



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119241692 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 03

(21) 申请号 202411139072.4

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2019.11.27

C07K 16/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/18 (2006.01)

62/775,192 2018.12.04 US

A61K 39/395 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980090856.3 2019.11.27

(71) 申请人 洛克菲勒大学

地址 美国纽约

申请人 加州理工学院

(72) 发明人 米歇尔·努森兹韦格

帕梅拉·J·比约克曼

A·埃斯科拉诺 H·格里斯蒂克

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

权利要求书2页 说明书87页

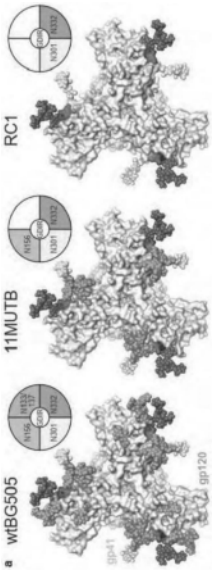
序列表(电子公布) 附图19页

(54) 发明名称

HIV疫苗免疫原

(57) 摘要

本公开涉及HIV疫苗免疫原,具体而言,半公开提供了HIV免疫原及其在受试者中产生免疫应答的用途。还公开了分离抗HIV抗体的方法及其用途。本公开进一步提供了使用所公开的HIV免疫原和/或抗体治疗或预防受试者中的人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)感染的方法。



1. 一种分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段,其包含选自由SEQ ID NO:22-49和110-283组成的组的重链互补决定区(CDR)3(CDRH3)和选自由SEQ ID NO:50-95和284-406组成的组的轻链CDR3(CDRL3)。

2. 如权利要求1所述的分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段,其结合具有选自由SEQ ID NO:2、4、6、8、11和13组成的组的氨基酸序列的多肽。

3. 如权利要求2所述的分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段,其包含下述1)至57)的氨基酸序列的任一组:

- 1) SEQ ID NO:96和65 (抗体271) ;
- 2) SEQ ID NO:97和109 (抗体340) ;
- 3) SEQ ID NO:98和84 (抗体341) ;
- 4) SEQ ID NO:99和78 (抗体343) ;
- 5) SEQ ID NO:100和95 (抗体344) ;
- 6) SEQ ID NO:101和78 (抗体346) ;
- 7) SEQ ID NO:102和70 (抗体347) ;
- 8) SEQ ID NO:103和50 (抗体351) ;
- 9) SEQ ID NO:104和61 (抗体352) ;
- 10) SEQ ID NO:105和70 (抗体274) ;
- 11) SEQ ID NO:105和61 (抗体275) ;
- 12) SEQ ID NO:40和65 (抗体276) ;
- 13) SEQ ID NO:40和67 (抗体278) ;
- 14) SEQ ID NO:46和65 (抗体280) ;
- 15) SEQ ID NO:106和70 (抗体294) ;
- 16) SEQ ID NO:107和93 (抗体348) ;
- 17) SEQ ID NO:108和94 (抗体349)
- 18) SEQ ID NO:134和294 (抗体874) ;
- 19) SEQ ID NO:133和294 (抗体876) ;
- 20) SEQ ID NO:182和285 (抗体890) ;
- 21) SEQ ID NO:145和291 (抗体893) ;
- 22) SEQ ID NO:172和433 (抗体897) ;
- 23) SEQ ID NO:195和285 (抗体901) ;
- 24) SEQ ID NO:407和314 (抗体933) ;
- 25) SEQ ID NO:408和284 (抗体934) ;
- 26) SEQ ID NO:409和362 (抗体935) ;
- 27) SEQ ID NO:410和394 (抗体936) ;
- 28) SEQ ID NO:411和311 (抗体937) ;
- 29) SEQ ID NO:412和348 (抗体938) ;
- 30) SEQ ID NO:413和395 (抗体986) ;
- 31) SEQ ID NO:414和400 (抗体987) ;
- 32) SEQ ID NO:415和402 (抗体988) ;

- 33) SEQ ID NO:416和286 (抗体990) ;
- 34) SEQ ID NO:417和284 (抗体992) ;
- 35) SEQ ID NO:418和284 (抗体992a) ;
- 36) SEQ ID NO:419和318 (抗体996) ;
- 37) SEQ ID NO:420和286 (抗体997) ;
- 38) SEQ ID NO:421和315 (抗体998) ;
- 39) SEQ ID NO:422和285 (抗体1000) ;
- 40) SEQ ID NO:423和373 (抗体1002) ;
- 41) SEQ ID NO:424和315 (抗体1003) ;
- 42) SEQ ID NO:425和382 (抗体1004) ;
- 43) SEQ ID NO:426和311 (抗体1005) ;
- 44) SEQ ID NO:427和305 (抗体1013) ;
- 45) SEQ ID NO:214和313 (抗体1053) ;
- 46) SEQ ID NO:219和284 (抗体1054) ;
- 47) SEQ ID NO:276和342 (抗体1061) ;
- 48) SEQ ID NO:252和322 (抗体1062) ;
- 49) SEQ ID NO:247和347 (抗体1063) ;
- 50) SEQ ID NO:257和355 (抗体1064) ;
- 51) SEQ ID NO:277和363 (抗体1068) ;
- 52) SEQ ID NO:428和383 (抗体1169) ;
- 53) SEQ ID NO:429和383 (抗体1169a) ;
- 54) SEQ ID NO:430和392 (抗体1170) ;
- 55) SEQ ID NO:272和352 (抗体1177) ;
- 56) SEQ ID NO:431和361 (抗体1178) ;或
- 57) SEQ ID NO:432和383 (抗体1180) 。

4. 一种药物组合物,其包含权利要求1-3任一项所述的分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或赋形剂。

5. 用于预防或治疗HIV感染或HIV相关疾病的方法的药物组合物,其中所述方法包括以下步骤:

鉴定需要此类预防或治疗的患者;并

向所述患者施用包含治疗有效量的至少一种权利要求1-3任一项所述的分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段的第一治疗剂。

6. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述方法进一步包括施用第二治疗剂。

7. 一种试剂盒,其包括药学上可接受的剂量单位的药学有效量的至少一种权利要求1-3任一项所述的分离的抗HIV抗体或其抗原结合片段。

HIV疫苗免疫原

[0001] 本申请是申请号为2019800908563,申请日为2019年11月27日,发明名称为“HIV疫苗免疫原”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35 U.S.C. §119(e)要求在2018年12月4日提交的美国临时专利申请号62/775,192的优先权。上述申请通过引用以其全文并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用以其全文并入本文。所述ASCII拷贝创建于2019年11月14日,命名为070413_20403_SL.txt,且大小为178,838字节。

技术领域

[0006] 本公开涉及免疫原性多肽,且尤其是能够刺激对人免疫缺陷病毒(HIV)的免疫应答的免疫原性多肽。

背景技术

[0007] 从感染了HIV-1的人类供体克隆的单细胞抗体表明,广泛中和抗HIV-1抗体(bNAb)的独特之处在于它们是高度体细胞突变的。此外,高度的体细胞突变对于与天然HIV-1 Env的结合和bNAb中和活性至关重要。大量突变的聚集表明,bNAb进化以应对体细胞超突变的迭代和生发中心(GC)中的选择。如人类的前瞻性研究所揭示的,bNAb这样做是为了应对抗体压力引起的病毒逃逸变体。总之,这些观察表明,用以激发(elicit) bNAb的疫苗接种需要一系列序贯(sequential)免疫原,其从诱导携带bNAb的种系前体的B淋巴细胞的扩增的免疫原开始。

[0008] 序贯免疫(sequential immunization)可以指导(shepherd) bNAb开发的想法已通过携带人bNAb的推断种系(inferred germline, iGL)前体的遗传修饰的小鼠实验得到证实。然而,用于启动应答的启动免疫原(priming immunogen)未能激活和扩增在具有多克隆抗体库(repertoires)的动物中表达bNAb的推断前体(inferred precursor)的B细胞。事实上,几乎所有bNAb的iGL都无法结合天然样HIV-1免疫原或中和HIV-1毒株。因此,HIV-1疫苗开发的关键目标已在于设计在具有多克隆库的动物(包括灵长类动物)中募集表达bNAb前体的B细胞至GC反应的免疫原。

[0009] 为此,针对免疫原设计的种系靶向方法已聚焦在产生以高亲和力与特定bNAb前体结合的免疫原上,其基本原理是B细胞募集至GC部分取决于受体对抗原的亲和力。然而,这种方法在质量和数量上有效地限制了所募集B细胞的库。而且,它无法解释以下发现:每个GC均能容纳(accommodate)具有宽范围亲和力的多种不同的创始(founder) B细胞,并且GC进入受限于竞争而非绝对亲和力。一种替代方法是设计增强所靶向表位的可用性同时掩蔽脱靶位点的免疫原。这种方法与种系靶向的不同之处在于它与特定种系抗体对抗原的亲和力无关。相反,它旨在募集和扩增对靶位点特异的不同组的前体。两种方法皆旨在产生扩增

的B细胞克隆,其随后可以通过序贯免疫原而被加强,以指导bNAb产生。迄今为止,这些方法均未显示能在野生型动物中扩增对目标HIV-1靶标特异的B细胞克隆。

[0010] 因此,迫切需要能够刺激对人免疫缺陷病毒(HIV)的免疫应答的免疫原,例如通过扩增对目标HIV-1靶标特异的B细胞克隆的方式。

发明内容

[0011] 本文件中描述的多个实施方案通过提供HIV免疫原及其用途来解决上述未满足的需求和/或其他需求。

[0012] 在一个方面,本公开涉及一种刺激有此需要的受试者的免疫应答(例如,HIV免疫应答)的免疫原。该免疫原包含具有与选自SEQ ID NO:2、4、6、8、11和13组成的组的序列至少75%同一的序列的多肽。多肽包含在对应于SEQ ID NO:1的N133、N137和N156的位置的取代。在一个实例中,多肽包含N156Q取代或N156的保守性取代。在另一个实例中,多肽包含V134Y、T135A、I138L、T139L、D140S、D141N、T320F、Q328M、T415V取代或其保守性取代。

[0013] 上述免疫原以(例如 K_D 约50 μ M或更小的)亲和力与广泛中和抗体结合。广泛中和抗体的实例可包括10-1074和PGT121广泛中和抗体。

[0014] 编码上述多肽的分离的核酸、包含该核酸的载体和包含该核酸的宿主细胞也在本发明的范围内。宿主细胞可以用于生产多肽的方法中。该方法包括在允许表达由核酸编码的多肽的条件下在培养基中培养宿主细胞,和从培养的细胞或细胞的培养基中纯化多肽。

[0015] 在另一个方面,本公开提供了包含至少一种上述多肽的蛋白复合物和包含至少一种上述多肽的病毒颗粒。

[0016] 在另一个方面,本公开提供了一种刺激有此需要的受试者的免疫应答的免疫原性组合物。该免疫原性组合物包含(i)上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒;和(ii)药学上可接受的载体。该方法可以进一步包括施用组合物两次或更多次。组合物的施用可以导致血清中能够识别V3-聚糖表位的广泛中和抗体的数量增加。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了一种刺激有此需要的受试者的免疫应答的方法。该方法包括向受试者施用有效量的包含上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒样颗粒(VLP)或其组合的组合物。

[0018] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗或预防有此需要的受试者中的HIV感染的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒,或其组合。在一些实施方案中,该方法还可包括向受试者施用治疗有效量的抗病毒剂。

[0019] 在另一个方面,本公开提供了上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒或其组合在制备用于治疗或预防受试者中的HIV感染的药物中的用途。

[0020] 在另一个方面,本公开提供了一种检测或分离感染了HIV-1的受试者中的HIV-1结合抗体的方法。该方法包括:(i)提供上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒,或其组合;(ii)使免疫原性组合物与一定量的来自受试者的体液接触;和(iii)检测HIV-1结合抗体与多肽的结合,从而检测或分离受试者中的HIV-1结合抗体。

[0021] 在另一个方面,本公开提供了一种用于刺激受试者的免疫应答的试剂盒。该试剂盒包含(i)一个或多个单位剂量的上述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒;(ii)

施用所述多肽、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒的说明书;和(iii)任选地,佐剂。

[0022] 本公开还提供了一种分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含具有与表4、5、6、7、9、10和11中列出的多肽序列至少75%同一的序列的互补决定区。

[0023] 包含所述分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物也在本公开范围内。

[0024] 在另一个方面,本公开提供了一种预防或治疗HIV感染或与HIV相关的疾病的方法,包括以下步骤:(i)鉴定需要这样的预防或治疗的患者,和(ii)向所述患者施用包含治疗有效量的至少一种上述抗HIV抗体或其抗原结合部分的第一治疗剂。本公开进一步提供了一种包含药学上可接受的剂量单位的药学有效量的至少一种上述分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分的试剂盒。

[0025] 在以下描述中详述了本发明的一个或多个实施方案。根据说明书和权利要求书,本发明的其他特征、目的和优点将是显而易见的。

附图说明

[0026] 图1a、1b和1c显示了RC1免疫原的特征化。图1a显示了wtBG505、11MUTB和RC1 Env三聚体的V3-聚糖斑(glycan patch)中的N-聚糖(有色球体)和GDIR基序(SEQ ID NO:15)(红色表面)的位置。聚糖的坐标以从由上至下的方向定位在wtBG505 Env三聚体结构(PDB 5T3Z)(N137聚糖来自PDB 5FYI)的表面表示上。图1b显示了与10-1074Fab复合的wtBG505(PDB 5T3Z)(左)和RC1(右)(4.0Å低温-EM结构)结构的比较。侧面显示Env三聚体-Fab复合物为表面表示,其中聚糖原子为有色球体。中小图显示了10-1074与wtBG505和RC1的复合物的方框区域的特写叠加。蛋白区域显示为卡通表示(10-1074V_H和V_L为深紫色和浅紫色,Env GDIR区域(SEQ ID NO:15)为红色,RC1的其他部分为小麦色,wtBG505为灰色,且wtBG505结构中的N156聚糖坐标显示为橙色球体。显示结构之间的最大移位的V1区域(gp120残基139-140)的位置表示为具有显示移位的箭头的点。V1残基149-151在RC1结构中是有序的,而在wtBG505结构中不是。图1c显示了将PGT121和10-1074的共同iGL的Fab注入所示固定的Env三聚体的实验中所显示的SPR结合数据(R_{eq},平衡结合反应(equilibrium binding response),相对于所注入的蛋白浓度的对数)。N.B.=无高于背景的结合。

[0027] 图2a、2b、2c、2d、2e、2f、2g、2h、2i、2j、2k和2l显示了用RC1对野生型小鼠进行免疫激发了抗聚糖斑抗体。图2a是代表性ELISA结果,显示了在用11MUTB(左)免疫后和用RC1(右)免疫后,携带PGT121/10-1074iGL抗体的敲入小鼠的血清与11MUTB(左)和RC1(右)的结合。对照包括未经免疫的血清、纯化的PGT121和iGL-PGT121。图2b显示了图2a中ELISA的曲线下面积(AUC),但合并了每次使用3只小鼠的2次独立实验的结果。每个点代表一只小鼠的血清。图2d显示了来自用11MUTB(左)和RC1(右)免疫的野生型小鼠的血清分别与11MUTB和RC1的结合的代表性ELISA结果。图2d显示了如c中所示的ELISA的AUC,但合并了每次使用3只小鼠的2次独立实验的结果。每个点代表一只小鼠的血清。图2e显示了ELISA中来自用RC1免疫的一只代表性野生型小鼠的血清与RC1和RC1-聚糖K0的结合。图2f显示了如图2e中所示的RC1 ELISA对RC1-聚糖K0 ELISA的AUC之比。该图显示了每次使用经RC1免疫的2-3只小鼠的7次实验的合并结果。每个点代表一只小鼠。图2g显示了显示来自经11MUTB Δ 301免疫的野生型小鼠的血清与11MUTB Δ 301的结合的代表性ELISA结果。图2h显示了经RC1或RC1-

4fi11免疫的野生型小鼠的RC1 ELISA对RC1-聚糖KO ELISA的AUC之比。图2i是饼图,显示了通过IgV_H基因测序确定的RC1结合生发中心B细胞的克隆扩增。有色饼切片与克隆相关物的数量成正比。白色表示单个IgV_H序列。中心的数字表示所分析的重链的数量。图2j显示了图2i中未经免疫的小鼠和经RC1免疫的小鼠的IgH核苷酸突变。图2k显示了ELISA中获自经RC1免疫的小鼠的单克隆抗体与RC1和RC1-聚糖KO的结合。图2l显示了通过ELISA在所示的Env蛋白上对分离自经RC1免疫和RC1-4fi11免疫的野生型小鼠的Ab275_{MUR}和Ab276_{MUR}的结合模式进行特征化。图2l公开了“GAIA”为SEQ ID NO:16。

