施例中,这些改变产生针对乙型流感病毒HA的抗体的结合亲和力的改进或优化。用于修饰的框架区残基的实例包括直接非共价结合抗原的那些(阿密特(Amit)等人,(1986),科学(Science),233:747-753);与CDR相互作用/实现CDR的构象的那些(乔西亚(Chothia)等人,(1987),分子生物学杂志,196:901-917);和/或参与VL-VH界面的那些(美国专利号5,225,539)。在其他实施例中,这些框架区可以使用IMGT的编号系统来鉴定。

[0142] 在另一个实施例中,出于“种系化(germlining)”的目的,FE可以包含一个或多个氨基酸变化。例如,可以将所选择的抗体重链和轻链的氨基酸序列与种系重链和轻链氨基酸序列进行比较,其中所选择的VL链和/或VH链的某些框架残基不同于种系构型(例如,由于免疫球蛋白的体细胞突变),可能希望的是使所选择抗体的改变的框架残基“回复突变”为种系构型(即,改变所选择的抗体的框架氨基酸序列,这样使得它们与种系框架氨基酸序列相同),例如以降低免疫原性的机会。框架残基的这种“回复突变”(或“种系化”)可以通过用于引入特定突变的标准分子生物学方法(例如,定点诱变;PCR介导的诱变,等)来完成。

[0143] 图6示出了通用化抗乙型流感抗体的VH结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:71),其中,FBC-39(SEQ ID NO:22)中的非种系残基被指定为Xaa₁₋₁₁。在一个实施例中,一个或多个非种系(Xaa₁₋₁₁)残基被“回复突变”至种系。在一个实施例中,SEQ ID NO:71的Xaa₁是Val或Glu;SEQ ID NO:71的Xaa₂是Leu或Phe;SEQ ID NO:71的Xaa₃是Ser或Thr;SEQ ID NO:71的Xaa₄是Leu或Ser;SEQ ID NO:71的Xaa₅是Ser或Thr;SEQ ID NO:71的Xaa₆是Met或Thr;SEQ ID NO:71的Xaa₇是Phe或Tyr;SEQ ID NO:71的Xaa₈是His或Gln;SEQ ID NO:71的Xaa₉是Ser或Asn;SEQ ID NO:71的Xaa₁₀是Arg或Lys;并且SEQ ID NO:71的Xaa₁₁是Ala或Thr。在另一个实施例中,SEQ ID NO:71的Xaa₁是Glu;SEQ ID NO:71的Xaa₅是Thr;SEQ ID NO:71的Xaa₆是Thr;SEQ ID NO:71的Xaa₇是Tyr;SEQ ID NO:71的Xaa₈是Gln;SEQ ID NO:71的Xaa₁₀是Lys;SEQ ID NO:71的Xaa₁₁是Thr,或其组合。在更具体的实施例中,SEQ ID NO:71的Xaa₉是Ser。在又一个实施例中,SEQ ID NO:71的Xaa₄是Leu。

[0144] 图7示出了通用化抗乙型流感抗体的VL结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:72),其中FBC-39(SEQ ID NO:27)的非种系残基是由Xaa₁表示。在一个实施例中,该非种系残基(Xaa₁)被“回复突变”至种系。在一个实施例中,SEQ ID NO:72的Xaa₁是Phe或Tyr。在更具体的实施例中,SEQ ID NO:72的Xaa₁是Tyr。

[0145] 编码本发明的抗体的核苷酸序列

[0146] 除了以上所述的氨基酸序列之外,本发明进一步提供对应于这些氨基酸序列并且编码本发明的人抗体的核苷酸序列。在一个实施例中,本发明提供多核苷酸,这些多核苷酸包含编码在此所述的抗体或其片段的核苷酸序列。这些包括但不限于编码以上提及的氨基酸序列的核苷酸序列。因此,本发明还提供编码包含在此所述的抗体的CDR和FR的VH和VL框架区的多核苷酸序列以及用于它们在细胞(例如哺乳动物细胞)中有效表达的表达载体。使用多核苷酸制备抗体的方法在下文更详细地描述。

[0147] 本发明还涵盖在严格或较低严格性杂交条件(例如,如在此所定义)下与编码在此所述的本发明的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。如在此使用的术语“严格性”是指杂交实验的实验条件(例如,温度和盐浓度),指示在探针与过滤器结合的核酸之间的同源性的程

度;严格性越高,探针与过滤器结合的核酸之间的同源性百分比越高。

[0148] 严格杂交条件包括但不限于:在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中、在约45℃下杂交至过滤器结合的DNA,随后在约50℃-65℃下在0.2X SSC/0.1%SDS中洗涤一次或多次;高度严格条件如在6X SSC中、在约45℃下杂交至过滤器结合的DNA,随后在约65℃下在0.1X SSC/0.2%SDS中洗涤一次或多次;或者本领域的技术人员已知的任何其他严格杂交条件(参见例如,奥苏贝尔(Ausubel)F.M.等人编辑,(1989)当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology),第1卷,格林出版协会公司(Green Publishing Associates,Inc.)和约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.),纽约,第6.3.1至6.3.6页和第2.10.3页)。

[0149] 基本上一致的序列可以是多态性序列,即种群中的可替代序列或等位基因。等位基因差异可以小到一个碱基对。基本上一致的序列还可以包含诱变序列,包括具有沉默突变的序列。突变可以包含一个或多个残基改变、一个或多个残基的缺失、或一个或多个另外的残基的插入。

[0150] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸以及确定的多核苷酸的核苷酸序列。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,那么编码该抗体的多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸来组装(例如,如库特梅尔(Kutmeier)等人,(1994),生物技术(BioTechniques)17:242中所描述),简单地说,这涉及合成含有编码该抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸,退火并且连接那些寡核苷酸,并且然后通过PCR来扩增所连接的寡核苷酸。

[0151] 编码抗体的多核苷酸还可以从来自适合来源的核酸产生。如果含有编码具体抗体的核酸的克隆是不可获得的,但抗体分子的序列是已知的,则编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成,或通过PCR扩增使用与序列的3'和5'端可杂交合成引物,或通过使用对具体基因序列具有特异性的寡核苷酸探针以便鉴别例如来自cDNA文库的编码抗体的cDNA克隆来进行克隆,而从适合的来源(例如,抗体cDNA文库、或从表达抗体的任何组织或细胞产生的cDNA文库、或从这些组织或细胞分离的核酸(在一个实施例中,polyA+RNA),这些细胞如被选择为表达抗体的杂交瘤细胞)获得。接着可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆进可复制的克隆载体中。

[0152] 一旦确定抗体的核苷酸序列和相应氨基酸序列,就可以使用本领域中熟知用于操纵核苷酸序列的方法,例如重组DNA技术、定点诱变、PCR等(参见,例如以下文献中所描述的技术:萨布鲁克(Sambrook)等人,1990,分子克隆:实验手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual),第2版,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约;和奥苏贝尔等人编辑,1998,当代分子生物学实验指南,约翰威利父子公司,纽约)来对抗体的核苷酸序列进行操纵以产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如以产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0153] 结合特征

[0154] 如上所述,本发明的抗体或抗原结合片段专有地抑或相对于其他多肽优先地免疫特异性地结合乙型流感病毒HA蛋白、肽、亚基、片段、部分或其任何组合的至少一个特定表位或抗原决定簇。在一个具体实施例中,乙型流感病毒HA蛋白的表位或抗原决定簇是球状头部。如在此使用的术语“表位”或“抗原决定簇”是指能够结合抗体的蛋白质决定簇。在一个实施例中,在此的术语“结合”涉及特异性结合。这些蛋白质决定簇或表位通常包括分子

(如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于:在变性溶剂存在下,与前者的结合丧失但与后者的结合不丧失。如在此使用的术语“非连续表位”是指在从蛋白质的一级序列中的至少两个分开的区域形成的蛋白质抗原上的构象表位。

[0155] 抗原与抗体之间的相互作用与其他非共价蛋白质-蛋白质相互作用相同。通常,四种类型的结合相互作用存在于抗原和抗体之间:(i)氢键,(ii)分散力,(iii)在路易斯酸与路易斯碱之间的静电力,以及(iv)疏水相互作用。疏水相互作用是抗体-抗原相互作用的主要驱动力,并且是基于经由非极性基团的水的排斥而不是分子的吸引(丹佛(Tanford), (1978), 科学(Science), 200:1012-8)。然而,某些物理力也促成抗原-抗体结合,例如表位形状与不同抗体结合位点的配合或互补。此外,其他材料和抗原可以与抗体发生交叉反应,由此竞争可获得的游离抗体。

[0156] 抗原与抗体之间的结合的亲和力常数和特异性的测量可以协助确定使用本发明的抗体的预防、治疗、诊断或研究方法的功效。“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如在此使用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由平衡解离常数(Kd)表示,计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见,例如陈(Chen)等人, (1999) 分子生物学杂志(J. Mol Biol.) 293:865-881。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于更长地保持结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的,其中的任何方法均可以用于本发明的目的。

[0157] 用于确定结合亲和力的方法包括通过使用感兴趣的抗体的Fab版本及其抗原执行的放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量解离常数“Kd”,如由陈(Chen)等人(1999) 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 293:865-881描述的可替代地,可以通过使用表面等离子体共振测定来测量Kd值,该测定使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore公司,皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西州)。如果结合速度超过由表面等离子体共振测定的 $10^6 M^{-1} S^{-1}$,然后结合速率可以通过使用在增加浓度的抗原存在下测量荧光发射强度的增加或减少的荧光猝灭技术来确定。还可以使用上述相同的表面等离子体共振技术来确定“结合速率”(on-rate或rate of association或association rate或 k_{on})。

[0158] 适用于确定本发明的抗体或其改变/突变的衍生物的结合特征的方法和试剂是本领域中已知的和/或是可商购的(美国专利号6,849,425;6,632,926;6,294,391;6,143,574)。此外,被设计用于这类动力学分析的设备 and 软件是可商购的(例如 **Biacore®** A100和 **Biacore®** 2000仪器;Biacore International AB公司,乌普萨拉(Uppsala),瑞典)。

[0159] 在一个实施例中,本发明的抗体(包括其抗原结合片段或变体)还可以在它们对甲型流感病毒多肽;乙型流感病毒多肽;或它们的组合的结合亲和力方面进行描述或说明。典型地,具有高亲和力的抗体具有小于 $10^{-7} M$ 的Kd。在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽;乙型流感多肽;它们片段或变体;或它们的组合,其中解离常数或Kd小于或等于 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 或 $10^{-15} M$ 。在更具体的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽;乙型流感多肽,它们的片段或变体;或它们

组合,其中解离常数或Kd小于或等于 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 或 10^{-12}M 。本发明涵盖结合甲型流感多肽;乙型流感多肽;或其组合的解离常数或Kd在任何单独列举的值之间的范围内的抗体。

[0160] 在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽;乙型流感多肽,它们的片段或变体;或它们组合,其中解离速率(k_{off})小于或等于 $5 \times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 、或 10^{-3}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-4}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5}\text{sec}^{-1}$ 、或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7}\text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 。在更具体的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽或它的片段或变体,其中解离速率(k_{off})小于或等于 $5 \times 10^{-4}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5}\text{sec}^{-1}$ 、或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7}\text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 。本发明还涵盖结合甲型流感多肽;乙型流感多肽;或其组合的解离速率(k_{off})在任何单独列举的值之间的范围内的抗体。

[0161] 在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽;乙型流感多肽,它们的片段或变体;或它们的组合,其中结合速率(k_{on})大于或等于 $10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 。在更具体的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段结合甲型流感多肽;乙型流感多肽,它们的片段或变体;或它们组合,其中结合速率(k_{on})大于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 。本发明涵盖结合甲型流感多肽;乙型流感多肽;或其组合的结合速率($k_{\text{结合}}$)在任何单独列举的值之间的范围内的抗体。

[0162] 在一个实施例中,可以将结合测定作为直接结合测定抑或作为竞争结合测定而进行。可以使用标准ELISA或标准流式细胞术测定来检测结合。在直接结合测定中,测试了候选抗体与其同源抗原的结合。在另一方面,竞争结合测定评定了候选抗体与已知的抗体或结合具体抗原,例如乙型流感病毒HA的其他化合物竞争的能力。一般来说,允许抗体与能够被检测的乙型流感病毒HA结合的任何方法被涵盖在用于检测和测量抗体的结合特征的本发明的范围内。本领域的技术人员将认识到这些熟知的方法并且出于这一原因未在此详细地提供。还利用这些方法来筛选提供所希望的特征的那些的一组抗体。

[0163] 在一个实施例中,本发明的抗体免疫特异性地结合乙型流感病毒HA并且能够中和乙型流感病毒感染。在一个实施例中,本发明的抗体免疫特异性地结合至少一种山形世系乙型流感病毒和至少一种维多利亚世系乙型流感病毒。在另一个实施例中,本发明的抗体免疫特异性结合山形世系和维多利亚世系乙型流感病毒。

[0164] 在另一个实施例中,本发明的抗体免疫特异性地结合乙型流感病毒HA和甲型流感病毒HA并且能够中和乙型流感病毒和甲型流感病毒感染。在一个实施例中,本发明的抗体免疫特异性地结合至少一种山形世系乙型流感病毒;至少一种维多利亚世系乙型流感病毒和至少一种甲型流感病毒亚型。

[0165] 甲型流感病毒的血凝素亚型分为两个主要系统发育分组,这些分组被鉴别为1组,该组包括亚型H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、以及H17;和2组,该组包括亚型H3、H4、H7、H10、H14、以及H15。在一个实施例中,根据本发明的抗体或抗原结合片段能够结合和/或中和选自H8、H9、H11、H12、H13、H16和H17及其变体的一种或多种甲型流感病毒组1亚型。在另一个实施例中,根据本发明的抗体或抗原结合片段能够结合和/或中和选自H4、

H10、H14和H15及其变体的一种或多种甲型流感病毒组2亚型。在一个实施例中，本发明的抗体结合甲型流感病毒组1亚型H9。在一个实施例中，本发明的抗体结合并中和甲型流感病毒组1亚型H9。

[0166] 在一个实施例中，本发明的抗体免疫特异性地结合乙型流感病毒HA并且能够中和乙型流感病毒感染。在另一个实施例中，本发明的抗体免疫特异性地结合甲型流感和乙型流感病毒HA并且能够中和甲型流感和乙型流感病毒感染。中和测定可以如在此实例部分中所描述或使用本领域中已知的其他方法来进行。术语“50%抑制浓度”（缩写为“IC₅₀”）表示用于甲型流感和/或乙型流感病毒的50%中和所需的抑制剂（例如，本发明的抗体）的浓度。本领域的普通技术人员将了解，更低的IC₅₀值对应于更有效的抑制剂。

[0167] 在一个实施例中，根据本发明的抗体或其抗原结合片段在微量中和测定中具有的对中和乙型流感病毒的IC₅₀在从约0.001μg/ml至约5μg/ml的范围中、或从约0.001μg/ml至约1μg/ml的抗体的范围中、或为小于5μg/ml、小于2μg/ml、小于1μg/ml、小于0.5μg/ml、小于0.1μg/ml、小于0.05μg/ml或小于0.01μg/ml。

[0168] 在一个实施例中，根据本发明的抗体或其抗原结合片段在微量中和测定中具有的对中和乙型流感病毒的IC₅₀在从约0.001μg/ml至约5μg/ml的范围中、或从约0.001μg/ml至约1μg/ml的抗体的范围中、或为小于5μg/ml、小于2μg/ml、小于1μg/ml、小于0.5μg/ml、小于0.1μg/ml、小于0.05μg/ml或小于0.01μg/ml；并且在微量中和测定中对于中和甲型流感病毒，对于中和甲型流感病毒的IC₅₀在从约0.1μg/ml至约5μg/ml的范围中、或从约0.1μg/ml至约2μg/ml的抗体的范围中、或为小于5μg/ml、小于2μg/ml、小于1μg/ml或小于0.5μg/ml。

[0169] 在一个实施例中，根据本发明的抗体或其抗原结合片段在微量中和测定中具有的对中和乙型流感病毒的IC₅₀在从约0.001μg/ml至约50μg/ml的范围中、或从约0.001μg/ml至约5μg/ml的抗体的范围中、或从约0.001μg/ml至约1μg/ml的抗体的范围中、或为小于10μg/ml、小于5μg/ml、小于1μg/ml、小于0.5μg/ml、小于0.1μg/ml、小于0.05μg/ml或小于0.01μg/ml；并且在微量中和测定中对于中和甲型流感病毒，对于中和甲型流感病毒的IC₅₀在从约0.01μg/ml至约50μg/ml的范围中、或从约0.05μg/ml至约5μg/ml的抗体的范围中、或从约0.1μg/ml至约2μg/ml的抗体的范围中、或为小于50μg/ml、小于25μg/ml、小于10μg/ml、小于5μg/ml或小于2μg/ml。

[0170] 在某些实施例中，本发明的抗体可以诱导细胞死亡。“诱导细胞死亡”的抗体是引起活细胞变得无活力的抗体。体外细胞死亡可以在不存在补体和免疫效应细胞的情况下测定以便区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。因此，用于细胞死亡的测定可以使用热灭活的血清（即，在不存在补体的情况下）且在不存在免疫效应细胞的情况下进行。为了测定抗体是否能够诱导细胞死亡，可以相对于未处理的细胞评定膜完整性的损失，如通过碘化丙啶 (PI)、台盼蓝（参见摩尔 (Moore) 等人，(1995)，细胞技术学 (Cytotechnology) 17:1-11）、7AAD的摄取或本领域中熟知的其他方法所评价。

[0171] 在一个具体实施例中，本发明的抗体可以经由细胞凋亡诱导细胞死亡。“诱导细胞凋亡”的抗体是诱导程序性细胞死亡的抗体，如通过膜联蛋白V的结合、DNA断裂、细胞收缩、内质网的扩张、细胞破碎和/或膜囊泡（称为凋亡小体）的形成所测定。多种方法可用于评估与细胞凋亡相关联的细胞事件。例如，可以通过膜联蛋白结合测量磷脂酰丝氨酸 (PS) 易位；

可以通过DNA梯化(laddering)评价DNA断裂;并且可以通过亚二倍体细胞的任何增加来评价核/染色质凝聚连同DNA断裂。在一个实施例中,诱导细胞凋亡的抗体是在膜联蛋白结合测定中相对于未处理的细胞产生约2至50倍、在一个实施例中,约5至50倍、并且在一个实施例中,约10至50倍膜联蛋白结合诱导的抗体。

[0172] 在另一个具体实施例中,本发明的抗体可以经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)来诱导细胞死亡。人IgG1亚类抗体的ADCC活性和CDC活性的表达通常涉及抗体的Fc区结合存在于效应细胞(如杀伤细胞、自然杀伤细胞或活化的巨噬细胞)表面上的针对抗体的受体(下文称为“Fc γ R”)。不同的补体组分可以被结合。关于结合,已经提出在铰链区中的若干氨基酸残基以及抗体C区的第二结构域(下文称为“C γ 2结构域”)是重要的(格林伍德(Greenwood)等人(1993)欧洲免疫学杂志(Eur. J Immunol.) 23(5):1098-104;摩根(Morgan)等人(1995)免疫学(Immunology) 86(2):319-324;克拉克(Clark, M.) (1997)化学免疫学(Chemical Immunology) 65:88-110),并且在C γ 2结构域中的糖链(克拉克(Clark, M.) (1997)化学免疫学(Chemical Immunology) 65:88-110)也是重要的。

[0173] 为了评定感兴趣的抗体的ADCC活性,可以使用体外ADCC测定,如美国专利号5,500,362中描述的测定。该测定还可以使用可商购的试剂盒,例如CytoTox 96®(普洛麦格公司(Promega))来进行。用于这类测定的有用的效应细胞包括但不限于,外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、以及NK细胞系。表达转基因Fc受体(CD16)和相关信号传导多肽(例如FC ϵ RI- γ)的NK细胞系也可以充当效应细胞(WO2006/023148)。在一个实施例中,NK细胞系包括CD16并且具有在NFAT启动子下的荧光素酶并且可以被用来测量NK细胞活化,而不是细胞溶解或细胞死亡。普洛麦格公司(Promega)出售相似的技术,它使用Jurkat细胞而不是NK细胞(普洛麦格ADCC报道子生物测定#G7010)。例如,可以测定任何特定抗体通过补体活化和/或ADCC介导细胞溶解的能力。在体外生长且标记感兴趣的细胞;将抗体与免疫细胞组合添加至细胞培养物,这些免疫细胞可以通过抗原抗体复合物活化;即,效应细胞参与ADCC应答。还可以针对补体活化对抗体进行测试。在任一情况下,通过标记从溶解的细胞的释放来检测细胞溶解。细胞溶解的程度还可以通过检测细胞质蛋白(例如LDH)至上清液中的释放来测定。事实上,可以使用患者自己的血清作为补体和/或免疫细胞的来源来筛选抗体。能够在体外测试中介导人ADCC的抗体随后可以治疗性地用于该特定患者。感兴趣的分子的ADCC活性也可以例如在如克莱因斯(Clynes)等人,(1998),美国国家科学院院刊95:652-656中披露的动物模型中进行体内评定。此外,用于调节(即,增加或降低)抗体的ADCC和任选地CDC活性的水平的技术是本领域中熟知的(例如,美国专利号5,624,821;6,194,551;7,317,091)。本发明的抗体可能能够诱导ADCC和/或CDC,或者可能已经进行修饰以便具有诱导ADCC和/或CDC的能力。用于确定ADCC功能的测定可以使用人效应细胞来实施以便评定人ADCC功能。这类测定还可以包括旨在筛选通过坏死和/或凋亡机制诱导、介导、增强、阻断细胞死亡的抗体的那些测定。包括利用活性染料的测定的这类方法、检测和分析半胱天冬酶的方法、以及测量DNA断裂的测定可以用于评定在体外用感兴趣的抗体培养的细胞的凋亡活性。

[0174] 抗体的产生

[0175] 以下描述用于产生适用于本发明的抗体的示例性技术。

[0176] 单克隆抗体

[0177] 可以使用本领域中已知的各种各样的技术来制备单克隆抗体,这些技术包括使用杂交瘤(科勒(Kohler)等人,(1975),自然(Nature),256:495;哈洛(Harlow)等人,(1988),抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版);哈默林(Hammerling)等人,(1981)在:单克隆抗体和T细胞杂交瘤(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)563-681(爱思唯尔(Elsevier)出版公司,纽约)中)、重组、以及噬菌体展示技术、或其组合。如在此使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同种或分离的抗体的群体中获得的抗体,例如单独的抗体,这些抗体构成除了可能天然存在的突变(可能以少量存在)之外的相同的群体。单克隆抗体是高特异性的,针对一个单一抗原位点的。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,每种单克隆抗体是针对该抗原上的相同决定簇的。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的有利之处在于它们可以在不被其他抗体污染的情况下合成。修饰词“单克隆”不应被理解为需要通过任何特定的方法而产生抗体。以下是用于产生单克隆抗体的代表性方法的描述(不是旨在为限制性的),并且这些方法可以用来产生例如单克隆哺乳动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体、双抗体(diabody)、疫苗体(vaccibody)、线性和多特异性抗体。

[0178] 杂交瘤技术

[0179] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法在本领域中是常规的并且是众多周知的。在杂交瘤方法中,小鼠或其他适当的宿主动物(如仓鼠)如上所述被免疫以便引出淋巴细胞,这些淋巴细胞产生或能够产生将特异性地结合用于免疫的抗原的抗体。可替代地,淋巴细胞可以被体外免疫。在免疫之后,分离淋巴细胞,并且然后使用适合的融合剂或融合配偶体(如聚乙二醇)与骨髓瘤细胞系融合从而形成杂交瘤细胞(戈丁(Goding),(1986),单克隆抗体:原理与实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice),第59-103页(学术出版社(Academic Press)))。在某些实施例中,所选择的骨髓瘤细胞是有效融合、支持由所选择的抗体产生细胞的稳定高水平抗体产生、并且对针对未融合的亲代细胞而选择的选择性培养基敏感的那些骨髓瘤细胞。在一方面,骨髓瘤细胞系是鼠类骨髓瘤系,如源自从美国加利福尼亚州圣地亚哥市的索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)可获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的、以及从美国马里兰州罗克维尔市的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)可获得的SP-2和衍生物(例如X63-Ag8-653细胞)的那些。也已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(科兹博(Kozbor),(1984),免疫学杂志(J. Immunol.),133:3001;和布罗德德尔(Brodeur)等人,(1987),单克隆抗体生产技术和应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),第51-63页(马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约))。

[0180] 一旦产生具有所希望的特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞被鉴别出,就可以通过有限稀释程序而将这些克隆进行亚克隆并且通过标准方法使其生长(戈丁(Goding),同上)。用于这一目的适合的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中体内生长为腹水瘤,例如通过将细胞腹膜内(i.p.)注射至小鼠中。

[0181] 将由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规抗体纯化程序(例如像,亲和色谱(例如使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖凝胶)或离子交换色谱、亲和标签、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、渗析等)而从培养基、腹水液、或血清适当地分离。示例性纯化方法在下文进行更详细地描述。

[0182] 重组DNA技术

[0183] 使用重组DNA技术产生和筛选特异性抗体的方法在本领域中是常规的并且是众所周知的(例如美国专利号4,816,567)可以容易地使用常规程序(例如,通过使用能够特异性地结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)来将编码单克隆抗体的DNA分离和/或测序。一旦分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将其转染至宿主细胞中,如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或不以另外的方式产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的文献综述包括斯盖拉(Skerra)等人,(1993),免疫学当前观点(Curr.Opinion in Immunol.),5:256-262和普吕克通(Pluckthun),(1992),免疫学评论(Immunol.Revs.),130:151-188。如下对于通过噬菌体展示和抗体人源化所产生的抗体所描述,可以从除了杂交瘤之外的产生本发明的抗体的一种或多种来源获得用于重组抗体的DNA或基因材料。