[0028] 图3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、3h、3i和3j是组图,显示了用RC1-4fi11 VLP对猕猴(macaque)进行免疫激发了类似于iGL bNAb的抗V3-聚糖斑抗体。图3a显示了RC1-4fi11 VLP的表示,其显示了RC1、spyttag、spycatcher和VLP。图3b显示了VLP(上)和RC1-4fi11-VLP(下)的电子显微照片。图3c显示了来自用RC1-4fi11 VLP、未经免疫的对照和单克隆抗体PGT121和3BNC117免疫的4只兔的血清与RC1(黑色)和RC1-聚糖KO(灰色)的结合,显示为ELISA曲线下面积(AUC)。图3d显示了来自用RC1-4fi11 VLP免疫的8只恒河猴(Rhesus macaque)的血清、未经免疫的对照和单克隆抗体PGT121和3BNC117与RC1(黑色)和RC1-聚糖KO(灰色)的结合,显示为ELISA曲线下面积(AUC)。图3e是代表性流式细胞点图,显示了未经免疫的(左)和经免疫(右)的猕猴的猕猴生发中心B细胞与RC1-PE(Y轴)和RC1-AF647或RC1-聚糖KO(X轴)的结合。图3f显示了来自4只未经免疫的或4只经免疫的猕猴的淋巴结样本的生发中心中的所有B细胞中与RC1结合但不与RC1-聚糖KO结合的百分比,通过流式细胞术测定。图3g是饼图,显示了通过IgH基因测序确定的RC1结合生发中心B细胞的克隆扩增。中心的数字表示所分析的IgV_H序列的数量。图3h显示了图3g中所有序列的IgV_H突变,每个点代表一个IgV_H。图3i显示了PGT121/10-1074的CDRL3的iGL序列(SEQ ID NO:446)和从与经免疫的猕猴GC B细胞结合的RC1克隆的GC B细胞的所有IgL链的标识图(logo plot)。图3j显示了从来自4只未经免疫的和4只经RC1免疫的猕猴的GC B细胞克隆的IgL CDR3序列的部分,其显示DSS样基序。

[0029] 图4a、4b、4c、4d和4e显示来自用RC1-4fi11 VLP免疫的猕猴的单克隆抗体与V3-聚糖斑结合。图4a显示了单克隆猕猴抗体与RC1和RC1-聚糖KO-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)结合的ELISA结果。对照为10-1074和3BNC1 17。图4b显示了V3-聚糖斑特异性猕猴抗体的IgH CDR3长度。图4c显示了V3-聚糖斑特异性猕猴抗体的IgV_H和IgV_L区域中的一些核苷酸突变。图4d显示了所示蛋白对抗体Ab876_{NHP}、Ab897_{NHP}、Ab933_{NHP}、Ab936_{NHP}、Ab1170_{NHP}、3BNC117和10-1074的ELISA的曲线下面积(AUC)。图4e公开“GAIA”为SEQ ID NO:16。

[0030] 图5a、5b和5c显示了10-1074和所激发的与RC1免疫原结合的抗体的结构比较。图5a显示了10-1074Fab与其他V3-聚糖斑bNAb Fab(PGT128和PGT135;PDB 5AC0和4JM2)(左)、Ab275_{MUR}(左二)、Ab874_{NHP}(左三)和Ab897_{NHP}(右)相比的结合方向的俯视图。Env和Fab结构显示为卡通表示。图5b(上小图)显示了与RC1三聚体的一个单体(protomer)上的V3-聚糖斑结合的10-1074(左)和所激发的抗体Fab(右三小图)的V_H-V_L结构域(来自与RC1 Env三聚体结合的10-1074(左)、Ab275_{MUR}(左二)、Ab874_{NHP}(左三)和Ab897_{NHP}(右)复合物的冷冻-EM结构)。gp120上的GDIR残基(SEQ ID NO:15)以红色突出表示,且聚糖坐标显示为有色球体。图5b(下小图)显示了上小图中复合物的90°旋转,以显示具有以环突出表示的CDR的抗体结合位点和gp120聚糖(有色球体)以及定位在抗体结合位点上的来自RC1的GDIR(SEQ ID NO:15)

(红色)区域的俯视图。图5c显示了GDIR基序(SEQ ID NO:15)与10-1074和其与所激发的抗体的相互作用的比较。

[0031] 图6a和6b显示了通过用ELISA评估RC1与bNAbs的相互作用对RC1进行特征化。图6a显示,与BG505相比,与N156聚糖32相互作用的V1-V2-特异性bNAbs显示与RC1的结合减少,且缺少N156 PNGS增强了PGT121和10-1074的中和作用。图6b显示了靶向V3-聚糖表位、CD4结合位点或gp120-gp41界面的bNAbs与RC1的结合和其与BG505的结合相似。

[0032] 图7a、7b、7c和7d显示了RC1分别与10-1074(图7a)、Ab874_{NHP}(图7b)、Ab275_{MUR}(图7c)和Ab897_{NHP}(图7d)的抗原结合片段(Fab)复合的RC1的单粒子冷冻-EM研究。

[0033] 图8显示了来自经RC1免疫的小鼠的血清与11MUTB交叉反应,但不与更天然的10MUT Env或BG505交叉反应。

[0034] 图9a、9b、9c、9d和9e显示了RC1和RC1-4fi11的特征化及其对脱靶位点的应答。

[0035] 图10显示了由RC1和RC1-4fi11在野生型小鼠中激发的体液应答的特征化。对来自与RC1结合但不与RC1-聚糖K0结合的单GC B细胞的抗体基因进行测序。

[0036] 图11a、11b、11c和11d显示了RC1和RC1-4fi11使野生型小鼠中的V3-聚糖斑特异性B细胞扩增。从经RC1(Ab275_{MUR})或RC1-4fi11(Ab276_{MUR})免疫的小鼠分离的抗体均结合11MUTB,但不结合BG505或覆盖(covers) V3环的冠的肽(图11a)。Ab275_{MUR}以约30nM的K_d结合RC1(图11b)。重要的是,Ab275_{MUR}保留了与11MUTB的结合(K_d约230nM),证明它可以容纳N156聚糖(图11c)。获得的突变对于结合至关重要,因为向iGL序列的回复导致与RC1的结合丧失(图11d)。

[0037] 图12显示了VLP-RC1-4fi11在兔和猕猴中激发V3-聚糖斑抗体。来自用RC1-4fi11 VLP初免的猕猴的血清显示与更天然样免疫原11MUTB和10MUT的结合序贯降低。

[0038] 图13a、13b、13c、13d、13e、13f、13g、13h、13i和13j(统称为“图13”)是组图,显示了免疫原(包括RC1-3fi11)的特征化。图13a是图表,显示了RC1、RC1-3fi11和RC1-4fi11免疫原的尺寸排阻色谱(SEC)迹线。图13b提供了每种免疫原在HEK293T 6E细胞中1L表达的代表性产量。图13c、13d、13e和13f是组图,显示了RC1和RC1-3fi11免疫原的SEC曲线和电子显微照片。图13g显示了AP205-RC1-VLP和AP205-RC1-3fi11-VLP的纯化的代表性SEC曲线。图13d显示了AP205-RC1-VLP(左)和AP205-RC1-3fi11-VLP(右)的电子显微照片。图13e显示了mi3-RC1-NP和mi3-RC1-3fi11-NP的纯化的代表性SEC曲线。图13f显示了mi3-RC1-NP(左)和mi3-RC1-3fi11-NP(右)的电子显微照片。图13f和13h显示了AP205-RC1-VLP(图13f)和mi3-RC1-NP(图13h)两者的初始纯化,以及在28天(AP205)和11天(mi3)回注样品的SEC曲线。图13i和13j显示了来自用mi3-RC1-NP(图13i)或mi3-RC1-3fi11-NP(图13j)免疫的6只WT小鼠的血清、未经免疫的对照以及单克隆抗体10-1074和3BNC117与RC1和RC1-聚糖K0的结合,显示为ELISA曲线下面积(AUC)。

具体实施方式

[0039] 所公开的刺激受试者的免疫应答的免疫原基于出人意料的发现,即新免疫原RC1及其变体激活在多克隆库中表达bNAbs的前体的B细胞。

[0040] 广泛中和抗体(bNAbs)保护使免受HIV-1感染,表明激发它们的疫苗将是有效的。然而,主要障碍之一是疫苗接种不激发bNAbs,部分因为表达种系bNAbs前体的B细胞对天然样

HIV-1包膜(Env)抗原无应答。因此,本公开提供了促进对HIV-1Env上V3-聚糖斑的识别同时掩蔽非保守性免疫优势区域(例如通过在病毒样颗粒上添加聚糖和/或进行多聚化)的免疫原。本公开证明,用所公开的免疫原(例如,RC1、RC1-4fi11、RC1-3fi11)对小鼠、兔和恒河猴进行免疫激发了靶向V3-聚糖斑的血清学应答。此外,抗体-Env复合物的抗体克隆和冷冻-EM结构证实,RC1免疫使携带类似于人bNAbs的预测前体的抗V3-聚糖斑抗体的B细胞克隆扩增。因此,所公开的免疫原,例如RC1,是用于序贯疫苗接种策略以刺激受试者的免疫应答(例如,HIV免疫应答)的合适的启动免疫原。

[0041] I. 免疫原和免疫原性组合物

[0042] A. 多肽

[0043] 本公开提供了一种刺激有此需要的受试者的免疫应答(例如,HIV免疫应答)的免疫原及其变体。在一些实施方案中,免疫原包含位于HIV表面上的HIV包膜蛋白的一部分,即gp120。gp120是在其羧基末端区域锚定在双层膜中的HIV包膜蛋白gp160的N末端区段。gp120伸入病毒体(virion)周围的水环境中,而其C端对应物gp41则跨膜。gp120分子由60,000道尔顿的多肽核心组成,其通过N-连接糖基化被广泛修饰以增加分子的表观分子量至120,000道尔顿。gp120的氨基酸序列含有五个相对保守的结构域,其间散布有五个高变结构域。gp120一级序列(primary sequence)中的18个半胱氨酸残基的位置和gp120序列中约24个N-连接糖基化位点中的13个的位置在所有gp120序列中是共有的。

[0044] 在一些实施方案中,免疫原可包含gp120的Env V3区域。gp120的Env V3区域涵盖V3-聚糖斑表位,其包含围绕Env V3区域的一组高甘露糖和复杂型N-聚糖。在V3-聚糖斑表位中,糖基化通常发生在gp120残基N133、N137、N156、N295、N301、N332、N339、N385和N392处。bNAb,例如PGT121、10-1074和BG18,靶向V3-聚糖斑表位。它们使用延长的CDRH3环以及CDRL1和CDRL3的部分穿过聚糖,以接触位于V3环基部(base)的高度保守的GDIR基序(G324-D325-I326-R327)(SEQ ID NO:15)。

[0045] 在一些实施方案中,免疫原可包含gp120的Env V3区域中的一个或多个修饰。免疫原包含具有与选自由表1中列出的SEQ ID NO:2、4、6、8、11和13组成的组的序列至少75%同一的序列的多肽。多肽可包含Env区域中的一个或多个糖基化位点(例如N133、N137、N156、N295、N301、N332、N339、N385和N392)的取代。例如,多肽可包含在对应于SEQ ID NO:1的N133、N137和N156的位置处的取代。在一个实例中,多肽包含N156Q取代或N156的保守性取代。在另一个实例中,多肽,例如RC1(SEQ ID NO:2;表1),包含在N133、N137和N156处的缺失以及其他取代,包括V134Y、T135A、I138L、T139L、D140S、D141N、T320F、Q328M和T415V。如将在实施例中说明的,所公开的免疫原,例如RC1,在小鼠、兔和猕猴中激活和扩增表达类似于人V3-聚糖bNAb前体的抗体的多种B细胞。

[0046] 表1:HIV免疫原的序列

[0047]

SEQ ID NO.	序列	其他信息
SEQ ID NO: 1	<u>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRRGARA</u>ENLWVTV YYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQE IHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL QCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVV QINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGF AILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPWSTQLLLNGSLAEEEV IRSENITNNAKNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD IIGDIRQAHC<u>N</u>VSKATWNETLGKWKQLRKHFGNNTIIRFANSSGGDL EVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPC RIKQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTET FRPGGDMRDNRSELYKYWKIEPLGVAPTR<u>C</u>KRRVVG<u>RRRRR</u> <u>R</u>AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSLL RA<u>P</u>EAQQHLLKLT VWGIKQLQARVLAVERYLRDQQLLGIWGCSGK LIC<u>C</u>TNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEE SQNQQEKNEDLLALD	11MUTB (SOSIP.664) 衍生自 wtBG505 (对 wtBG505 所 做的改变以 下划线和粗 体表示)
SEQ ID NO: 2	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVWKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNM WKNNMVEQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGT GPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEVIRSENITNNAKNIL VQLNTPVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNV SKATWNETLGKVVKQLRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGG	RC1

[0048]

	EFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRKQIINMWQRI GQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRD NWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRRVGRRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQHLLK DTHWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLLGIWGCSGKLICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQD LLALD	
SEQ ID NO: 3	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCAGTGTGATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGC GCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTTC CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCAACCTTTTGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG GATAAGAAGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAGCGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGCA AGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAAGGTGGTCAAACAGTTG CGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCGGTTTGCCAGTCT TCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT GGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCA ACGACAGCATCGTCTTGCCCTTGTCGAATCAAGCAGATCATTAAATA TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG GAGTCATTGCGTGCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAAACTTTCCGCCCA	RC1

[0049]

	GGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA GTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAACTA GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA GTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCCTGGGTGCTGCCGGC AGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTGAG AGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTG GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCT GGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG CTTGCCCTTGACTGA	
SEQ ID NO: 4	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVWKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNM WKNNMVEQMHEIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGT GPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE EEEVIIRSENITNNAKNIL VQLNTPVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGKVVKQLRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGG EFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRI GQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGDMRD NWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSNLLRAPEPQQHLLK DTHWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLLGIWGC SGKLICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQKEKNEQD LLALDGGGGSGGGSGGGSGSGAHIVMVDAYKPTK	RC1 spytag
SEQ ID NO: 5	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCAGTGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGCGCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAACATG TGGA AAAACAACATGGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTTC CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCAACCTTTTGAG	RC1 spytag

[0050]

TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC
 CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG
 GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA
 ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC
 GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG
 ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG
 GATAAGAAGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAGCGTTTCAACG
 GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC
 CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG
 CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA
 TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT
 GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG
 AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGCA
 AGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAAGGTGGTCAAACAGTTG
 CGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCGGTTTGCCAGTCT
 TCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA
 GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT
 GGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCCACCGGTAGCA
 ACGACAGCATCGTCTTGCCCTTGTCGAATCAAGCAGATCATTAA
 TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG
 GAGTCATTTCGGTTCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA
 GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAAACTTTCCGCCCA
 GGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA
 GTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAACTA
 GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA
 GTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCCTGGGTGCTGCCGGC
 AGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG
 GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTGAG
 AGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG
 GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC
 TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA
 CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC
 AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTG
 GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCCT
 GGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG
 CTTGCCCTTGACGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGATCTGGCGGT
 GGGAGCGGTTTCGGGAGCCCATATAGTGATGGTTGATGCCTATAAA
 CCGACCAAGTGA

[0051]

SEQ ID NO: 6	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVWKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNM WKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKNKTFNGT GPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEVIRSENITNNAKNIL VQLNTSVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGNVSKQLRKHFNGNTIIRFAQSSGGDLEVTTTHSFNCGGE FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRIG QAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDN WRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLGF LGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSNLLRAPEPQQHLLKD THWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLGIWGC SGK LICCTNPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQKEKNEQD LLALD	RC1-4fill
SEQ ID NO: 7	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCAGTGTGATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGC GCCTCCGACGCTAAAGCATA CGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTCT CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACAAGTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCG TGAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCG GAGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGC AAGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGCAAACAGTT	RC1-4fill

[0052]

	GCGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCGGTTTGCCAGTC TTCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGG AGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTAC ATGGATCTCAAATACCAAGTGTCCAGGGGTCAAATCCACCGGTAG CAACGACAGCATCGTCTTGCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTA TATGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACA GGGAGTCATTTCGGTGCCTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCAC CAGAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCC CAGGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTAT AAGTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAAC TAGATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAG CAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCG GCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCC CGGAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTG AGAGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTG GGGCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATT CCTGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAA AACTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAA ACAGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAG TGGGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTC CTGGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCT GCTTGCCCTTGACTGA	
SEQ ID NO: 8	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVWKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNWATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNM WKNNMVEQMHEIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKNKTFNGT GPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEVEIIRSENITNNAKNIL VQLNTSVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGNVSKQLRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTSHFNCGGE FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRIG QAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDN WRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRRAVGIGAVSLGF LGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSNLLRAPEPQQHLLKD THWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLGIWGC SGK LICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQD LLALDGGGGSGGSGGGSGSGAHIVMVDAYKPTK	RC1-4fill spytag

[0053]

SEQ ID NO: 9	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCACGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGCGCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTT CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCAACCTTTTGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACAAGTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACCCG TGAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCG GAGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGC AAGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGCAAACAGTT GCGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCGGTTTGCCAGTC TTCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGG AGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTAC ATGGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCCACCGGTAG CAACGACAGCATCGTCTTGCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTA TATGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACA GGGAGTCATTTCGGTTCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCAC CAGAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCC CAGGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTAT AAGTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAAC TAGATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGAGACGGCGGCGGAGAG CAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCG GCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCC CGGAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTG AGAGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTG	RC1-4fill spytag
-----------------	---	---------------------

[0054]

	GGGCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACCTGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAACTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAACAGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTGGGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCTGGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTGCTTGCCCTTGACGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGATCTGGCGGTGGGAGCGGTTTCGGGAGCCCATATAGTGATGGTTGATGCCTATAAACCGACCAAGTGA	
SEQ ID NO: 10	KGKGKGKGKGCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHC	V3 环-共有的 C 肽
SEQ ID NO: 11	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNWATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSNMRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKNKTFNGTGPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE EEEVIIRSENITNNAKNILVQLNTPVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNVSKATWNETLGNVSKQLRKHFNGNTIIRFAQSSGGDLEVTTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCR KQIINMWQRIGQAMYAPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRRAVGIGAVSLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSNLLRAPEPQQHLLKDTHWGIKQLQARVLA VEHYLRDQQLLGIWGCSGKLICCTNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD	RC1-3fill
SEQ ID NO: 12	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGGGTCACTGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACAACACTCTTTTGCGCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGAGAAGCACAACTGTGGGCGACCCATGCCGTGTCCCTACAGACCCTAACCTCAGGAAATTCATCTTGA AAATGTCACAGAAGAGTTTAACATGTGGAAAAACAACATGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTCCCTGTGGGACCA GAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCTGTGCGTGA CTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCAACCTTTGAGTAAT	RC1-3fill

[0055]

ATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC
CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCT
ACCGGCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAA
TAGAAGCAACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAAT
TGCAATACCAGCGCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAG
CTTTGAGCCAATCCCGATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTT
CGCTATACTGAAATGCAAGAATAAGACGTTTAATGGGACAG
GCCCTTGCCCTAACGTTTCAACGGTCCAATGTACCCACGGG
ATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTCCTGCTGAACGGCAG
CCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAGCGAGAACATA
ACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAATACACC
TGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGTGA
AGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTC
GGAGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGT
GAGCAAGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGC
AAACAGTTGCGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCG
GTTTGCCAGTCTTCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTC
ATAGCTTCAACTGTGGAGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACAT
CAGGCCTGTTCAACTCTACATGGATCTCAAATACCAGTGTC
CAGGGGTCAAATTCCACCGGTAGCAACGACAGCATCGTCTT
GCCTTGTCGAATCAAGCAGATCATTAAATATGTGGCAGAGGA
TTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGGGAGTCATT
CGGTGCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCAGAGA
TGCGGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCCCAG
GAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTA
TAAGTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGC
CAACTAGATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCG
GCGGAGAGCAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCC
TGGGTGCTGCCGGCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACG
CTCACAGTGCAGGCCCCGAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCA
ACAACAAAGCAATCTGTTGAGAGCCCCGGAACCGCAGCAA
CATCTGTTGAAGGACACACATTGGGGCATCAAGCAGCTGCA
AGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACCTGAGAGACCAAC
AGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAACCTGATCTGC
TGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAACAGGAA
CCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTGGG
ACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTC

[0056]

	CTGGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGG ATCTGCTTGCCCTTGACTGA	
SEQ ID NO: 13	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYYGVPVW KDAETTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQEIHLE NVTEEFNMWKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL QCTNYAPNLLSNMRGELKQCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRL DVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIH YCAPAGFAILKCKNKT FN GTGPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQL LLNGSLAEEEVIRSENITNNAKNILVQLNTPVQINCTRPNNNTV KSIRIGPGQAFYYFGDIIGDIRMAHCNVSKATWNETLGNVSKQ LRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFN STWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCR KQIINMWQRIGQAMYAP PIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNWS ELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQ HLLKDTHWGIKQLQARVLA VEHYLRDQQLGIWGC SGKLI CC TNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIHYGLLE ESQNQQEKNEQDLLALDGGGGSGGGSGGGSGGAHIVMVDA YKPTK	RC1-3fill- Spytag
SEQ ID NO: 14	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTC ACTGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGCGCCTCCGACGCTAAAGCATAACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAACATG TGGA AAAACAACATGGTGG AACAGATGCACGAGGATATCATTTTC CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGCGAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC	RC1-3fill- Spytag

[0057]

CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG
 CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA
 TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT
 GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG
 AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGCA
 AGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGCAAACAGTTG
 CGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCGGTTTGCCAGTCT
 TCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA
 GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT
 GGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCA
 ACGACAGCATCGTCTTGCCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTATA
 TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG
 GAGTCATTTCGGTGCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA
 GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAAACTTTCCGCCCA
 GGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA
 GTATAAGGTGGTGAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAACTA
 GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA
 GTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCCTGGGTGCTGCCGGC
 AGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG
 GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTGAG
 AGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG
 GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC
 TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA
 CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC
 AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTG
 GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCCT
 GGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG
 CTTGCCCTTGACGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGATCTGGCGGT
 GGGAGCGGTTTCGGGAGCCCATATAGTGATGGTTGATGCCTATAAA
 CCGACCAAGTGA

[0058] 以上HIV免疫原的氨基酸或核酸序列包含在N-末端(对于氨基酸序列)或在5'末端(对于核酸序列)的分泌前导序列。分泌前导序列是一般分泌信号,且不是最终/成熟表达蛋白的一部分。如本领域普通技术人员将理解的,其他分泌前导序列也可以用于产生相同的最终/成熟HIV免疫原。

[0059] 表2:免疫原变体和特异性修饰

[0060]

蛋白	PNGS		其他修饰	目的
	缺失	添加		
RC1	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	免疫 /ELISA
RC1-3fill	133, 137, 156	N230, N241, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	免疫 /ELISA
RC1-4fill	133, 137, 156	N230, N241, N289, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	免疫 /ELISA
RC1-聚糖 KO	133, 137, 156, 301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, H330A, MD39*	ELISA
RC1-聚糖 KO-GAIA ("GAIA"公开为 SEQ ID NO: 16)	133, 137, 156, 301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, GDIR (SEQ ID NO: 15) /GAIA (SEQ ID NO: 16), H330A, MD39*	ELISA
RC1-GAIA ("GAIA"公开 为 SEQ ID NO: 16)	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, GDIR (SEQ ID NO: 15) /GAIA (SEQ ID NO: 16), MD39*	ELISA
11MUTBD301	133, 137, 301	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	免疫 /ELISA

[0061]

RC1D301	133, 137, 156, 301	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	ELISA
RC1D332	133, 137, 156, 332		V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	ELISA
11MUTB	133, 137	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	免疫 /ELISA
10MUT	133, 137	-	V134Y, T135A, N136P, N137F, I138L, T139I, D140N, T320F, Q328M, MD39*	ELISA
7MUT	133, 137	-	V134Y, T135A, N136P, N137F, I138L, T139I, D140N, MD39*	ELISA
5MUT	-	-	V134Y, N136P, I138L, D140N, MD39*	ELISA
BG505	-	-	MD39*	ELISA
RC1-4fill VLP	133, 137, 156	N230, N241, N289, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, Spytag, MD39*	免疫
RC1-Avitag	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, Avitag, MD39*	分选
RC1-聚糖 KO-Avitag	133, 137, 156, 301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N,	分选

[0062]

			T320F, Q328M, T415V, H330A, Avitag, MD39*	
--	--	--	--	--

[0063] “多肽”以其常规含义使用,即意指氨基酸的序列。多肽不限于特定长度的产物。

肽、多肽和蛋白均包括在多肽的定义内,并且此类术语在本文中可以互换使用,除非另有明确指出。这个术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等,以及本领域已知的天然存在和非天然存在的其他修饰。多肽可以是完整的蛋白或其子序列。本文中使用的术语多肽“变体”,是通常与本文中具体公开的多肽不同在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入的多肽。这样的变体可以是天然存在的,或者可以是合成产生的,例如,通过修饰一种或多种本公开的以上多肽序列并评估本文所述的多肽的一种或多种生物学活性和/或使用本领域公知的一些技术的任一种。

[0064] 例如,在蛋白结构中,某些氨基酸可以代替其他氨基酸,而不显著丧失其结合其他多肽(例如抗原)或细胞的能力。由于决定蛋白的生物学功能活性的是蛋白的结合能力和性质,因此可以在蛋白序列和相应地其基础DNA编码序列中进行某些氨基酸序列取代,从而获得具有相似性质的蛋白。因此,预期可以对所公开的组物的肽序列或编码所述肽的相应DNA序列进行各种改变,而不显著丧失其生物学用途或活性。

[0065] 变体序列包括其中已经通过修饰编码本公开的多肽的多核苷酸而引入保守性取代的那些序列。可以根据物理性质以及对二级和三级蛋白结构的贡献将氨基酸分类。这样的保守性修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0066] “序列同一性”或“同源性”是指在比对序列并引入空位(如必要)以实现最大百分比同源性后,多核苷酸或多肽序列变体中与非变体序列相同的残基的百分比。在具体的实施方案中,多核苷酸和多肽变体与本文所述的多核苷酸或多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的多核苷酸或多肽同源性。

[0067] 多肽变体序列可以与本公开中所述的序列具有70%或更高(即80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多)的序列同一性。多肽变体还可包括包含各种长度的本文公开的氨基酸序列的连续区段的多肽片段。多肽变体序列包含本文中公开的一个或多个序列的至少约5个、10个、15个、20个、30个、40个、50个、75个、100个、150个或更多个连续的肽,以及其间的的所有中间长度。

[0068] 上述免疫原可以与bNAbs特异性结合。bNAbs是中和多种HIV-1病毒株的中和抗体。bNAbs的独特之处在于它们靶向病毒的保守性表位。广泛中和抗体的实例可包括但不限于VRC26.25、PCT64-24E、VRC38.01、PG9、PGDM1400、CH01、BG18、DH270.1、DH270.6、PGDM12、VRC41.01、PGDM21、PCDN-33A、BF520.1、VRC29.03、PGT121、10-1074、N49-P7、N6、NC-Cow1、IOMA、CH235、CH235.12、b12、VRC01、3BNC117、CH103、VRC-PG05、VRC34.01、ACS202、PGT151、35022、8ANC195、DH511.11P。在这些bNAbs中,BG18、DH270.1、DH270.6、PGDM12、VRC41.01、PGDM21、PCDN-33A、BF520.1、VRC29.03、PGT121、10-1074广泛中和抗体与V3聚糖特异性结合。在一些实施方案中,所公开的免疫原以解离常数(K_D)为约50 μ M或更小的亲和力与

PGT121或10-1074广泛中和抗体结合。

[0069] 术语“特异性结合”和“选择性结合”是指抗体结合预定抗原上的表位而不结合其他抗原。通常,抗体以约小于 10^{-6} M,例如约小于 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的平衡解离常数(K_D)结合,当通过以下测定时:例如,使用预定抗原,例如HIV-1病毒包膜上的表位,例如gp120作为分析物和抗体作为配体的ELISA、平衡透析或BIACORE®2000表面等离子共振仪中的表面等离子共振 (SPR) 技术,或对抗体与抗原阳性细胞结合的Scatchard分析,和(ii)以至少两倍于其与预定抗原或紧密相关的抗原以外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力的亲和力与预定抗原结合。

[0070] 在另一个方面,本公开提供了在病毒样颗粒(VLP)(例如,逆转录病毒样颗粒、HIV样颗粒)上多聚化的免疫原多肽。在本公开的上下文中,病毒样颗粒或逆转录病毒样颗粒是膜包围的结构,其包含嵌入在其中生产它们的宿主细胞的膜内的病毒包膜蛋白,和优选地,VLP中的其他病毒核心蛋白。这些VLP不含完整的病毒核酸,并且它们是非感染性的。理想地,在VLP的表面上有足够的包膜蛋白,使得当将VLP制剂配制成为免疫原性组合物并施用给动物或人时,会产生免疫应答(细胞介导的或体液的)。理想地,与天然存在的病毒包膜蛋白相比,Env蛋白从羧基末端被截短。在本发明的上下文中,“截短的”包膜蛋白是含有少于全长细胞质结构域的蛋白,但其保留了被针对会产生免疫应答,优选保护性免疫应答的表面抗原决定簇,并且其保留了足够的包膜序列以用于合适的前体处理和膜插入。技术人员可以使用公众容易获得的重组DNA技术和病毒编码序列来生产截短的病毒包膜蛋白。例如,可以将病毒包膜蛋白的编码序列工程化以在杆状病毒表达载体中表达,例如使用市售的杆状病毒载体,在病毒启动子的调控下,对序列进行适当的修饰,以实现编码序列与调节序列的功能化连接,以及将编码包膜蛋白胞质结构域的编码序列的部分截短(缺失),仍通过使用合适的翻译终止信号和使截短的包膜及相关片段有效地剪接进载体的序列。具体示例性的截短的SIV包膜蛋白缺少位于天然存在的SIV包膜蛋白羧基末端的89个氨基酸。

[0071] 在另一个方面,本公开提供了一种蛋白复合物,其包含至少一种经由共价或非共价键合/相互作用(例如,范德华相互作用)多聚化的上述免疫原多肽。例如,两个或更多个免疫原多肽可以通过一种或多种交联剂交联。交联剂是具有能与蛋白或其他分子上的特定官能团(例如伯胺或巯基)反应的末端的试剂。交联剂能够通过共价键连接两个或更多个分子。交联剂包括但不限于胺-胺交联剂(例如,双琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS))、胺-巯基交联剂(例如,N- γ -马来酰亚胺基丁酰-氧琥珀酰亚胺酯(GMBS))、羧基-胺交联剂(例如二环己基碳二亚胺(DCC))、巯基-碳水化合物交联剂(例如N- β -马来酰亚胺丙酸酐肼(BMPH))、巯基-巯基交联剂(例如1,4-双马来酰亚胺基丁烷(BMB))、光反应性交联剂(例如,N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOS))、化学选择性连接交联剂(例如,NHS-PEG4-叠氮化物)。

[0072] B. 核酸

[0073] 本公开的另一个方面的特征在于一种分离的核酸,其包含编码上述多肽或蛋白的序列。核酸是指DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如mRNA)或DNA或RNA类似物。DNA或RNA类似物可以从核苷酸类似物合成。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0074] “分离的核酸”是指其结构与任何天然存在的核酸或天然存在的基因组核酸的任

何片段的结构均不相同的核酸。因此,该术语涵盖,例如,(a)具有天然存在的基因组DNA分子的一部分序列,但未侧接有在其天然存在的生物体的基因组中侧接那个分子部分的两个编码序列的DNA;(b)以所得分子不同于任何天然存在的载体或基因组DNA的方式并入载体或原核生物或真核生物的基因组DNA中的核酸;(c)单独的分子,例如cDNA,基因组片段,通过聚合酶链式反应(PCR)产生的片段,或限制性片段;和(d)作为杂合基因,即编码融合蛋白的基因的一部分的重组核苷酸序列。上述核酸可用于表达本发明的多肽、融合蛋白或抗体。为了这个目的,可以将核酸有效连接至合适的调控序列以产生表达载体。

[0075] 使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的单字母代码来显示本文公开的核酸和氨基酸序列。每个核酸序列仅显示一条链,但互补链应理解为通过任意引用包括在所展示的链中。

[0076] 本公开还包括含有所公开的免疫原的编码序列的载体,含有该载体的宿主细胞,和制备基本上纯的免疫原的方法,包括以下步骤:将免疫原的编码序列引入宿主细胞,并在合适的条件下培养宿主细胞,以生产和分泌免疫原。如此生产的免疫原可以以常规方式收获。因此,本发明还涉及表达本文公开的免疫原和生物学等同物的方法,采用这些基因产物的测定法,以及包含表达这些受体蛋白的DNA构建体的重组宿主细胞。

[0077] 所公开的免疫原可以通过以下进行重组表达:将编码免疫原的核酸分子克隆到含有合适启动子和其他合适转录调控元件的表达载体(例如pcDNA3.neo、pcDNA3.1、pCR2.1、pBlueBacHis2或pLITMUS28)中,并转移到原核或真核宿主细胞中以生产免疫原。用于此类操作的技术描述在Sambrook等,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual;Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York中,它们是公知的,并且对于本领域普通技术人员而言是容易获得的。因此,本发明的另一个方面包括已经工程化以含有和/或表达编码免疫原的DNA序列的宿主细胞。此类重组宿主细胞可以在合适的条件下培养以生产所公开的免疫原或生物学等价形式。重组宿主细胞可以是原核或真核的,包括但不限于细菌如大肠杆菌(E.coli),真菌细胞如酵母,哺乳动物细胞,包括但不限于人、牛、猪、猴和啮齿动物来源的细胞系,以及昆虫细胞,包括但不限于果蝇和蚕衍生的细胞系。

[0078] 例如,一种昆虫表达系统利用草地贪夜蛾(Spodopterafrugiperda)(Sf21)昆虫细胞(Invitrogen)与杆状病毒表达载体(pAcG2T,Pharmlngen)。另外,可能合适并且可商购的哺乳动物物种包括但不限于,L细胞L-M(TK~)(ATCC CCL 1.3)、L细胞L-M(ATCC CCL 1.2)、Saos-2(ATCC HTB-85)、293(ATCC CRL 1573)、Raji(ATCC CCL 86)、CV-1(ATCC CCL 70)、COS-1(ATCC CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、CHO-K1(ATCC CCL61)、3T3(ATCC CCL 92)、NIH/3T3(ATCC CRL 1658)、HeLa(ATCC CCL 2)、C127I(ATCC CRL 1616)、BS-C-1(ATCC CCL26)、MRC-5(ATCC CCL 171)和CPAE(ATCC CCL 209)。

[0079] 可以使用多种哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达重组免疫原。表达载体在本文中定义为在合适的宿主中转录克隆的DNA和翻译其mRNA所需的DNA序列。这样的载体可用于在多种宿主中表达真核DNA,所述宿主例如细菌、蓝绿藻、植物细胞、昆虫细胞和动物细胞。专门设计的载体可使DNA在宿主例如细菌-酵母或细菌-动物细胞之间穿梭。构建合适的表达载体应含有:用于在宿主细胞中自主复制的复制起点、可选择的标记、有限数量的有用限制性酶切位点、高拷贝数的潜力和有活性的启动子。启动子定义为指导RNA聚合酶结合DNA并启动RNA合成的DNA序列。强启动子是导致mRNA以高频率启动的启动子。

[0080] 表达载体可以包括但不限于克隆载体、修饰的克隆载体、专门设计的质粒或病毒。可适用于免疫原表达的市售哺乳动物表达载体包括但不限于pIRES-hyg (Clontech)、pIRES-puro (Clontech)、pcDNA3.neo (Invitrogen)、pcDNA3.1 (Invitrogen)、pCI-neo (Promega)、pLITMUS28、pLITMUS29、pLITMUS38和pLITMUS39 (New England Biolabs)、pcDNA1、pcDNA1amp (Invitrogen)、pcDNA3 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EB0-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460) 以及1ZD35 (ATCC 37565)。