[0184] 抗体或其变体的重组表达通常需要构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。因此,本发明提供可复制的载体,这些载体包含可操作地连接至启动子的,编码抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变结构域或其一部分、或者重链或轻链CDR的核苷酸序列。这类载体可以包含编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如,美国专利号5,981,216;5,591,639;5,658,759和5,122,464),并且可以将抗体的可变结构域克隆至这种载体中以用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0185] 一旦通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞中,然后就通过常规技术培养转染的细胞以便产生抗体。因此,本发明包括可操作地连接至异源启动子的含有编码本发明的抗体或其片段、或其重链或轻链、或其部分、或本发明的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞。在用于表达双链抗体的某些实施例中,可以将编码重链和轻链的载体在宿主细胞中共表达,以用于表达整个免疫球蛋白分子,如下所详述。

[0186] 作为用于表达重组抗体的宿主可获得的哺乳动物细胞系是在本领域中已知的,并且包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,HepG2)、人上皮肾293细胞、以及多种其他细胞系。不同的宿主细胞具有针对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以便确保所表达的抗体或其部分的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机器(cellular machinery)的真核宿主细胞。这类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性地产生任何功能性免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、SP20、CRL7030以及HsS78Bst细胞。通过使人淋巴细胞永生化而产生的人细胞系可以用来重组产生单克隆抗体。人细胞系PER.C6®(库赛尔(Crucell),荷兰)可以用来重组产生单克隆抗体。

[0187] 可以用作表达重组抗体的宿主的另外的细胞系包括但不限于昆虫细胞(例如Sf21/Sf9,粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)Bti-Tn5b1-4)或酵母细胞(例如啤酒酵母

(*S.cerevisiae*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、US 7326681;等)、植物细胞(US 20080066200);以及鸡细胞(WO 2008142124)。

[0188] 在某些实施例中,本发明的抗体被表达于具有抗体的稳定表达的细胞系中。稳定表达可以用于重组蛋白的长期、高产量的生产。例如,可以产生稳定表达抗体分子的细胞系。可以用适当的包含表达控制元件(例如,启动子、增强子、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标志基因的工程化的载体转化宿主细胞。在引入外源DNA后,可以允许细胞在富集培养基中生长1-2天,并且然后切换至选择性培养基。在重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许将质粒稳定整合进其染色体中的细胞生长并且形成病灶,进而可以将其克隆并且扩增成细胞系。用于以高产量产生稳定细胞系的方法是在本领域中熟知的,并且试剂通常是可商购的。

[0189] 在某些实施例中,本发明的抗体被表达于具有抗体的瞬时表达的细胞系中。瞬时转染是这样一种方法:在该方法中引入细胞的核酸不会整合至该细胞的基因组或染色体DNA中。事实上该核酸被维持作为细胞中的染色体外元件,例如,作为附加体。附加体的核酸的转录过程不受影响,并且产生由附加体的核酸编码的蛋白质。

[0190] 稳定抑或瞬时转染的细胞系被维持在本领域中熟知的产生单克隆抗体的表达和产生的细胞培养基和条件中。在某些实施例中,哺乳动物细胞培养基是基于可商购的培养基配制品,包括例如DMEM或汉姆氏(Ham's) F12。在其他实施例中,将细胞培养基进行改良以便支持细胞生长和生物蛋白表达两者的增长。如在此使用,术语“细胞培养基”、“培养基”和“培养基配制品”是指多细胞生物体或组织以外的人工体外环境中用于细胞的维持、生长、增殖、或扩增的营养液。可以将细胞培养基优化以用于特定的细胞培养用途,包括例如,被配制来促进细胞生长的细胞培养物生长培养基,或者被配制来促进重组蛋白产生的细胞培养物生产培养基。术语营养素、成分、以及组分(component)在此可互换地使用,是指组成细胞培养基的组分(constituent)。

[0191] 在一个实施例中,使用补料分批法维持细胞系。如在此使用,“补料分批法”是指在首先用基础培养基孵育之后,用另外的营养素供应给细胞培养物的方法。例如,一种补料分批法可以包括根据一个所确定的补料时间表在一个给定时期内添加补充培养基。因此,“补料分批细胞培养”是指这样一种细胞培养:其中最初将细胞(典型地为哺乳动物细胞)和培养培养基供应至培养容器,并且在培养期间,连续地或以不连续递增方式将另外的培养营养素馈送至培养物,有或没有在培养终止之前的定期的细胞和/或产物的收获。

[0192] 所使用的细胞培养基以及其中含有的营养素是本领域的技术人员已知的。在一个实施例中,细胞培养基包含基础培养基以及产生改良的基础培养基的至少一种水解产物,例如基于大豆的水解产物、基于酵母的水解产物、或这两种类型的水解产物的组合。在另一个实施例中,另外的营养素可以仅包含基础培养基如浓缩的基础培养基,或者可以仅包含水解产物或浓缩的水解产物。适合的基础培养基包括但不限于达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、DME/F12、最低必需培养基(MEM)、伊格尔基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -最低必需培养基(α -MEM)、格拉斯哥最低必需培养基(G-MEM)、PFCHO(参见,例如,CHO无蛋白质培养基(西格玛)或用于无蛋白质的CHO细胞的EX-CELL™325 PF CHO无血清培养基(SAFC生物科学公司))、以及伊斯科夫改良的达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。可以用于本发明的基础培养基的其他实例包括BME基础培养基

(Gibco-英杰 (Invitrogen); 还参见伊格尔, H (Eagle, H) (1965) 实验生物学与医学会会报 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.) 89, 36); 达尔伯克改良的伊格尔培养基 (DMEM, 粉末) (Gibco-英杰 (#31600); 还参见达尔伯克 (Dulbecco) 和弗里曼 (Freeman) (1959) 病毒学 (Virology) 8: 396; 史密斯 (Smith) 等人 (1960) 病毒学 12: 185 体外组织培养标准委员会 (Tissue Culture Standards Committee, In Vitro) 6: 2, 93); CMRL 1066 培养基 (Gibco-英杰 (#11530); 还参见帕克 (Parker) 等人 (1957) 特别出版物 (Special Publications), 纽约科学院, 5: 303)。

[0193] 基础培养基可以是无血清的, 意指该培养基不含血清 (例如, 胎牛血清 (FBS)、马血清、山羊血清、或本领域的技术人员已知的任何其他动物源的血清), 或没有动物蛋白的培养基或化学上限定的培养基。

[0194] 可以改良基础培养基以便去除在标准基础培养基中发现的某些非营养组分, 如不同的无机和有机缓冲液、一种或多种表面活性剂、以及氯化钠。此类组分从基础细胞培养基的去除允许剩余营养组分的浓度增加, 并且可以改进总体的细胞生长和蛋白质表达。另外, 可以根据细胞培养条件的要求, 将省去的组分添加回至含有改良的基础细胞培养基的细胞培养基中。在某些实施例中, 细胞培养基包含改良的基础细胞培养基以及至少一种以下营养素: 铁源、重组生长因子; 缓冲液; 表面活性剂; 渗透性调节剂; 能量源; 以及非动物水解产物。另外, 改良的基础细胞培养基可以任选地含有氨基酸、维生素、或氨基酸和维生素两者的组合。在另一个实施例中, 改良的基础培养基进一步包含谷氨酰胺, 例如 L-谷氨酰胺和/或氨甲蝶呤。

[0195] 可以通过使用本领域中已知的补料分批、分批、灌注的生物反应器工艺或连续进料生物反应器方法而大量地进行抗体产生。大规模生物反应器具有至少 1000 升的容量, 在一个实施例中, 约 1,000 至 100,000 升的容量。这些生物反应器可以使用叶轮搅拌器来分布氧和营养素。小规模生物反应器通常是指在不大于大致 100 升的体积容量中的细胞培养, 并且范围可以从约 1 升至约 100 升。可替代地, 一次性生物反应器 (SUB) 可以用于大规模抑或小规模培养。

[0196] 温度、pH、搅拌、曝气以及接种密度将取决于所使用的宿主细胞和有待表达的重组蛋白而不同。例如, 重组蛋白细胞培养可以被维持在 30°C 与 45°C 之间的温度下。可以在培养过程期间监测培养基的 pH, 以使得 pH 停留在最佳水平, 对于某些宿主细胞来说, 该最佳水平可以是在 6.0 至 8.0 的 pH 范围内。叶轮驱动的混合可以用于此类培养方法以用于搅拌。叶轮的转速可以大致是 50 至 200 cm/秒叶尖速度, 但可以取决于所培养的宿主细胞的类型而使用本领域中已知的其他气升或其他混合/曝气系统。提供充足的曝气以便在培养物中维持大致 20% 至 80% 空气饱和度的溶解氧浓度, 这再次取决于所培养的所选择的宿主细胞。可替代地, 生物反应器可以直接将空气或氧气喷射至培养基之中。存在其他供氧方法, 包括采用中空纤维膜曝气器的无泡曝气系统。

[0197] 噬菌体展示技术

[0198] 可以从使用麦卡弗蒂 (McCafferty) 等人, (1990), 自然 (Nature), 348: 552-554、克拉克森 (Clackson) 等人, (1991), 自然 (Nature), 352: 624-628 (1991) 以及马克斯 (Marks) 等人, (1991), 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 222: 581-597 中描述的技术产生的抗体噬菌体文库分离单克隆抗体或抗体片段。在此类方法中, 抗体可以通过筛选重组组合抗体文库来分离。在一个实施例中, 使用从源自人淋巴细胞的 mRNA 制备的人 VL 和 VH cDNA 来制备 scFv 噬

菌体展示文库。用于制备和筛选这类文库的方法学是本领域中已知的。除了用于产生噬菌体展示文库的可商购的试剂盒(例如,法玛西亚重组噬菌体抗体系统(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System),目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAPTM噬菌体展示试剂盒,目录号240612)之外,特别适合用于在产生和筛选抗体展示文库中使用的方法和试剂的实例可以在例如美国专利号6,248,516;US 6,545,142;6,291,158;6,291,159;6,291,160;6,291,161;6,680,192;5,969,108;6,172,197;6,806,079;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,593,081;6,582,915;7,195,866中找到。因此,这些技术是用于产生和分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代。

[0199] 在噬菌体展示方法中,将功能抗体结构域展示在噬菌体颗粒的表面上,这些颗粒携带对其进行编码的多核苷酸序列。在一个具体实施例中,这种噬菌体可以用于展示从谱系或组合抗体文库(例如,人或鼠类)表达的抗原结合结构域。表达结合所感兴趣的抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原来选择或鉴别,例如,使用标记的抗原或结合或捕获于固体表面或珠粒上的抗原。这些方法中使用的噬菌体典型地是丝状噬菌体,该噬菌体包括从具有Fab、Fv的噬菌体表达的fd和M13结合结合域或重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白的二硫化物稳定的Fv抗体结构域。

[0200] 如上文参考文献中所述,在噬菌体选择之后,来自噬菌体的抗体编码区可以被分离并且用于产生完整抗体,包括人抗体、人源化抗体或任何其他所希望的抗原结合片段,并且表达在任何所希望的宿主之中,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、以及细菌,例如如下文详细描述。例如,还可以使用本领域中已知的方法采用重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术,这些方法如以下文献中所披露的那些:PCT公布WO 92/22324;马利纳克斯(Mullinax)等人,(1992),生物技术(BioTechniques) 12(6):864-869;以及贝特尔(Better)等人,(1988),科学(Science) 240:1041-1043。

[0201] 可以用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括在美国专利号4,946,778和5,258,498中描述的那些。因此,以上所述的本领域中熟知的那些技术可以用于产生重组抗体,其中从噬菌体展示文库分离结合结构域(例如ScFv)。

[0202] 抗体纯化和分离

[0203] 一旦抗体分子已经通过重组或杂交瘤表达而产生,可以通过本领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法将其纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱,特别是通过对于特定抗原蛋白A或蛋白G的亲力的亲和色谱,以及尺寸柱色谱(sizing column chromatography))、离心、差别溶解度,或者通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。此外,本发明的抗体或其片段可以融合至异源多肽序列(在此称为“标签”),以便促进纯化。

[0204] 在使用重组技术时,抗体可以在细胞内、在周质间隙中产生,或直接分泌至培养基之中。如果抗体是在细胞内产生,那么作为第一步,(例如)通过离心或超滤去除宿主细胞抑或溶解片段的颗粒碎片。卡特(Carter)等人,(1992),生物/技术(Bio/Technology),10:163-167描述了一种用于分离分泌到大肠杆菌的周质空间中的抗体的程序。在抗体分泌到培养基中的情况下,通常首先使用可商购的蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)对来自这类表达系统的上清液进行浓缩。蛋白酶抑制剂如PMSF可以被包括在任何前述步骤中以便抑制蛋白水解,并且抗生素可以被包括来防止外来污染物的生长。

[0205] 从细胞制备的抗体组合物可以单独使用例如羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、渗析和/或亲和色谱或其他纯化步骤组合来纯化。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型并且将由本领域的技术人员理解。附着有亲和配体的基质最通常为琼脂糖,但其他基质也是可用的。在机械上稳定的基质如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许比用琼脂糖可以实现的更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含CH₃结构域的情况下,Bakerbond ABX树脂(马林克罗特贝克有限公司(J.T.Baker),菲利普斯堡(Phillipsburg),新泽西)可用于纯化。取决于待回收的抗体也可用其他蛋白质纯化技术,如离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上色谱、肝素上色谱、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上SEPHAROSE色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸铵沉淀。

[0206] 在任何一个或多个初步纯化步骤之后,包含感兴趣的抗体和污染物的混合物可以经受低pH疏水性相互作用色谱,该色谱使用pH介于约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液并且在低盐浓度(例如,从约0至0.25M盐)下进行。

[0207] 因此,在某些实施例中提供基本上纯化/分离的本发明的抗体。在一个实施例中,这些分离/纯化的重组表达的抗体可以被给予至患者以便介导预防或治疗作用。预防剂是被设计且用于预防疾病、病症或感染发生的药物或治疗。治疗剂具体地涉及特定疾病、病症或感染的治疗。治疗剂量是用于治疗特定疾病、病症或感染所需的量。在另一个实施例中,这些分离/纯化的抗体可以用于诊断流感病毒感染,例如乙型流感病毒感染,或在其他实施例中,甲型和乙型流感病毒感染。

[0208] 人抗体

[0209] 人抗体可以使用本领域中熟知的方法来产生。人抗体避免了一些与具有小鼠或大鼠可变区和/或恒定区的抗体相关的问题。这种鼠类或大鼠源性蛋白质的存在可以导致抗体的快速清除或可以导致患者产生针对该抗体的免疫应答。

[0210] 可以通过体外方法获得人抗体。适合的实例包括但不限于噬菌体展示(米迪缪尼有限公司(MedImmune(以前为CAT)、莫弗西斯生物公司(Morphosys)、Dyax、Biosite/梅达瑞克斯、Xoma、Symphogen、亚力兄公司(Alexion,(以前为Proliferon)、Affimed)、核糖体展示(米迪缪尼有限公司(以前为CAT))、酵母展示等。可以使用噬菌体展示技术(参见例如美国专利号5,969,108)来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱系体外产生人抗体和抗体片段。根据这项技术,抗体V结构域基因是以框内方式克隆至丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能特性的选择还导致编码展现那些特性的抗体的基因的选择。因而,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以例如综述于约翰逊(Johnson)和奇斯韦尔(Chiswell), (1993), 结构生物学新见(Current Opinion in Structural Biology) 3:564-571中的多种形式进行。若干V基因区段来源可以用于噬菌体展示。克拉克森等人, (1991), 自然(Nature), 352:624-628 (1991) 从源自免疫小鼠的脾脏的V基因的小随机组合文库分离了抗噁唑酮抗体的不同阵列。可以构建来自未免疫人供体的V基因谱系,并且可以按照由马克斯(Marks)等人, (1991), 分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 222:581-597或格里菲斯(Griffith)等人, (1993), 欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.) 12:725-734描述的技术而基本上分离针对抗原(包括自身抗原)的不同阵列的

抗体。还参见美国专利号5,565,332和5,573,905。

[0211] 如上所讨论,还可以由体外活化的B细胞产生人类抗体(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0212] 在免疫应答的成熟过程中,免疫球蛋白基因经历不同的修饰,包括在V、D和J基因区段之间的重组、同种型转换、以及可变区中的超突变。重组和体细胞超突变是产生抗体多样性和亲和力成熟的基础,但是它们还可以产生序列文库,这些序列文库可以使作为治疗剂的这种免疫球蛋白的商业生产有困难或者增加抗体的免疫原性风险。通常,虽然在框架区中的突变可以增加免疫原性的风险,CDR区中的突变可能促成改进的亲和力和功能。这种风险可以通过将框架突变回复为种系而降低,同时确保抗体的活性未受不利影响。多样化过程还可以产生一些结构文库,或这些结构文库可以存在于促成重链和轻链可变域的种系序列中。不论来源,可能希望的是将潜在的结构文库去除,这些结构文库可以导致产物的不稳定性、聚集、异质性、或者增加的免疫原性。不希望的文库的实例包括不成对的半胱氨酸(可以导致二硫键混乱或可变的巯基加合物形成)、N-连接糖基化位点(导致结构和活性的异质性)、以及脱酰胺作用(例如NG、NS)、异构化(DG)、氧化(暴露的甲硫氨酸)、以及水解(DP)位点。

[0213] 因此,为了降低免疫原性的风险并且改进药学特性,可能希望的是将框架序列回复为种系、将CDR回复为种系、和/或去除结构倾向(structural liability)。

[0214] 因此,在一个实施例中,在特定的抗体在氨基酸水平上不同于其对应的种系序列的情况下,可以将抗体序列突变回种系序列。通过使用标准分子生物学技术,这种纠正突变可以在一个、二个、三个或更多个位置、或任何突变位置的组合处发生。

[0215] 抗体片段

[0216] 在某些实施例中,本发明抗体是抗体片段或包含这些片段的抗体。抗体片段包括全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd和Fv片段、双抗体;线性抗体(美国专利号5,641,870)和单链抗体分子。

[0217] 在历史上,这些片段是使用本领域中熟知的技术、经由完整抗体的蛋白水解消化而衍生的。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。所有Fab、Fv和scFv抗体片段都可以表达在大肠杆菌中并且从其分泌,因而允许大量这些片段的容易生产。在一个实施例中,可以从以上讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地,Fab'-SH片段还可以直接从大肠杆菌中回收并且化学连接以便形成F(ab')₂片段(卡特(Carter)等人,(1992),生物/技术(Bio/Technology),10:163-167)。根据另一个途径,可以直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练的从业人员将是清楚的。在其他实施例中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。在某些实施例中,抗体不是Fab片段。Fv和scFv是没有恒定区的具有完整组合位点的仅有种类;因此,它们适合用于在体内使用过程中减少非特异性结合。可以将scFv融合蛋白构建为在scFv的氨基末端抑或羧基末端产生效应蛋白融合。

[0218] 在某些实施例中,本发明的抗体是结构域抗体,例如对应于人抗体的重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)的、包含抗体的小功能性结合单位的抗体。结构域抗体的实例包括但不限于,多曼提斯(Domantis)的那些结构域抗体(参见例如,WO 04/058821;WO 04/081026;WO 04/003019;WO 03/002609;美国专利号6,291,158;6,582,915;6,696,245;以及

6,593,081)。

[0219] 在本发明的某些实施例中,本发明的抗体是线性抗体。线性抗体包括一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),这些区段形成一对抗原结合区。参见,萨帕塔(Zapata)等人,(1995),蛋白质工程化(ProteinEng.),8(10):1057-1062。

[0220] 其他氨基酸序列修饰

[0221] 除了以上描述的人、人源化和/或嵌合抗体外,本发明还涵盖本发明的抗体的进一步修饰以及其变体和其片段,这些修饰包括可变轻链(VL)结构域和/或可变重链(VH)结构域和/或Fc区中的一个或多个氨基酸残基和/或多肽取代、添加和/或缺失以及翻译后修饰。包括在这些修饰中的是其中抗体已经共价连接至一个部分的抗体结合物。适用于连接至抗体的部分包括但不限于蛋白质、肽、药物、标记物、以及细胞毒素。可以作出针对抗体的这些改变以便改变或微调这些抗体的特征(生物化学的、结合和/或功能性的),适用于治疗和/或诊断流感病毒感染。用于形成轭合物、作出氨基酸和/或多肽改变以及翻译后修饰的方法是本领域中熟知的,其中一些在下文详述。

[0222] 针对抗体的氨基酸变化必然产生与以上鉴别的抗体序列或亲本抗体序列小于100%一致的序列。在某些实施例中,在这种情况下,抗体可以与如在此所述的抗体的重链或轻链可变结构域的氨基酸序列具有约25%至约95%序列一致性。因此,在一个实施例中,修饰的抗体可以具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列与如在此所述的抗体的重链或轻链可变结构域的氨基酸序列具有至少25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列一致性或相似性。在另一个实施例中,改变的抗体可以具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列与如在此所述的抗体的重链或轻链CDR-1、CDR-2或CDR-3的氨基酸序列具有至少25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列一致性或相似性。在另一个实施例中,改变的抗体可以具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列与如在此所述的抗体的重链或轻链FR1、FR2、FR3或FR4的氨基酸序列具有至少25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列一致性或相似性。

[0223] 在某些实施例中,通过引入抗体的一个或多个可变区中的一种或多种氨基酸改变(例如,置换、缺失和/或添加)而产生改变的抗体。在另一个实施例中,氨基酸改变被引入框架区。框架区残基的一种或多种改变可以导致对于抗原的抗体的结合亲和力的改进。当这些变化是针对人源化抗体(不同于CDR区,框架区可以来自不同的物种)做出时,尤其如此。用于修饰的框架区残基的实例包括直接非共价结合抗原的那些(阿密特(Amit)等人,(1986),科学(Science),233:747-753);与CDR相互作用/实现CDR的构象的那些(乔西亚(Chothia)等人,(1987),分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),196:901-917);和/或参与VL-VH界面的那些(美国专利号5,225,539和6,548,640)。在一个实施例中,可以改变从约一个至约五个框架残基。有时,甚至在没有任何高变区残基已被改变时,这可能足以产生适合于在临床前试验中使用的抗体突变体。然而,通常改变的抗体将包含另外的一种或多种高变区改变。

[0224] 用于产生改变的抗体的一种有用程序被称为“丙氨酸扫描诱变”(坎宁安(Cunningham)和威尔斯(Wells), (1989),科学(Science),244:1081-1085)。在这种方法中,一个或多个高变区残基被一个或多个丙氨酸或聚丙氨酸残基置换,从而改变氨基酸与靶抗

原的相互作用。然后,对于取代显示功能敏感度的那些高变区残基通过在(或针对)取代位点引入另外的或其他突变而被改善(refined)。因此,尽管用于引入氨基酸序列变异的位点被预先确定,本身突变的本性不需要预先确定。如在此所述,针对以此方式产生的Ala突变体的生物活性来筛选它们。

[0225] 在某些实施例中,取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,所得的被选择用于进一步开发的一种或多种变体相对于它们从其产生的亲本抗体而言将具有改进的生物特性。用于产生这类取代变体的方便的方式涉及使用噬菌体的亲和力成熟(霍金斯(Hawkins)等人,(1992),分子生物学杂志(J.Mol.Biol.), 254:889-896和洛曼(Lowman)等人,(1991),生物化学(Biochemistry), 30(45):10832-10837)。简言之,若干高变区位点(6-7个位点)被突变以在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。因而产生的抗体突变体被展示为来自丝状噬菌体颗粒的、作为与包装在每个颗粒中的M13的基因III产物融合的单价形式。然后,如在此披露,针对噬菌体展示突变体的生物活性(例如,结合亲和力)来筛选它们。

[0226] 在抗体序列中的突变可以包括取代、缺失(包括内部缺失)、添加(包括产生融合蛋白的添加)、或在氨基酸序列之内和/或邻近处的氨基酸残基的保守性取代,但是那导致“沉默”改变,导致这种改变产生功能上等效的抗体。可以在涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性、和/或两亲性的相似性的基础上做出保守性氨基酸取代。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸;极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;并且带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。另外,甘氨酸和脯氨酸是能影响链取向的残基。非保守性取代将使得必需将这些类别之一的成员与另一类别中的成员交换。此外,如果希望的话,非典型氨基酸或化学氨基酸相似物可以作为取代或添加而被引入抗体序列中。非典型氨基酸总体上包括但不限于普通氨基酸的D-异构体、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代氨基酸、设计者(designer)氨基酸(例如 β -甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸、以及氨基酸相似物)。

[0227] 在另一个实施例中,不参与维持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基还可以被(通常用丝氨酸)取代以便改进分子的氧化稳定性并且预防异常交联。相反,可以将半胱氨酸键添加至抗体以改进它的稳定性(特别是在抗体是如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0228] 变体Fc区

[0229] 已知Fc区的变体(例如,氨基酸取代和/或添加和/或缺失)增强或减小抗体的效应子功能(参见,例如,美国专利号5,624,821;5,885,573;6,538,124;7,317,091;5,648,260;6,538,124;WO 03/074679;WO 04/029207;WO 04/099249;WO 99/58572;美国公开号2006/0134105;2004/0132101;2006/0008883)并且可以改变该抗体的药代动力学特性(例如,半衰期)(参见,美国专利6,277,375和7,083,784)。因此,在某些实施例中,本发明的抗体包含改变的Fc区(在此也被称为“变体Fc区”),其中已经在该Fc区中做出一种或多种改变以便改变这些抗体的功能特性和/或药代动力学特性。此类改变可以导致C1q结合和补体依赖的细

胞毒性 (CDC) 或者对于 IgG 的 Fc γ R 结合以及抗体依赖的细胞的细胞毒性 (ADCC)、或者抗体依赖的细胞介导的吞噬作用 (ADCP) 的减少或增加。本发明涵盖在此所述的具有变体 Fc 区的抗体, 其中已经做出变化以便微调效应子功能, 从而增强或减弱、提供所希望的效应子功能。因此, 本发明的抗体包含变体 Fc 区 (即, 已经如下文所讨论进行改变的 Fc 区)。本发明的具有变体 Fc 区的抗体在此还被称为“Fc 变体抗体”。如在此使用的, 天然的是指未修饰的亲本序列, 并且具有天然 Fc 区的抗体在此被称为“天然 Fc 抗体”。Fc 变体抗体可以通过本领域已熟知的多种方法产生。非限制性实例包括分离抗体编码区 (例如, 从杂交瘤) 以及在分离的抗体编码区的 Fc 区中形成一个或多个所希望的取代。可替代地, 可以将抗体的抗原结合部分 (例如, 可变区) 亚克隆至编码变体 Fc 区的载体中。在一个实施例中, 如与天然 Fc 区相比, 变体 Fc 区表出相似的诱导效应子功能的水平。在另一个实施例中, 如与天然 Fc 相比的, 变体 Fc 区展现出较高的效应子功能的诱导作用。在下文详述了变体 Fc 区的一些具体实施例。用于测量效应子功能的方法是本领域中熟知的。