[0081] 还可以使用多种细菌表达载体以在细菌细胞中表达所公开的免疫原。可适于免疫原表达的市售细菌表达载体包括但不限于pCR2.1 (Invitrogen)、pET11a (Novagen)、 λ gt11 (Invitrogen) 和pKK223-3 (Pharmacia)。

[0082] 另外,可以使用多种真菌细胞表达载体在真菌细胞中表达免疫原。可适用于表达重组免疫原的市售真菌细胞表达载体包括但不限于pYES2 (Invitrogen) 和毕赤酵母表达载体 (Invitrogen)。

[0083] 此外,可以使用多种昆虫细胞表达载体在昆虫细胞中表达重组受体。可适用于重组表达免疫原的市售昆虫细胞表达载体包括但不限于pBlueBac III和pBlueBacHis2 (Invitrogen) 以及pAcG2T (Pharminogen)。

[0084] 可通过包括但不限于以下的多种技术中的任一种将表达载体引入宿主细胞:转化、转染、原生质体融合和电穿孔。转化意指涵盖由于并入DNA而导致的靶细胞的遗传变化。转染意指包括本领域已知的用于将免疫原引入检测细胞中的任何方法。例如,转染包括磷酸钙或氯化钙介导的转染、脂质转染、电穿孔以及使用例如包含编码免疫原的核苷酸序列的病毒载体如重组逆转录病毒载体进行感染,及其组合。单独分析含表达载体的细胞,以确定它们是否产生免疫原。表达免疫原的细胞的鉴定可以通过多种手段进行,包括但不限于与特定bNAbs的免疫反应性、所标记的配体的结合以及关于免疫原的宿主细胞相关活性的存在。

[0085] 含有上述核酸的宿主细胞也在本发明的范围内。实例包括细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞。参见,例如,Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif.。为了生产本发明的多肽,可以在允许表达由本发明的核酸编码的多肽的条件下在培养基中培养宿主细胞,并从培养的细胞或细胞的培养基中纯化多肽。或者,本发明的核酸可以例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶在体外进行转录和翻译。

[0086] C. 组合物

[0087] 在另一个方面,本公开提供了一种刺激有此需要的受试者的免疫应答的免疫原性组合物。该免疫原性组合物包括(i) 上述的免疫原、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒;和(ii) 药学上可接受的载体。该方法可以进一步包括施用组合物两次或更多次。组合物的施用可以导致血清中能够识别V3-聚糖表位的广泛中和抗体的数量增加。

[0088] 免疫原性组合物是包含免疫原性肽的组合物,所述免疫原性肽诱导针对表达免疫原性肽的病毒的可测量的CTL应答,或诱导针对免疫原性肽的可测量的B细胞应答(例如抗体的产生)。在一个实例中,“免疫原性组合物”是包含衍生自gp120的所公开的免疫原或其

抗原性片段的组合物。它进一步指编码免疫原的分离的核酸,例如可用于表达免疫原(并因此用于激发针对这种多肽的免疫应答)的核酸。

[0089] 对于体外使用,免疫原性组合物可以由分离的蛋白、肽表位或编码蛋白或肽表位的核酸组成。对于体内使用,免疫原性组合物通常将包含药学上可接受的载体和/或其他试剂中的蛋白、免疫原性肽或核酸。任何具体的肽,例如所公开的免疫原,或编码该免疫原的核酸,均可以通过本领域公认的测定法容易地检测其诱导CTL或B细胞应答的能力。免疫原性组合物可以包含本领域技术人员公知的佐剂。

[0090] 无菌可注射组合物可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的溶液或悬浮液。这样的溶液包括但不限于1,3-丁二醇、甘露醇、水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。另外,常规采用不挥发油作为溶剂或悬浮介质(例如合成的甘油单酯或甘油二酯)。脂肪酸,例如但不限于油酸及其甘油酯衍生物,可用于制备注射剂,如天然药学上可接受的油,例如但不限于橄榄油或蓖麻油,其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液还可包含长链醇稀释剂或分散剂,例如但不限于羧甲基纤维素或类似的分散剂。为了配制目的,也可以使用其他常用的表面活性剂,例如但不限于TWEEN或SPANS或其他类似的乳化剂或生物利用度增强剂,其通常用于制备药学上可接受的固体、液体或其他剂型。

[0091] 用于经口施用的组合物可以是任何经口可接受的剂型,包括胶囊、片剂、乳剂和水性悬浮液、分散液和溶液。就片剂而言,常用的载体包括但不限于乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如但不限于硬脂酸镁。对于胶囊形式的经口施用,有用的稀释剂包括但不限于乳糖和干燥的玉米淀粉。当经口施用水性悬浮液或乳剂时,可以将活性成分悬浮或溶解在与乳化剂或悬浮剂结合的油相中。如需要,可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0092] 可以根据所述发明的用于局部施用的药物组合物配制为溶液、软膏剂(ointment)、乳剂、悬浮液、洗剂、粉末、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂或油剂。或者,局部用制剂可以是浸有活性成分的贴剂或敷料的形式,其可以任选地包含一种或多种赋形剂或稀释剂。在一些优选的实施方案中,局部用制剂包括会增强活性剂经皮肤或其他受累区域的吸收或渗透的物质。局部用组合物可用于治疗皮肤炎症性疾病,包括但不限于湿疹、痤疮、红斑痤疮(rosacea)、银屑病、接触性皮炎和对毒葛的反应。

[0093] 局部用组合物含有适用于皮肤的安全有效量的皮肤病学上可接受的载体。“化妆可接受的”或“皮肤病学上可接受的”组合物或组分是指适用于和人皮肤接触而没有过度毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等的组合物或组分。载体使活性剂和任选的组分能够以合适的浓度递送至皮肤。因此,载体可以用作稀释剂、分散剂、溶剂等,以确保将活性物质以合适的浓度施加并均匀地分布在所选目标上。载体可以是固体、半固体或液体。载体可以是洗剂、乳剂或凝胶的形式,尤其是具有足够的厚度或屈服点以防止活性物质沉积的形式。载体可以是惰性的或具有皮肤病学上的益处。它也应该与本文所述的活性成分在物理和化学上相容,并且不应过度地损害稳定性、功效或与组合物相关的其他使用益处。局部用组合物可以是本领域已知用于局部或经皮应用的形式的化妆品或皮肤病学产品,这些形式包括溶液、气雾剂、乳剂、凝胶、贴剂、软膏剂、洗剂或泡沫。

[0094] 药学上可接受的载体包括任何和所有生理上相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。“药学上可接受的载体”在向受试者或在受试者上施用后,不引起不希望的生理学作用。药物组合物中的载体必须是“可接受的”也意味着与

活性成分相容并能够使其稳定。可以使用一种或多种增溶剂作为药物载体以递送活性剂。药学上可接受的载体的实例包括但不限于生物相容性媒介物、佐剂、添加剂和稀释剂,以实现可用作剂型的组合物。其他载体的实例包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、纤维素和月桂基硫酸钠。其他合适的药物载体和稀释剂以及使用它们的药物必需性描述在Remington's Pharmaceutical Sciences中。优选地,载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。治疗性化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留亲本化合物的所需生物学活性且不赋予任何不希望的毒理作用的盐(参见,例如,Berge, S.M., 等 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。

[0095] 免疫原性组合物中提供的宿主细胞可以是失活的或化学上/遗传上减毒的细菌疫苗,其不激发肿瘤细胞和感染了胞内病原体的细胞的裂解所必需的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答。

[0096] II. 使用所公开的免疫原刺激免疫应答的方法

[0097] 可以将本文所公开的免疫原、编码所公开的免疫原的核酸分子、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒施用给受试者,以产生针对病原体例如HIV的免疫应答。在另一个方面,本公开提供了一种治疗或预防有此需要的受试者中的HIV感染的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的上述免疫原、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒,或其组合。本公开还提供了上述免疫原、核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒或其组合在制备用于治疗或预防受试者中的HIV感染的药物中的用途。

[0098] 在示例性应用中,将组合物施用给患有HIV感染或处于被HIV感染的风险中的受试者。在其他应用中,可以预防性施用本文公开的免疫原,例如作为免疫方案的一部分。

[0099] 免疫原以足以产生针对HIV病毒的免疫应答的量施用。施用引起足够的免疫应答以治疗病原性感染,例如抑制感染和/或减少感染的体征(sign)和/或症状。对于这种用途有效的量将取决于疾病的严重程度、受试者健康的一般状况以及受试者免疫系统的稳健性。免疫原的治疗有效量是指提供如医师或其他有资质的观察人员所指出的主观上症状的缓解或客观上可鉴别的改善。

[0100] 治疗有效量或有效量是指足以预防、治疗(包括预防性治疗)、减轻和/或改善任意一种病症或疾病的症状和/或根本原因,例如预防、抑制和/或治疗HIV的药剂,例如核酸疫苗或其他治疗剂的量。在一些实施方案中,“有效量”足以减轻或消除疾病例如AIDS的症状。例如,这可以是抑制病毒复制或可测量地改变病毒感染的外在症状(例如在HIV-1感染的情况下T细胞计数增加)所需的量。通常,这个量将足以可测量地抑制病毒(例如,HIV)的复制或感染性。当施用给受试者时,通常会使用将实现已显示实现病毒复制的体外抑制的目标组织浓度(例如,淋巴细胞中)的剂量。

[0101] 可以通过本领域技术人员已知的任何手段来施用免疫原(参见Banga, A., “Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins,” in Therapeutic Peptides and Proteins, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1995), 局部或全身地,例如通过肌内、皮下或静脉内注射,甚至考虑经口、经鼻或肛门施用。在一个实施方案中,通过皮下或肌内注射施用。为了延长所公开的免疫原可用于刺激应答的时间,免疫原可以以植入物(implant)、油性注射剂(oily injection)或颗粒系统(particulate system)提供。颗粒系统可以是微粒、微胶囊、微球、纳米胶囊或类似的颗粒

(参见,例如,Banga,见上文)。已显示基于合成聚合物的颗粒载体除了提供控释外,还充当佐剂以增强免疫应答。也可以使用铝盐作为佐剂以产生免疫应答。

[0102] 任选地,可以使用一种或多种细胞因子例如白介素(IL)-2、IL-6、IL-12、IL-15、RANTES、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)- α 或IFN- γ 、一种或多种生长因子例如GM-CSF或G-CSF、一种或多种共刺激分子例如ICAM-1、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2或其他B7相关分子;一种或多种分子例如OX-40L或41BBL,或这些分子的组合作为生物佐剂(参见,例如,Salgaller等,1998,J.Surg.Oncol.68(2):122-38; Lotze等,2000,Cancer J Sci.Am.6(Suppl 1):S61-6;Cao等,1998,Stem Cells16(Suppl 1J.-251-60;Kuiper等,2000,Adv.Exp.Med.Biol.465:381-90)。这些分子可以全身(或局部)施用给宿主。在一些实例中,施用IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、B7-1 B.7-2、OX-40L、41BBL和ICAM-1。

[0103] 提供了包含分离的免疫原的药物组合物。在一些实施方案中,将免疫原与含有两种或更多种稳定性去污剂、胶束形成剂和油的佐剂混合。合适的稳定性去污剂、胶束形成剂和油详细描述在美国专利号5,585,103;美国专利号5,709,860;美国专利号5,270,202和美国专利号5,695,770中。稳定性去污剂是使乳剂组分保持为稳定乳剂的任意去污剂。此类去污剂包括聚山梨酯80(TWEEN)(山梨聚糖-单-9-十八烯酸酯-聚(氧基-1,2-乙二基;由ICI Americas,Wilmington,DE制造)、TWEEN 40TM、TWEEN 20TM、TWEEN 60TM、、ZWITTERGENTTM3-12、TEEPOL HB7TM和SPAN 85TM。这些去污剂通常以约0.05%至0.5%,例如约0.2%的量提供。胶束形成剂是能够稳定与其他成分形成的乳剂从而形成胶束状结构的试剂。此类试剂通常在注射部位引起一些刺激,以募集巨噬细胞以增强细胞应答。此类试剂的实例包括聚合物表面活性剂,由以下描述:BASF Wyandotte publications,例如,Schmolka,J.Am.Oil.Chem.Soc.54:110,1977,和Hunter等,J.Immunol 129:1244,1981,PLURONICTM L62LF、L101和L64、PEG1000和TETRONICTM 1501、150R1、701、901、1301和130R1。此类试剂的化学结构是本领域公知的。在一个实施方案中,选择试剂为具有0至2之间的亲水-亲脂平衡(HLB),如Hunter和Bennett,J.Immun.133:3167,1984所定义的。试剂可以以有效量,例如0.5至10%之间,或1.25至5%之间的量提供。

[0104] 控释肠胃外制剂可以制成植入物、油性注射剂或颗粒系统。有关蛋白递送系统的广泛概述,参见Banga,Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing, and Delivery Systems,Technomic Publishing Company,Inc.,Lancaster,PA,1995。颗粒系统包括微球、微粒、微胶囊、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒。微胶囊含有作为中央核心的治疗性蛋白。在微球中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1 μ m的颗粒、微球和微胶囊通常分别称为纳米颗粒、纳米球和纳米胶囊。毛细管的直径为约5 μ m,因此仅纳米颗粒以静脉内施用。微粒的直径通常为约100 μ m,并以皮下或肌肉内施用(参见Kreuter,Colloidal Drug Delivery Systems,J.Kreuter,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,pp.219-342,1994;Tice&Tabibi,Treatise on Controlled Drug Delivery,A.Kydonieus,ed.,Marcel Dekker,Inc.New York,NY,pp.315-339,1992)。

[0105] 聚合物可用于离子控释。用于受控药物递送的各种可降解的和不可降解的聚合物基质是本领域已知的(Langer,Accounts Chem.Res.26:53',1993)。例如,嵌段共聚物泊洛沙姆407在低温下以粘性但可流动的液体形式存在,但在体温下形成半固体凝胶。已显示它

是配制和持续递送重组白介素-2和脲酶的有效载体(Johnston等,Pharm.Res.9:425,1992;和Pec,/.Parent.Sci.Tech.44(2):58,1990)。另外,羟基磷灰石(hydroxyapatite)已用作蛋白控释的微载体(Ijntema等,Int.J.Pharm.112:215,1994)。在另一个方面,脂质体用于脂质包封的药物的控释以及药物靶向(Betageri等,Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA,1993)。用于治疗性蛋白的受控递送的许多其他系统是已知的(例如,美国专利号5,055,303;美国专利号5,188,837;美国专利号4,235,871;美国专利号4,501,728;美国专利号4,837,028;美国专利号4,957,735;和美国专利号5,019,369;美国专利号5,055,303;美国专利号5,514,670;美国专利号5,413,797;美国专利号5,268,164;美国专利号5,004,697;美国专利号4,902,505;美国专利号5,506,206;美国专利号5,271,961;美国专利号5,254,342和美国专利号5,534,496)。

[0106] 在另一个实施方案中,药物组合物包括编码所公开的免疫原的核酸。可以向受试者施用治疗有效量的核酸,以产生免疫应答。在一个特定的非限制性实例中,向受试者施用治疗有效量的编码所公开的gp120免疫原或其免疫原性片段的核酸以治疗或预防或抑制HIV感染。

[0107] 任选地,可以使用一种或多种细胞因子例如IL-2、IL-6、IL-12、RANTES、GM-CSF、TNF- α 或IFN- γ ,一种或多种生长因子例如GM-CSF或G-CSF,一种或多种共刺激分子例如ICAM-1、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2或其他B7相关分子;一种或多种分子例如OX-40L或41BBL,或这些分子的组合作为生物佐剂(参见,例如,Salgaller等,1998,J.Surg.Oncol.68(2):122-38;Lotze等,2000,Cancer J Sci.Am.6(Suppl1):S61-6;Cao等,1998,Stem Cells 16(Suppl1):251-60;Kuiper等,2000,Adv.Exp.Med.Biol.465:381-90)。这些分子可以全身施用给宿主。应当注意,可以通过将编码分子的核酸插入载体例如重组痘病毒载体中来共同施用这些分子(参见,例如,美国专利号6,045,802)。在各种实施方案中,可以将编码生物佐剂的核酸克隆到与所公开的编码免疫原的序列相同的载体中,或者可以将核酸克隆到一种或多种单独的载体中以共同施用。另外,可以共同施用非特异性免疫调节因子,例如芽孢杆菌Cahnette-Guerin(Bacillus Cahnette-Guerin,BCG)和左旋咪唑。一种施用核酸的方法是用质粒DNA,例如哺乳动物表达质粒进行直接免疫。如上所述,可以将编码所公开的免疫原的核苷酸序列置于启动子的控制下以增加分子的表达。

[0108] 通过核酸构建体进行免疫是本领域公知的,并且在例如以下中教导:美国专利号5,643,578(其描述了一种通过引入编码所需免疫原的DNA以激发细胞介导的应答或体液应答来免疫脊椎动物的方法),以及美国专利号5,593,972和美国专利号5,817,637(其描述了将编码抗原的核酸序列有效连接至使其能够进行表达的调控序列)。美国专利号5,880,103描述了几种将编码免疫原性肽或其他抗原的核酸递送至生物体的方法。该方法包括以脂质体递送核酸(或其合成肽本身),和免疫刺激构建体或ISCOMSTM,即在混合胆固醇和QuilATM(皂素)上自发形成的大小为30-40nm的带负电荷的笼状结构。使用ISCOMSTM作为抗原的递送媒介物,已在多种实验感染模型(包括弓形虫病和爱泼斯坦-巴尔病毒引起的肿瘤)中产生了保护性免疫(Mowat和Donachie,Immunol.Today 12:383,1991)。已发现封装在ISCOMSTM中的低至1 μ g剂量的抗原可产生I类介导的CTL应答(Takahashi等,Nature 344:873,1990)。