[0230] 通过 Fc 区的变化来改变抗体的效应子功能, 这些变化包括但不限于氨基酸取代、氨基酸添加、氨基酸缺失以及对于 Fc 氨基酸的翻译后修饰 (例如, 糖基化) 的变化。以下所述的方法可以用于微调本发明抗体的效应子功能、Fc 区对于 FcR 的结合特性 (例如, 亲和力和特异性) 的比率, 从而产生具有所希望特性的治疗性抗体。

[0231] 应理解, 如在此使用的 Fc 区包括构成抗体的除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的恒定区的多肽。因此, Fc 是指 IgA、IgD、以及 IgG 的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域、以及 IgE 和 IgM 的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域、以及在这些结构域的 N 末端的柔性铰链。对于 IgA 和 IgM, Fc 可以包括 J 链。对于 IgG, Fc 包含免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 (C γ 2 和 C γ 3) 以及 C γ 1 (C γ 1) 与 C γ 2 (C γ 2) 之间的铰链。

[0232] 尽管 Fc 区的界限可以改变, 人 IgG 重链 Fc 区可以被定义为在其羧基末端包括残基 C226 或 P230, 其中编号是根据如卡巴特 (Kabat) 中列出的 EU 索引进行的。Fc 可以是指孤立地这个区, 或在抗体、抗体片段或 Fc 融合蛋白的环境中的这个区。已在多个不同 Fc 位置处观察到多态性, 包括但不限于如由 EU 索引编号的位置 270、272、312、315、356、以及 358, 并且因此所呈现的序列与现有技术序列之间可能存在略微的差异。

[0233] 在一个实施例中, 与天然 Fc 抗体相比, Fc 变体抗体对于一种或多种 Fc 受体展现出改变的结合亲和力, 这些 Fc 受体包括但不限于 FcRn、Fc γ RI (CD64) (包括同种型 Fc γ RIA、Fc γ RIB 和 Fc γ RIC); Fc γ RII (CD32, 包括同种型 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIC); 以及 Fc γ RIII (CD16, 包括同种型 Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIB)。

[0234] 在一个实施例中, 相对于天然 Fc 抗体, Fc 变体抗体具有增强的对一种或多种 Fc 配体的结合。在另一个实施例中, Fc 变体抗体展现出增加或降低的对 Fc 配体的亲和力, 该亲和力比天然 Fc 抗体高或低至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、以及高达 25 倍、或高达 50 倍、或高达 75 倍、或高达 100 倍、或高达 200 倍、或在 2 倍和 10 倍之间、或在 5 倍和 50 倍之间、或在 25 倍和 100 倍之间、或在 75 倍和 200 倍之间、或在 100 和 200 倍之间。在另一个实施例中, Fc 变体抗体展现出比天然 Fc 抗体高或低至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5% 的对 Fc 配体的亲和力。在某些实施例中, Fc 变体抗体具有增加的对 Fc 配体的亲和力。

在其他实施例中,Fc变体抗体具有降低的对Fc配体的亲和力。

[0235] 在一个具体实施例中,Fc变体抗体对Fc受体Fc γ RIIIA具有增强的结合。在另一个具体实施例中,Fc变体抗体对Fc受体Fc γ RIIB具有增强的结合。在另一个具体实施例中,Fc变体抗体对Fc受体Fc γ RIIIA和Fc γ RIIB两者具有增强的结合。在某些实施例中,与天然Fc抗体相比,对Fc γ RIIIA具有增强的结合的Fc变体抗体在结合Fc γ RIIB受体方面不具有伴随的增加。在一个具体实施例中,Fc变体抗体对Fc受体Fc γ RIIIA具有降低的结合。在另一个具体实施例中,Fc变体抗体对Fc受体Fc γ RIIB具有降低的结合。在仍然另一个具体实施例中,对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB展现出改变的亲和力的Fc变体抗体对Fc受体FcRn具有增强的结合。在又一个具体实施例中,相对于天然Fc抗体,对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB展现出改变的亲和力的Fc变体抗体对C1q具有改变的结合。

[0236] 在一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达60倍、或高达70倍、或高达80倍、或高达90倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间的对Fc γ RIIIA受体的亲和力。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%、或至少5%的对Fc γ RIIIA的亲和力。

[0237] 在一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达60倍、或高达70倍、或高达80倍、或高达90倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间的对Fc γ RIIB受体的亲和力。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%、或至少5%的对Fc γ RIIB的亲和力。

[0238] 在一个实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体展现出增加的或降低的对C1q的亲和力。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达60倍、或高达70倍、或高达80倍、或高达90倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间的对C1q受体的亲和力。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高或低至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%、或至少5%的对C1q的亲和力。在仍然另一个具体实施例中,对C1q展现出改变的亲和力的Fc变体抗体对Fc受体FcRn具有增强的结合。在又一个具体实施例中,相对于天然Fc抗体,展现出改变的对C1q的亲和力的Fc变体抗体具有改变的对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB的结合。

[0239] 在本领域熟知的是抗体能够通过在本领域中共同称为抗体效应子功能的多种方法引导攻击和破坏。被称为“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”的这些方法之一指

的是细胞毒性的一种形式,其中结合存在于某些细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、以及巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)上的分泌的Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合带有抗原的细胞并且随后用细胞毒素杀伤该细胞。针对细胞表面的特异性高亲和力IgG抗体“武装”细胞毒性细胞并且是这种杀伤所需要的。细胞的溶解是细胞外的,要求直接的细胞与细胞接触,并且不涉及补体。

[0240] 术语效应子功能所涵盖的另一种方法是补体依赖性细胞毒性(下文称为“CDC”),该方法指的是通过补体系统进行的细胞破坏的生物化学事件。补体系统是在正常血浆中发现的一种蛋白质复合系统,该系统与抗体组合以消灭病原菌以及其他外源细胞。

[0241] 术语效应子功能所涵盖的仍然另一种方法是抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),该方法指的是细胞介导的反应,其中表达一种或多种效应配体的非特异性细胞毒性细胞识别细胞上的结合抗体并且随后引起该细胞的吞噬作用。

[0242] 期望的是,通过用于确定一种或多种Fc γ R介导的效应细胞功能的体外功能测定来表征Fc变体抗体。在某些实施例中,Fc变体抗体在体内模型中与基于体外的测定中的那些具有相似的结合特性和的效应细胞功能(例如在此描述和披露的那些)。然而,本发明不排除在基于体外的测定中未展现出所希望的表型但在体内展现出所希望的表型的Fc变体抗体。

[0243] 在某些实施例中,具有Fc变体的抗体具有相对于具有天然Fc区的抗体增强的细胞毒性或吞噬活性(例如,ADCC、CDC和ADCP)。在一个具体实施例中,Fc变体抗体具有的细胞毒性或吞噬活性比天然Fc抗体大至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达75倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间。可替代地,Fc变体抗体具有相对于天然Fc抗体降低的细胞毒性或吞噬活性。在一个具体实施例中,Fc变体抗体具有的细胞毒性或吞噬活性比天然Fc抗体低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达75倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间。

[0244] 在某些实施例中,Fc变体抗体展现出相较于天然Fc抗体降低的ADCC活性。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达75倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间的ADCC活性。在仍然另一个实施例中,Fc变体抗体展现出相对于天然Fc抗体,降低至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%、或至少200%、或至少300%、或至少400%、或至少500%的ADCC活性。在某些实施例中,Fc变体抗体不具有可检测的ADCC活性。在具体实施例中,ADCC活性的降低和/或消除可以归因于Fc变体抗体对Fc配体和/或受体展现出的亲和力降低。

[0245] 在一个替代实施例中,Fc变体抗体展现出相较于天然Fc抗体增加的ADCC活性。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体的ADCC活性大至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍的ADCC活性。在仍然另一个实施例中,Fc变体

抗体展现出相对于天然Fc抗体,增加至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%、或至少200%、或至少300%、或至少400%、或至少500%的ADCC活性。在一个具体实施例中,增加的ADCC活性可以归因于Fc变体抗体对Fc配体和/或受体展现出的亲和力增加。

[0246] 在一个具体实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体具有增强的与Fc受体Fc γ RIIIA的结合并且具有增强的ADCC活性。在其他实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体具有增强的ADCC活性和增加的血清半衰期两者。在另一个具体实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体具有降低的与Fc受体Fc γ RIIIA的结合并且具有降低的ADCC活性。在其他实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体具有降低的ADCC活性和增加的血清半衰期两者。

[0247] 在某些实施例中,细胞毒性是由CDC介导,其中Fc变体抗体相对于天然Fc抗体具有增强或降低的CDC活性。在某些实施例中,细胞毒性是由CDC介导的,其中Fc变体抗体具有相对于天然Fc抗体增强的抑或降低的CDC活性。为了评定补体活化,可以进行如在加扎诺-太郎 (Gazzano-Santaro) 等人, (1996), 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods), 202:163中描述的CDC测定。

[0248] 在一个实施例中,本发明的抗体展现出相较于天然Fc抗体增加的CDC活性。在另一个实施例中,Fc变体抗体展现出比天然Fc抗体高至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍、或高达50倍、或高达75倍、或高达100倍、或高达200倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和50倍之间、或在25倍和100倍之间、或在75倍和200倍之间、或在100和200倍之间的CDC活性。在仍然另一个实施例中,Fc变体抗体展现出相对于天然Fc抗体,增加至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%、或至少200%、或至少300%、或至少400%、或至少500%的CDC活性。在具体实施例中,CDC活性的增加可以归因于Fc变体抗体对C1q表现出的亲和力增加。

[0249] 本发明的抗体可以凭借 **COMPLEGENT®** 技术 (协和发酵麒麟有限公司 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)) 展现出相较于天然Fc抗体增加的CDC活性,该技术增强抗体的主要作用机制之一,CDC。使用被称为同种型嵌合现象的方法,其中IgG3 (抗体的同种型) 的多个部分被引入IgG1 (治疗性抗体的标准同种型) 的相应区中, **COMPLEGENT®** 技术使CDC活性显著增强超过IgG1抑或IgG3的CDC活性,同时保留IgG1的所希望的特征,如ADCC、PK曲线和蛋白质A结合。此外,该技术可以与 **POTELLIGENT®** 技术一起使用,从而产生具有增强的ADCC和CDC活性的更优异的治疗性Mab (**ACCRETAMAB®**) 。

[0250] 本发明的Fc变体抗体可以具有相对于天然Fc抗体增强的ADCC活性和增强的血清半衰期。

[0251] 本发明的Fc变体抗体可以具有相对于天然Fc抗体增强的CDC活性和增强的血清半衰期。

[0252] 本发明的Fc变体抗体可以具有相对于天然Fc抗体增强的ADCC活性、增强的CDC活性以及增强的血清半衰期。

[0253] 可以通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力而增加具有Fc区的蛋白质的血清半衰期。如在此使用的术语“抗体半衰期”表示一种抗体的药物代谢动力学特性,它是抗体分子在它们的给予之后的平均存活时间的量度。抗体半衰期可以表示为从患者 (或其他哺乳动物) 的

身体或其特定区室(例如,如在血清中测量的,即循环半衰期),或在其他组织中消除50%已知量的免疫球蛋白所需要的时间。从一种免疫球蛋白或免疫球蛋白类别到另一种免疫球蛋白或免疫球蛋白类别,半衰期可以不同。通常,抗体半衰期的增加导致循环中所给予抗体的平均停留时间(MRT)的增加。

[0254] 半衰期的增加允许供给患者的药物量的减少以及给予频率的减少。为了增加抗体的血清半衰期,可以例如将补救受体结合表位并入到抗体(尤其是抗体片段)中,如在美国专利号5,739,277中所描述的。如在此使用,术语“补救受体结合表位”是指引起IgG分子的体内血清半衰期的增加的IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4)的Fc区的表位。

[0255] 可替代地,具有延长的半衰期的本发明的抗体可以通过对鉴别为参与Fc与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基进行修饰而产生(参见例如美国专利号6,821,505和7,083,784;以及WO 09/058492)。另外,可利用本领域中广泛使用的技术通过与PEG或白蛋白轭合来使本发明抗体的半衰期增加。在一些实施例中,本发明的具有Fc变体区的抗体与具有天然Fc区的抗体相比具有增加约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约65%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约125%、约150%或更多的半衰期。在一些实施例中,具有Fc变体区的抗体与具有天然Fc区的抗体相比具有增加约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约10倍、约20倍、约50倍或更多、或高达约10倍、约20倍、或约50倍、或在2倍和10倍之间、或在5倍和25倍之间、或在15倍和50倍之间的半衰期。

[0256] 在一个实施例中,本发明提供Fc变体,其中Fc区包含在选自以下项的一个或多个位置处的修饰(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失):如通过如在卡巴特(Kabat)中列出的EU索引来编号的221、225、228、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、250、251、252、254、255、256、257、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、308、313、316、318、320、322、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、428、433、434、435、436、440、以及443。任选地,Fc区可以包含在本领域技术人员已知的另外的和/或替代位置处的修饰(参见例如美国专利5,624,821、6,277,375、6,737,056、7,083,784、7,317,091、7,217,797、7,276,585、7,355,008、2002/0147311、2004/0002587、2005/0215768、2007/0135620、2007/0224188、2008/0089892、WO 94/29351、以及WO 99/58572)。另外,有用的氨基酸位置以及特定取代在US 6,737,056的表2以及表6-10、US 2006/024298的图41中呈现的表、US 2006/235208的图5、12以及15中呈现的表、US 2006/0173170的图8、9以及10中呈现的表、以及WO 09/058492的图8-10、13以及14中呈现的表中举例说明。

[0257] 在一个具体实施例中,本发明提供了Fc变体,其中Fc区包含选自以下项的至少一个取代:221K、221Y、225E、225K、225W、228P、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235E、235F、236E、237L、237M、237P、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、250E、250Q、251F、252L、252Y、254S、254T、255L、256E、256F、256M、257C、257M、257N、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265A、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、

266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、296G、297S、297D、297E、298A、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、308F、313F、316D、318A、318S、320A、320S、322A、322S、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、326A、326D、326E、326G、326M、326V、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、333A、333D、333G、333Q、333S、333V、334A、334E、334H、334L、334M、334Q、334V、334Y、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、428L、428F、433K、433L、434A、424F、434W、434Y、436H、440Y和443W，如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号。任选地，Fc区可以包含本领域的技术人员已知的另外的和/或替代的氨基酸取代，这些氨基酸取代包括但不限于在US 6,737,056的表2以及表6-10、US 2006/024298的图41中呈现的表、US 2006/235208的图5、图12以及图15中呈现的表、US2006/0173170的图8、图9以及图10中呈现的表、以及WO 09/058492的图8、图9以及图10中呈现的表中举例说明的那些。

[0258] 在一个具体实施例中，本发明提供Fc变体抗体，其中Fc区包含在选自以下项的一个或多个位置处的至少一个修饰(例如，氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失)：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的228、234、235以及331。在一个实施例中，该修饰是选自以下项的至少一个取代：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的228P、234F、235E、235F、235Y、以及331S。

[0259] 在另一个具体实施例中，本发明提供Fc变体抗体，其中Fc区是IgG4 Fc区并且包含在选自以下项的一个或多个位置处的至少一个修饰：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的228和235。在仍然另一个具体实施例中，Fc区是IgG4 Fc区并且非天然存在的氨基酸是选自以下项：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的228P、235E以及235Y。

[0260] 在另一个具体实施例中，本发明提供Fc变体，其中Fc区包含在选自以下项的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的239、330以及332。在一各实施例中，该修饰是选自以下项的至少一个取代：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的239D、330L、330Y以及332E。

[0261] 在另一个具体实施例中，本发明提供Fc变体抗体，其中Fc区包含在选自以下项的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的252、254以及256。在一各实施例中，该修饰是选自以下项的至少一个取代：如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的252Y、254T以及256E。在本发明的特别优选的抗体中，该修饰是如通过如在卡巴特 (Kabat) 中列出的EU索引来编号的三个取代252Y、254T和256E(称为“YTE”)，参见U.S.7,083,784。

[0262] 在某些实施例中，由IgG抗体引发的效应子功能很大程度上取决于连接至蛋白质的Fc区的碳水化合物部分(费拉拉 (Ferrara) 等人，(2006)，生物技术与生物工程 (Biotechnology and Bioengineering) 93:851-861)。因此，可以修饰Fc区的糖基化以便提

高或降低效应子功能(参见例如乌马纳(Umana)等人,(1999),自然生物技术(Nat.Biotechnol)17:176-180;戴维斯(Davies)等人,(2001),生物技术和生物工程74:288-294;希尔兹(Shields)等人,(2002),生物化学杂志277:26733-26740;新川(Shinkawa)等人,(2003),生物化学杂志278:3466-3473;美国专利号6,602,684;6,946,292;7,064,191;7,214,775;7,393,683;7,425,446;7,504,256;美国公开号2003/0157108;2003/0003097;2009/0010921;Potillegent™技术(Biowa有限公司(Biowa,Inc.)新泽西州普林斯顿(Princeton,N.J.));GlycoMAb™糖基化工程技术(格黎卡特生物技术股份公司(GLYCART biotechnology AG),瑞士苏黎世(Zurich,Switzerland)))。因此,在一个实施例中,本发明的抗体的Fc区包含氨基酸残基的改变的糖基化。在另一个实施例中,氨基酸残基的改变的糖基化导致效应功能降低。在另一个实施例中,氨基酸残基的改变的糖基化导致效应功能增强。在一个具体实施例中,Fc区具有减少的岩藻糖基化。在另一个实施例中,Fc区未被岩藻糖基化(参见例如美国专利申请公开号2005/0226867)。在一方面,如在宿主细胞(例如,CHO细胞,浮萍(Lemna minor))中产生的、具有增加的效应子功能(尤其是ADCC)的这些抗体被工程化来产生ADCC比通过亲本细胞产生的抗体高出100倍以上的高度去岩藻糖基化的抗体(莫里(Mori)等人,(2004),生物技术与生物工程88:901-908;考克斯(Cox)等人,(2006),自然生物技术24:1591-7)。

[0263] 向IgG分子上的低聚糖添加唾液酸可以增强它们的抗炎症活性并且改变它们的细胞毒性(肯内高(Keneko)等人,(2006),科学(Science),313:670-673;斯卡隆(Scallan)等人,(2007),分子免疫学(Mol.Immuno.);44(7):1524-34)。以上参考的研究论证了具有增加的唾液酸化的IgG分子具有抗炎症特性,而具有降低的唾液酸化的IgG分子具有提高的免疫刺激特性(例如,提高ADCC活性)。因此,对于具体治疗性应用,抗体可以被修饰为具有适当的唾液酸化分布(美国公开号2009/0004179和国际公开号WO 2007/005786)。

[0264] 在一个实施例中,与天然Fc区相比,本发明的抗体的Fc区包含改变的唾液酸化分布。在一个实施例中,与天然Fc区相比,本发明的抗体的Fc区包含增加的唾液酸化分布。在另一个实施例中,与天然Fc区相比,本发明的抗体的Fc区包含降低的唾液酸化分布。

[0265] 在一个实施例中,本发明的Fc变体可以与其他已知的Fc变体组合,这些其他已知的Fc变体如在贵特(Ghetie)等人,(1997),自然生物技术(Nat Biotech.),15:637-40;邓肯(Duncan)等人,(1988),自然(Nature),332:563-564;伦德(Lund)等人,(1991),免疫学杂志(J.Immunol),147:2657-2662;伦德(Lund)等人,(1992),分子免疫学(Mol Immunol.),29:53-59;阿莱格里(Alegre)等人,(1994),移植(Transplantation),57:1537-1543;哈钦斯(Hutchins)等人,(1995),美国美国科学院院刊(Proc Natl.Acad.Sci.USA.)92:11980-11984;杰弗里斯(Jefferis)等人,(1995),免疫学快报(Immunol Lett.),44:111-117;伦德(Lund)等人,(1995),美国实验生物学学会联合会杂志(Faseb J)9:115-119;杰弗里斯(Jefferis)等人,(1996),免疫学快报(Immunol.Lett.),54:101-104;伦德(Lund)等人,(1996),免疫学杂志(J.Immunol.),157:4963-4969;阿穆尔(Armour)等人,(1999),欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol),29:2613-2624;伊度索奇(Idusogie)等人,(2000),免疫学杂志(J.Immunol.),164:4178-4184;雷迪(Reddy)等人,(2000),免疫学杂志(J.Immunol.),164:1925-1933;许(Xu)等人,(2000),细胞免疫学(Cell Immunol),200:16-26;伊度索奇(Idusogie)等人,(2001),免疫学杂志(J.Immunol.),166:2571-2575;希尔兹(Shields)等

人, (2001), 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 276:6591-6604; 杰弗里斯 (Jefferis) 等人, (2002), 免疫学快报 (Immunol. Lett.), 82:57-65; 普雷斯塔 (Presta) 等人, (2002), 生物化学学会汇刊 (Biochem Soc Trans) 30:487-490; 美国专利号 5,624,821、5,885,573、5,677,425、6,165,745、6,277,375、5,869,046、6,121,022、5,624,821、5,648,260、6,528,624、6,194,551、6,737,056、7,122,637、7,183,387、7,332,581、7,335,742、7,371,826、6,821,505、6,180,377、7,317,091、7,355,008; 2004/0002587; 以及 WO 99/58572 中披露的那些。Fc 结构域的其他修饰和/或取代和/或添加和/或缺失将易于对本领域技术人员显而易见。

[0266] 糖基化

[0267] 除了糖基化的改变抗体的效应子功能的能力之外, 在可变区中的修改的糖基化还可以改变抗体对于抗原的亲和力。在一个实施例中, 在本发明抗体的可变区中的糖基化模式被修改。例如, 可以制作无糖基化的抗体 (即, 抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化作用例如以增加该抗体对抗原的亲合性。此类糖类修饰可以通过例如改变在抗体序列之内的一个或多个糖基化位点来完成。例如, 可以进行一个或多个氨基酸取代, 导致一个或多个可变区框架糖基化位点的消除, 由此消除在那个位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对于抗原的亲和力。这种方法在美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中更详细地描述。还可以进行一个或多个氨基酸取代, 氨基酸取代导致存在于 Fc 区中的糖基化位点 (例如, IgG 的天冬酰胺 297) 的消除。此外, 无糖基化的抗体可以在缺乏必要的糖基化机器 (machinery) 的细菌细胞中产生。

[0268] 抗体轭合物

[0269] 在某些实施例中, 使用本领域中熟知的方法将本发明的抗体轭合或共价连接至一种物质。在一个实施例中, 连接的物质是治疗剂、可检测的标记 (在此还被称为报道分子) 或固体支撑物。用于连接至抗体的适合的物质包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、多糖、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、半抗原、药物、激素、脂质、脂质组装体、合成聚合物、聚合微粒、生物细胞、病毒、荧光团、生色团、染料、毒素、半抗原、酶、抗体、抗体片段、放射性同位素、固体基质、半固体基质、及其组合。将另一物质轭合或共价连接至抗体的方法是本领域中熟知的。

[0270] 在某些实施例中, 本发明的抗体被轭合至固体支撑物。抗体可轭合于固体支撑物作为筛选和/或纯化和/或制造方法的一部分。可替代地, 本发明的抗体可以轭合至固体支撑物作为诊断方法或组合物的一部分。适用于在本发明中使用的固体支撑物典型地在液相中基本上不可溶。有大量支撑物可用并且为本领域中的普通技术人员所已知。因此, 固体支撑物包括固体和半固体基质, 如气凝胶和水凝胶、树脂、珠粒、生物芯片 (包括薄膜涂布生物芯片)、微流体芯片、硅芯片、多孔板 (也称为微量滴定板或微板)、膜、导体和非导体金属、玻璃 (包括显微镜载玻片) 和磁性支撑物。固体支撑物的更具体实例包括硅胶、聚合物膜、粒子、衍生化塑胶膜、玻璃珠、棉花、塑胶珠粒、氧化铝凝胶、多糖 (如琼脂糖凝胶)、聚 (丙烯酸酯)、聚苯乙烯、聚 (丙烯酰胺)、多元醇、琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、淀粉、聚蔗糖 (FICOLL)、肝素、糖原、支链淀粉、甘露聚糖、菊糖、硝酸纤维素、重氮纤维素、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯 (包括聚 (乙二醇))、尼龙、乳胶珠粒、磁性珠粒、顺磁性珠粒、超顺磁性珠粒、淀粉等。

[0271] 在一些实施例中, 固体支撑物可包括反应性官能团, 包括但不限于羟基、羧基、氨

基、硫醇基、醛、卤素、硝基、氰基、酰胺基、脲、碳酸酯、氨基甲酸酯、异氰酸酯、砒、磺酸酯、磺酰胺、亚砒等,用于连接本发明的抗体。

[0272] 适合的固相支撑物可根据期望的最终用途和对于各种合成方案的适合性进行选择。例如,在需要形成酰胺键以便将本发明抗体连接至固体支撑物的情况下,可采用一般适用于肽合成的树脂,如聚苯乙烯(例如,获自巴亨公司(Bachem Inc.),半岛实验室(Peninsula Laboratories)的PAM树脂等)、POLYHIPETM树脂(获自阿米诺技术公司(Aminotech),加拿大)、聚酰胺树脂(获自半岛实验室)、接枝有聚乙二醇的聚苯乙烯树脂(TentaGelTM,拉普聚合物公司(Rapp Polymere),图宾根(Tubingen),德国)、聚二甲基-丙烯酸树脂(可获自米利根公司(Milligen)/Biosearch公司,加利福尼亚州)或PEGA珠粒(获自聚合物实验室(Polymer Laboratories))。

[0273] 在某些实施例中,本发明的抗体出于诊断和其他测定的目的辄合至标记,其中可以检测到抗体和/或其相关的配体。辄合至抗体且在此所述的本发明的方法和组合物中使用的标记是任何化学部分(有机或无机的),该部分在大于280nm的波长下展现出最大吸收并且在共价连接至抗体时保留其光谱特性。标记物包括但不限于发色团、荧光团、荧光蛋白、磷光性染料、叠层染料(tandem dye)、颗粒、半抗原、酶以及放射性同位素。

[0274] 在某些实施例中,抗体辄合至荧光团。如此,用于标记本发明的抗体的荧光团包括但不限于:苌(包括在美国专利5,132,432中披露的相应衍生物化合物中的任一种)、葱、茌、吡啶、茌、吡啶或苯并吡啶、噻唑或苯并噻唑、噻唑或苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD)、花青(包括美国专利号6,977,305和6,974,873中的任何相应化合物)、羰花青(包括美国序列号09/557,275;美国专利号4,981,977;5,268,486;5,569,587;5,569,766;5,486,616;5,627,027;5,808,044;5,877,310;6,002,003;6,004,536;6,008,373;6,043,025;6,127,134;6,130,094;6,133,445;以及公开WO 02/26891、WO 97/40104、WO 99/51702、WO 01/21624;EP 1 065 250 A1中的任何相应化合物)、喹诺酮(carbostyryl)、吡啶、水杨酸酯、邻氨基苯甲酸酯、萘、茌、吡啶、喹啉、硼聚氮杂引达省(borapolyazaindacene)(包括美国专利号4,774,339;5,187,288;5,248,782;5,274,113;以及5,433,896中披露的任何相应化合物)、咕吨(包括美国专利号6,162,931;6,130,101;6,229,055;6,339,392;5,451,343;5,227,487;5,442,045;5,798,276;5,846,737;4,945,171;美国序列号09/129,015和09/922,333中披露的任何相应化合物)、噻嗪(包括美国专利号4,714,763中披露的任何相应化合物)或苯并噻嗪、卡巴嗪(包括美国专利号4,810,636中披露的任何相应化合物)、次联苯甲酮(phenalenone)、香豆素(包括美国专利号5,696,157;5,459,276;5,501,980以及5,830,912中披露的任何相应化合物)、苯并呋喃(包括美国专利号4,603,209和4,849,362中披露的任何相应化合物)、以及苯次联苯甲酮(benzphenalenone)(包括美国专利号4,812,409中披露的任何相应化合物)及其衍生物。如在此使用,噻嗪包括试卤灵(包括5,242,805中披露的任何相应化合物)、氨基噻嗪酮、二氨基噻嗪、以及其苯并取代的相似物。

[0275] 在一个具体实施例中,辄合至在此描述的抗体的荧光团包括咕吨(对甲氨基酚、若丹明、荧光素、以及其衍生物)、香豆素、花青、苌、噻嗪、以及硼聚氮杂引达省。在其他实施例中,这类荧光团是碘化的咕吨、氟化的咕吨、碘化的香豆素、氟化的香豆素、以及碘化的花青。还包括以下列商品名出售且通常已知为以下各项的染料:ALEXAFLUOR®、DyLight、

CY®染料、BODIPY®、OREGONGREEN®、PACIFICBLUE™、IRDYE®、FAM、FITC、以及ROX™。

[0276] 连接至抗体上的荧光团的选择将确定被结合的抗体的吸收和荧光发射特性。包括但不限于：光谱特征（吸收、发射和斯托克斯位移）、荧光强度、寿命、极化以及光致漂白率、或其组合。所有这些物理特性可以用于将一个荧光团与另一个荧光团区分开，并且从而允许多元分析。在某些实施例中，荧光团在大于480nm的波长下具有最大吸收。在其他实施例中，荧光团在处于或接近488nm至514nm（特别适合用于由氩离子激光激发源的输出激发）或在接近546nm（特别适合用于由水银弧光灯激发）下吸收。在其他实施例中，荧光团可以针对组织或完整生物体应用在NIR（近红外区域）中发射。荧光标记的其他所希望的特性可以包括细胞渗透性和低毒性，例如，如果将在细胞或生物体（例如，活体动物）中执行抗体的标记。

[0277] 在某些实施例中，酶是标记并且结合至在此所述的抗体。因为可以获得可检测的信号放大，从而得到提高的测定灵敏度，所以酶是合乎需要的标记物。酶自身不产生可检测的响应，但是当它被适当的底物接触时，起到分解底物的作用，这样使得被转化的底物产生荧光、比色或发光信号。因为标记试剂上的一种酶可以导致多个底物被转化成可检测的信号，所以酶将可检测的信号放大。选择酶底物以产生优选的可测量的产物，例如，比色、荧光或化学发光。这类底物在本领域中广泛使用且是本领域的技术人员熟知的。

[0278] 在一个实施例中，比色或荧光底物和酶组合使用氧化还原酶如辣根过氧化物酶和底物如3,3'-二氨基联苯胺（DAB）和3-氨基-9-乙基咔唑（AEC），这产生有区别的颜色（分别棕色和红色）。产生可检测的产物的其他比色氧化还原酶底物包括但不限于：2,2-连氮基-双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）（ABTS）、邻苯二胺（OPD）、3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）、邻联茴香胺、5-氨基水杨酸、4-氯-1-萘酚。荧光底物包括但不限于，高香草酸或4-羟基-3-甲氧基苯乙酸；还原的吩噻嗪和还原的苯并噻嗪，包括Amplex®红试剂及其变体（美国专利号4,384,042）；和还原的二氢咕吨，包括二氢荧光素（美国专利号6,162,931）；以及二氢若丹明，包括二氢若丹明123。为酪氨酸的过氧化物酶底物（美国专利号5,196,306；5,583,001和5,731,158）表示一类独特的过氧化物酶底物，在于它们可以在酶的作用之前固有地可检测，但在如酪氨酸信号放大（TSA）描述的过程中通过过氧化物酶的作用“固定在适当位置”。这些底物广泛地用于标记样品（这些样品是细胞、组织或阵列）中的抗原以用于其随后通过显微术、流式细胞术、光学扫描和荧光测定法进行的检测。

[0279] 在另一个实施例中，比色（并且在一些情况下荧光）底物和酶组合使用磷酸酶（如酸性磷酸酶、碱性磷酸酶或这种磷酸酶的重组型式）与比色底物（如5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯（BCIP）、6-氯-3-吲哚基磷酸酯、5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯、对硝基苯基磷酸酯或邻硝基苯基磷酸酯）或与荧光底物（如4-甲基伞形酮基磷酸酯、6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素基磷酸酯（DiFMUP，美国专利号5,830,912）、荧光素二磷酸酯、3-邻甲基荧光素磷酸酯、试卤灵磷酸酯、9H-（1,3-二氯-9,9-二甲基吡啶-2-酮-7-基）磷酸酯（DDAO磷酸酯）或ELF97、ELF39或相关磷酸酯（美国专利号5,316,906和5,443,986））的组合。

[0280] 糖苷酶，具体地说β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖醛酸糖苷酶和β-葡萄糖苷酶是另外适合的酶。适当的比色底物包括但不限于，5-溴-4-氯-3-吲哚基β-D-吡喃半乳糖苷（X-gal）和相似的吲哚基半乳糖苷、葡萄糖苷和葡萄糖苷酸、邻硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷（ONPG）、以及对硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷。在一个实施例中，荧光底物包括试卤灵β-D-吡喃半乳糖苷、荧光素

二半乳糖苷 (FDG)、荧光素二葡萄糖苷酸以及它们的结构变体 (美国专利号 5,208,148; 5,242,805; 5,362,628; 5,576,424 以及 5,773,236)、4-甲基伞形酮基 β -D-吡喃半乳糖苷、羧基伞形酮基 β -D-吡喃半乳糖苷、以及氟化香豆素 β -D-吡喃半乳糖苷 (美国专利号 5,830,912)。

[0281] 另外的酶包括但不限于,水解酶如胆碱酯酶和肽酶、氧化酶如葡萄糖氧化酶和细胞色素氧化酶、以及还原酶,对于这些酶适合的底物是已知的。

[0282] 酶以及其产生化学发光的适当的底物优选用于一些测定。这些包括但不限于天然和重组形式的荧光素酶和水母发光蛋白。磷酸酶、糖苷酶和氧化酶的产生化学发光的底物,如含有稳定的二氧杂环丁烷、鲁米诺、异氨基苯二酰肼以及吖啶酯的那些也是有用的。

[0283] 在另一个实施例中,也利用如生物素的半抗原作为标记。生物素是有用的,这是因为它可以在酶系统中起作用以进一步放大可检测的信号并且它可以充当一个有待在亲和色谱中使用用于分离目的标签。出于检测目的,使用对于生物素具有亲和力的酶轭合物,如抗生物素蛋白-HRP。随后添加一种过氧化物酶底物以产生可检测的信号。

[0284] 半抗原还包括激素、天然存在和合成的药物、污染物、过敏原、影响分子、生长因子、趋化因子、细胞因子、淋巴因子、氨基酸、肽、化学中间体、核苷酸及相似物。

[0285] 在某些实施例中,荧光蛋白可以轭合至抗体作为标记。荧光蛋白的实例包括绿色荧光蛋白 (GFP) 和藻胆蛋白及其衍生物。荧光蛋白,特别是藻胆蛋白,对于产生叠层染料标记的标记试剂尤其有用。出于获得较大的斯托克斯位移的目的,这些叠层染料包含荧光蛋白和荧光团,其中发射光谱从荧光蛋白的吸收光谱的波长发生更远的位移。对于检测样品中的较低量的抗原来说这是特别有利的,其中发射的荧光被最大限度地优化,换言之之很少至没有发射光被荧光蛋白重吸收。为了实现这一点,荧光蛋白和荧光团充当能量转移对,其中荧光蛋白在荧光团所吸收的波长下发射,并且荧光团随后在远离仅存在荧光蛋白的情况下所能够获得的波长的波长下发射。特别有用的组合是美国专利号 4,520,110; 4,859,582; 5,055,556 中披露的藻胆蛋白和美国专利号 5,798,276 中披露的磺基若丹明荧光团,或美国专利号 6,977,305 和 6,974,873 中披露的磺化花青荧光团; 或美国专利号 6,130,101 中披露的磺化咕吨衍生物,以及美国专利号 4,542,104 中披露的那些组合。可替代地,荧光团充当能量供体并且荧光蛋白是能量受体。

[0286] 在某些实施例中,标记是放射性同位素。适合的放射性材料的实例包括但不限于碘 (^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、碳 (^{14}C)、硫 (^{35}S)、氚 (^3H)、铟 (^{111}In 、 ^{112}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{115\text{m}}\text{In}$)、锝 (^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钽 (^{201}Ti)、镓 (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯 (^{103}Pd)、钼 (^{99}Mo)、氙 (^{135}Xe)、氟 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、和 ^{97}Ru 。

[0287] 医学治疗和用途

[0288] 本发明的抗体及其抗原结合片段以及其变体可以用于治疗乙型流感病毒感染、用于预防乙型流感病毒感染; 用于乙型流感病毒感染的检测、诊断和/或预后; 或其组合。在一个实施例中,本发明的抗体及其抗原结合片段及其变体可以用于治疗甲型流感和乙型流感感染,用于预防甲型流感和乙型流感; 用于甲型流感和乙型流感感染的检测、诊断和/或预后; 或其组合。

[0289] 诊断方法可以包括使抗体或抗体片段与样品相接触。这类样品可以是例如鼻腔通道、鼻窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑或皮肤取得的组织样品。检测、诊断和/或预后方法还可以包括检测抗原/抗体复合

物。

[0290] 在一个实施例中,本发明提供一种通过向受试者给予有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段或包含该抗体或其抗原结合片段的药用组合物来治疗该受试者的方法。在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段是基本上纯化的(即,基本上不含限制其作用或产生不希望的副作用的物质)。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露后给予,或在受试者已经暴露于乙型流感病毒或感染乙型流感病毒之后给予。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露后给予,或在受试者已经暴露于山形和/或维多利亚世系的乙型流感病毒或感染了山形和/或维多利亚世系的乙型流感病毒之后给予。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露后给予,或在受试者已经暴露于至少一种甲型流感病毒亚型;山形世系的乙型流感病毒;维多利亚世系的乙型流感病毒,或其组合;或感染了至少一种甲型流感病毒亚型和/或山形和/或维多利亚世系的乙型流感病毒之后给予。

[0291] 在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露前给予,或给予至尚未暴露于乙型流感病毒或尚未感染乙型流感病毒的受试者。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露前给予,或向仍还没有暴露于山形和/或维多利亚世系的乙型流感病毒或仍没有感染山形和/或维多利亚世系的乙型流感病毒的受试者给予。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段在暴露前给予,或向仍还没有暴露于甲型流感病毒;山形世系的乙型流感病毒;维多利亚世系的乙型流感病毒;或其组合,或仍没有感染甲型流感病毒;山形世系的乙型流感病毒;维多利亚世系的乙型流感病毒;或其组合的受试者给予。

[0292] 在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种乙型流感病毒血清反应阴性的受试者。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种乙型流感病毒世系血清反应阴性的受试者。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种甲型流感亚型和/或一种或多种乙型流感病毒血清反应阴性的受试者。

[0293] 在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种乙型流感病毒血清反应阳性的受试者。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种乙型流感病毒世系血清反应阳性的受试者。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至针对一种或多种甲型流感病毒亚型和/或一种或多种乙型流感病毒血清反应阳性的受试者。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被给予至在感染或症状发作的1、2、3、4、5天内的受试者。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以被给予至在感染或症状发作之后1、2、3、4、5、6或7天之后的受试者和在感染或症状发作之后2、3、4、5、6、7、8、9或10天之内的受试者。

[0294] 在一个实施例中,该方法减轻受试者的乙型流感病毒感染。在另一个实施例中,该方法减轻受试者甲型流感病毒感染和/或乙型流感病毒感染。在另一个实施例中,该方法预防受试者的乙型流感病毒感染、降低受试者的乙型流感病毒感染的风险或延迟受试者的乙型流感病毒感染。在另一个实施例中,该方法预防受试者的甲型流感和/或乙型流感病毒感染、降低受试者的甲型流感和/或乙型流感病毒感染的风险或延迟受试者的甲型流感和/或乙型流感病毒感染。在一个实施例中,受试者是动物。在一个实施例中,受试者是哺乳动物。

在一个更具体的实施例中,受试者是人。在一个实施例中,受试者包括但不限于,特别处于甲型流感和/或乙型流感病毒感染的风险或易患甲型流感和/或乙型流感病毒感染的受试者,例如,免疫功能低下的受试者。

[0295] 治疗可以是单剂量方案或多剂量方案,并且本发明的抗体或其抗原结合片段可以用于被动免疫或主动免疫接种。

[0296] 在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段与一种或多种抗病毒药物组合给予至受试者。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段与一种或多种小分子抗病毒药物组合给予至受试者。小分子抗病毒药物包括神经氨酸酶抑制剂,如奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®);以及金刚烷,如金刚烷胺和金刚乙胺。

[0297] 在另一个实施例中,本发明提供一种用作用于预防或治疗甲型流感和/或乙型流感病毒感染的药剂的组合物。在另一个实施例中,本发明提供本发明的抗体或其抗原结合片段和/或具有本发明的抗体或其抗原结合片段所结合的表位的蛋白质在制造用于治疗受试者和/或诊断受试者的药剂中的用途。

[0298] 如在本发明中描述的抗体及其片段还可以在诊断甲型流感病毒感染;乙型流感病毒感染;或其组合的试剂盒中使用。此外,能够结合本发明的抗体的表位可以用于试剂盒中,该试剂盒用于通过检测保护性抗甲型流感和/或乙型病毒抗体的存在来监测疫苗接种程序的功效。如在本发明中描述的抗体、抗体片段或其变体和衍生物还可以在用于监测具有所希望的免疫原性的疫苗制造的试剂盒中使用。

[0299] 本发明还提供一种制备药用组合物的方法,该方法包括将单克隆抗体与一种或多种药学上可接受的载体掺混的步骤,其中该抗体是在此所述的根据本发明的单克隆抗体。

[0300] 各种递送系统是已知的并且可以用于给予本发明的抗体或其抗原结合片段,包括但不限于,封装在脂质体中、微颗粒、微胶囊、能够表达该抗体或抗体片段的重组细胞、受体介导的内吞作用、构建作为逆转录病毒或其他载体的一部分的核酸、等。引入方法包括但不限于,皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、以及口服途径。在另一个实施例中,疫苗可以作为DNA疫苗给予,例如使用电穿孔技术,包括但不限于体内电穿孔。可以通过任何方便的途径给予这些组合物,例如通过输注或单次快速静脉注射(bolus injection)、通过经由上皮或皮肤粘膜内层(例如口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收,并且可以将其与其他生物活性剂(包括但不限于小分子抗病毒组合物)一起给予。给予可以是全身性的或局部的。也可以例如通过使用吸入器或雾化器以及具有雾化剂的制剂而采用肺部给予。在又一个实施例中,可以在控制释放系统中递送该组合物。

[0301] 本发明还提供了药物组合物。这类组合物包含治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。如在此使用的术语“药学上可接受的”意指由联邦政府或州政府的监管机构批准的或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的,用于在动物体内并且更具体地在人体内使用。术语“载体”是指与治疗剂一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药物载体可以为无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内给予药用组合物时,水是优选的载体。还可以将盐水溶液、水性右旋糖和甘油溶液用作液体载体,特别是用于注射溶液。适合的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇以及相似物。如果希望的话,该组

合物还以含有少量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取以下形式：溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放配制品以及相似物。该组合物可以与传统的结合剂和载体如甘油三酯一起配制为栓剂。口服配制品可以包含标准载体，如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。在一个实施例中，该药物组合物含有治疗有效量的抗体或其抗原结合片段（优选呈纯化形式）连同适合量的载体以便提供用于正确给予至患者的形式。该制剂应该符合给予方式的要求。

[0302] 典型地，对于抗体治疗剂，给予至患者的剂量在约0.1mg/kg至100mg/kg患者体重之间。

[0303] 实例

[0304] 实例1. 从记忆B细胞分离的人单克隆抗体的构建和优化

[0305] 从针对B/佛罗里达/4/2006山形世系 (B/FLA/06) 和B/布里斯班/60/2008维多利亚世系 (B/BNE/08) 的高中和滴度选择的供体的冷冻保存的外周血单核细胞 (PBMC) 分选CD22+ IgG+B细胞，并且使用埃-巴二氏病毒病毒 (EBV)、CpG寡脱氧核苷酸2006和饲养细胞以3个细胞/孔永生化。含有抗体的培养物上清液在14天后收获，并且通过微量中和测定 (MNA) 进行筛选，该微量中和测定从先前描述的加速病毒抑制测定修改而来，使用神经氨酸酶活性 (NA) 作为读出 (Hassantoufighi等人，(2010) 疫苗 (Vaccine) 28:790-7) 以鉴定可以中和来自山形和维多利亚乙型流感世系两者的病毒的抗体克隆。

[0306] 简言之，将10μl培养上清液与400TCID₅₀的流感B/BNE/08 (维多利亚世系) 或B/FLA/06 (山形世系) 在37℃一起孵育一小时。将梅丁-达尔比 (Madin-Darby) 犬肾 (MDCK) 细胞添加至板中 (每孔20,000个细胞)，孵育4小时，用含有TPCK-胰蛋白酶的培养基洗涤两次，然后在37℃孵育2天。孵育后，通过以25μl/孔 (10μM) 添加荧光标记的底物甲基伞形酮基-N-乙酰神经氨酸 (MU-NANA) (西格玛公司 (Sigma))，并且用荧光计读取平板来测量NA活性。

[0307] 发现三个B细胞克隆 (FBC-39、FBD-56、和FBD-94) 具有针对乙型流感维多利亚和山形世系的中和活性。将这些克隆的VH和VL基因进行测序，并且克隆到IgG1表达载体中。通过瞬时转染源自人胚胎肾 (HEK) 或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的哺乳动物细胞系生产重组抗体。在培养7-10天之后收集来自转染的细胞的上清液，并且通过蛋白质A色谱法亲和力纯化抗体 (IgG)，并且渗析至磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。

[0308] 使用IgBLAST算法将mAb序列与人抗体种系序列的数据库进行比对。对于VH和VL的每个基因区域鉴定最接近的种系模板 (表6)。通过与这些参比序列的比对来鉴定非种系氨基酸。

[0309] 表6. 包含VH和VL的最接近的人类基因的鉴定

	VH V 基因	VH J 基因	VH D 基因	VL V 基因	VL J 基因
[0310]	FBD-56	IGHV3-9*01	IGHJ6*02	IGHD5-12*01	IGKV3-11*01
	FBD-94	IGHV3-9*01	IGHJ6*02	IGHD6-13*01	IGKV3-11*01
[0311]	FBC-39	IGHV3-15*01	IGHJ6*02	IGHD3-3*01	IGKV1-12*01

[0312] FBC-39变体构建：

[0313] 在FBC-39抗体VL中，仅存在一个非种系框架残基：在轻链中位置87处的F，其中种

系化的氨基酸是Y(或L87F(Y))、如通过卡巴特(Kabat)编号的(对于IMGT编号为位置103)。种系化的序列在此被称为FBC-39-L87Y。非种系序列被称为FBC-39-L87F。

[0314] 在FBC-39抗体VH中,存在11个非种系卡巴特(Kabat)定义的框架残基:H6V(E)、H27L(F)、H28S(T)、H30L(S)、H68S(T)、H77M(T)、H79F(Y)、H81H(Q)、H82aS(N)、H83R(K)、和H93A(T),如通过卡巴特(Kabat)编号的。如果使用框架残基的IMGT定义,存在7个非种系残基:H6V(E)、H77S(T)、H86M(T)、H88F(Y)、H90H(Q)、H92S(N)、和H95R(K)。

[0315] 构建了变体,其中所有12个非种系卡巴特(Kabat)定义的框架残基被回复到种系氨基酸。这个抗体构建体展示了针对维多利亚世系乙型流感病毒的中和活性和气息覆盖范围的显著降低,意味着一个或多个非种系残基对于活性是重要的。

[0316] 三个非种系框架残基,位于位置H27、H28和H30,是在被卡巴特(Kabat)系统定义为VH框架1的区域中,尽管它们被认为是通过IMGT系统的HCDR-1的一部分。通过将所有非种系卡巴特(Kabat)定义的框架氨基酸回复为它们相应的种系残基来产生抗体变体,除了这三个位置:H27L(F)、H28S(T)、H30L(S),它在种系残基和非种系残基之间“摇摆”以产生七个重链变体:FBC-39 LSL;FBC-39 FSL;FBC-39 LTL;FBC-39 FTL;FBC-39-FSS;FBC-39-LTS;FBC-39-FTS,其中种系残基加下划线,使得FBC-39 FTS含有三个种系氨基酸,并且FBC-39 LSL在位置H27、H28和H30处含有三个野生型残基。

[0317] 另外,在H82(H92IMGT)的种系残基N在VH中产生了潜在的脱酰胺作用位点(NS)。因此,在所有七个变体FBC-39 LSL、FBC-39 FSL、FBC-39 LTL、FBC-39 FTL、FBC-39-FSS、FBC-39-LTS、和FBC-39-FTS中,这被FBC-39的野生型S所取代。另外,所有七个FBC-39变体共有相同的轻链序列(FBC-39-L87Y),它与FBC-39轻链有一个氨基酸不同。

[0318] 将所得抗体变体如以上所述进行表达和纯化,并且进一步表征。

[0319] 实例2. 分离的抗-HA抗体结合乙型流感HA全部两个世系

[0320] 进行HA ELISA结合测定以确定分离的抗体的结合和交叉反应。将384孔Maxisorb ELISA板(能肯公司(Nunc))在4℃用0.5μg/ml源自山形世系株B/FLA/06或维多利亚世系株B/BNE/08的重组HA在PBS中包被过夜。将板用含有0.1%v/v吐温-20的PBS洗涤以便去除未包被的蛋白质,并且添加含有1%(w/v)酪蛋白(赛默科技公司(Thermo Scientific))的封闭溶液,在室温下,持续1小时。丢弃封闭溶液,并且添加3-倍连续稀释在PBS中的每个抗-HA抗体(FBC-39、FBD-56、和FBD-94)并且在室温下孵育1小时。将板洗涤三次并且使用过氧化物酶耦联的小鼠抗人IgG抗体(杰克逊(Jackson))检测结合的抗体。通过在加入Supersignal Pico底物(赛默科技公司(Thermo Scientific))之后测量化学发光信号或通过与四甲基联苯胺(TMB)单组分底物(可得自科克加德和佩里实验室有限公司(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) (KPL),盖瑟斯堡,马里兰州(Gaithersburg, MD))孵育,接着添加2N硫酸以便终止反应之后测量在450nm下的颜色变化来计算抗体结合活性。

[0321] 表7.

	通过ELISA检测的与rHA的结合 (平均EC ₅₀ , ng/ml)	
	B/FL/06 (yam)	B/BNE/08 (vic)
[0322] FBC-39	20	48
FBD-56	24	30
FBD-94	13	16

[0323] 表7示出了来自三个独立实验的平均EC₅₀。所有三个抗HA IgG (FBC-39、FBD-56和FBD-94) 结合来自全部两个乙型流感世系的重组HA。在所有三种抗体针对山形 (B/FL/06) HA之间观察到相似的EC₅₀值。用维多利亚 (B/BNE/08), 对于FBD-94比对于FBD-56抑或FBC-39观察到更低的EC₅₀。

[0324] 通过ELISA测试了七个FBC-39抗体种系变体的结合活性。表8示出了未纯化的抗HA的FBC-39 IgG变体的结合结果, 其中FBC-39 FTS含有卡巴特 (Kabat) 定义的框架种系氨基酸, 并且FBC-39 LSL含有卡巴特 (Kabat) 定义的框架种系氨基酸, 除了在位置H27、H28和H30处的野生型残基 (卡巴特 (Kabat) 编号)。这些结果示出, 所有变体结合山形世系 (B/FL/06) HA蛋白, 但是在位置H30处含有S残基的变体丧失对维多利亚世系 (B/BNE/08) HA蛋白的结合亲和力。四个变体 (FBC-39 LSL、FSL、LTL、和FTL) 示出比FBC-39对来自全部两个世系的HA蛋白相当或更好的结合亲和力。

[0325] 表8.