[0109] 在使用核酸进行免疫的另一种方法中,所公开的免疫原也可以由减毒的病毒宿主或载体或细菌载体表达。可以使用重组痘苗病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒、逆转录病

毒、巨细胞病毒或其他病毒载体来表达肽或蛋白,从而激发CTL应答。例如,美国专利号4,722,848中描述了可用于免疫方案的痘苗载体和方法。BCG(Bacillus Calmette Guerin,卡介苗)提供了另一种用于表达肽的载体(参见Stover,Nature 351:456-460,1991)。

[0110] 在一个实施方案中,将编码所公开的免疫原的核酸直接引入细胞。例如,可以通过标准方法将核酸装载到金微球上,并通过例如Bio-Rad的HELIOS™基因枪的设备将其引入皮肤。核酸可以是“裸露的”,由受强启动子控制的质粒组成。通常,将DNA注射到肌肉中,尽管也可以将其直接注射到其他部位,包括靠近转移灶的组织。注射剂量通常是约0.5g/kg至约50mg/kg,且通常是约0.005mg/kg至约5mg/kg(参见,例如,美国专利号5,589,466)。

[0111] 根据受试者需要和耐受的剂量和频率,以单次或多次施用来施用组合物。在一个实施方案中,以推注(bolus)单次施用该剂量,但在另一个实施方案中,可以定期施用直至达到治疗结果。通常,该剂量足以治疗或改善疾病的症状或体征,而不会对受试者产生不可接受的毒性。可以使用全身或局部施用。

[0112] 将本文公开的免疫原性组合物与其他药剂例如蛋白、肽、抗体和其他抗病毒剂例如抗HIV剂一起施用可以是有利的。此类抗HIV治疗剂的实例包括核苷逆转录酶抑制剂,例如阿巴卡韦(abacavir)、AZT、地达诺新(didanosine)、恩曲他滨(emtricitabine)、拉米夫定(lamivudine)、司他夫定(stavudine)、替诺福韦(tenofovir)、扎西他滨(zalcitabine)、齐多夫定(zidovudine)等,非核苷逆转录酶抑制剂,例如地拉夫定(delavirdine)、依法韦仑(efavirenz)、奈韦拉平(nevirapine),蛋白酶抑制剂例如安普那韦(amprenavir)、阿扎那韦(atazanavir)、茚地那韦(indinavir)、洛匹那韦(lopinavir)、奈非那韦(nelfinavir)、福沙那韦(fosamprenavir)、利托那韦(ritonavir)、沙奎那韦(saquinavir)、替拉那韦(tipranavir)等,和融合蛋白抑制剂例如恩夫韦地(enfuvirtide)等。在某些实施方案中,免疫原性组合物与其他抗HIV治疗剂同时施用。在一些实例中,所公开的免疫原与辅助性T细胞,例如外源辅助性T细胞一起施用。用于产生和施用辅助性T细胞的示例性方法可以在国际专利公开WO 03/020904中找到,其通过引用并入本文。在某些实施方案中,免疫原性组合物与其他抗HIV治疗剂序贯施用,例如在其他药剂之前或之后。本领域普通技术人员将知晓,序贯施用可意指之后立即施用,或在合适的时间段之后,例如数小时、数天、数周、数月或甚至数年之后施用。

[0113] 所公开的gp120免疫原或其免疫原性片段和编码这些免疫原的核酸可以用于多步免疫程序中。在一些实例中,该程序包括向受试者施用治疗有效量的本文所公开的第一免疫原或其免疫原性片段(初免)并在合适的时间段之后用一种或多种另外的免疫原或其免疫原性片段加强免疫原性应答。激发这样的免疫反应的方法就是所谓“初免-加强(prime-boost)”。在这种方法中,通过让受试者的免疫系统有机会在多种情况下“看到”抗原表面,来聚焦抗体对所选免疫原性表面的应答。换言之,具有共同抗原表面的多种免疫原或其免疫原性片段的使用选择了与共同免疫原表面结合的抗体。

[0114] 在一些实例中,免疫原或其免疫原性片段以及编码这些免疫原的核酸可以以“初免-加强”免疫程序来施用。例如,免疫原或其免疫原性片段以及编码这些免疫原的核酸可以在施用稳定的gp140三聚体(参见例如Yang等J Virol.76(9):4634-42,2002)之前、期间、之后施用给受试者。

[0115] 还可以使用含有所公开的免疫原性剂,例如上述免疫原、编码该免疫原的核酸、宿

主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒或其组合的混合物进行初免,且然后用来自多种不同HIV毒株的三聚体或作为多种HIV毒株的混合物的三聚体进行加强。初免可以以单剂量或多剂量施用,例如,可在数天、数周或数月内向受试者施用两剂、三剂、四剂、五剂、六剂或更多剂。加强可以以单剂量或多剂量施用,例如,可以在一天、一周或数月内向受试者施用二至六剂或更多剂。也可以给予多次加强,例如一至五次,或更多次。不同剂量可用于一系列序贯接种。例如,在初次接种中使用相对大的剂量,且然后以相对较小的剂量进行加强。针对所选抗原表面的免疫应答可以通过用本文公开的免疫原性组合物对受试者进行一次或多次接种来产生。

[0116] III. 免疫诊断试剂和试剂盒

[0117] 本公开提供了一种检测或分离感染了HIV-1的受试者中的HIV-1结合抗体的方法。该方法包括使来自受试者的样品,例如但不限于来自受试者的血液、血清、血浆、尿液或痰样品与一种或多种所公开的免疫原性剂接触,所公开的免疫原性剂例如上述免疫原、编码该免疫原的核酸、宿主细胞、蛋白复合物或病毒颗粒,或其组合。该方法还可包括检测样品中抗体与所公开的免疫原性剂的结合。可以通过本领域技术人员已知的任何手段检测该结合,包括使用与来自样品的抗体特异性结合的标记的二抗。标记包括放射性标记、酶标记和荧光标记。在一些实施方案中,该方法可以进一步包括分离受试者中的HIV-1结合抗体。

[0118] 所公开的免疫原性剂可以作为试剂盒的组分。这样的试剂盒还可包括其他组分,包括包装、说明书和各种其他试剂,例如缓冲液、底物、抗体或配体,例如对照抗体或配体,以及检测试剂。试剂盒可任选地包含佐剂。

[0119] 佐剂是用于增强抗原性的媒介物。佐剂包括将抗原吸附其上的矿物质(明矾、氢氧化铝或磷酸盐)悬浮液;或油包水乳剂,其中抗原溶液乳化在矿物油(弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant))中,有时包含灭活的分枝杆菌(弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant))以进一步增强抗原性(抑制抗原降解和/或导致巨噬细胞流入)。也可以使用免疫刺激性寡核苷酸(例如包含CpG基序的那些)作为佐剂(例如参见美国专利号6,194,388;美国专利号6,207,646;美国专利号6,214,806;美国专利号6,218,371;美国专利号6,239,116;美国专利号6,339,068;美国专利号6,406,705;和美国专利号6,429,199)。佐剂包括生物分子(“生物佐剂”),例如共刺激分子。示例性佐剂包括IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L和41BBL。佐剂可以与所公开的免疫原组合使用。

[0120] IV. 定义

[0121] 如本文件中所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数引用,除非上下文另外明确指出。除非另有定义,否则此处使用的所有技术和科学术语。

[0122] 术语“和/或”意指与该术语相关联的项的任意一个、项的任意组合或所有的项。

[0123] 本发明的组合物可包含所要求保护的成分,基本上由其组成,或由其组成。词语“包含”(以及任何形式的包含,例如“包含”(comprise)和“包含”(comprises))、“具有”(以及任何形式的具有,例如“具有”(have)和“具有”(has))、“包括”(以及任何形式的包括,例如“包括”(includes)和“包括”(include))或“含有”(以及任何形式的含有,例如“含有”(contains)和“含有”(contain))是包含的或开放式的,并且不排除额外的、未列举的元素或方法步骤。

[0124] 术语“治疗”或“疗法”是指向患有病症或处于发展病症的风险中的受试者施用化合物或药剂,其目的是治愈、减轻、缓解、补救、延迟发作、预防或改善病症、病症的症状、病症的继发疾病状态或对病症的易感性(predisposition)。

[0125] 术语“预防”、“防止”、“预防性治疗”等是指降低受试者发展病症或病况的可能性,该受试者未患病症或病况但处于易于发展病症或病况的风险中。

[0126] 术语“受试者”是指人和非人动物。非人动物的实例包括所有脊椎动物,例如哺乳动物,例如非人哺乳动物、非人灵长类动物(尤其是高等灵长类动物)、狗、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、猫和兔以及非哺乳动物,例如禽类、两栖动物、爬行动物等。在一个实施方案中,受试者是人。在另一个实施方案中,受试者是实验性非人动物或适合作为疾病模型的动物。

[0127] 如本文所公开,提供了多个值范围。应当理解,还具体公开了在该范围的上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一,除非上下文另有明确规定。指定范围内的任何指定值或中间值与该指定范围内的任何其他指定值或中间值之间的每个较小范围都包含在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或排除在该范围外,并且其中两个限任一、都包括、都不包括在较小范围内的每个范围也包括在本发明内,前提是不考虑指定范围中具体排除的限。在指定范围包括一个或两个限的情况下,不包括这些被包括的限之一或两者的范围也包括在本发明中。

[0128] 术语“约”通常是指指定数字的正负10%。例如,“约10%”可表示9%至11%的范围,且“约1”可意指0.9至1.1。“约”的其他含义从上下文可以是显而易见的,例如四舍五入,因此,例如,“约1”也可以意指0.5至1.4。

[0129] gp120是来自人免疫缺陷病毒(HIV)的包膜蛋白。成熟的gp120野生型多肽在一级序列中具有约500个氨基酸。gp120被高度N-糖基化,产生120kD的表观分子量。该多肽由五个保守性区域(C1-C5)和五个高度可变的区域(V1-V5)组成。野生型gp160多肽的示例性序列显示在**GENBANK®**上,例如,登录号AAB05604和AAD12142,它们从2010年6月29日起可获得,通过引用以其全文并入本文。来自HIV-1DU156的gp120多肽的示例性序列显示在**GENBANK®**上,例如,登录号ABD83635、AA050350和AAT91997,它们从2010年9月27日起可获得,通过引用以其全文并入本文。来自HIV-1 ZA012的gp120多肽的示例性序列显示在**GENBANK®**上,例如,登录号ACF75939,其从2010年9月27日起可获得,通过引用以其全文并入本文。

[0130] “糖基化位点”是指多肽例如蛋白表面上的氨基酸序列,其容纳聚糖的附着。N-连接糖基化位点是NXS/T的三联体序列,其中N是天冬酰胺,X是除脯氨酸以外的任意残基,S/T意指丝氨酸或苏氨酸。聚糖是多糖或寡糖。聚糖也可用于指糖偶联物的碳水化合物部分,例如糖蛋白、糖脂或蛋白聚糖。

[0131] “免疫原性多肽”是指能够诱导哺乳动物例如感染了病原体或处于感染病原体的风险中的哺乳动物的免疫应答的蛋白或其部分。施用源自目标病原体的免疫原性多肽诱导免疫应答。施用免疫原性多肽能导致针对目标病原体的保护性免疫。在一些实例中,免疫原性多肽是经表面重整(resurface)以将免疫原性聚焦到靶表位的抗原。“免疫原性gp120多肽”是能够诱导哺乳动物例如患有或未患有HIV感染的哺乳动物的免疫应答的gp120分子、经表面重整的gp120分子或其部分。施用诱导免疫应答的免疫原性gp120多肽能导致针对

HIV的保护性免疫。

[0132] “免疫应答”是指免疫系统的细胞例如B细胞、T细胞或单核细胞对刺激的应答。在一个实施方案中,应答对特定抗原特异(“抗原特异性应答”)。在一个实施方案中,免疫应答是T细胞应答,例如CD4⁺应答或CD8⁺应答。在另一个实施方案中,应答是B细胞应答并导致产生特异性抗体。

[0133] “分离的”是指“分离的”生物组分(例如蛋白,例如所公开的抗原或编码此类抗原的核酸)已从该组分天然存在于其中的其他生物组分,例如其他染色体和染色体外DNA、RNA和蛋白基本分离或纯化。已“分离”的蛋白、肽和核酸包括通过标准纯化方法纯化的蛋白。该术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的蛋白或肽,以及化学合成的蛋白、肽和核酸分子。分离的(或纯化的)不需要绝对纯度,并且可以包括至少50%分离的、例如至少75%、80%、90%、95%、98%、99%或甚至99.9%分离的蛋白、肽或核酸分子。

[0134] “编码”是指多核苷酸(例如基因、cDNA或mRNA)中核苷酸特定序列的固有特性,以用作生物过程中合成其他聚合物和大分子的模板,这些聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物学特性。因此,如果由基因产生的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白,则该基因编码该蛋白。基因或cDNA的编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,且通常在序列表中提供)和非编码链(用作转录模板)均可以称为编码该基因或cDNA的蛋白或其他产物。除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此互为简并形式并编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白和RNA的核苷酸序列可以包括内含子。在一些实例中,核酸编码所公开的抗原。“重组核酸”是指具有天然不连接在一起的核苷酸序列的核酸。这包括包含扩增的或组装的核酸并可用于转化合适宿主细胞的核酸载体。包含重组核酸的宿主细胞称为“重组宿主细胞”。然后在重组宿主细胞中表达基因以产生例如“重组多肽”。重组核酸也可以提供非编码功能(例如启动子、复制起点、核糖体结合位点等)。

[0135] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管在本发明的实践或检测中也可以使用与本文中描述的那些所相似或必要的任意方法和材料,现在描述优选的方法和材料。本文中提及的所有出版物均通过引用以其全文并入本文。

[0136] V. 实施例

[0137] 实施例1

[0138] 此实施例描述了以下实施例2-6中使用的材料和方法。

[0139] 包膜蛋白

[0140] Env三聚体表达为可溶性天然样可溶gp140三聚体,其包括SOSIP置换:“SOS”置换(A501C_{gp120}、T605C_{gp41}),“IP”(I559P_{gp41}),残基332_{gp120}(T332N_{gp120})处的N-连接聚糖序列的添加,增强的gp120-gp41切割位点(REKR(SEQ ID NO:17)至RRRRRR(SEQ ID NO:18)),以及残基664_{gp41}后的终止密码子(根据HX命名法的Env编号)。使用合成基因片段(整合DNA技术(IDT)),将新工程化的Env三聚体RC1、RC1-4fill、RC1-Avitag、RC1-Spytag、RC1-聚糖K0、RC1-聚糖K0-Avitag、RC1-聚糖K0-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)和RC1-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)、wtBG505和先前报告的BG505变体11MUTB、10MUT、7MUT、5MUT克隆到pPPPI4表达载体中。聚糖变体RC1 Δ 301、RC1 Δ 332和11MUTB Δ 301通过定点诱变

(QuikChange Lightning Multi-site定向诱变试剂盒,目录号#210515,Agilent Technologies)产生。

[0141] Env蛋白的不带标签版本用于ELISA(参见ELISA部分)和野生型小鼠的免疫(参见动物部分)中。RC1-4filll的带Spytag版本与病毒样颗粒(VLP)偶联并用于兔和猕猴的免疫(参见VLP的生产和偶联以及动物部分)。RC1和RC1-聚糖K0的带Avitag版本经生物素化并用作FACS中的诱饵(bait)(参见流式细胞术和单B细胞分选部分)。

[0142] 可溶性Env三聚体通过瞬时转染在HEK293-6E细胞(加拿大国家研究委员会)或Expi293细胞(Life Technologies)中表达,并通过2G12或NIH45-46免疫亲和色谱和尺寸排阻色谱(SEC)从细胞上清液中纯化,如先前所述(Wang,H.等Elife 6(2017))。蛋白在4℃下储存在20mM Tris pH 8.0和150mM氯化钠(TBS缓冲液)中。将带SpyTag的免疫原更换缓冲液为20mM磷酸钠pH 7.5,150mM氯化钠。

[0143] VLP的生产和偶联

[0144] 为了与VLP连接,将C端SpyTag序列(13个残基)添加到RC1-4filll以与SpyCatcher蛋白形成不可逆的异肽键(Zakeri,B.等Proc Natl Acad Sci U S A 109,E690-697(2012))。编码SpyCatcher蛋白所连接的噬菌体AP205外壳蛋白的基因是牛津大学MarkHowarth博士的馈赠。SpyCatcher-AP205 VLP如所述(Brune,K.D.等SciRep 6,19234(2016))进行纯化,与3倍摩尔过量的带SpyTag的RC1-4filll Env三聚体一同孵育,并通过SEC在用20mM磷酸钠pH 7.5、150mMNaCl平衡的Superdex 200柱上从游离Env三聚体分离偶联的VLP。通过阴性染色EM和/或SDS-PAGE验证Env三聚体的偶联,并通过与在相同SDS-PAGE凝胶上运行的已知量的游离免疫原进行比较来估算免疫原浓度。

[0145] 动物

[0146] 先前描述了携带Ig V(D)J基因的小鼠(GL_{HL}121敲入小鼠),该基因编码对应于人PGT121和10-1074广泛中和抗体的iGL IgH和IgL(Escolano,A.等Cell166,1445-1458e1412,(2016))。将来自JacksonLaboratory的6-8周龄的C57BL6雄性小鼠用于免疫。所有动物程序均按照洛克菲勒大学IACUC批准的协议进行。雄性和雌性GL_{HL}121敲入小鼠或雄性C57BL6野生型小鼠平均分布在各组中,并用10μg可溶性SOSIP包膜三聚体(1:1于Ribi佐剂(Sigma)中)进行腹膜内免疫。

[0147] 对六月龄的新西兰白兔(NewZealandWhite rabbit,Covance)进行免疫。用约22μg与VLP偶联的RC1-4filll SOSIP Env三聚体(RC1-4filll VLP)(于ISCOM样皂苷佐剂中)对兔进行皮下免疫(参见佐剂合成部分)。在免疫后第0周和第2周从小鼠和兔中收集血清样品。

[0148] 8只2至4岁龄的印度遗传来源的恒河猴(Macaca mulatta)根据实验动物护理和使用指南(Guide for Care and Use ofLaboratory Animals)NIH 82-53号报告(Department of Health and Human Services,Bethesda,Maryland,1985)在生物安全2级NIH设施中进行饲养和护理。所有动物程序和实验均根据NIH的NIAID机构动物护理和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee ofNIAID,NIH)批准的协议进行。

[0149] 用约200μg与VLP偶联的RC1-4filll SOSIPEnv三聚体(RC1-4filll VLP),以IscoMPLA为佐剂,对动物进行皮下(s.c)免疫至内侧前腿和后腿(共4处/动物)。定期抽血以监测血清中和活性并通过ELISA特征化血清抗体结合。淋巴结活检获自未经免疫的猕猴和免疫后3周的经免疫的猕猴。

[0150] 佐剂合成

[0151] 如先前所述制备ISCOM样皂昔佐剂(K. **Lövgren**-Bengtsson等, in *Methods in Molecular Medicine, Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, D.O'Hagan编 (Humana Press, Totowa, NJ, 2000), 第42卷, 239-258页)。简言之, 在20% MEGA-10 (Sigma D6277) 去污剂中制备20mg/ml的胆固醇 (Avanti Polar Lipids 700000) 和1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC) (Avanti Polar Lipids 850355) 溶液。Quil-A皂昔 (InvivoGen vac-quil) 以100mg/ml的终浓度溶解在Milli-Q水中。所有组分以1:1:5 (胆固醇:DPPC:Quil-A) 的比例混合, 然后用1xPBS稀释至胆固醇终浓度为1mg/ml。对于ISCOM-MPLA皂昔佐剂, 在20% MEGA-10中制备5mg/ml MPLA (Avanti 699800) 溶液, 并以2:1:1:10 (胆固醇:DPPC:MPLA:Quil-A) 的比例混合组分。使溶液在RT下平衡过夜, 然后使用10k MWC0膜 (ThermoFisher 66456) 相对于1xPBS进行透析。然后将佐剂溶液无菌过滤, 使用50k MWC0 Centricon旋转过滤器 (Millipore Sigma UFC905024) 进行浓缩, 并使用Sephacryl S-500 HR尺寸排阻柱 (GE Life Sciences 28-9356-06) 通过快速蛋白液相色谱 (FPLC) 将其进一步纯化。通过胆固醇定量 (Sigma MAK043) 确定最终佐剂浓度。

[0152] ELISA

[0153] 通过用50 μ l每孔的2 μ g/ml蛋白溶液 (于1xPBS中) 在4 $^{\circ}$ C下对高结合96孔板 (Coming#9018) 的过夜直接包被, 对以下进行ELISA: SOSIPEnv三聚体11MUTB、RC1、11MUTB Δ 301、RC1 Δ 301、RC1-GAIA (“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)、RC1-聚糖-敲除 (RC1-聚糖KO)、RC1-聚糖KO-GAIA (“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)、RC1 Δ 332、BG505)、10MUT、7MUT、5MUT或V3环-共有C肽 (SEQ ID NO:10: KGKGGKGGKGGCTRPNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHC)。将平板用洗涤缓冲液 (含0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) 的1xPBS) 洗涤3次, 并在室温 (RT) 下在封闭缓冲液 (含2% 奶粉的1xPBS) 中孵育1小时 (h)。封闭后立即将单克隆抗体或血清样品添加到封闭缓冲液中, 并在RT下孵育2小时。将血清样品以1:100或1:30的起始稀释和7个额外的3倍连续稀释进行分析。在结果部分指定的浓度下评估小鼠和人单克隆抗体 (IgG) 或人Fab。将平板用洗涤缓冲液洗涤3次, 并且然后与1:5000稀释于洗涤缓冲液中的与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch#115-035-071)、抗人IgG重链 (Jackson ImmunoResearch#109-035-098) 或抗人Ig重链和轻链 (Jackson ImmunoResearch#109-036-088) 一同孵育。通过添加HRP底物、ABTS单溶液 (Life Technologies#00-2024) 使平板显色, 并使用ELISA酶标仪 (FluoStar Omega, BMG Labtech) 在405nm处测量吸光度。

[0154] 在其他ELISA中, 将高结合96孔板直接用50 μ l含20 μ g/ml Fab的1xPBS溶液在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。将平板用洗涤缓冲液洗涤3次, 并在RT下于封闭缓冲液中孵育1小时。封闭后立即将平板在50 μ l RC1或RC1-聚糖KO-GAIA (“GAIA”公开为SEQ ID NO:16) 溶液 (以2 μ g/ml于封闭缓冲液中) 中在RT下孵育1小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤3次, 并在RT下与50 μ l CD4结合位点bNAb 3BNC60的嵌合形式 (人Fab和小鼠Fc) (从5 μ g/ml起3倍连续稀释于封闭缓冲液中) 一同孵育1小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤3次, 并在RT下与HRP偶联的抗小鼠IgG二抗 (Jackson ImmunoResearch#115-035-071) 孵育1小时。如上所述地洗涤和显色平板。

[0155] 流式细胞术和单B细胞分选

[0156] 从经免疫的小鼠的引流淋巴结和脾获得单细胞悬液, 并按照制造商的说明使用抗CD43磁珠 (MACS) 通过负选择分离成熟的B细胞。

[0157] 将冷冻的PBMC或来自从未经免疫的猕猴和经免疫的猕猴获得的淋巴结活检的细胞在RPMI培养基1640(1x)(Gibco#11875-093)中解冻并洗涤。将小鼠或猕猴细胞与100 μ l分别含1:500稀释的小鼠(BD Biosciences#553142)或人(BD Biosciences#564219)Fc阻断剂的FACS缓冲液(PBS1x,含2%胎牛血清和1mM乙二胺四乙酸(EDTA))在冰上孵育30分钟。

[0158] 通过将5 μ g带Avitag并生物素化的RC1(RC1-AviBio)或带Avitag并生物素化的RC1-聚糖K0(RC1-聚糖K0AviBio)与荧光链霉亲和素(以1:200比例稀释在1xPBS中)在冰上孵育30分钟,来制备RC1和RC1-聚糖K0(RC1⁺/RC1聚糖K0⁻)四聚体。

[0159] 使用与链霉亲和素BV711(BD Biosciences,#563262)偶联的RC1-AviBio和与链霉亲和素-PE(BD Biosciences,#554061)偶联的RC1-聚糖K0AviBio作为诱饵分离RC1⁺/RC1-聚糖K0⁻小鼠B细胞。使用三种诱饵分离RC1⁺/RC1-聚糖K0⁻猕猴B细胞:与链霉亲和素-PE和链霉亲和素AF647偶联的RC1-AviBio,和与链霉亲和素BV605(BD Biosciences,#563260)偶联的RC1-聚糖K0 AviBio。将四聚体与下述人或小鼠抗体混合物混合至两者终浓度均为5 μ g/ml。

[0160] 小鼠细胞用以下针对小鼠细胞表面标志物的荧光抗体染色:抗CD4 APC-eFluor780(Invitrogen,#47-0042-82)、抗CD8 APC-eFluor780(Invitrogen,#47-0081-82)、抗F4/80APC-eFluor780(Invitrogen,#47-4801-82)、抗NK1.1APC-eFluor780(Invitrogen,#47-5941-82)、抗CD11b APC-eFluor780(eBioscience#47-0112-82)、抗CD11c APC-eFluor780(eBioscience#47-0114-82)、抗Gr-1 APC-eFluor780(Invitrogen,#47-5931-82)、抗B220 APC(Biolegend,#103212)、抗GL7 FITC(BD Biosciences#553666)和抗CD95 BV421(BD Biosciences#562633)以1:200稀释,和活/死标志物Zombie NIR(Biolegend,#77184)以1:400稀释在FACS缓冲液中。猕猴细胞用以下抗人抗体染色:抗CD16APC-eFluor780(Invitrogen,#47-0168-41)、抗CD8a APC-eFluor780(Invitrogen,#47-0086-42)、抗CD3 APC-eFluor780(Invitrogen,#47-0037-41)、抗CD14 APC-eFluor780(eBiosciences,#47-0149-41)、抗CD20 PeCy7(BD,#335793)、抗CD38 FITC(StemCelltechnologies,#60131FI)、抗IgG BV421(BD Biosciences,#562581)、抗IgM PerCP-Cy5.5(BD Biosciences,#561285)以1:200稀释,和活/死标志物Zombie NIR以1:400稀释在FACS缓冲液中。将小鼠或猕猴细胞与含有RC1和RC1-聚糖K0诱饵的相应抗体混合物在冰上孵育30分钟,用FACS缓冲液洗涤并重悬于1ml FACS缓冲液中。在分选或分析之前,将细胞悬液通过40 μ M细胞滤网(cell strainer)过滤。

[0161] 使用FACS Aria III(Becton Dickinson),从小鼠细胞匀浆分离Zombie NIR⁻/CD4⁻/CD8⁻/F4/80⁻/NK1.1⁻/CD11b⁻/CD11c⁻/B220⁺/GL7⁺/CD95⁺RC1⁺/RC1-聚糖K0⁻单细胞,并从猕猴细胞匀浆分离Zombie NIR⁻/CD16⁻/CD8a⁻/CD3⁻/CD14⁻/CD20⁺/CD38⁺/IgG⁺/双RC1⁺/RC1-聚糖K0⁻单细胞。

[0162] 将单细胞分选至含有5 μ l裂解缓冲液(含1%2- β -巯基乙醇的TCL缓冲液(Qiagen#1031576))的96孔板的各个孔中。将平板立即在干冰上冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0163] 抗体测序和克隆

[0164] 将含有单细胞裂解物的96孔板在冰上解冻。按照制造商的说明,使用磁珠(RNAClean XP,#A63987 Beckman Coulter)在指定的干净区域纯化单细胞RNA。在纯化方案的最后步骤,使用11 μ l含(14.5ng/ μ l随机引物(Invitrogen,#48190-011)、0.5%tergitol

(NP-40型,70%于H₂O中,Sigma-Aldrich,#NP40S-100ML)、0.6U/ μ l RNase抑制剂(Promega#N2615)于无核酸酶水(Qiagen)的溶液从磁珠上洗脱RNA,并在65°C下孵育3分钟。随后,如先前所述(von Boehmer,L等Nat Protoc 11,1908-1923(2016))通过逆转录(**SuperScript®** III Reverse Transcriptase,Invitrogen,#18080-044,10' 000U)合成cDNA。将cDNA储存在-80°C或用于通过巢式聚合酶链式反应(PCR)进行抗体基因扩增。为了从单B细胞扩增抗体基因,将10 μ l无核酸酶水添加到含cDNA的溶液中。

[0165] 如先前所述(von Boehmer,L等Nat Protoc 11,1908-1923(2016)),通过巢式PCR扩增小鼠和猕猴抗体基因。PCR方案:(退火(°C)/延伸(秒)/循环数):第一个PCR(IgG IgH和Ig λ):46/55/50;第二个PCR(IgG IgH和Ig λ):50/55/50。使用不受序列和连接约束的克隆(SLIC)方法(Li,M.Z.&Elledge,S.J.Nat Methods 4,251-256(2007)),将扩增的重链和轻链cDNA分别克隆到含有完整小鼠或人IgG抗体恒定区或人重链恒定区1的表达载体(片段抗原结合(Fragment antigen-binding,Fab)载体)中。

[0166] 抗体生产和纯化

[0167] 按照制造商的说明,使用Ab Spin Trap Protein G Sepharose柱(GE Healthcare,#28-4083-47)从200 μ l小鼠或猕猴血清中纯化Ig。将Ig洗脱到4个级分中,每个200 μ l。通过在4°C下过夜透析(透析盒20000 MWC0 Thermo Scientific,#66005)将含有Ig的级分用PBS进行缓冲液交换。

[0168] 对于结构研究,通过瞬时转染在HEK293-6E或Expi293细胞中表达小鼠IgG和猕猴的带His₆标签的Fab("His₆"公开为SEQ ID NO:19),并使用蛋白A或G(GE Healthcare)(对于IgG)或Ni-NTA(GE Healthcare)或Ni Sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)(对于Fab)色谱和SEC(如Scharf,L等Cell 162,1379-1390(2015)所述),从细胞上清液将其纯化。小鼠Fab通过使用修改自Thermo Scientific的方案用无花果蛋白酶(ficin)(Sigma)以1-5mg ml⁻¹消化IgG获得。如所述,通过蛋白G(GE Healthcare)和SEC色谱,随后Mono Q 5/50(GE Healthcare)离子交换色谱(Diskin,R.等,Nat Struct Mol Biol 17,608-613),来纯化Fab。如上所述,PGT121和10-1074bNAb的共同iGL表达为带His₆标签的Fab("His₆"公开为SEQ ID NO:19)。

[0169] 体外中和测定

[0170] 如所述(Montefiori,D.C.Curr Protoc Immunol Chapter 12,Unit 1211(2005).),进行T₂M-b1测定。简言之,中和活性计算为单轮病毒感染后,T₂M-b1报告细胞系中Tat诱导的荧光素酶表达减少的函数。

[0171] SPR

[0172] 使用Biacore T200(Biacore)进行SPR实验。为了测定针对PGT121/10-1074iGLFab的亲合力,通过伯胺化学(Biacore手册)将蛋白A固定在CM5芯片(Biacore)上,并将200nM 8ANC195_{G52K5}抗Env IgG注射到实验流动池(experimental flow cell)中,如所述(Scharf,L.等Cell 162,1379-1390(2015))。通过注射不结合HIV Env的200nM mG053 IgG来制备参考流动池(reference flowcell)。注射1 μ M人Fc以封闭剩下的蛋白A位点。捕获10 μ M SOSIP蛋白(RC1、11MUTB或10MUT)后,注射PGT121/10-1074iGLFab的浓度系列(对于10MUT,从最高浓度160 μ M进行4倍稀释,对于11MUTB和RC1,从最高浓度150 μ M进行2倍稀释),且使结合反应达到平衡。如所述(Scharf,L.等Cell 162,1379-1390(2015)),用10mM甘氨酸pH 2.0和1M盐

酸胍以90 μ l/min的流速对流动池进行再生。通过对 R_{eq} (平衡结合应答) 与所注射蛋白浓度的对数的图进行非线性回归分析得出 K_D , 并且将数据拟合至1:1结合模型, 如所述 (Vaughn, 等 *Biochemistry* 36,9374-9380(1997))。

[0173] 为了测量从小鼠和猴子分离的抗体的相对结合, 通过伯胺化学将SOSIP Env三聚体固定在CM5芯片上, 并以200nM注射所选的Fab。用10mM甘氨酸pH 2.0对流动池进行再生。

[0174] 冷冻-EM样品制备

[0175] 通过将纯化的RC1与10-1074Fab和CD4结合位点 (CD4bs) Fab以1:3:3摩尔比 (gp140单体:10-1074Fab:CD4bs Fab) 在室温下孵育过夜来制备与10-1074复合的RC1。使用Superdex-200Increase 10/300柱 (GE Healthcare) 通过SEC在TBS (20mMTris pH 8.0, 100mMNaCl) 中分离RC1-Fab复合物。通过将纯化的RC1与小鼠或猕猴Fab和8ANC195 Fab以1:1.3:1.3摩尔比 (gp140单体:小鼠或猕猴Fab:8ANC195 Fab) 在室温下孵育过夜, 来制备RC1与小鼠和猕猴Fab的复合物, 且不进行SEC纯化即使用。将RC1-Fab复合物在TBS中稀释至0.75-1.4mg/mL, 添加到辉光放电 (glow-discharged) 的300目Quantifoil R1.2/1.3铜网格, 并使用Mark IVVitrobot (FEI) 在液态乙烷中将其玻璃化。

[0176] 冷冻-EM数据收集

[0177] 在Talos Arctica冷冻电子显微镜上成像RC1-Fab复合物, 其在200kV下运作, 并配备有Falcon 3EC直接电子检测器, 其使用EPU自动图像采集软件 (Tan, 等 *Microscopy* (Oxf) 65,43-56(2016))。RC1-10-1074数据在两个不同天数收集, 并在处理时合并。每张显微照片均以73,000的放大倍率收集, 致使像素大小为**1.436 Å**。

[0178] 冷冻-EM数据处理

[0179] 将电影显微照片在RELION-3中进行运动校正, 并使用MotionCor2进行剂量加权 (dose weight), 使用Gctf估算CTF, 并使用高斯极值点自动挑选 (Gaussian blob auto-picking) 从显微照片中挑选出颗粒 (Zivanov, J. 等 *Elife* 7(2018); Zheng, S.Q. 等 *Nat Methods* 14,331-332(2017); Zhang, K. Gctf. *J Struct Biol* 193,1-12(2016))。将提取出的颗粒导入cryoSPARC v2中并分类至2D类别平均 (Punjani, A., 等 *Nat Methods* 14,290-296(2017))。将所选颗粒分选至两个从头计算 (ab initio) 模型, 并将所选模型用作那些所选颗粒的同质细化 (homogenous refinement) 的参考。使用独立改进的半图谱 (其中FSC=0.143) 的黄金标准傅立叶壳相关性 (Gold Standard Fourier shell correlation) 估算分辨率, 并在cryoSPARC中将图谱自动锐化 (Punjani, A., 等 *Nat Methods* 14,290-296(2017); Scheres, S.H.&Chen, S. *Nat Methods* 9,853-854(2012))。为了解析N-连接聚糖, 生成了一系列图谱, 其中整体B因子范围为-150至-**400 Å²**, 以改善PNGS的局部特征和图谱连接性 (Terwilliger, T.C., 等 *Acta Crystallogr D Struct Biol* 74,545-559(2018))。