	通过ELISA检测的与rHA的结合 (平均EC ₅₀ , ng/ml)	
	B/FL/06 (yam)	B/BNE/08 (vic)
[0326] FBC-39	22	186
FBC-39 LSL	21	152
FBC-39 FSL	14	273
FBC-39 LTL	17	114
FBC-39 FTL	17	118
FBC-39 FSS	19	>1000
FBC-39 LTS	13	>1000
FBC-39 FTS	26	>1000

[0327] 实例3. 抗乙型流感HA IgG针对来自两个不同世系的病毒的体外交叉反应中和活性

[0328] 如实例1中所描述的, 使用相似的微量中和测定法来测试纯化的mAb活性。简言之, 对在补充有抗生素、谷氨酰胺 (完全MEM培养基) 以及10% (v/v) 胎牛血清的MEM培养基 (英杰公司) 中培养的MDCK细胞。将60TCID₅₀ (50%组织培养物感染剂量) 的病毒添加至在384孔板中一式两份孔中的含有0.75ug/mlTPCK处理的胰蛋白酶 (沃辛顿 (Worthington)) 的完全MEM培养基中的抗体的三倍稀释液, 在室温下30分钟孵育之后, 将2×10⁴个细胞/孔添加至该板。在33℃5%CO₂孵育器中孵育大约40小时之后, 通过将荧光标记的底物甲基伞形酮基-N-乙酰基神经氨酸 (MU-NANA) (西格玛公司) 添加至每个孔并且在37℃下孵育1小时来测量NA活性。使用以下设置, 通过使用Envision荧光计 (珀金埃尔默公司 (PerkinElmer)) 读取荧光来定量由NA活性表示的病毒复制: 激发355nm, 发射460nm; 每孔10次发光。中和滴度 (50%抑制浓度 [IC₅₀]) 被表示为相较于细胞对照孔使荧光信号降低50%的最终抗体浓度。在表9中使用的乙型流感病毒株如下所列: B/Lee/40 (B/Lee/40); B/AA/66 (ca B/安阿伯/1/66); B/

HK/72 (B/香港/5/72) ; B/BJ/97 (ca B/北京/243/97 (维多利亚)) , B/HK/01 (B/香港/330/2001 (维多利亚)) ; B/MY/04 (B/马来西亚/2506/2004 (维多利亚)) ; B/BNE/08 (ca B/布里斯班 (Brisbane) /60/2008 (维多利亚)) ; B/AA/94 (ca B/安阿伯/2/94 (山形)) ; B/YSI/98 (ca B/山梨 (Yamanashi) /166/98 (山形)) ; B/JHB/99 (ca B/约翰尼斯堡 (Johannesburg) /5/99 (山形)) ; B/SC/99 (B/四川/379/99 (山形)) ; B/FL/06 (B/佛罗里达/4/2006 (山形))。

[0329] 表9.

[0330]

世系	病毒株	中和 (平均IC ₅₀ , µg/ml)						
		FBD-56	FBD-94	FBC39	FBC-39 LSL	FBC-39 FSL	FBC-39 LTL	FBC-39 FTL
非典型化的	B/Lee/40	0.004	0.009	0.021	0.014	0.011	0.010	0.013
	B/AA/66	0.035	0.014	0.061	0.027	0.034	0.023	0.026
	B/HK/72	0.051	0.017	0.026	0.019	0.019	0.018	0.022
维多利亚世系	B/BJ/97	0.016	0.005	0.218	0.182	0.195	0.152	0.134
	B/HK/01	0.038	0.021	0.142	0.172	0.132	0.084	0.121
	B/MY/04	0.058	0.023	0.079	0.094	0.076	0.076	0.074
	B/BNE/08	0.010	0.006	0.238	0.100	0.080	0.151	0.098
山形世系	B/AA/94	1.251	0.891	0.027	0.033	0.023	0.023	0.023
	B/YSI/98	0.133	0.012	0.039	0.014	0.009	0.010	0.007
	B/JHB/99	0.021	0.012	0.304	nd	nd	nd	nd
	B/SC/99	nd*	nd	0.034	0.026	0.022	0.023	0.023
	B/FL/06	0.013	0.016	0.046	0.016	0.017	0.023	0.014
*nd = 未确定的								

[0331] 表9示出了来自两个独立实验的平均IC₅₀。抗HA抗体中和所有测试的乙型流感病毒。FBD-56和FBD-94比FBC-39更有效,但示出一些针对B/AA/94株减少的活性。FBC-39变体, LSL、FSL、LTL、和FTL以与FBC-39相似或更低的IC₅₀中和所有病毒。

[0332] 实例4. 甲型流感H9病毒株的结合和中和

[0333] 使用与如实例2中相似的方法进行结合HA的ELISA,其中例外是384孔板在室温下用3µg/ml的源自甲型流感亚型H9 (A/鸡/HK/G9/97 (H9N2)) 的重组HA在PBS中包被2小时。结果示出FBC-39和种系变体LTL结合H9 HA具有分别为6.2和6.3µg/ml的相似的EC₅₀值,并且FBC-39 LSL和FTL结合具有分别为41.7和46.1µg/ml的更高的EC₅₀ (表10)。相比之下,FBC-39 FSL在测试的最高剂量50µg/ml仅微弱地结合,并且使用FBD-56和FBD-94没有看到结合。

[0334] 表10.

[0335]

针对甲型流感/鸡/HK/ G9/97 (H9N2) 的活性		
	结合EC ₅₀ (µg/ml)	中和IC ₅₀ (µg/ml)
FBD-56	nb*	>50
FBD-94	nb	>50
FBC-39	6.2	0.17
FBC-39 LSL	41.7	0.59
FBC-39 FSL	弱	1.70
FBC-39 LTL	6.3	0.09
FBC-39 FTL	46.1	0.43
Ctl mAb	nb	>50

[0336] *nb = 未结合

[0337] 为了确认甲型流感H9Ha蛋白的结合在功能上是相关的,使用如实例3中所描述的

相似方法进行微量中和测定。对于这个测定,使用如由吉恩(Jin)等人(2003)病毒学(Virology) 306:18-24描述的相似的方法,在caA/安阿伯/6/60(H2N2)病毒的六个内在的蛋白质基因的背景下,通过反向遗传学产生冷适应的(ca)活减毒流感疫苗病毒,该病毒含有来自A/鸡/香港/G9/97(H9N2)病毒的病毒HA和NA基因。微量中和测定的结果在表10中示出。与结合曲线一致,FBC-39和这些变体以生物学相关的 IC_{50} 值潜在地中和H9N2病毒。FBC-39和FBC-39 LTL具有最有效的活性,其中 IC_{50} 值分别为0.17和0.09 $\mu\text{g/ml}$ 。如所期望的,FBD-56、FBD-94和对照抗体在测试的最高浓度(50 $\mu\text{g/ml}$)示出没有中和活性。

[0338] 实例5.通过选择单克隆抗体抗性突变体(MARM)进行的表位鉴别

[0339] 在病毒和抗体的混合物以30,000 TCID₅₀/孔在10x96孔板中吸附到MDCK细胞,并且在FBC-39、FBD-56和FBD-94(10 $\times IC_{50}$)的存在下培养之前,山形世系乙型流感病毒(B/佛罗里达/4/2006;B/FLA/06)和维多利亚世系乙型流感病毒(B/马来西亚/2506/2004;B/MY/04)与高浓度的FBC-39、FBD-56和FBD-94(125 $\times IC_{50}$)一起孵育1小时。分离在感染后长达3天内对感染细胞展现出细胞病变效应(CPE)的推定MARM。HA基因通过RT-PCR扩增,并且随后测序,然后通过微量中和测定确认分离的病毒的抗性。当在FBC-39、FBD-56或FBD-94的存在下培养时,没有从B/FLA/09病毒中分离到MARM。当使用维多利亚世系(B/MY/04)病毒时,在FBD-56和FBD-94存在下分离MARM,但在FBC-39存在下不分离。序列分析显示两个FBD-56MARM在位置128处包含从谷氨酸(E)到赖氨酸(K)或缬氨酸(V)的单个氨基酸取代(表11)。FBD-94MARM在位置128处具有从E到K的单个氨基酸取代(表11)。与野生型病毒(B/FLA/06)相比,在位置141含有从甘氨酸(G)至E(B/FLA/06G141E)的单个氨基酸取代的山形世系B/佛罗里达/4/2006的变体赋予FBC-39中和的8倍降低。使用这种B/FLA/09 G141E变体和山形世系病毒B/江苏(Jiangsu)/10/2003(B/JIN/03),在位置141含有R(G141R)的天然循环病毒,仅使用FBC-39 mAb重复了MARM分离。使用在位置235具有从G到精氨酸(R)的单个氨基酸变化的B/FLA/09 G141E病毒分离了一个MARM病毒(表11)。使用在位置150从丝氨酸(S)到异亮氨酸(I)或在位置235处从E到亮氨酸(L)的单个氨基酸取代来鉴定两个B/JIN/03逃逸突变病毒(表11)。在这些乙型流感MARM中鉴定的氨基酸取代位于HA的头部区域(王(Wang)等人(2008)病毒学杂志(J.Virol.) 82(6):3011-20),表明FBC-39、FBD-56、和FBD-94识别在乙型流感病毒的HA头部的表位,其中FBD-56和FBD-94在位置128处具有关键接触并且共享重叠表位,并且FBC-39具有在位置141、150和235带有重要接触残基的构象表位。

[0340] 表11.

		通过MARM选择鉴定的氨基酸取代			
		B/FLA/06	B/MY/04	B/FLA/06 G141E	B/JIN/03
[0341]	FBC-39	*NF	NF	G235R	S150I 或 E235L
	FBD-56	NF	E128K 或 E128V	[^] NA	NA
	FBD-94	NF	E128K	NA	NA

[0342] *NF=未发现MARM

[0343] [^]NA=未测定的

[0344] 实例6.乙型流感抗HA抗体展现出Fc效应子功能

[0345] 抗体具有通过Fc效应子功能如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用和补体依赖性杀伤清除病毒感染的细胞的潜力。为了证实抗HA抗体展现出ADCC活性;

我们用ADCC生物测定在乙型流感病毒的存在下测试了它们激活NK细胞的能力。这种测定使用人NK细胞系(NK92)以便测量Fc效应子活化,该人NK细胞系已经稳定转染了人FcγRIIIA高亲和力受体和在NFAT启动子的控制下的荧光素酶转基因。96孔板用 5.0×10^4 TCID₅₀/孔的B/香港/330/2001(维多利亚)病毒储备进行包被。将FBD-94、FBC-39连同在Fc区含有两个取代(L234A和L235A(FBD-94 LALA和FBC-39 LALA)的Fc效应子无效变体(赫扎雷(Hezareh)等人(2001)病毒学杂志(J.Virol.) 75(24):12161)的系列稀释应用于病毒,然后NK细胞以 5.0×10^4 个细胞/孔添加,并在37℃下孵育4小时。荧光素酶通过添加Steady-Glo试剂(普洛麦格公司(Promega))来进行检测并且通过envision平板读数仪进行测量。图1示出FBD-94和FBC-39两者展现出剂量依赖性乙型流感ADCC活性,然而LALA变体在相同浓度下示出没有活性。

[0346] 实例7. 在流感感染的致死鼠模型中抗乙型流感IgG的体内预防和治疗效果

[0347] 在致死乙型流感鼠模型中评估了乙型流感中和单克隆抗体的保护性功效。

[0348] 预防活性(图2A-D):为了测试预防功效,以在100μl体积中的3、1、0.3或0.1mg/kg的剂量,通过单次腹膜内(IP)注射向六至八周龄的BALB/c(哈伦实验室(Harlan Laboratories))小鼠给予FBC-39或FBD-94抗体,每组8只。对于每个研究,一组对照动物用100μl体积中的3mg/kg的人同种型非相关对照IgG进行IP处理。给药后四小时,将小鼠鼻内接种在50μl体积中的15倍50%小鼠致死剂量(15MLD₅₀)的B/四川/379/99(山形)(B/Sic/99)或10MLD₅₀的B/香港/330/2001(维多利亚)(B/HK/01)。小鼠在病毒激发当天称重,并且每天监测体重损失和存活,持续14天(具有体重损失≥25%的小鼠被安乐死)。FBC-39和FBD-94 mAb两者以剂量依赖性方式赋予保护。0.3mg/kg或更大的FBC-39和FBD-94对用B/Sic/99(图2A和B)和B/HK/01(图2C和D)激发的动物提供90%-100%的保护。在0.1mg/kg的较低剂量下的FBC-39和FBD-94也对B/HK/01具有高度保护性,分别具有90%和80%存活率。如所预期,接受3或30mg/kg的同种型对照mAb的小鼠分别在B/Sic/99或B/HK/01的激发下存活。

[0349] 治疗活性(图3A-D和图4A和B):为了评估抗体的治疗功效,用10MLD₅₀的B/Sic/99(山形)或5MLD₅₀的B/HK/01(维多利亚)接种小鼠,并且在感染后2天内注射10、3、1、或0.3mg/kg的FBC-39或FBD-94(pi)。当以1mg/kg或更大给予时,FBC-39和FBD-94提供了对用B/Sic/99激发的动物的完全保护(图3A和B)。对于B/HK/01感染,FBC-39和FBD-94在0.3mg/kg和更大的剂量下提供完全保护(图3C和D)。如所期望,在10或30mg/kg下给予的同种型对照mAb不能保护小鼠,其中对于B/Sic/99和B/HK/01感染存活率分别为10%或20%。

[0350] 为了测试乙型流感抗体随时间的保护能力,小鼠用5MLD₅₀的B/HK/01进行接种,并且在感染后(pi)1、2、3或4天开始用3mg/kg的FBC-39或FBD-94进行IP注射。当在感染后(pi)第1天给予时FBC-39保护100%的小鼠,并且在感染后第2天和第3天分别为80%和70%(图4A)。当在感染后(pi)第1天和第2天给予时FBD-94保护100%的小鼠,并且在感染后第3天和第4天分别为80%和60%(图4B)。如所预期,用相同剂量的非相关同种型对照抗体处理的小鼠不能保护小鼠,存活率为10%。

[0351] 实例8. 血凝抑制活性

[0352] 为了确定本发明的抗体的乙型流感抗体功能的可能作用机制,使用不同组的乙型流感病毒株进行血凝抑制(HAI)测定。通过测量病毒介导的红细胞凝集的抑制,HAI测定检

测阻断细胞表面表达的唾液酸的病毒受体结合的抗体。将乙型流感病毒(如下面表12描述的缩写)调节至4HA单位,在抗体不存在下通过与0.05%土耳其红血细胞(Lampire生物实验室)一起孵育来确定。在96孔U型底板中,将FBD-94和FBC-39 IgG以两倍增量连续稀释,并且将稀释的病毒添加至这些孔中。在孵育30至60分钟后,添加50 μ l的0.05%土耳其红血细胞。将板孵育另外的30至60分钟,并观察凝集。HAI滴度被确定为完全抑制凝集的抗体最小有效浓度(nM)。表12示出FBD-94和FBC-39具有针对所有测试的乙型流感株的HAI活性,提供结合乙型流感HA的球状头部的证据。使用HAI测定,本发明的其他抗体示出相似的活性。

[0353] 表12.

[0354] 血凝抑制滴定度(nM)

[0355]	病毒株	FBD-94	FBC-39
	B/Lee/40 (un)	1	5
	B/AA/66 (un)	10	6
	B/HK/72 (Un)	3	8
[0356]	B/BJ/97 (Vic)	10	14
	B/HK/01 (Vic)	10	16
	B/Mal/04 (Vic)	10	20
	B/OH/05 (Vic)	10	24
	B/Bne/08 (Vic)	4	20
	B/Yam/88 (Yam)	250	11
	B/AA/94 (Yam)	5	6
	B/Geo/98 (Yam)	8	16
	B/Ysh/98 (Yam)	10	13
	B/Joh/99 (Yam)	10	18
	B/Sic/99 (Yam)	5	10
	B/Vic/2000 (Yam)	8	16
	B/Shg/02 (Yam)	0	16
	B/Fla/4/06 (Yam)	5	7

[0357] B/Lee/40 (B/Lee/40); B/AA/66 (ca B/安阿伯/1/66); B/HK/72 (B/香港/5/72); B/BJ/97 (ca B/北京/243/97 (维多利亚)); B/HK/01 (B/香港/330/2001 (维多利亚)); B/Mal/04 (B/马来西亚/2506/2004 (维多利亚)); B/OH/05 (B/俄亥俄州/1/2005 (维多利亚)); B/BNE/08 (ca B/布里斯班/60/2008 (维多利亚)); B/Yam/88 (B/山形/16/88 (山形)); B/AA/94 (ca B/安阿伯/2/94 (山形)); B/geo/98 (ca B/乔治亚州/02/98 (山形)); B/Ysh/98 (ca B/山梨/166/98 (山形)); B/Joh/99 (ca B/约翰尼斯堡/5/99 (山形)); B/Sic/99 (B/四川/379/99 (山形)); B/Vic/00 (ca B/维多利亚/504/2000 (山形)); B/Shg/02 (B/上海/361/02 (山形)); 和 B/FL/06 (B/佛罗里达/4/06 (山形))。

[0358] 在本说明书中提到的所有公开、专利和专利申请均通过引用结合在此并入在本说

说明书中,引用程度如同每个单独公开、专利或专利申请特定地并且单独地指示通过引用结合在此一般。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 米迪缪尼有限公司
[0003]	<120> 中和抗乙型流感抗体及其用途
[0004]	<130> FLUB-100W01
[0005]	<140> PCT/US2015/040385
[0006]	<141> 2015-07-14
[0007]	<150> 62/024,804
[0008]	<151> 2014-07-15
[0009]	<160> 154
[0010]	<170> PatentIn版本3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 391
[0013]	<212> DNA
[0014]	<213> 人工序列
[0015]	<220>
[0016]	<223> 人工序列的说明:合成
[0017]	多核苷酸
[0018]	<400> 1
[0019]	gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggacac ttggtgcagc ctggcaggtc cctgagactc 60
[0020]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttgag gattatgcca tgaattgggt ccggcaagct 120
[0021]	ccagggaagg gcctggagtg ggtctcagtc attagttggg acagtggtag gataggctat 180
[0022]	gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctctctgtat 240
[0023]	ctgcaaatac acagtctgag acctgaggac actgccttgt attatttgtt aagagatatg 300
[0024]	ttggcttatt attctgacaa tagtggcaaa aaatacaacg tctacggtat ggacgtcttg 360
[0025]	ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca g 391
[0026]	<210> 2
[0027]	<211> 130
[0028]	<212> PRT
[0029]	<213> 人工序列
[0030]	<220>
[0031]	<223> 人工序列的说明:合成
[0032]	多肽
[0033]	<400> 2
[0034]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly His Leu Val Gln Pro Gly Arg
[0035]	1 5 10 15
[0036]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
[0037]	20 25 30
[0038]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0039]	35	40	45
[0040]	Ser Val Ile Ser Trp Asp Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
[0041]	50	55	60
[0042]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Ser Tyr		
[0043]	65	70	75
[0044]	80		
[0044]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[0045]	85	90	95
[0046]	Val Arg Asp Met Leu Ala Tyr Tyr Ser Asp Asn Ser Gly Lys Lys Tyr		
[0047]	100	105	110
[0048]	Asn Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val		
[0049]	115	120	125
[0050]	Ser Ser		
[0051]	130		
[0052]	<210> 3		
[0053]	<211> 5		
[0054]	<212> PRT		
[0055]	<213> 人工序列		
[0056]	<220>		
[0057]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0058]	肽		
[0059]	<400> 3		
[0060]	Asp Tyr Ala Met Asn		
[0061]	1	5	
[0062]	<210> 4		
[0063]	<211> 17		
[0064]	<212> PRT		
[0065]	<213> 人工序列		
[0066]	<220>		
[0067]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0068]	肽		
[0069]	<400> 4		
[0070]	Val Ile Ser Trp Asp Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0071]	1	5	10
[0072]	15		
[0072]	Gly		
[0073]	<210> 5		
[0074]	<211> 21		
[0075]	<212> PRT		
[0076]	<213> 人工序列		
[0077]	<220>		

[0078]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0079]		肽	
[0080]	<400>	5	
[0081]	Asp Met Leu Ala Tyr Tyr Ser Asp Asn Ser Gly Lys Lys Tyr Asn Val		
[0082]	1	5	10 15
[0083]	Tyr Gly Met Asp Val		
[0084]		20	
[0085]	<210>	6	
[0086]	<211>	322	
[0087]	<212>	DNA	
[0088]	<213>	人工序列	
[0089]	<220>		
[0090]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0091]		多核苷酸	
[0092]	<400>	6	
[0093]	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60	
[0094]	ctctcctgca gggccagtca gagtgtttcc accttcttag cctggtacca acagaaacct	120	
[0095]	ggccaggctc ccaggctcct catgtatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180	
[0096]	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagaacct	240	
[0097]	gaagattttg caatttacta ctgtcagcag cgtagccact ggcctcctat cttcggccaa	300	
[0098]	gggacacgac tggagattaa ac	322	
[0099]	<210>	7	
[0100]	<211>	107	
[0101]	<212>	PRT	
[0102]	<213>	人工序列	
[0103]	<220>		
[0104]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0105]		多肽	
[0106]	<400>	7	
[0107]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0108]	1	5	10 15
[0109]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Phe		
[0110]		20	25 30
[0111]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Met		
[0112]		35	40 45
[0113]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0114]		50	55 60
[0115]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0116]	65	70	75 80

[0117]	Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
[0118]	85 90 95
[0119]	Ile Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0120]	100 105
[0121]	<210> 8
[0122]	<211> 10
[0123]	<212> PRT
[0124]	<213> 人工序列
[0125]	<220>
[0126]	<223> 人工序列的说明:合成
[0127]	肽
[0128]	<400> 8
[0129]	Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Phe Leu Ala
[0130]	1 5 10
[0131]	<210> 9
[0132]	<211> 7
[0133]	<212> PRT
[0134]	<213> 人工序列
[0135]	<220>
[0136]	<223> 人工序列的说明:合成
[0137]	肽
[0138]	<400> 9
[0139]	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
[0140]	1 5
[0141]	<210> 10
[0142]	<211> 9
[0143]	<212> PRT
[0144]	<213> 人工序列
[0145]	<220>
[0146]	<223> 人工序列的说明:合成
[0147]	肽
[0148]	<400> 10
[0149]	Gln Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile
[0150]	1 5
[0151]	<210> 11
[0152]	<211> 391
[0153]	<212> DNA
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

- [0156] <223> 人工序列的说明:合成
 [0157] 多核苷酸
 [0158] <400> 11
 [0159] gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcaac ctggcaggtc cctgagactc 60
 [0160] tcctgtgcag tttctggatt catctttgaa gattatgcca taaactgggt ccggcaagct 120
 [0161] ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaatt attagtggg acagtggtag gataggctac 180
 [0162] gcggactctg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctcgttt 240
 [0163] ctgcaaata acagtctgag acccgaagac acggccgtgt attattgtgt aaaagatatg 300
 [0164] ttggcgtatt attatgatgg tagcggcatc aggtacaacc tctacggat ggacgtctgg 360
 [0165] ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca g 391
 [0166] <210> 12
 [0167] <211> 130
 [0168] <212> PRT
 [0169] <213> 人工序列
 [0170] <220>
 [0171] <223> 人工序列的说明:合成
 [0172] 多肽
 [0173] <400> 12
 [0174] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0175] 1 5 10 15
 [0176] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ile Phe Glu Asp Tyr
 [0177] 20 25 30
 [0178] Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0179] 35 40 45
 [0180] Ser Ile Ile Ser Trp Asp Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [0181] 50 55 60
 [0182] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Ser Phe
 [0183] 65 70 75 80
 [0184] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0185] 85 90 95
 [0186] Val Lys Asp Met Leu Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Arg Tyr
 [0187] 100 105 110
 [0188] Asn Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0189] 115 120 125
 [0190] Ser Ser
 [0191] 130
 [0192] <210> 13
 [0193] <211> 5
 [0194] <212> PRT

[0195] <213> 人工序列
 [0196] <220>
 [0197] <223> 人工序列的说明:合成
 [0198] 肽
 [0199] <400> 13
 [0200] Asp Tyr Ala Ile Asn
 [0201] 1 5
 [0202] <210> 14
 [0203] <211> 17
 [0204] <212> PRT
 [0205] <213> 人工序列
 [0206] <220>
 [0207] <223> 人工序列的说明:合成
 [0208] 肽
 [0209] <400> 14
 [0210] Ile Ile Ser Trp Asp Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 [0211] 1 5 10 15
 [0212] Gly
 [0213] <210> 15
 [0214] <211> 21
 [0215] <212> PRT
 [0216] <213> 人工序列
 [0217] <220>
 [0218] <223> 人工序列的说明:合成
 [0219] 肽
 [0220] <400> 15
 [0221] Asp Met Leu Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Asn Leu
 [0222] 1 5 10 15
 [0223] Tyr Gly Met Asp Val
 [0224] 20
 [0225] <210> 16
 [0226] <211> 322
 [0227] <212> DNA
 [0228] <213> 人工序列
 [0229] <220>
 [0230] <223> 人工序列的说明:合成
 [0231] 多核苷酸
 [0232] <400> 16
 [0233] gaaattgtgt tgacacagtc tccagccact ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