[0180] 模型建立

[0181] 使用UCSF Chimera将每个复合物的各组分的坐标对接 (dock) 到图谱中。对于RC1-10-1074复合物, 将BG505 (PDB 5T3Z)、10-1074Fab (PDB 5T3Z) 和8ANC131Fab (PDB 4RWY) 对接到密度 (Goddard, T.D., 等 *J Struct Biol* 157,281-287(2007))。对于小鼠或猕猴的Fab与RC1的复合物, 将BG505Env (PDB 5CEZ)、PGT121/10-1074iGL Fab (PDB 4FQQ) 和8ANC195 Fab (PDB 5CJX) 坐标对接到密度图谱。在替换复合物中Fab和RC1的序列后, 在Coot和Phenix中的迭代改进之后建立模型 (Adams, P.D. 等 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66,

213-221 (2010); Emsley, P., 等 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501 (2010)). 将聚糖的坐标以 Man_g 添加, 并然后进行调整以在 $\sigma = 5$ 处拟合图谱。使用 MolProbity 和 Privateer 进行模型验证 (Chen, V.B. 等 *Acta Crystallogr DBiol Crystallogr* 66, 12-21 (2010); Agirre, J. 等 *Nat Struct Mol Biol* 22, 833-834 (2015))。

[0182] RC1-10-1074 复合物中的 CD4 结合位点 Fab 和 RC1 与小鼠和猕猴 Fab 的复合物中的 8ANC195 Fab 未显示在结构图中, 且它们的坐标未包含在存于 EMDB 和 PDB 的 RC1-Fab 复合物结构中。

[0183] 分析软件

[0184] 使用 Geneious X 和 MacVector 15.5.3 进行序列分析, 并使用 R 语言创制图。使用 FlowJo 10.5.0 处理流式细胞数据。使用 GraphPad Prism 7 进行数据分析。

[0185] 定量和统计学分析

[0186] 包括 n 、平均值和统计学显著性值在内的统计学信息显示在文本或图例中。使用 GraphPad Prism 7 通过未配对 T 检验进行统计学分析。在 $*p \leq 0.05$ 、 $**p \leq 0.01$ 、 $***p \leq 0.001$ 和 $****p \leq 0.0001$ 时认为数据是统计学显著的。

[0187] 实施例 2

[0188] RC1 促进抗体与 V3-聚糖表位的结合

[0189] 使用 11MUTB, 一种衍生自进化枝 A/E BG505 Env 的修饰的天然样可溶性 Env 三聚体 (SOSIP.664) 作为模板来设计 RC1。与 BG505 相比, 11MUTB 在 V1 中包含多个取代并且缺少在位置 N133 和 N137 处的潜在 N-连接糖基化位点 (PNGS) (图 1a) (Steichen, J.M. 等 *Immunity* 45, 483-496 (2016); Sanders, R.W 等 *PLoS Pathog* 9, e1003618 (2013))。假设在位置 156 处额外去除 PNGS (N156Q) 将通过增加与 V3-聚糖斑 bNAbs 相互作用的 V1 部分的可及性 (accessibility) 来促进 V3-聚糖斑的识别。与该想法一致, N156 PNGS 的缺失增强了 PGT121 和 10-1074 的中和作用 (图 6a)。此外, 进一步假设去除 N156 聚糖 (包括带负电荷的末端唾液酸) 将产生更静电中性 (electrostatically-neutral) 的 Env 表面, 其能促进 V3-聚糖 bNAbs PGT121 和 10-1074 的主要中性抗体前体 (iGL PGT121/10-1074) 的结合。

[0190] 首先通过 ELISA 评估 RC1 与 bNAbs 的相互作用将其特征化。如预期的, 与 N156 聚糖相互作用的 V1-V2 特异性 bNAbs 与 BG505 相比显示出与 RC1 的结合降低 (图 6a 和 6b)。相比之下, 靶向 V3-聚糖表位、CD4 结合位点或 gp120-gp41 界面的 bNAbs 与 RC1 和 BG505 的结合相似 (图 6b)。因此, RC1 保留了 BG505 的整体抗原特性。

[0191] 为了进一步特征化 RC1, 解析了与 10-1074 的抗原结合片段 (Fab) 复合的 RC1 的 **4.0 Å** 单粒子冷冻-EM 结构, 并将其与结合 BG505 的相同 bNAbs 的结构进行比较 (图 1b; 图 7; 表 3)。RC1 结构与 BG505 相似, 两者均显示 Env 的封闭构象并含有与三个 V3-聚糖斑表位结合的三个 10-1074 Fab (图 1b)。与 BG505 相比, RC1 中的 V1 环包含更多有序的残基, 并移向 (shift towards) 10-1074 的 CDRH3, 从而增加了 RC1 和 10-1074 之间的相互作用 (图 1b)。

[0192] 尽管 V1 的结构变化归因于 N156 聚糖的缺失 (图 1b), 但 PGT121 和 10-1074 的共同 iGL 前体以相似的亲和力 (K_D 约 $50 \mu\text{M}$) 与 RC1 和 11MUTB 结合 (图 1c)。与这些观察结果一致, RC1 和 11MUTB 在携带编码 iGL PGT121/10-1074 的基因的敲入 (KI) 小鼠中激发相当的 V3-聚糖表位特异性血清学应答 (图 2a 和 2b)。综上, RC1 表现出相比于 BG505 的结构变化, 但这些并不影响其对 iGL PGT121/10-1074 前体抗体的亲和力。

[0193] 实施例3**[0194] RC1在野生型小鼠中激发V3-聚糖斑抗体**

[0195] 为了确定RC1是否能够激活野生型小鼠中携带V3-聚糖斑特异性抗体的B细胞,用RC1或11MUTB对C57B1/6小鼠进行免疫。11MUTB未产生可测量的血清学应答(图2c)。相比之下,经RC1免疫的小鼠显示出可重复的抗V3-聚糖斑应答,其通过ELISA比较与RC1和与缺少位置301和332处的两个额外V3 PNGS的突变体RC1(RC1-聚糖KO)的结合而确定(图2c、2d、2e和2f;表2)。此外,来自经RC1免疫的小鼠的血清与11MUTB交叉反应,但不与更天然的10MUTEnv或BG505交叉反应(图8)。RC1的V3-聚糖斑表位的免疫原性提高是从11MUTB特异性去除N156聚糖的结果,因为从11MUTB去除N301聚糖(11MUTB Δ 301)(见表2)未能在小鼠中诱导可检测的血清学应答(图2g)。得出结论,与11MUTB和11MUTB Δ 301不同,RC1在野生型小鼠中激发V3-聚糖特异性血清学应答。

[0196] 为了减少抗体对脱靶表位的应答,并进一步将应答聚焦至V3-聚糖斑上,通过添加PNGS以掩蔽gp120位置230、241、289和344处的潜在聚糖脱靶位点,来产生RC1变体RC1-4fi11(图9)。RC1-4fi11激发的血清学应答对野生型小鼠中V3-聚糖斑的特异性高于RC1激发的血清学应答,如通过针对RC1和RC1-聚糖KO的ELISA而确定的(图2h)。得出结论,RC1-4fi11将抗体应答聚焦至V3-聚糖斑表位。

[0197] 实施例4**[0198] V3-聚糖斑特异性B细胞在野生型小鼠中的克隆扩增**

[0199] 为了进一步对由RC1和RC1-4fi11在野生型小鼠中激发的体液应答进行特征化,对来自结合RC1但不结合RC1-聚糖KO的单GC B细胞的抗体基因进行测序(图10)。所分析的所有经RC1和RC1-4fi11免疫的小鼠均显示出GC B细胞克隆的扩增(图2i)。扩增的克隆主要表达重链V基因区段VH5-6、VH9-3和VH2-9,以及轻链区段VK3-4和VK14-111(图2i;表4、5和6)。扩增克隆中的CDRH3序列显示出与人V3-聚糖斑bNAbs的相似性,例如富含Tyr的或RxY基序(表4和6)和长于平均水平的CDRH3,但它们均没有插入或缺失。扩增克隆的VH基因平均有3.2个核苷酸突变(图2j;表4)。

[0200] 为了确定由扩增的B细胞克隆产生的抗体的靶位点,克隆和生产所选抗体,并针对RC1和RC1突变体蛋白进行ELISA。一组不同的单克隆抗体(mAb)在ELISA中显示出V3-聚糖斑特异性结合(图2k)。对从经RC1(Ab275_{MUR})或RC1-4fi11(Ab276_{MUR})免疫的小鼠分离的两种mAb的Env结合特性的进一步特征化表明,这些抗体以GDIR(SEQ ID NO:15)-和N301-聚糖-依赖的方式与V3-聚糖斑表位结合(图21;表2)。两种抗体都结合11MUTB,但都不结合BG505或掩蔽V3环的冠的肽(图21;图11a)。Ab275_{MUR}以约30nM的K_D结合RC1(图11b)。重要的是,Ab275_{MUR}保留了与11MUTB的结合(K_D约230nM),表明它可以容纳N156聚糖(图11c)。获得的突变对于结合至关重要,因为回复到iGL序列导致失去与RC1的结合(图11d)。如预期,Ab275_{MUR}和Ab276_{MUR}在TZMb1测定中均未显示出针对一小组的1B级(tier 1B)和2级(tier 2)HIV-1分离株的可检测的中和活性(数据未显示)。因此,得出结论,RC1和RC1-4fi11使表达靶向V3-聚糖斑的抗体的小鼠B细胞克隆扩增。

[0201] 实施例5**[0202] VLP-RC1-4fi11在兔和恒河猴中激发V3-聚糖斑抗体**

[0203] 为了增强潜在的亲合力(avidity)效应并限制Env三聚体基部的额外脱靶表位的

暴露,使用Spytag-SpyCatcher系统将RC1-4fi11在病毒样颗粒(VLP)上多聚化(图3a和3b)。对于HIV-1疫苗研究,兔和恒河猴被认为是比小鼠更好的模型,因为它们的抗体具有比小鼠更长的CDRH3(小鼠中平均为11个残基,兔中13个,且恒河猴和人类中15个)。

[0204] 用RC1-4fi11 VLP对4只兔和8只恒河猴进行免疫激发了血清学应答,其对所有动物中的V3-聚糖斑呈部分特异,如通过针对RC1和RC1-聚糖K0的ELISA确定的(图3c和3d)。来自用RC1-4fi11 VLP初免的猕猴的血清显示了与更天然样免疫原11MUTB和10MUT的结合序贯降低(图12)。因此,RC1-4fi11 VLP激发了定位至兔和恒河猴中的V3-聚糖斑的稳健的血清学应答。

[0205] 为了进一步特征化猕猴中RC1-4fi11 VLP激发的应答,通过流式细胞术纯化结合RC1但不结合RC1-聚糖K0的引流淋巴结GC B细胞(RC1⁺/RC1-聚糖K0⁻)。尽管未经免疫的猕猴的GC中不存在RC1⁺细胞,在所分析的4只猕猴的淋巴结中的所有GC B细胞中发现RC1⁺/RC1-聚糖K0-GC B细胞的平均频率为0.4%(图3e和3f)。

[0206] 4只经免疫的猕猴的抗体克隆显示,所有均显示出扩增的B细胞克隆,其使用平均具有5.6个核苷酸体细胞突变的多个VH基因(图3g和3h;表7)。最为特征化的人V3-聚糖斑bNAb含有 λ 轻链。对 λ 基因使用的分析显示,猕猴RC1结合细胞优选使用基因VL132,其与PGT125-128和PGT130-131中的VL2-8为90.6%同一,以及VL124,其与PGT121-123/10-1074中的VL3-21为93.8%同一(图3i;表8)。此外,86%的 λ 轻链具有CDRL3,其包括存在于PGT121-123、10-1074和PGT124的iGL中的DSS基序(图3j;表9)。这个基序在成熟bNAb中突变为DSR,并且这个替代对于PGT121的中和活性至关重要。得出结论,用RC1-4fi11 VLP对猕猴进行免疫扩增了B细胞克隆,其抗体序列与人V3-聚糖斑bNAb前体类似。

[0207] 用与iGLV3-聚糖斑bNAb的CDRL3类似的CDRL3表达38种猕猴GC抗体(表10)。这些抗体中33种的CDRL3含有在位置89处的DSS基序和Q(QxxDSS基序(SEQ ID NO:20)),其也见于PGT121-3、10-1074、PGT124和BG18 iGL的CDRL3中(表11)。其他五种抗体含有SYAG基序(SEQ ID NO:21),其存在于PGT125-7、PGT128、PGT130和PGT131 iGL的CDRL3中(表11)。33种含QxxDSS基序的抗体中的30种(“QxxDSS”公开为SEQ ID NO:20)和5种含SYAG基序的抗体中的2种(“SYAG”公开为SEQ ID NO:21)与V3-聚糖斑表位结合,如使用RC1和RC1-聚糖K0-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)通过ELISA确定的(图4a;表10)。这38种V3-聚糖斑抗体的CDRH3长度范围为11至21个残基(平均=15.5个残基)(图4b)。较长的CDRH3包括高含量的Tyr和/或Phe残基,与人V3-聚糖斑bNAb的长CDRH3相似(表10)。这些抗体的VH和VL基因分别具有平均4.9和3.3个核苷酸突变(图4c)。

[0208] 为了进一步特征化RC1的抗体识别,针对其他突变体RC1-聚糖K0、RC1-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)、RC1-聚糖K0-GAIA(“GAIA”公开为SEQ ID NO:16)、11MUTB Δ 301、RC1 Δ 301、RC1 Δ 332、11MUTB和BG505进行ELISA(图4d和4e;表2)。ELISA表明了CDRL3中含有QxxDSS基序(SEQ ID NO:20)的抗体间对RC1的四种不同结合模式(pattern)(图4d),和含有SYAG基序(SEQ ID NO:21)的抗体间的其他模式(图4e)。尽管所有抗体都依赖于聚糖(由不与RC1-聚糖K0结合而确定),但它们不同之处在于它们与11MUTB或10MUT的结合,对GDIR基序(SEQ ID NO:15)的依赖和对N301、N332和N156聚糖的依赖(图4a、4d和4e)。在TZMb1测定中,所检测的抗体均不与BG505结合或对一小组的1B级和2级HIV-1分离株具有中和活性(图4d和4e;数据未显示)。得出结论,用RC1-4fi11 VLP对猕猴进行免疫会激发V3-聚

糖斑特异性抗体,其与靶向此位点的人bNAb前体类似。

[0209] 实施例6

[0210] 与RC1复合的小鼠和猕猴抗体的冷冻-EM结构

[0211] 为了定义结合的分子机制并比较V3-聚糖斑识别的模式,使用单粒子冷冻电子显微镜确定与RC1复合的一种小鼠Fab和两种猕猴Fab的结构。三种抗体均结合V3-聚糖斑表位,其足迹(footprint)与10-1074足迹重叠,但与10-1074相比以不同的接近角度结合(图5a和5b)。Ab275_{MUR}(4.4Å分辨率)和Ab874_{NHP}(3.9Å)(衍生自与Ab876_{NHP}相同的克隆)彼此相似结合,这与它们69%的序列同一性相一致,而Ab897_{NHP}(4.4Å)(分别与Ab275_{MUR}和Ab874_{NHP}以48%和54%的序列同一性关联)采用不同的接近角度(图5b)。

[0212] RC1复合物中的所有三种Fab均与GDIR基序(SEQ ID NO:15)接触,但彼此和与10-1074相比具有不同的足迹。10-1074使用CDRH3、CDRL1和CDRL3与保守性GDIR基序(SEQ ID NO:15)接触(图1c和5b),而Ab874_{MUR}和Ab275_{NHP}主要使用其CDRH2达成GDIR(SEQ ID NO:15)接触,且Ab897_{NHP}使用CDRL1和CDRL3(图5b和5c)。除了与GDIR(SEQ ID NO:15)接触之外,Ab275_{MUR}和Ab874_{NHP}还与N332聚糖相互作用(图5a和5b)。然而,与通过其CDRL1、FRWL3、CDRH2和CDRH3与N332聚糖广泛相互作用的10-1074不同,Ab275_{MUR}仅使用其CDRH2达成最小接触,且Ab874_{NHP}通过其CDRH2和FRWH3与N332聚糖接合。在Ab897_{NHP}-RC1结构中未观察到与N332聚糖的相互作用。尽管Ab275_{MUR}、Ab876_{NHP}(与Ab874_{NHP}相同的克隆)和Ab897_{NHP}与RC1 Δ 301的结合减少(图21),但RC1复合物中的Fab均未显示与N301聚糖的相互作用,表明了会掩盖这种相互作用的聚糖异质性和/或缺乏会减少结合的这种聚糖的V3-聚糖斑中的构象变化。得出结论,RC1在具有多克隆抗体库的动物(包括灵长类动物)中激发具有不同结合模式的靶向V3-聚糖斑的抗体。

[0213] 通过响应快速进化的病原体的连续轮次体细胞突变,在经感染的人体中发展了HIV-1bNAb。用一系列相关抗原进行疫苗接种能在携带超生理数量的表达bNAb的iGL前体的B淋巴细胞的基因工程化小鼠中重现这些事件进展。HIV-1疫苗设计的一个重要目标是设计在具有多克隆免疫系统的生物体中启动这种应答的免疫原,其目的是在人体中重现这些应答。