[0234] ctctcctgca gggccagtcg gagtattacc accttcttag cctggtacca acaaaaacct 120
 [0235] ggccaggctc ccaggctcct catctacgat gcatccaaca gggccactgg cgtcccagcc 180
 [0236] aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcaacag cctagagcct 240
 [0237] gacgattttg caatttatta ctgtcagcag cgtgaccact ggcctccgat cttcggccaa 300
 [0238] gggacacgac tggagattaa ac 322
 [0239] <210> 17
 [0240] <211> 107
 [0241] <212> PRT
 [0242] <213> 人工序列
 [0243] <220>
 [0244] <223> 人工序列的说明:合成
 [0245] 多肽
 [0246] <400> 17
 [0247] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0248] 1 5 10 15
 [0249] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Ile Thr Thr Phe
 [0250] 20 25 30
 [0251] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [0252] 35 40 45
 [0253] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 [0254] 50 55 60
 [0255] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Pro
 [0256] 65 70 75 80
 [0257] Asp Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp His Trp Pro Pro
 [0258] 85 90 95
 [0259] Ile Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 [0260] 100 105
 [0261] <210> 18
 [0262] <211> 11
 [0263] <212> PRT
 [0264] <213> 人工序列
 [0265] <220>
 [0266] <223> 人工序列的说明:合成
 [0267] 肽
 [0268] <400> 18
 [0269] Arg Ala Ser Arg Ser Ile Thr Thr Phe Leu Ala
 [0270] 1 5 10
 [0271] <210> 19
 [0272] <211> 7

[0273]	<212> PRT	
[0274]	<213> 人工序列	
[0275]	<220>	
[0276]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0277]	肽	
[0278]	<400> 19	
[0279]	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr	
[0280]	1 5	
[0281]	<210> 20	
[0282]	<211> 9	
[0283]	<212> PRT	
[0284]	<213> 人工序列	
[0285]	<220>	
[0286]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0287]	肽	
[0288]	<400> 20	
[0289]	Gln Gln Arg Asp His Trp Pro Pro Ile	
[0290]	1 5	
[0291]	<210> 21	
[0292]	<211> 403	
[0293]	<212> DNA	
[0294]	<213> 人工序列	
[0295]	<220>	
[0296]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0297]	多核苷酸	
[0298]	<400> 21	
[0299]	gaggtgcagc tgggtggtgtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[0300]	tcctgtgcag cctctggact cagtttcctt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[0301]	ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[0302]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc agcatctcaa gagacgattc aaagaacatg	240
[0303]	ctgtttctgc atatgagcag cctgagaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcgccaca	300
[0304]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[0305]	atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cag	403
[0306]	<210> 22	
[0307]	<211> 134	
[0308]	<212> PRT	
[0309]	<213> 人工序列	
[0310]	<220>	
[0311]	<223> 人工序列的说明:合成	

[0312]	多肽
[0313]	<400> 22
[0314]	Glu Val Gln Leu Val Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0315]	1 5 10 15
[0316]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ser Phe Leu Asn Ala
[0317]	20 25 30
[0318]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0319]	35 40 45
[0320]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
[0321]	50 55 60
[0322]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met
[0323]	65 70 75 80
[0324]	Leu Phe Leu His Met Ser Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0325]	85 90 95
[0326]	Tyr Cys Ala Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr
[0327]	100 105 110
[0328]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0329]	115 120 125
[0330]	Thr Val Thr Val Ser Ser
[0331]	130
[0332]	<210> 23
[0333]	<211> 5
[0334]	<212> PRT
[0335]	<213> 人工序列
[0336]	<220>
[0337]	<223> 人工序列的说明:合成
[0338]	肽
[0339]	<400> 23
[0340]	Asn Ala Trp Met Ser
[0341]	1 5
[0342]	<210> 24
[0343]	<211> 19
[0344]	<212> PRT
[0345]	<213> 人工序列
[0346]	<220>
[0347]	<223> 人工序列的说明:合成
[0348]	肽
[0349]	<400> 24
[0350]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro

[0351]	1	5	10	15
[0352]	Val Lys Gly			
[0353]	<210> 25			
[0354]	<211> 23			
[0355]	<212> PRT			
[0356]	<213> 人工序列			
[0357]	<220>			
[0358]	<223> 人工序列的说明:合成			
[0359]	肽			
[0360]	<400> 25			
[0361]	Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr			
[0362]	1	5	10	15
[0363]	Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val			
[0364]	20			
[0365]	<210> 26			
[0366]	<211> 322			
[0367]	<212> DNA			
[0368]	<213> 人工序列			
[0369]	<220>			
[0370]	<223> 人工序列的说明:合成			
[0371]	多核苷酸			
[0372]	<400> 26			
[0373]	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60			
[0374]	atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctggttag cctgggtatca gcagaaacca 120			
[0375]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180			
[0376]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240			
[0377]	gaagattttg caacttactt ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag 300			
[0378]	gggaccaagc tggagatcaa ac 322			
[0379]	<210> 27			
[0380]	<211> 107			
[0381]	<212> PRT			
[0382]	<213> 人工序列			
[0383]	<220>			
[0384]	<223> 人工序列的说明:合成			
[0385]	多肽			
[0386]	<400> 27			
[0387]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly			
[0388]	1	5	10	15
[0389]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp			

[0390]	20	25	30
[0391]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0392]	35	40	45
[0393]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0394]	50	55	60
[0395]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0396]	65	70	75
[0397]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro		
[0398]	85	90	95
[0399]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0400]	100	105	
[0401]	<210> 28		
[0402]	<211> 11		
[0403]	<212> PRT		
[0404]	<213> 人工序列		
[0405]	<220>		
[0406]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0407]	肽		
[0408]	<400> 28		
[0409]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala		
[0410]	1	5	10
[0411]	<210> 29		
[0412]	<211> 7		
[0413]	<212> PRT		
[0414]	<213> 人工序列		
[0415]	<220>		
[0416]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0417]	肽		
[0418]	<400> 29		
[0419]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser		
[0420]	1	5	
[0421]	<210> 30		
[0422]	<211> 9		
[0423]	<212> PRT		
[0424]	<213> 人工序列		
[0425]	<220>		
[0426]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0427]	肽		
[0428]	<400> 30		

[0429]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[0430]	1	5
[0431]	<210>	31
[0432]	<211>	402
[0433]	<212>	DNA
[0434]	<213>	人工序列
[0435]	<220>	
[0436]	<223>	人工序列的说明:合成
[0437]	多核苷酸	
[0438]	<400>	31
[0439]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[0440]	tcctgtgcag cctctggact ctcttttcctt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[0441]	ccaggggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[0442]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240
[0443]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300
[0444]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[0445]	atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[0446]	<210>	32
[0447]	<211>	134
[0448]	<212>	PRT
[0449]	<213>	人工序列
[0450]	<220>	
[0451]	<223>	人工序列的说明:合成
[0452]	多肽	
[0453]	<400>	32
[0454]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0455]	1	5 10 15
[0456]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ser Phe Leu Asn Ala	
[0457]	20	25 30
[0458]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0459]	35	40 45
[0460]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	
[0461]	50	55 60
[0462]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
[0463]	65	70 75 80
[0464]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[0465]	85	90 95
[0466]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr	
[0467]	100	105 110

[0468]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0469]	115 120 125
[0470]	Thr Val Thr Val Ser Ser
[0471]	130
[0472]	<210> 33
[0473]	<211> 5
[0474]	<212> PRT
[0475]	<213> 人工序列
[0476]	<220>
[0477]	<223> 人工序列的说明:合成
[0478]	肽
[0479]	<400> 33
[0480]	Asn Ala Trp Met Ser
[0481]	1 5
[0482]	<210> 34
[0483]	<211> 19
[0484]	<212> PRT
[0485]	<213> 人工序列
[0486]	<220>
[0487]	<223> 人工序列的说明:合成
[0488]	肽
[0489]	<400> 34
[0490]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
[0491]	1 5 10 15
[0492]	Val Lys Gly
[0493]	<210> 35
[0494]	<211> 23
[0495]	<212> PRT
[0496]	<213> 人工序列
[0497]	<220>
[0498]	<223> 人工序列的说明:合成
[0499]	肽
[0500]	<400> 35
[0501]	Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr
[0502]	1 5 10 15
[0503]	Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[0504]	20
[0505]	<210> 36
[0506]	<211> 322

[0507]	<212> DNA	
[0508]	<213> 人工序列	
[0509]	<220>	
[0510]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0511]	多核苷酸	
[0512]	<400> 36	
[0513]	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[0514]	atcacttgtc gggcgagtc ggaattagc acctggtag cctggtagtca gcagaaacca	120
[0515]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
[0516]	agattcagcg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[0517]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300
[0518]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322
[0519]	<210> 37	
[0520]	<211> 107	
[0521]	<212> PRT	
[0522]	<213> 人工序列	
[0523]	<220>	
[0524]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0525]	多肽	
[0526]	<400> 37	
[0527]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
[0528]	1 5 10 15	
[0529]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[0530]	20 25 30	
[0531]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0532]	35 40 45	
[0533]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0534]	50 55 60	
[0535]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0536]	65 70 75 80	
[0537]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro	
[0538]	85 90 95	
[0539]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0540]	100 105	
[0541]	<210> 38	
[0542]	<211> 11	
[0543]	<212> PRT	
[0544]	<213> 人工序列	
[0545]	<220>	

[0546]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0547]		肽	
[0548]	<400>	38	
[0549]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala		
[0550]	1	5	10
[0551]	<210>	39	
[0552]	<211>	7	
[0553]	<212>	PRT	
[0554]	<213>	人工序列	
[0555]	<220>		
[0556]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0557]		肽	
[0558]	<400>	39	
[0559]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser		
[0560]	1	5	
[0561]	<210>	40	
[0562]	<211>	9	
[0563]	<212>	PRT	
[0564]	<213>	人工序列	
[0565]	<220>		
[0566]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0567]		肽	
[0568]	<400>	40	
[0569]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr		
[0570]	1	5	
[0571]	<210>	41	
[0572]	<211>	402	
[0573]	<212>	DNA	
[0574]	<213>	人工序列	
[0575]	<220>		
[0576]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0577]		多核苷酸	
[0578]	<400>	41	
[0579]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60	
[0580]	tcctgtgcag cctctggatt ctcttttcctt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120	
[0581]	ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180	
[0582]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240	
[0583]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300	
[0584]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360	

[0585]	atggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[0586]	<210> 42	
[0587]	<211> 134	
[0588]	<212> PRT	
[0589]	<213> 人工序列	
[0590]	<220>	
[0591]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0592]	多肽	
[0593]	<400> 42	
[0594]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0595]	1 5 10 15	
[0596]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Leu Asn Ala	
[0597]	20 25 30	
[0598]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0599]	35 40 45	
[0600]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	
[0601]	50 55 60	
[0602]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
[0603]	65 70 75 80	
[0604]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[0605]	85 90 95	
[0606]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr	
[0607]	100 105 110	
[0608]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr	
[0609]	115 120 125	
[0610]	Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0611]	130	
[0612]	<210> 43	
[0613]	<211> 5	
[0614]	<212> PRT	
[0615]	<213> 人工序列	
[0616]	<220>	
[0617]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0618]	肽	
[0619]	<400> 43	
[0620]	Asn Ala Trp Met Ser	
[0621]	1 5	
[0622]	<210> 44	
[0623]	<211> 19	

[0624]	<212> PRT	
[0625]	<213> 人工序列	
[0626]	<220>	
[0627]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0628]	肽	
[0629]	<400> 44	
[0630]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro	
[0631]	1 5 10 15	
[0632]	Val Lys Gly	
[0633]	<210> 45	
[0634]	<211> 23	
[0635]	<212> PRT	
[0636]	<213> 人工序列	
[0637]	<220>	
[0638]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0639]	肽	
[0640]	<400> 45	
[0641]	Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr	
[0642]	1 5 10 15	
[0643]	Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val	
[0644]	20	
[0645]	<210> 46	
[0646]	<211> 322	
[0647]	<212> DNA	
[0648]	<213> 人工序列	
[0649]	<220>	
[0650]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0651]	多核苷酸	
[0652]	<400> 46	
[0653]	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[0654]	atcacttggtc gggcgagtca ggatattagc acctgggttag cctggtatca gcagaaacca	120
[0655]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
[0656]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[0657]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300
[0658]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322
[0659]	<210> 47	
[0660]	<211> 107	
[0661]	<212> PRT	
[0662]	<213> 人工序列	

[0663] <220>
 [0664] <223> 人工序列的说明:合成
 [0665] 多肽
 [0666] <400> 47
 [0667] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 [0668] 1 5 10 15
 [0669] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp
 [0670] 20 25 30
 [0671] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0672] 35 40 45
 [0673] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0674] 50 55 60
 [0675] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0676] 65 70 75 80
 [0677] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
 [0678] 85 90 95
 [0679] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0680] 100 105
 [0681] <210> 48
 [0682] <211> 11
 [0683] <212> PRT
 [0684] <213> 人工序列
 [0685] <220>
 [0686] <223> 人工序列的说明:合成
 [0687] 肽
 [0688] <400> 48
 [0689] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala
 [0690] 1 5 10
 [0691] <210> 49
 [0692] <211> 7
 [0693] <212> PRT
 [0694] <213> 人工序列
 [0695] <220>
 [0696] <223> 人工序列的说明:合成
 [0697] 肽
 [0698] <400> 49
 [0699] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 [0700] 1 5
 [0701] <210> 50

[0702]	<211> 9	
[0703]	<212> PRT	
[0704]	<213> 人工序列	
[0705]	<220>	
[0706]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0707]	肽	
[0708]	<400> 50	
[0709]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[0710]	1 5	
[0711]	<210> 51	
[0712]	<211> 402	
[0713]	<212> DNA	
[0714]	<213> 人工序列	
[0715]	<220>	
[0716]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0717]	多核苷酸	
[0718]	<400> 51	
[0719]	gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[0720]	tcctgtgcag cctctggact cactttcctt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[0721]	ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[0722]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240
[0723]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300
[0724]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[0725]	atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[0726]	<210> 52	
[0727]	<211> 134	
[0728]	<212> PRT	
[0729]	<213> 人工序列	
[0730]	<220>	
[0731]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0732]	多肽	
[0733]	<400> 52	
[0734]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0735]	1 5 10 15	
[0736]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Leu Asn Ala	
[0737]	20 25 30	
[0738]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0739]	35 40 45	
[0740]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	

[0741]	50	55	60
[0742]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
[0743]	65	70	75
[0744]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[0745]	85	90	95
[0746]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr		
[0747]	100	105	110
[0748]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
[0749]	115	120	125
[0750]	Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0751]	130		
[0752]	<210> 53		
[0753]	<211> 5		
[0754]	<212> PRT		
[0755]	<213> 人工序列		
[0756]	<220>		
[0757]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0758]	肽		
[0759]	<400> 53		
[0760]	Asn Ala Trp Met Ser		
[0761]	1	5	
[0762]	<210> 54		
[0763]	<211> 19		
[0764]	<212> PRT		
[0765]	<213> 人工序列		
[0766]	<220>		
[0767]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0768]	肽		
[0769]	<400> 54		
[0770]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro		
[0771]	1	5	10
[0772]	Val Lys Gly		15
[0773]	<210> 55		
[0774]	<211> 23		
[0775]	<212> PRT		
[0776]	<213> 人工序列		
[0777]	<220>		
[0778]	<223> 人工序列的说明:合成		
[0779]	肽		

[0780]	<400>	55	
[0781]	Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr		
[0782]	1	5	10 15
[0783]	Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val		
[0784]		20	
[0785]	<210>	56	
[0786]	<211>	322	
[0787]	<212>	DNA	
[0788]	<213>	人工序列	
[0789]	<220>		
[0790]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0791]		多核苷酸	
[0792]	<400>	56	
[0793]	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60	
[0794]	atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctggtttag cctggtatca gcagaaacca	120	
[0795]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180	
[0796]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240	
[0797]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300	
[0798]	gggaccaagc tggagatcaa ac		322
[0799]	<210>	57	
[0800]	<211>	107	
[0801]	<212>	PRT	
[0802]	<213>	人工序列	
[0803]	<220>		
[0804]	<223>	人工序列的说明:合成	
[0805]		多肽	
[0806]	<400>	57	
[0807]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly		
[0808]	1	5	10 15
[0809]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp		
[0810]		20	25 30
[0811]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0812]		35	40 45
[0813]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0814]		50	55 60
[0815]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0816]	65	70	75 80
[0817]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro		
[0818]		85	90 95

[0819]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0820]	100 105
[0821]	<210> 58
[0822]	<211> 11
[0823]	<212> PRT
[0824]	<213> 人工序列
[0825]	<220>
[0826]	<223> 人工序列的说明:合成
[0827]	肽
[0828]	<400> 58
[0829]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala
[0830]	1 5 10
[0831]	<210> 59
[0832]	<211> 7
[0833]	<212> PRT
[0834]	<213> 人工序列
[0835]	<220>
[0836]	<223> 人工序列的说明:合成
[0837]	肽
[0838]	<400> 59
[0839]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0840]	1 5
[0841]	<210> 60
[0842]	<211> 9
[0843]	<212> PRT
[0844]	<213> 人工序列
[0845]	<220>
[0846]	<223> 人工序列的说明:合成
[0847]	肽
[0848]	<400> 60
[0849]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[0850]	1 5
[0851]	<210> 61
[0852]	<211> 402
[0853]	<212> DNA
[0854]	<213> 人工序列
[0855]	<220>
[0856]	<223> 人工序列的说明:合成
[0857]	多核苷酸

[0858]	<400> 61	
[0859]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[0860]	tcctgtgcag cctctggatt cactttcctt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[0861]	ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[0862]	gactacgccg caccctgaa aggacagatt accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240
[0863]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300
[0864]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[0865]	atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[0866]	<210> 62	
[0867]	<211> 134	
[0868]	<212> PRT	
[0869]	<213> 人工序列	
[0870]	<220>	
[0871]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0872]	多肽	
[0873]	<400> 62	
[0874]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0875]	1 5 10 15	
[0876]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Asn Ala	
[0877]	20 25 30	
[0878]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0879]	35 40 45	
[0880]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	
[0881]	50 55 60	
[0882]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
[0883]	65 70 75 80	
[0884]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[0885]	85 90 95	
[0886]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr	
[0887]	100 105 110	
[0888]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr	
[0889]	115 120 125	
[0890]	Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0891]	130	
[0892]	<210> 63	
[0893]	<211> 5	
[0894]	<212> PRT	
[0895]	<213> 人工序列	
[0896]	<220>	

[0897] <223> 人工序列的说明:合成
 [0898] 肽
 [0899] <400> 63
 [0900] Asn Ala Trp Met Ser
 [0901] 1 5
 [0902] <210> 64
 [0903] <211> 19
 [0904] <212> PRT
 [0905] <213> 人工序列
 [0906] <220>
 [0907] <223> 人工序列的说明:合成
 [0908] 肽
 [0909] <400> 64
 [0910] Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 [0911] 1 5 10 15
 [0912] Val Lys Gly
 [0913] <210> 65
 [0914] <211> 23
 [0915] <212> PRT
 [0916] <213> 人工序列
 [0917] <220>
 [0918] <223> 人工序列的说明:合成
 [0919] 肽
 [0920] <400> 65
 [0921] Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr
 [0922] 1 5 10 15
 [0923] Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
 [0924] 20
 [0925] <210> 66
 [0926] <211> 322
 [0927] <212> DNA
 [0928] <213> 人工序列
 [0929] <220>
 [0930] <223> 人工序列的说明:合成
 [0931] 多核苷酸
 [0932] <400> 66
 [0933] gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 [0934] atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctggtttag cctggtatca gcagaaacca 120
 [0935] gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

[0936]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[0937]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300
[0938]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322
[0939]	<210> 67	
[0940]	<211> 107	
[0941]	<212> PRT	
[0942]	<213> 人工序列	
[0943]	<220>	
[0944]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0945]	多肽	
[0946]	<400> 67	
[0947]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
[0948]	1 5 10 15	
[0949]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[0950]	20 25 30	
[0951]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0952]	35 40 45	
[0953]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0954]	50 55 60	
[0955]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0956]	65 70 75 80	
[0957]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro	
[0958]	85 90 95	
[0959]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0960]	100 105	
[0961]	<210> 68	
[0962]	<211> 11	
[0963]	<212> PRT	
[0964]	<213> 人工序列	
[0965]	<220>	
[0966]	<223> 人工序列的说明:合成	
[0967]	肽	
[0968]	<400> 68	
[0969]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala	
[0970]	1 5 10	
[0971]	<210> 69	
[0972]	<211> 7	
[0973]	<212> PRT	
[0974]	<213> 人工序列	

[0975] <220>
[0976] <223> 人工序列的说明:合成
[0977] 肽
[0978] <400> 69
[0979] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0980] 1 5
[0981] <210> 70
[0982] <211> 9
[0983] <212> PRT
[0984] <213> 人工序列
[0985] <220>
[0986] <223> 人工序列的说明:合成
[0987] 肽
[0988] <400> 70
[0989] Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[0990] 1 5
[0991] <210> 71
[0992] <211> 134
[0993] <212> PRT
[0994] <213> 人工序列
[0995] <220>
[0996] <223> 人工序列的说明:合成
[0997] 多肽
[0998] <220>
[0999] <221> MOD_RES
[1000] <222> (6) .. (6)
[1001] <223> Val或者Glu
[1002] <220>
[1003] <221> MOD_RES
[1004] <222> (27) .. (27)
[1005] <223> Leu或者Phe
[1006] <220>
[1007] <221> MOD_RES
[1008] <222> (28) .. (28)
[1009] <223> Thr或者Ser
[1010] <220>
[1011] <221> MOD_RES
[1012] <222> (30) .. (30)
[1013] <223> Ser或者Leu

[1014]	<220>
[1015]	<221> MOD_RES
[1016]	<222> (71) .. (71)
[1017]	<223> Thr或者Ser
[1018]	<220>
[1019]	<221> MOD_RES
[1020]	<222> (80) .. (80)
[1021]	<223> Thr或者Met
[1022]	<220>
[1023]	<221> MOD_RES
[1024]	<222> (82) .. (82)
[1025]	<223> Tyr或者Phe
[1026]	<220>
[1027]	<221> MOD_RES
[1028]	<222> (84) .. (84)
[1029]	<223> Gln或者His
[1030]	<220>
[1031]	<221> MOD_RES
[1032]	<222> (86) .. (86)
[1033]	<223> Asn或者Ser
[1034]	<220>
[1035]	<221> MOD_RES
[1036]	<222> (89) .. (89)
[1037]	<223> Lys或者Arg
[1038]	<220>
[1039]	<221> MOD_RES
[1040]	<222> (99) .. (99)
[1041]	<223> Thr或者Ala
[1042]	<400> 71
[1043]	Glu Val Gln Leu Val Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[1044]	1 5 10 15
[1045]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Xaa Asn Ala
[1046]	20 25 30
[1047]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1048]	35 40 45
[1049]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
[1050]	50 55 60
[1051]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Xaa Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Xaa
[1052]	65 70 75 80

[1053]	Leu Xaa Leu Xaa Met Xaa Ser Leu Xaa Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1054]	85 90 95
[1055]	Tyr Cys Xaa Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr
[1056]	100 105 110
[1057]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[1058]	115 120 125
[1059]	Thr Val Thr Val Ser Ser
[1060]	130
[1061]	<210> 72
[1062]	<211> 107
[1063]	<212> PRT
[1064]	<213> 人工序列
[1065]	<220>
[1066]	<223> 人工序列的说明:合成
[1067]	多肽
[1068]	<220>
[1069]	<221> MOD_RES
[1070]	<222> (87) .. (87)
[1071]	<223> Phe或者Tyr
[1072]	<400> 72
[1073]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
[1074]	1 5 10 15
[1075]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1076]	20 25 30
[1077]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1078]	35 40 45
[1079]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1080]	50 55 60
[1081]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1082]	65 70 75 80
[1083]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
[1084]	85 90 95
[1085]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1086]	100 105
[1087]	<210> 73
[1088]	<211> 402
[1089]	<212> DNA
[1090]	<213> 人工序列
[1091]	<220>

- [1092] <223> 人工序列的说明:合成
- [1093] 多核苷酸
- [1094] <400> 73
- [1095] gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
- [1096] tcctgtgcag cctctggatt ctctttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
- [1097] ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca 180
- [1098] gactacgccg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg 240
- [1099] ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca 300
- [1100] gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga 360
- [1101] atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct ca 402
- [1102] <210> 74
- [1103] <211> 134
- [1104] <212> PRT
- [1105] <213> 人工序列
- [1106] <220>
- [1107] <223> 人工序列的说明:合成
- [1108] 多肽
- [1109] <400> 74
- [1110] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
- [1111] 1 5 10 15
- [1112] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Ala
- [1113] 20 25 30
- [1114] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [1115] 35 40 45
- [1116] Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
- [1117] 50 55 60
- [1118] Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
- [1119] 65 70 75 80
- [1120] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
- [1121] 85 90 95
- [1122] Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr
- [1123] 100 105 110
- [1124] Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
- [1125] 115 120 125
- [1126] Thr Val Thr Val Ser Ser
- [1127] 130
- [1128] <210> 75
- [1129] <211> 11
- [1130] <212> PRT

[1131] <213> 人工序列
[1132] <220>
[1133] <223> 人工序列的说明:合成
[1134] 肽
[1135] <400> 75
[1136] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala
[1137] 1 5 10
[1138] <210> 76
[1139] <211> 19
[1140] <212> PRT
[1141] <213> 人工序列
[1142] <220>
[1143] <223> 人工序列的说明:合成
[1144] 肽
[1145] <400> 76
[1146] Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
[1147] 1 5 10 15
[1148] Val Lys Gly
[1149] <210> 77
[1150] <211> 23
[1151] <212> PRT
[1152] <213> 人工序列
[1153] <220>
[1154] <223> 人工序列的说明:合成
[1155] 肽
[1156] <400> 77
[1157] Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr
[1158] 1 5 10 15
[1159] Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1160] 20
[1161] <210> 78
[1162] <211> 8
[1163] <212> PRT
[1164] <213> 人工序列
[1165] <220>
[1166] <223> 人工序列的说明:合成
[1167] 肽
[1168] <400> 78
[1169] Gly Phe Ser Phe Ser Asn Ala Trp

[1170]	1	5	
[1171]	<210>	79	
[1172]	<211>	10	
[1173]	<212>	PRT	
[1174]	<213>	人工序列	
[1175]	<220>		
[1176]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1177]		肽	
[1178]	<400>	79	
[1179]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr		
[1180]	1	5	10
[1181]	<210>	80	
[1182]	<211>	25	
[1183]	<212>	PRT	
[1184]	<213>	人工序列	
[1185]	<220>		
[1186]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1187]		肽	
[1188]	<400>	80	
[1189]	Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala		
[1190]	1	5	10 15
[1191]	Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val		
[1192]		20	25
[1193]	<210>	81	
[1194]	<211>	322	
[1195]	<212>	DNA	
[1196]	<213>	人工序列	
[1197]	<220>		
[1198]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1199]		多核苷酸	
[1200]	<400>	81	
[1201]	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60	
[1202]	atcacttgctc gggcgagtc ggaattagc acctgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120	
[1203]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180	
[1204]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240	
[1205]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300	
[1206]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322	
[1207]	<210>	82	
[1208]	<211>	107	

[1209]	<212>	PRT
[1210]	<213>	人工序列
[1211]	<220>	
[1212]	<223>	人工序列的说明:合成
[1213]		多肽
[1214]	<400>	82
[1215]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
[1216]	1 5 10 15	
[1217]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[1218]	20 25 30	
[1219]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[1220]	35 40 45	
[1221]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1222]	50 55 60	
[1223]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[1224]	65 70 75 80	
[1225]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro	
[1226]	85 90 95	
[1227]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1228]	100 105	
[1229]	<210>	83
[1230]	<211>	11
[1231]	<212>	PRT
[1232]	<213>	人工序列
[1233]	<220>	
[1234]	<223>	人工序列的说明:合成
[1235]		肽
[1236]	<400>	83
[1237]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala	
[1238]	1 5 10	
[1239]	<210>	84
[1240]	<211>	7
[1241]	<212>	PRT
[1242]	<213>	人工序列
[1243]	<220>	
[1244]	<223>	人工序列的说明:合成
[1245]		肽
[1246]	<400>	84
[1247]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser	

[1248]	1	5
[1249]	<210>	85
[1250]	<211>	9
[1251]	<212>	PRT
[1252]	<213>	人工序列
[1253]	<220>	
[1254]	<223>	人工序列的说明:合成
[1255]		肽
[1256]	<400>	85
[1257]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[1258]	1	5
[1259]	<210>	86
[1260]	<211>	6
[1261]	<212>	PRT
[1262]	<213>	人工序列
[1263]	<220>	
[1264]	<223>	人工序列的说明:合成
[1265]		肽
[1266]	<400>	86
[1267]	Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[1268]	1	5
[1269]	<210>	87
[1270]	<211>	3
[1271]	<212>	PRT
[1272]	<213>	人工序列
[1273]	<220>	
[1274]	<223>	人工序列的说明:合成
[1275]		肽
[1276]	<400>	87
[1277]	Ala Ala Ser	
[1278]	1	
[1279]	<210>	88
[1280]	<211>	9
[1281]	<212>	PRT
[1282]	<213>	人工序列
[1283]	<220>	
[1284]	<223>	人工序列的说明:合成
[1285]		肽
[1286]	<400>	88

[1287]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[1288]	1	5
[1289]	<210>	89
[1290]	<211>	402
[1291]	<212>	DNA
[1292]	<213>	人工序列
[1293]	<220>	
[1294]	<223>	人工序列的说明:合成
[1295]	多核苷酸	
[1296]	<400>	89
[1297]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[1298]	tcctgtgcag cctctggact cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[1299]	ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[1300]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240
[1301]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300
[1302]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[1303]	atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[1304]	<210>	90
[1305]	<211>	134
[1306]	<212>	PRT
[1307]	<213>	人工序列
[1308]	<220>	
[1309]	<223>	人工序列的说明:合成
[1310]	多肽	
[1311]	<400>	90
[1312]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[1313]	1	5 10 15
[1314]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Asn Ala	
[1315]	20	25 30
[1316]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1317]	35	40 45
[1318]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	
[1319]	50	55 60
[1320]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
[1321]	65	70 75 80
[1322]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[1323]	85	90 95
[1324]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr	
[1325]	100	105 110

[1326]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[1327]	115 120 125
[1328]	Thr Val Thr Val Ser Ser
[1329]	130
[1330]	<210> 91
[1331]	<211> 11
[1332]	<212> PRT
[1333]	<213> 人工序列
[1334]	<220>
[1335]	<223> 人工序列的说明:合成
[1336]	肽
[1337]	<400> 91
[1338]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala
[1339]	1 5 10
[1340]	<210> 92
[1341]	<211> 19
[1342]	<212> PRT
[1343]	<213> 人工序列
[1344]	<220>
[1345]	<223> 人工序列的说明:合成
[1346]	肽
[1347]	<400> 92
[1348]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
[1349]	1 5 10 15
[1350]	Val Lys Gly
[1351]	<210> 93
[1352]	<211> 23
[1353]	<212> PRT
[1354]	<213> 人工序列
[1355]	<220>
[1356]	<223> 人工序列的说明:合成
[1357]	肽
[1358]	<400> 93
[1359]	Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr
[1360]	1 5 10 15
[1361]	Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1362]	20
[1363]	<210> 94
[1364]	<211> 8

90

[1404]	atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctggttag cctggatatca gcagaaacca	120
[1405]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
[1406]	agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[1407]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300
[1408]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322
[1409]	<210> 98	
[1410]	<211> 107	
[1411]	<212> PRT	
[1412]	<213> 人工序列	
[1413]	<220>	
[1414]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1415]	多肽	
[1416]	<400> 98	
[1417]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
[1418]	1 5 10 15	
[1419]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[1420]	20 25 30	
[1421]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[1422]	35 40 45	
[1423]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1424]	50 55 60	
[1425]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[1426]	65 70 75 80	
[1427]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro	
[1428]	85 90 95	
[1429]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1430]	100 105	
[1431]	<210> 99	
[1432]	<211> 11	
[1433]	<212> PRT	
[1434]	<213> 人工序列	
[1435]	<220>	
[1436]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1437]	肽	
[1438]	<400> 99	
[1439]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala	
[1440]	1 5 10	
[1441]	<210> 100	
[1442]	<211> 7	

[1443] <212> PRT
[1444] <213> 人工序列
[1445] <220>
[1446] <223> 人工序列的说明:合成
[1447] 肽
[1448] <400> 100
[1449] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[1450] 1 5
[1451] <210> 101
[1452] <211> 9
[1453] <212> PRT
[1454] <213> 人工序列
[1455] <220>
[1456] <223> 人工序列的说明:合成
[1457] 肽
[1458] <400> 101
[1459] Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1460] 1 5
[1461] <210> 102
[1462] <211> 6
[1463] <212> PRT
[1464] <213> 人工序列
[1465] <220>
[1466] <223> 人工序列的说明:合成
[1467] 肽
[1468] <400> 102
[1469] Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1470] 1 5
[1471] <210> 103
[1472] <211> 3
[1473] <212> PRT
[1474] <213> 人工序列
[1475] <220>
[1476] <223> 人工序列的说明:合成
[1477] 肽
[1478] <400> 103
[1479] Ala Ala Ser
[1480] 1
[1481] <210> 104

[1482]	<211> 9	
[1483]	<212> PRT	
[1484]	<213> 人工序列	
[1485]	<220>	
[1486]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1487]	肽	
[1488]	<400> 104	
[1489]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[1490]	1	5
[1491]	<210> 105	
[1492]	<211> 402	
[1493]	<212> DNA	
[1494]	<213> 人工序列	
[1495]	<220>	
[1496]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1497]	多核苷酸	
[1498]	<400> 105	
[1499]	gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
[1500]	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct	120
[1501]	ccagggaagg gcctggagtg ggttggccgt attaaaagta atactgatgg tgggacaaca	180
[1502]	gactacgccg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagacgattc aaagaacacg	240
[1503]	ctgtatctgc aaatgagcag cctgaaaacc gaggacacag ccgtctatta ctgcaccaca	300
[1504]	gatggacctt actctgacga ttttagaagt ggttatgccg cacgctaccg ttatttcgga	360
[1505]	atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct ca	402
[1506]	<210> 106	
[1507]	<211> 134	
[1508]	<212> PRT	
[1509]	<213> 人工序列	
[1510]	<220>	
[1511]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1512]	多肽	
[1513]	<400> 106	
[1514]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[1515]	1	5 10 15
[1516]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala	
[1517]	20 25 30	
[1518]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1519]	35 40 45	
[1520]	Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala	

[1521]	50	55	60
[1522]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
[1523]	65	70	75
[1524]	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[1525]	85	90	95
[1526]	Tyr Cys Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr		
[1527]	100	105	110
[1528]	Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
[1529]	115	120	125
[1530]	Thr Val Thr Val Ser Ser		
[1531]	130		
[1532]	<210> 107		
[1533]	<211> 11		
[1534]	<212> PRT		
[1535]	<213> 人工序列		
[1536]	<220>		
[1537]	<223> 人工序列的说明:合成		
[1538]	肽		
[1539]	<400> 107		
[1540]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala		
[1541]	1	5	10
[1542]	<210> 108		
[1543]	<211> 19		
[1544]	<212> PRT		
[1545]	<213> 人工序列		
[1546]	<220>		
[1547]	<223> 人工序列的说明:合成		
[1548]	肽		
[1549]	<400> 108		
[1550]	Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro		
[1551]	1	5	10
[1552]	Val Lys Gly		
[1553]	<210> 109		
[1554]	<211> 23		
[1555]	<212> PRT		
[1556]	<213> 人工序列		
[1557]	<220>		
[1558]	<223> 人工序列的说明:合成		
[1559]	肽		

- [1560] <400> 109
[1561] Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr
[1562] 1 5 10 15
[1563] Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1564] 20
[1565] <210> 110
[1566] <211> 8
[1567] <212> PRT
[1568] <213> 人工序列
[1569] <220>
[1570] <223> 人工序列的说明:合成
[1571] 肽
[1572] <400> 110
[1573] Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
[1574] 1 5
[1575] <210> 111
[1576] <211> 10
[1577] <212> PRT
[1578] <213> 人工序列
[1579] <220>
[1580] <223> 人工序列的说明:合成
[1581] 肽
[1582] <400> 111
[1583] Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr
[1584] 1 5 10
[1585] <210> 112
[1586] <211> 24
[1587] <212> PRT
[1588] <213> 人工序列
[1589] <220>
[1590] <223> 人工序列的说明:合成
[1591] 肽
[1592] <400> 112
[1593] Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg
[1594] 1 5 10 15
[1595] Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1596] 20
[1597] <210> 113
[1598] <211> 322

[1599]	<212> DNA	
[1600]	<213> 人工序列	
[1601]	<220>	
[1602]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1603]	多核苷酸	
[1604]	<400> 113	
[1605]	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[1606]	atcacttgtc gggcgagtc ggaattagc acctggtag cctggtagtca gcagaaacca	120
[1607]	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
[1608]	agattcagcg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[1609]	gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccctccgac ttttggccag	300
[1610]	gggaccaagc tggagatcaa ac	322
[1611]	<210> 114	
[1612]	<211> 107	
[1613]	<212> PRT	
[1614]	<213> 人工序列	
[1615]	<220>	
[1616]	<223> 人工序列的说明:合成	
[1617]	多肽	
[1618]	<400> 114	
[1619]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
[1620]	1 5 10 15	
[1621]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
[1622]	20 25 30	
[1623]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[1624]	35 40 45	
[1625]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1626]	50 55 60	
[1627]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[1628]	65 70 75 80	
[1629]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro	
[1630]	85 90 95	
[1631]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[1632]	100 105	
[1633]	<210> 115	
[1634]	<211> 11	
[1635]	<212> PRT	
[1636]	<213> 人工序列	
[1637]	<220>	

[1638] <223> 人工序列的说明:合成
[1639] 肽
[1640] <400> 115
[1641] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala
[1642] 1 5 10
[1643] <210> 116
[1644] <211> 7
[1645] <212> PRT
[1646] <213> 人工序列
[1647] <220>
[1648] <223> 人工序列的说明:合成
[1649] 肽
[1650] <400> 116
[1651] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[1652] 1 5
[1653] <210> 117
[1654] <211> 9
[1655] <212> PRT
[1656] <213> 人工序列
[1657] <220>
[1658] <223> 人工序列的说明:合成
[1659] 肽
[1660] <400> 117
[1661] Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1662] 1 5
[1663] <210> 118
[1664] <211> 6
[1665] <212> PRT
[1666] <213> 人工序列
[1667] <220>
[1668] <223> 人工序列的说明:合成
[1669] 肽
[1670] <400> 118
[1671] Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1672] 1 5
[1673] <210> 119
[1674] <211> 3
[1675] <212> PRT
[1676] <213> 人工序列

[1677]	<220>
[1678]	<223> 人工序列的说明:合成
[1679]	肽
[1680]	<400> 119
[1681]	Ala Ala Ser
[1682]	1
[1683]	<210> 120
[1684]	<211> 9
[1685]	<212> PRT
[1686]	<213> 人工序列
[1687]	<220>
[1688]	<223> 人工序列的说明:合成
[1689]	肽
[1690]	<400> 120
[1691]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1692]	1 5
[1693]	<210> 121
[1694]	<211> 8
[1695]	<212> PRT
[1696]	<213> 人工序列
[1697]	<220>
[1698]	<223> 人工序列的说明:合成
[1699]	肽
[1700]	<400> 121
[1701]	Gly Leu Ser Phe Leu Asn Ala Trp
[1702]	1 5
[1703]	<210> 122
[1704]	<211> 10
[1705]	<212> PRT
[1706]	<213> 人工序列
[1707]	<220>
[1708]	<223> 人工序列的说明:合成
[1709]	肽
[1710]	<400> 122
[1711]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr
[1712]	1 5 10
[1713]	<210> 123
[1714]	<211> 25
[1715]	<212> PRT

[1716] <213> 人工序列
[1717] <220>
[1718] <223> 人工序列的说明:合成
[1719] 肽
[1720] <400> 123
[1721] Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg
[1722] 1 5 10 15
[1723] Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp
[1724] 20 25
[1725] <210> 124
[1726] <211> 6
[1727] <212> PRT
[1728] <213> 人工序列
[1729] <220>
[1730] <223> 人工序列的说明:合成
[1731] 肽
[1732] <400> 124
[1733] Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1734] 1 5
[1735] <210> 125
[1736] <211> 3
[1737] <212> PRT
[1738] <213> 人工序列
[1739] <220>
[1740] <223> 人工序列的说明:合成
[1741] 肽
[1742] <400> 125
[1743] Ala Ala Ser
[1744] 1
[1745] <210> 126
[1746] <211> 9
[1747] <212> PRT
[1748] <213> 人工序列
[1749] <220>
[1750] <223> 人工序列的说明:合成
[1751] 肽
[1752] <400> 126
[1753] Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1754] 1 5

[1755]	<210> 127
[1756]	<211> 8
[1757]	<212> PRT
[1758]	<213> 人工序列
[1759]	<220>
[1760]	<223> 人工序列的说明:合成
[1761]	肽
[1762]	<400> 127
[1763]	Gly Leu Ser Phe Leu Asn Ala Trp
[1764]	1 5
[1765]	<210> 128
[1766]	<211> 10
[1767]	<212> PRT
[1768]	<213> 人工序列
[1769]	<220>
[1770]	<223> 人工序列的说明:合成
[1771]	肽
[1772]	<400> 128
[1773]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr
[1774]	1 5 10
[1775]	<210> 129
[1776]	<211> 25
[1777]	<212> PRT
[1778]	<213> 人工序列
[1779]	<220>
[1780]	<223> 人工序列的说明:合成
[1781]	肽
[1782]	<400> 129
[1783]	Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala
[1784]	1 5 10 15
[1785]	Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1786]	20 25
[1787]	<210> 130
[1788]	<211> 6
[1789]	<212> PRT
[1790]	<213> 人工序列
[1791]	<220>
[1792]	<223> 人工序列的说明:合成
[1793]	肽

[1794] <400> 130
[1795] Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1796] 1 5
[1797] <210> 131
[1798] <211> 3
[1799] <212> PRT
[1800] <213> 人工序列
[1801] <220>
[1802] <223> 人工序列的说明:合成
[1803] 肽
[1804] <400> 131
[1805] Ala Ala Ser
[1806] 1
[1807] <210> 132
[1808] <211> 9
[1809] <212> PRT
[1810] <213> 人工序列
[1811] <220>
[1812] <223> 人工序列的说明:合成
[1813] 肽
[1814] <400> 132
[1815] Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1816] 1 5
[1817] <210> 133
[1818] <211> 8
[1819] <212> PRT
[1820] <213> 人工序列
[1821] <220>
[1822] <223> 人工序列的说明:合成
[1823] 肽
[1824] <400> 133
[1825] Gly Phe Ser Phe Leu Asn Ala Trp
[1826] 1 5
[1827] <210> 134
[1828] <211> 10
[1829] <212> PRT
[1830] <213> 人工序列
[1831] <220>
[1832] <223> 人工序列的说明:合成

[1833]	肽
[1834]	<400> 134
[1835]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr
[1836]	1 5 10
[1837]	<210> 135
[1838]	<211> 25
[1839]	<212> PRT
[1840]	<213> 人工序列
[1841]	<220>
[1842]	<223> 人工序列的说明:合成
[1843]	肽
[1844]	<400> 135
[1845]	Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala
[1846]	1 5 10 15
[1847]	Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val
[1848]	20 25
[1849]	<210> 136
[1850]	<211> 6
[1851]	<212> PRT
[1852]	<213> 人工序列
[1853]	<220>
[1854]	<223> 人工序列的说明:合成
[1855]	肽
[1856]	<400> 136
[1857]	Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1858]	1 5
[1859]	<210> 137
[1860]	<211> 3
[1861]	<212> PRT
[1862]	<213> 人工序列
[1863]	<220>
[1864]	<223> 人工序列的说明:合成
[1865]	肽
[1866]	<400> 137
[1867]	Ala Ala Ser
[1868]	1
[1869]	<210> 138
[1870]	<211> 9
[1871]	<212> PRT

[1872]	<213>	人工序列
[1873]	<220>	
[1874]	<223>	人工序列的说明:合成
[1875]		肽
[1876]	<400>	138
[1877]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
[1878]	1	5
[1879]	<210>	139
[1880]	<211>	8
[1881]	<212>	PRT
[1882]	<213>	人工序列
[1883]	<220>	
[1884]	<223>	人工序列的说明:合成
[1885]		肽
[1886]	<400>	139
[1887]	Gly Leu Thr Phe Leu Asn Ala Trp	
[1888]	1	5
[1889]	<210>	140
[1890]	<211>	10
[1891]	<212>	PRT
[1892]	<213>	人工序列
[1893]	<220>	
[1894]	<223>	人工序列的说明:合成
[1895]		肽
[1896]	<400>	140
[1897]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr	
[1898]	1	5 10
[1899]	<210>	141
[1900]	<211>	25
[1901]	<212>	PRT
[1902]	<213>	人工序列
[1903]	<220>	
[1904]	<223>	人工序列的说明:合成
[1905]		肽
[1906]	<400>	141
[1907]	Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala	
[1908]	1	5 10 15
[1909]	Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val	
[1910]		20 25

[1911]	<210> 142
[1912]	<211> 6
[1913]	<212> PRT
[1914]	<213> 人工序列
[1915]	<220>
[1916]	<223> 人工序列的说明:合成
[1917]	肽
[1918]	<400> 142
[1919]	Gln Asp Ile Ser Thr Trp
[1920]	1 5
[1921]	<210> 143
[1922]	<211> 3
[1923]	<212> PRT
[1924]	<213> 人工序列
[1925]	<220>
[1926]	<223> 人工序列的说明:合成
[1927]	肽
[1928]	<400> 143
[1929]	Ala Ala Ser
[1930]	1
[1931]	<210> 144
[1932]	<211> 9
[1933]	<212> PRT
[1934]	<213> 人工序列
[1935]	<220>
[1936]	<223> 人工序列的说明:合成
[1937]	肽
[1938]	<400> 144
[1939]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[1940]	1 5
[1941]	<210> 145
[1942]	<211> 8
[1943]	<212> PRT
[1944]	<213> 人工序列
[1945]	<220>
[1946]	<223> 人工序列的说明:合成
[1947]	肽
[1948]	<400> 145
[1949]	Gly Phe Thr Phe Leu Asn Ala Trp

[1950]	1	5	
[1951]	<210>	146	
[1952]	<211>	10	
[1953]	<212>	PRT	
[1954]	<213>	人工序列	
[1955]	<220>		
[1956]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1957]		肽	
[1958]	<400>	146	
[1959]	Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr		
[1960]	1	5	10
[1961]	<210>	147	
[1962]	<211>	25	
[1963]	<212>	PRT	
[1964]	<213>	人工序列	
[1965]	<220>		
[1966]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1967]		肽	
[1968]	<400>	147	
[1969]	Thr Thr Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala		
[1970]	1	5	10 15
[1971]	Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly Met Asp Val		
[1972]		20	25
[1973]	<210>	148	
[1974]	<211>	6	
[1975]	<212>	PRT	
[1976]	<213>	人工序列	
[1977]	<220>		
[1978]	<223>	人工序列的说明:合成	
[1979]		肽	
[1980]	<400>	148	
[1981]	Gln Asp Ile Ser Thr Trp		
[1982]	1	5	
[1983]	<210>	149	
[1984]	<211>	3	
[1985]	<212>	PRT	
[1986]	<213>	人工序列	
[1987]	<220>		
[1988]	<223>	人工序列的说明:合成	

[1989]	肽
[1990]	<400> 149
[1991]	Ala Ala Ser
[1992]	1
[1993]	<210> 150
[1994]	<211> 9
[1995]	<212> PRT
[1996]	<213> 人工序列
[1997]	<220>
[1998]	<223> 人工序列的说明:合成
[1999]	肽
[2000]	<400> 150
[2001]	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
[2002]	1 5
[2003]	<210> 151
[2004]	<211> 347
[2005]	<212> PRT
[2006]	<213> 乙型流感病毒
[2007]	<400> 151
[2008]	Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val
[2009]	1 5 10 15
[2010]	Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu
[2011]	20 25 30
[2012]	Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Glu
[2013]	35 40 45
[2014]	Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp
[2015]	50 55 60
[2016]	Val Ala Leu Gly Arg Pro Lys Cys Thr Gly Asn Ile Pro Ser Ala Arg
[2017]	65 70 75 80
[2018]	Val Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro
[2019]	85 90 95
[2020]	Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg
[2021]	100 105 110
[2022]	Gly Tyr Glu His Ile Arg Leu Ser Thr His Asn Val Ile Asn Ala Glu
[2023]	115 120 125
[2024]	Asn Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Lys Ile Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro
[2025]	130 135 140
[2026]	Asn Val Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val
[2027]	145 150 155 160

[2028]	Pro	Lys	Asn	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Glu
[2029]					165					170					175	
[2030]	Val	Pro	Tyr	Ile	Cys	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Gln	Ile	Thr	Val	Trp	Gly
[2031]					180					185					190	
[2032]	Phe	His	Ser	Asp	Asn	Glu	Ile	Gln	Met	Ala	Lys	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser
[2033]					195					200					205	
[2034]	Lys	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	His	Tyr
[2035]			210						215						220	
[2036]	Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asn	Gln	Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu
[2037]	225						230					235				240
[2038]	Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Val	Gln	Lys	Ser	Gly
[2039]					245					250						255
[2040]	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys
[2041]					260					265						270
[2042]	Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro
[2043]					275					280					285	
[2044]	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn
[2045]					290					295					300	
[2046]	Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn
[2047]	305						310					315				320
[2048]	Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys
[2049]					325					330						335
[2050]	Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg					
[2051]					340					345						
[2052]	<210> 152															
[2053]	<211> 346															
[2054]	<212> PRT															
[2055]	<213> 乙型流感病毒															
[2056]	<400> 152															
[2057]	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro	His	Val	Val
[2058]	1				5					10					15	
[2059]	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Thr	Gly	Val	Ile	Pro	Leu
[2060]					20					25					30	
[2061]	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Arg
[2062]					35					40					45	
[2063]	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asp	Cys	Leu	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu	Asp
[2064]					50					55					60	
[2065]	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Met	Cys	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Lys
[2066]	65						70					75				80

[2067]	Ala Ser Ile Leu His Glu Val Lys Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro		
[2068]		85	90
[2069]	Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg		95
[2070]		100	105
[2071]	Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asp Ala Glu		110
[2072]		115	120
[2073]	Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro		125
[2074]		130	135
[2075]	Asn Ala Thr Ser Lys Ser Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val		140
[2076]	145	150	155
[2077]	Pro Lys Asp Asn Asn Lys Asn Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val		160
[2078]		165	170
[2079]	Pro Tyr Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe		175
[2080]		180	185
[2081]	His Ser Asp Asp Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn		190
[2082]		195	200
[2083]	Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val		205
[2084]		210	215
[2085]	Ser Gln Ile Gly Ser Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro		220
[2086]	225	230	235
[2087]	Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Met Gln Lys Pro Gly Lys		240
[2088]		245	250
[2089]	Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val		255
[2090]		260	265
[2091]	Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu		270
[2092]		275	280
[2093]	Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys		285
[2094]		290	295
[2095]	Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys		300
[2096]	305	310	315
[2097]	Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr		320
[2098]		325	330
[2099]	Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg		335
[2100]		340	345
[2101]	<210>	153	
[2102]	<211>	346	
[2103]	<212>	PRT	
[2104]	<213>	乙型流感病毒	
[2105]	<400>	153	

[2106]	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro	His	Val	Val
[2107]	1				5					10					15	
[2108]	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Thr	Gly	Val	Ile	Pro	Leu
[2109]					20					25					30	
[2110]	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Arg
[2111]					35					40					45	
[2112]	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asp	Cys	Leu	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu	Asp
[2113]					50					55					60	
[2114]	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Met	Cys	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Lys
[2115]	65									70					75	
[2116]	Ala	Ser	Ile	Leu	His	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Phe	Pro
[2117]					85					90					95	
[2118]	Ile	Met	His	Asp	Arg	Thr	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Arg
[2119]					100					105					110	
[2120]	Gly	Tyr	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Ile	Asp	Ala	Glu
[2121]					115					120					125	
[2122]	Lys	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Arg	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Cys	Pro
[2123]					130					135					140	
[2124]	Asn	Ala	Thr	Ser	Lys	Ser	Gly	Phe	Phe	Ala	Thr	Met	Ala	Trp	Ala	Val
[2125]	145									150					155	
[2126]	Pro	Lys	Asp	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Thr	Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Glu	Val
[2127]					165					170					175	
[2128]	Pro	Tyr	Ile	Cys	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Gln	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Phe
[2129]					180					185					190	
[2130]	His	Ser	Asp	Asp	Lys	Thr	Gln	Met	Lys	Asn	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asn
[2131]					195					200					205	
[2132]	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	His	Tyr	Val
[2133]					210					215					220	
[2134]	Ser	Gln	Ile	Gly	Ser	Phe	Pro	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	Pro
[2135]	225									230					235	
[2136]	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Met	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
[2137]					245					250					255	
[2138]	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys	Val
[2139]					260					265					270	
[2140]	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu
[2141]					275					280					285	
[2142]	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys
[2143]					290					295					300	
[2144]	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn	Cys

[2145]	305	310	315	320
[2146]	Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr			
[2147]		325	330	335
[2148]	Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg			
[2149]		340	345	
[2150]	<210> 154			
[2151]	<211> 346			
[2152]	<212> PRT			
[2153]	<213> 乙型流感病毒			
[2154]	<400> 154			
[2155]	Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val			
[2156]	1	5	10	15
[2157]	Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu			
[2158]		20	25	30
[2159]	Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser Tyr Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Arg			
[2160]		35	40	45
[2161]	Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asp Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp			
[2162]		50	55	60
[2163]	Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala Lys			
[2164]	65	70	75	80
[2165]	Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro			
[2166]		85	90	95
[2167]	Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg			
[2168]		100	105	110
[2169]	Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asp Ala Glu			
[2170]		115	120	125
[2171]	Asn Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Arg Ser Cys Pro			
[2172]		130	135	140
[2173]	Asn Ala Thr Ser Lys Ser Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val			
[2174]	145	150	155	160
[2175]	Pro Lys Asp Asn Asn Lys Asn Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val			
[2176]		165	170	175
[2177]	Pro Tyr Val Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe			
[2178]		180	185	190
[2179]	His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn			
[2180]		195	200	205
[2181]	Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val			
[2182]		210	215	220
[2183]	Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Ala Gln Thr Glu Asp Glu Gly Leu Pro			

[2184]	225					230					235					240
[2185]	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Val	Gln	Lys	Pro	Arg	Lys
[2186]						245					250					255
[2187]	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys	Val
[2188]						260					265					270
[2189]	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu
[2190]						275					280					285
[2191]	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys
[2192]						290					295					300
[2193]	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn	Cys
[2194]	305						310				315					320
[2195]	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr
[2196]						325					330					335
[2197]	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg						
[2198]						340					345					

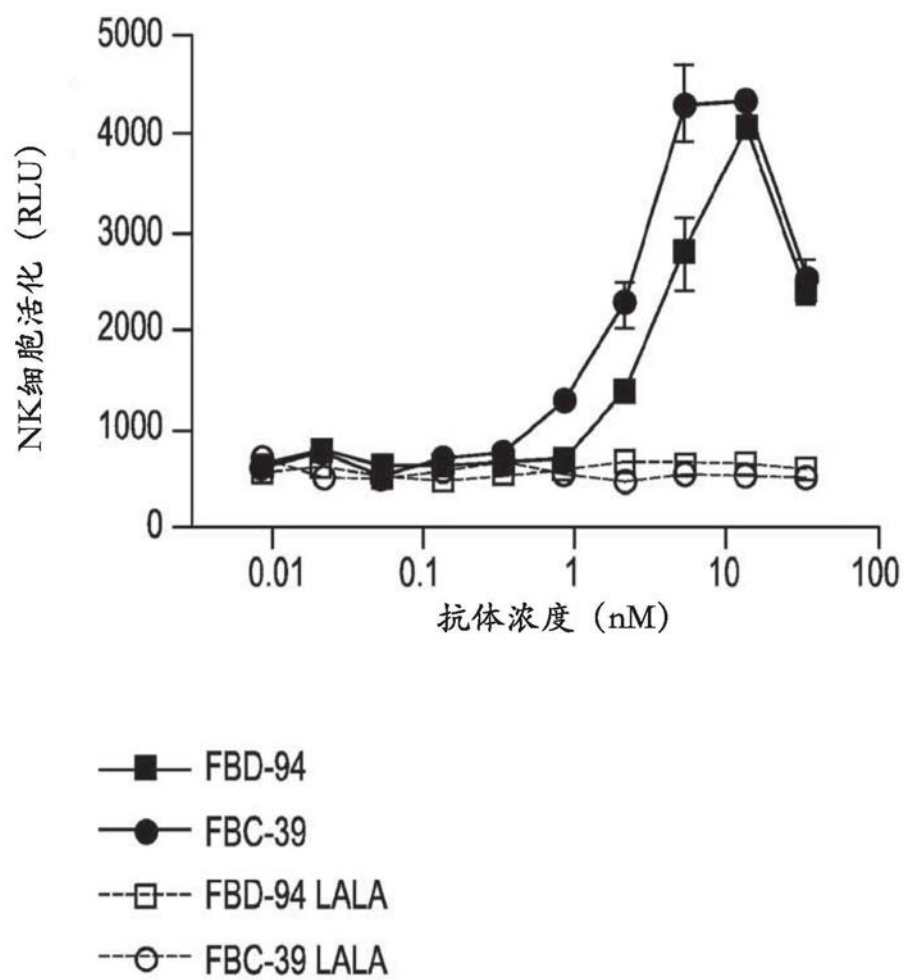


图1

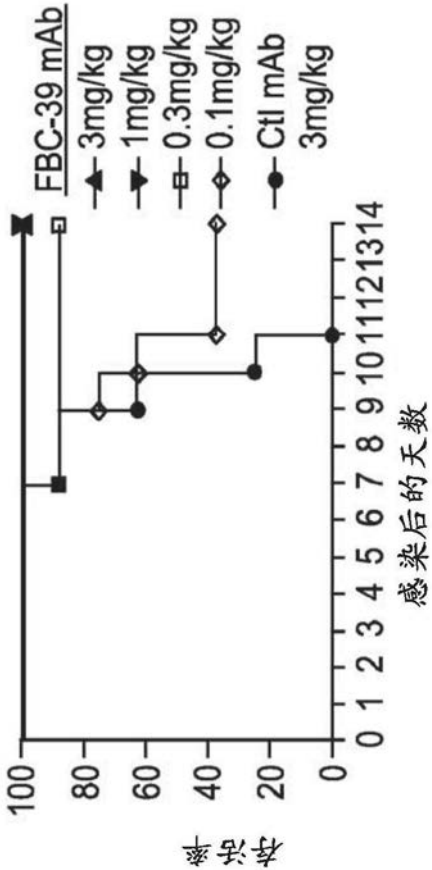


图2A

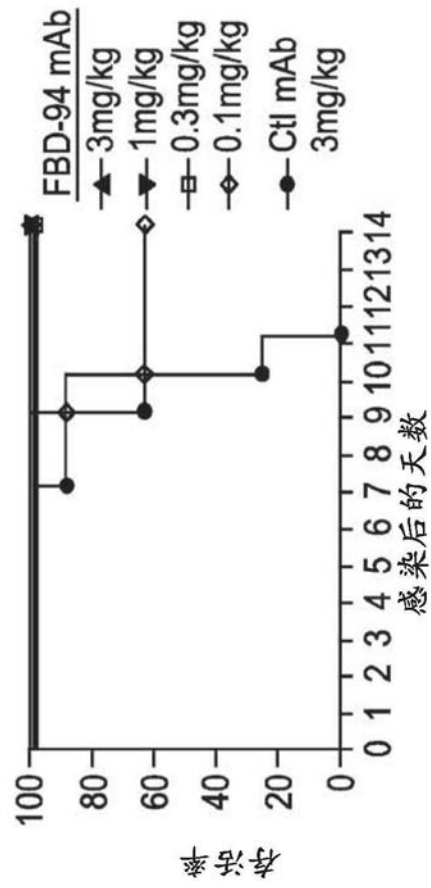


图2B

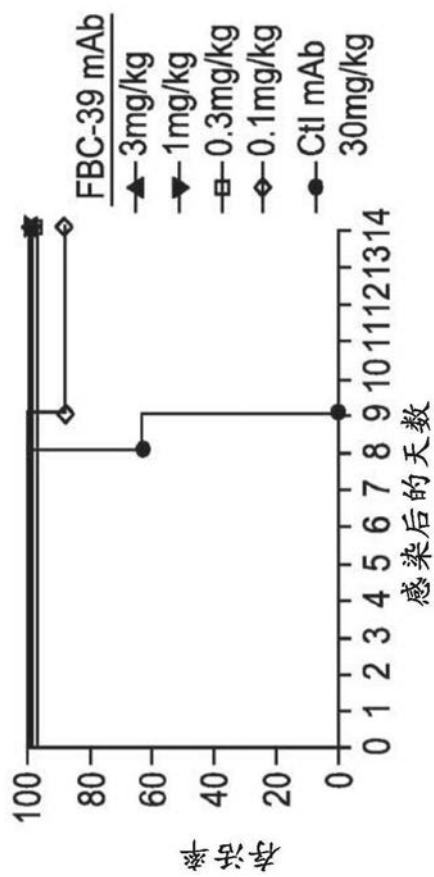


图2C

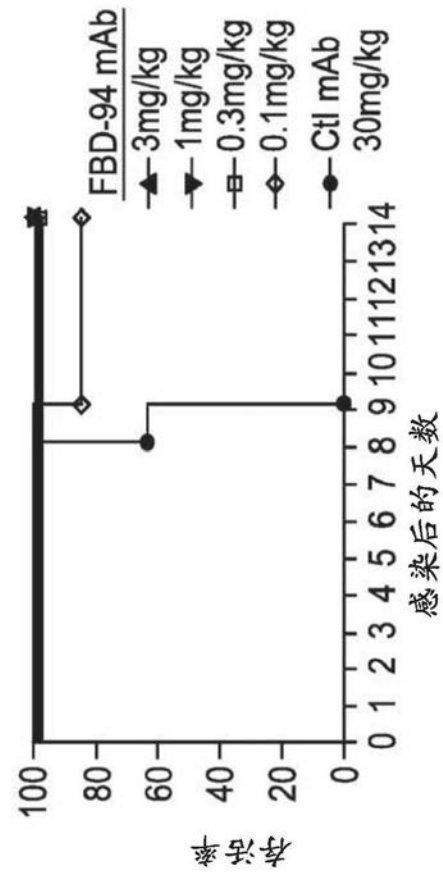


图2D

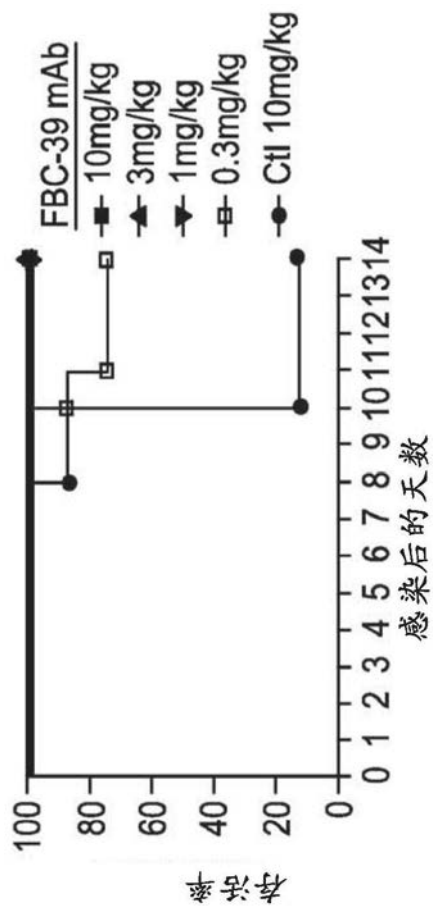


图3A

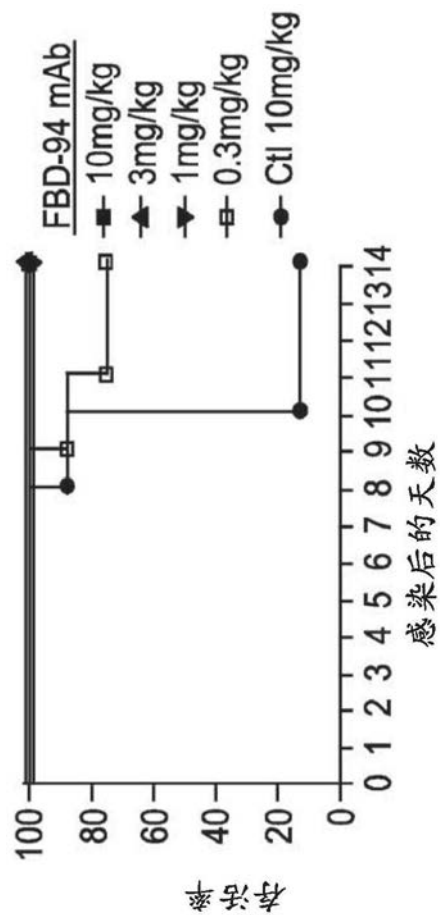


图3B

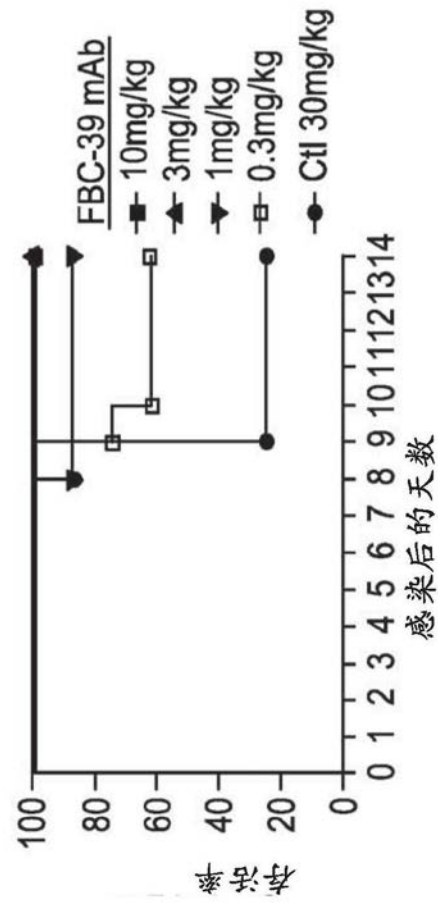


图3C

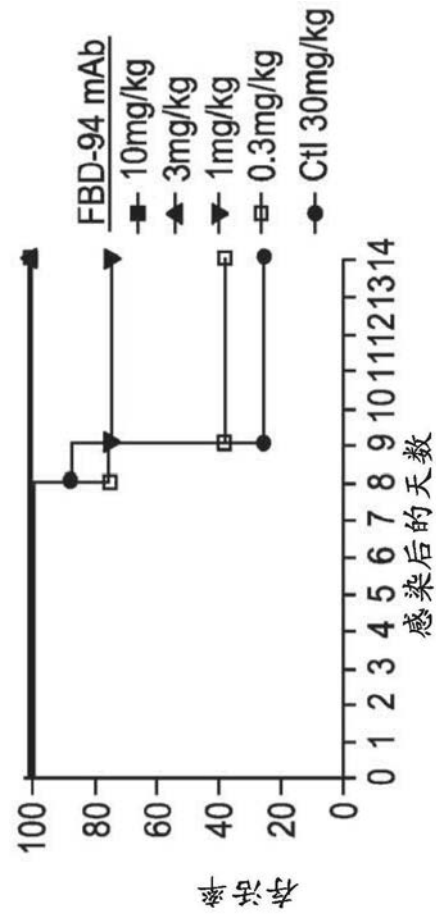


图3D

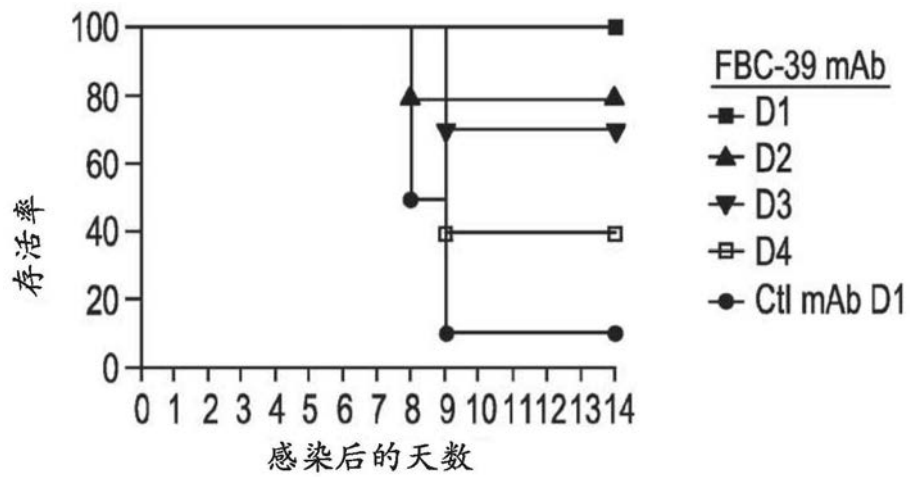


图4A

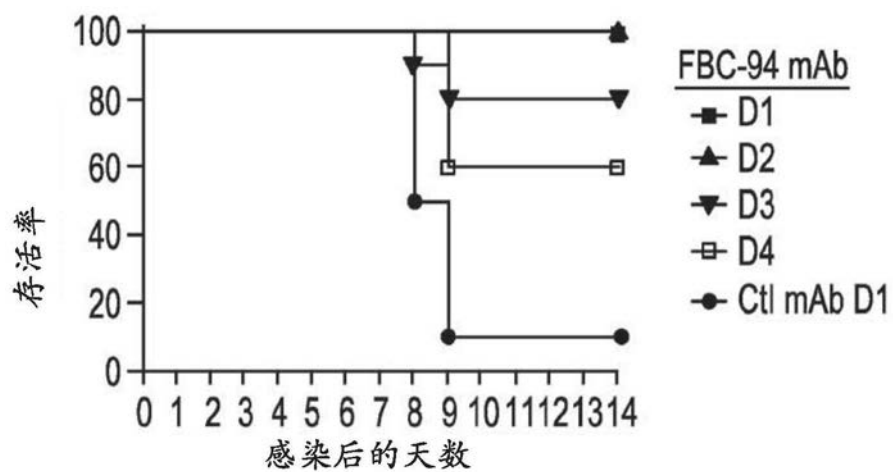


图4B

卡巴特

		CDRH1 (31-35b)										CDRH2 (50-65)										CDRL3 (89-97)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
FBD-56	VH	EVQLVESGGHLVQPGKSLRLS	CAASGFTEDYAMN	WVRQAPGKGL	EWVS	VI	S	--	WDSGRIGV	ADSVK	GRFTISRDN	AKN	SSYLQ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

图5A

IMGT

		CDRH1 (27-38)	CDRH2 (56-65)
'BD-56	VH	EVQLVESGG- <u>HLVQPG</u> SLRLSCAASGFTF-----EDYAMNWVRQAPGKGLEWVSII	SWD--SGRIGYADSVK-GRFTISRDNAKNSSYLQMNSLRPED
'BD-94	VH	EVQLVESGG- <u>GLVQPG</u> SLRLSCAVSGFIF-----EDYAINWVRQAPGKGLEWVSII	SWD--SGRIGYADSVR-GRFTISRDNAKNSSFLQMNSLRPED
'BC-39	VH	EVQLVSSG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLSF-----LNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTFLHMSSLRTPED
'BC-39	LSL	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLSF-----LNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	FSL	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLSF-----LNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	LTl	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLTF-----LNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	FTL	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLTF-----LNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	FSS	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLSF-----SNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	LTS	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLTF-----SNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
'BC-39	FTS	VH EVQLVESGG- <u>GLVKPG</u> SLRLSCAASGLTF-----SNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI	KSNTDGGTTDYAAPVK-GRFTISRDDSKNMTLYLQMSLKTED
CDRH3 (105-117)			
BD-56	VH	TALYYC <u>VRDML</u> AYSDNS--GKKYNVYGM <u>DVWGQGT</u> TVTVSS	
'BD-94	VH	TAVYYC <u>VKDM</u> LAYYDGS--GIRYNLYGM <u>DVWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	VH	TAVYYC <u>ATDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	LSL	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	FSL	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	LTl	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	FTL	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	FSS	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	LTS	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	
'BC-39	FTS	VH TAVYYC <u>TTDGP</u> SYDDFRSGYAARYRYFGMD <u>VWGQGT</u> TVTVSS	

图5B

IMGT

FB-D-56 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV-----STFLAWYQQKPGQAPRLIMYDA-----SNRATGIP-ARFSGSG--	CDRL1 (27-38)	CDRL2 (56-65)
FB-D-94 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASRI-----TTHLAWYQQKPGQAPRLIYDA-----SNRATGVP-ARFSGSG--		
FBC-39 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 LSL VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 FSL VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 LTL VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 FTL VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 FSS VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 LTS VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
FBC-39 FTS VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDI-----STWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA-----SSLQSGVP-SRFSGSG--		
CDRL3 (105-117)			
FB-D-56 VL	SGTDFTLTISSLEPEDFAIYYCQQRSH-----WPPIFGQGTRLEIK		
FB-D-94 VL	SGTDFTLTINSLEPDFAIYYCQQRDH-----WPPIFGQGTRLEIK		
FBC-39 VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 LSL VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 FSL VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 LTL VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 FTL VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 FSS VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 LTS VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		
FBC-39 FTS VL	SGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQANS-----FPPTFGQGTKLEIK		

图5C

Glu Val Gln Leu Val Xaa₁ Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa₂Xaa₃Phe Xaa₄ Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
 (HCDR1)
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Asn Thr Asp Gly Gly Thr Thr
 (HCDR2)
 Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Xaa₅ Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Xaa₆
 Leu Xaa₇ Leu Xaa₈ Met Xaa₉ Ser Leu Xaa₁₀Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa₁₁Thr
 (HCDR3)
 Asp Gly Pro Tyr Ser Asp Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Ala Ala Arg Tyr Arg Tyr Phe Gly
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 71)

图6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 (LCDR1)
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 (LCDR2)
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 (LCDR3)
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa₁ Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 72)

图7

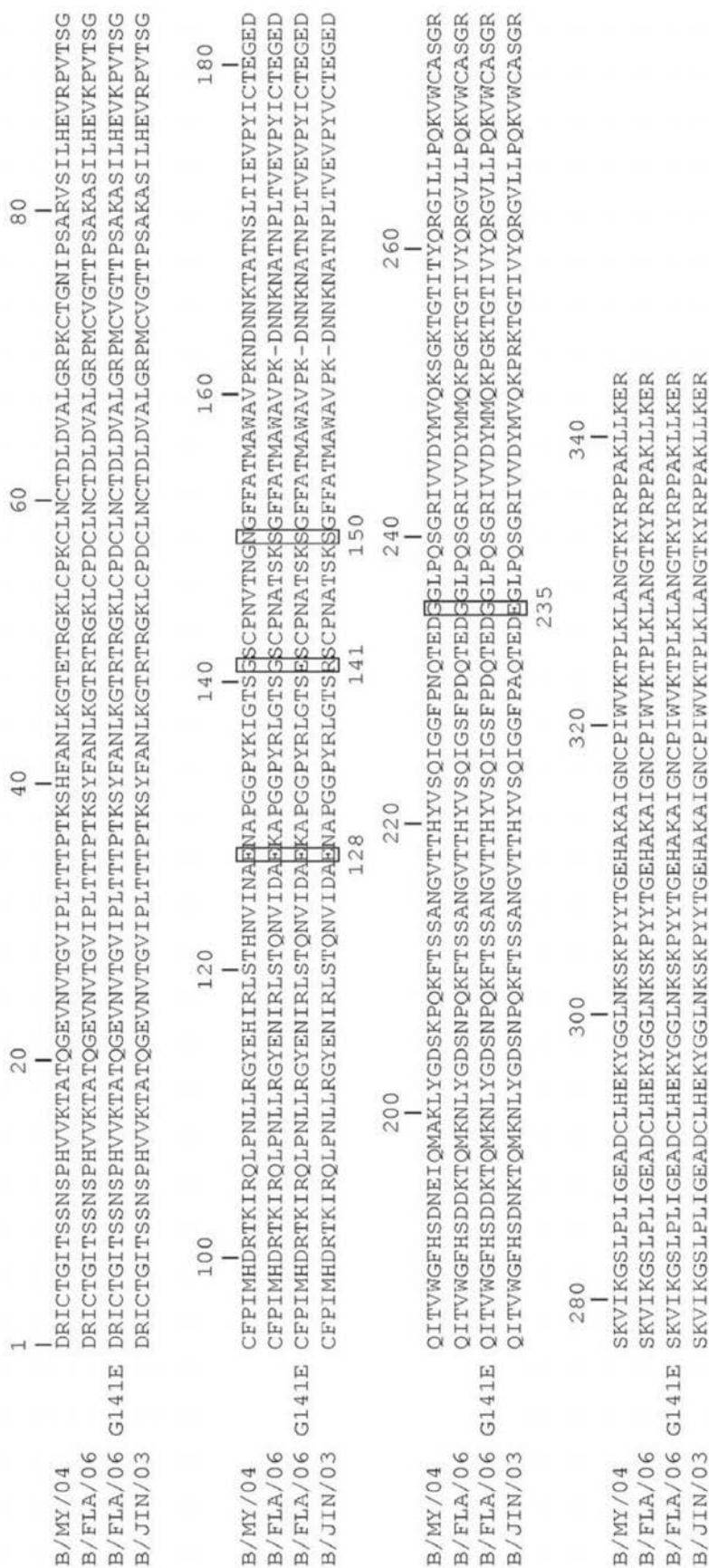


图8