[0214] HIV-1疫苗免疫原设计聚焦于提高候选免疫原对特定iGL bNAb前体的亲和力,其目的是将一组特定的稀有(rare)前体募集至GC。这种方法通常无法解释由多聚化抗原与B细胞表面的多价抗原受体之间的相互作用产生的表观亲和力的增加。此外,GC进入主要受竞争限制。因此,亲和力的重要性是相对的,如由在生理条件下在GC中经常发现带有低亲和力受体的B细胞的观察所证明。

[0215] 产生RC1使用的原则未考虑亲和力。相反,设计RC1为增加可以与GC进入竞争的bNAb祖细胞(progenitor)的数量。这通过使抗原靶位点更可用,同时促进与静电中性iGL前体的结合来实现。此外,RC1-4f111 VLP并入了以下想法:掩蔽对脱靶表位的竞争使与GC进入的竞争最小化。

[0216] RC1与其他HIV-1候选疫苗的不同之处在于,其诱导表达针对所靶向表位的抗体的B细胞,以在具有完全多克隆B细胞库的动物的GC中进行克隆扩增。在猕猴中,这些B细胞表达的抗体显示出与靶向V3-聚糖斑的bNAb的iGL前体的序列和结构相似性。因此,RC1-4f111 VLP是用于旨在激发V3-聚糖bNAb的序贯接种策略的合适的候选免疫原。

[0217] 实施例7

[0218] RC1-3fi11 VLP和NP的表现与RC1 VLP和NP相似

[0219] RC1、RC1-3fi11和RC1-4fi11免疫原的尺寸排阻色谱 (SEC) 迹线 (图13a) 显示, 与RC1-4fi11相比, 洗脱在空体积 (voidvolume) 中的RC1和RC1-3fi11免疫原的部分较小, 证明了RC1和RC1-3fi11与RC1-4fi11相比更稳定且更不易聚集 (aggregate)。HEK 293T 6E细胞中每种免疫原的1L表达的代表性产量 (图13b) 表明RC1-3fi11的表达水平高于RC1-4fi11, 且与RC1的水平相似。

[0220] 图13c显示了AP205-RC1-VLP (深灰色) 和AP205-RC1-3fi11-VLP (黑色) 的纯化的代表性SEC迹线。图13d显示了AP205-RC1-VLP (左) 和AP205-RC1-3fi11-VLP (右) 的电子显微照片, 显示AP205-RC1-3fi11-VLP看起来与AP205-RC1-VLP相似, 并且每个粒子具有相似数量的偶联三聚体。显微照片还显示纯化策略是充分的, 并且任一样品中均不存在游离三聚体。mi3-RC1-NP (深灰色) 和mi3-RC1-3fi11-NP (黑色) 的纯化的代表性SEC迹线 (图13e) 显示RC1和RC1-3fi11可以与mi3 NP偶联。mi3-RC1-NP (左) 和mi3-RC1-3fi11-NP (右) 的电子显微照片 (图13f) 显示mi3-RC1-3fi11-NP看起来与mi3-RC1-NP相似, 并且每个粒子具有相似数量的偶联三聚体。显微照片还显示纯化策略是充分的, 并且任一样品中均不存在游离三聚体。AP205-RC1-VLP (图13g) 和mi3-RC11-NP (图13h) 的初始纯化以及在28天 (AP205) 和11天 (mi3) 回注样品的SEC谱显示, 偶联颗粒随时间是稳定的, 并且在储存28或11天后未见未偶联的RC1或降解产物。

[0221] 检测来自用mi3-RC1-NP (图13i) 或mi3-RC1-3fi11-NP (图13j) 免疫的六只WT小鼠的血清与RC1 (黑色) 和RC1聚糖KO (灰色) 的结合。来自用Mi3-RC1或Mi3-RC1-3fi11免疫的所有六只小鼠的血清在ELISA中均与RC1结合, 并且与RC1聚糖KO的结合降低, 表明对V3/N332聚糖斑特异的血清应答。包括单克隆抗体10-1074和3BNC117作为阳性和阴性对照。ELISA数据显示为ELISA曲线下面积 (AUC)。

[0222] 表3: 冷冻-EM数据收集和加工统计

[0223]

Env	RC1	RC1	RC1	RC1
Fab	10-1074; CD4bs	Ab275 _{MUR} ; 8ANC195	Ab874 _{NHP} ; 8ANC195	Ab897 _{NHP} ; 8ANC195
浓度 (mg/mL)	0.75	1.25	1.25	1.4
印迹 (blot) 时间 (s)	3.5	3.0	2.0	3.5
显微镜	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica
电压 (kV)	200	200	200	200
检测器	Falcon 3EC	Falcon 3EC	Falcon 3EC	Falcon 3EC
记录模式	计数	计数	计数	计数
放大倍率	73k	73k	73k	73k
像素大小 (Å)	1.436	1.436	1.436	1.436
剂量率 (e-/px/s)	0.73, 0.77	1.28	1.3	1.3
每张显微照片帧数	39	40	39	39
总剂量 (e-/Å ²)	39.1	40	40	40
离焦范围 (μm)	1-3.4	0.8-2.5	0.8-2.5	0.8-2.5

[0224]

显微照片张数	684	328	465	510
粒子数量	122,013	49,308	86,564	158,954
对称性	C3	C3	C3	C3
分辨率 (FSC 0.143) (Å)	4.05	4.39	3.90	4.43
B-因子 (Å ²)	-281.9	-252.4	-230.0	-322.1

[0225]

表4:从经RC1和RC1-4f111免疫的小鼠产生的抗体序列

[0226]

小鼠 5						
VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	4
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	3
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	6
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	23	11	3
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	6
IGHV1-84*01		IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	4
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
IGHV1-84*01		IGHJ3*01	ANGDALAWFAY	24	11	5

[0227]

IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	2
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	5
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	6
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	5
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	4
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ACGDELAWFAY	25	11	3
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	ASGDELAWFAY	22	11	2
IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	AGGDELAWFAY	26	11	7
IGHV1-72*01	IGHD2-4*01	IGHJ3*0 1	VRGEVYYDYDGFAY	27	14	8
IGHV1-72*01	IGHD2-4*01	IGHJ3*0 1	ARGEVYYDYDGFAY	28	14	1
IGHV1-9*01	IGHD2-4*01	IGHJ1*0 3	ARIRSDYDVGWWYFD V	29	16	4
IGHV1-9*01	IGHD2-4*01	IGHJ1*0 3	ARIRSDYDVGWWYFD V	29	16	4
IGHV1-72*01	IGHD1-1*01	IGHJ2*0 1	ARYYYGHYFDY	30	11	5
IGHV1-9*01	IGHD2- 14*01	IGHJ2*0 1	VRSGIYYFDY	31	10	5
IGHV1-72*01	IGHD1-1*01	IGHJ2*0 1	ARYLLLRPFDY	32	11	4
IGHV1-22*01	IGHD1-1*01	IGHJ4*0 1	ARAGTTGYVMDY	33	12	3

[0228]

IGHV1-74*01	IGHD6-1*01	IGHJ4*0 1	AIASYYYTLDY	34	11	5
IGHV1-19*01	IGHD3-2*02	IGHJ3*0 1	ARRGAAQAPFAY	35	12	3
IGHV1-82*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*0 1	VRSELGPAPFAY	36	11	7
IGHV1-22*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*0 1	ARRGYGYGAMDY	37	12	1
IGHV1-61*01	IGHD2-5*01	IGHJ3*0 1	ARAYSNYVPWFAY	38	13	0
IGHV1-69*01	IGHD2- 10*02	IGHJ2*0 1	ARREYGFFDY	39	10	6
小鼠 6						
IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	3
IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	6
IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	0
IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	2
IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	2
IGHV5-6*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*0 1	ARHGAGNALDY	41	11	2
IGHV5-6*01		IGHJ4*0 1	ARHGAGNAMDY	42	11	3
IGHV5-6*01		IGHJ4*0 1	ARHGAGNAMDY	42	11	6
IGHV5-6*01		IGHJ4*0 1	ARHGAGNAMDY	42	11	2

[0229]

IGHV9-3*01	IGHD2-1*01	IGHJ2*0 1	QVEVTMWTT	43	9	0
IGHV9-3*01		IGHJ2*0 1	ASGRNYVDY	44	9	3
IGHV9-3*01		IGHJ2*0 1	ASGPNYFDY	45	9	3
IGHV5-6*01	IGHD1-1*01	IGHJ4*0 1	ARHGHYYGSSYGMDY	46	15	2
IGHV1-75*01	IGHD1-1*02	IGHJ1*0 1	ARDDGGYWFYDV	47	12	1
IGHV2-9*01	IGHD1-3*01	IGHJ4*0 1	ANIPKDRLCYGP	48	12	2
IGHV1-62- 2*01	IGHD2-3*01	IGHJ3*0 1	ARHEEDGYWFAY	49	12	11

[0230]

表5:从经RC1和RC1-4f111免疫的小鼠产生的抗体序列

[0231]

轻链						
小鼠	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	10
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LRYYDDFPYT	53	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	8
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	IQYDEFPYT	54	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	2

[0232]

4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	6
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDEFPYT	55	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDLPHYT	56	9	6
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	1
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	1
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDLPHYT	56	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	8
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPHY	57	9	4
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	6
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDESPYT	58	9	9
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPCT	59	9	1
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPHY	57	9	3
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDDFPHT	60	9	5
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNVDPYT	62	9	2
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSHEDPYT	63	9	11
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	8
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	8

[0233]

4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNVDPYT	62	9	27
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	7
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	12
6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QHSNEDPYT	64	9	2
6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	3
1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	1
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQGNEDPPWT	66	10	1
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	HQSNEDPPWT	67	10	2
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQINEDPPWT	68	10	3
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	7
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	10
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	0
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	11
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSYEDPPWT	69	10	1
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	10
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSYEDPPWT	69	10	11
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	13
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	7
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	3
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQNEDPWT	71	9	3
6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	6
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	3

[0234]

1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	0
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	8
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	15
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	0
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	4
1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	16
2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	2
2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	5
6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	4
6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	2
6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFTFT	72	9	2
6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	8
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	3
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	4
1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	3
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYDSYPYT	73	9	7
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNNYPYT	74	9	2
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	8
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNTYPYT	76	9	10
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	2
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	8
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNIYPYT	77	9	5
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	6
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	4
6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	2
1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	2
1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	2
1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	1

[0235]

2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	1
2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEYMYT	79	9	2
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEYMYT	79	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEYMYT	79	9	0
1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEYMYT	79	9	2
1	IGKV10-96*01	IGKJ1*01	QQGNTLPWT	80	9	1
1	IGKV10-96*01	IGKJ1*01	QQGNTIPWT	81	9	4
2	IGKV10-96*01	IGKJ1*01	QQGNTLPRT	82	9	1
2	IGKV10-96*01	IGKJ1*01	QQGNTLPRT	82	9	5
6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	3
6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	0
6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	2
2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYVQFPLT	84	9	2
2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYAQFPLT	85	9	2
2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYAQFPLT	85	9	1
3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
1	IGKV1-117*01	IGKJ1*01	FQGSHPWT	86	9	2
1	IGKV1-117*01	IGKJ1*01	FQGSHPWT	86	9	1
3	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
3	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
1	IGKV14-100*01	IGKJ4*01	VQYAQFPFT	87	9	4
1	IGKV14-126*01	IGKJ2*01	LQHGESPYT	88	9	0
6	IGKV4-50*01	IGKJ2*01	QQFTSSPYT	89	9	2
2	IGKV10-96*01	IGKJ2*01	QQGNTLPYT	90	9	3

[0236]

1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFRTT	91	9	5
4	IGKV6-15*01	IGKJ5*01	QQYNSYPFT	92	9	1
2	IGKV4-62*01	IGKJ5*01	QQCSGYPLT	93	9	3
6	IGKV10-94*01	IGKJ1*01	QQYSKLPWT	94	9	1
2	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	3
3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	3
2	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPPFT	95	10	2
2	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPPFT	52	9	5

[0237]

表 6: 从经 RC1 和 RC1-4fi11 免疫的小鼠产生的抗体序列。

抗体	小鼠	IMM.	VH	CDRH3	SEQ ID NO:	长度 (AA).	VK	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA).	RC1 结合
271	1	RC1	IGHV5-6*01	ARHSRTGTGAMDY	96	13	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	是
340	2	RC1	IGHV1-17*01	ARPYYYGSSPYFDY	97	14	IGKV4-57*01	QQRSSYPPT	109	9	否
341	2	RC1	IGHV5-17*01	ARSIVPDY	98	8	IGKV14-100*01	VQYVQFPPLT	84	9	是*
343	2	RC1	IGHV5-6*01	ASLYGNAFDY	99	10	IGKV3-4*01	QQSNEDPFT	78	9	是
344	2	RC1	IGHV9-3*01	ASGGNYFDY	100	9	IGKV14-111*01	LQYDEFPFPT	95	10	是
346	2	RC1	IGHV5-6*01	ARHVGDDHAMDY	101	11	IGKV3-4*01	QQSNEDPFT	78	9	是
347	2	RC1	IGHV1-81*01	ARPYYYGSSPNFDY	102	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	否
351	3	RC1	IGHV9-3*01	GTGKNYFDH	103	9	IGKV14-111*01	LQYDEFPYT	50	9	是
352	3	RC1	IGHV5-6*01	ATNYGAWFPY	104	10	IGKV3-4*01	QQSNEDPYT	61	9	是
274	4	RC1	IGHV5-6*01	ARHGTTTGVAMDY	105	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	是
275	4	RC1	IGHV5-6*01	ARHGTTTGVAMDY	105	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPYT	61	9	是
276	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGRLTGTGAMD	40	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	是
278	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGRLTGTGAMD	40	14	IGKV3-4*01	HQSNEDPPWT	67	10	是
280	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGHHYGGSSYGM	46	15	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	是
294	6	RC1-4	IGHV2-9*01	AN I PKDRLCYG	106	11	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	是
348	NS	RC1	IGHV1-62-	ARHEGNYLYAMDY	107	13	IGKV4-62*01	QQCSGYPLT	93	9	是
349	NS	RC1	IGHV1-7*01	ARPPFITVVANYFDY	108	15	IGKV10-94*01	QQYSKLPWT	94	9	是

[0238]

表7:从经RC1-4fi11 VLP免疫的猕猴产生的抗体序列

[0239]

NHP 1						
VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVNYGPLDY	110	11	3
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 2*01	IGHJ4*0 1	ARVVKNGPLDY	111	11	6
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	3
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARLVRYGPLDY	113	11	7
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARIVKYGPLDF	114	11	6
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	4
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	2
IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	7
IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	5
IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDH	116	11	7
IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	9
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	SRYQARGPIDS	117	11	3
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDQARGPIDY	118	11	4
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARNQARGPIDY	119	11	27
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDQARGPIDY	118	11	9

[0240]

IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	6
IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	6
IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	4
IGHV4_2C*F 124	IGHD2- 1*01	IGHJ4*0 1	ARDKRIGPFDY	121	11	6
IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKRRQLENDY	122	11	4
IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	VKKRRQLENDY	123	11	4
IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKRRQLENDY	122	11	6
IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	VKKRRQLENDY	123	11	4
IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASRIAGGPFDY	124	11	4
IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASRIAGGPFDY	125	11	8
IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASLIAAGPFDY	126	11	8
IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ASRIRGGPFDY	127	11	0
IGHV4_3M*F 133	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	ARDIVVGPIDY	128	11	7
IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ARDIVIGPIDY	129	11	11
IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ARDIVIGPIDY	129	11	6
IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ATVGR LAPFDY	130	11	5
IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 2*01	IGHJ4*0 1	ARVGRVVPFDY	131	11	5

[0241]

IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 5*01	IGHJ4*0 1	ARVGRVAPFDY	132	11	6
IGHV3_2N*F 134	IGHD6- 6*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSSSFYFE	133	16	4
IGHV3_2N*F 134	IGHD6- 6*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSTSFYFE	134	16	5
IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 1*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSSYFEYF	135	16	3
IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ASVLWGLPQDDNSL DV	136	16	6
IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ASVLWEVPQDDNSL DV	137	16	3
IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ANVLWGLPQDDNSL DV	138	16	2
IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	6
IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	4
IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	2
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 4*01	IGHJ1*0 1	ASLQYFGPF EF	140	11	0
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 4*01	IGHJ1*0 1	ASLQYFGPFDF	141	11	5
IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARAERAGPFDY	142	11	10
IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARAERAGPFDY	142	11	5
IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHPHLESFDY	143	11	4
IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHPHLESFDY	143	11	2

[0242]

IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 3*01	IGHJ1*0 1	ARNYGNYGYFEF	144	12	5
IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 3*01	IGHJ1*0 1	ARNYGNYGYFEF	144	12	2
IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 3*01	IGHJ1*0 1	ATGPYWGDYYGRY FEL	145	16	2
IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 3*01	IGHJ1*0 1	ATGPYWGDYYGRY FEF	146	16	2
IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	ATERRAGPVDY	147	11	4
IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ATDRRAGPLDY	148	11	2
IGHV3_1E*F 130	IGHD1- 2*01	IGHJ5- 1*01	AGTLAGTTSFDV	149	12	11
IGHV3_1E*F 130	IGHD1- 7*01	IGHJ5- 1*01	AGGLGRTTSFDV	150	12	14
IGHV4_11*S3 777	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVSGWSTEGNFD Y	151	15	4
IGHV4_11*S3 777	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVSGWSTEGNFD Y	151	15	2
IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	AKDWIQWLHLGSYF DF	152	16	6
IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	AKDWIQWVHLGSYF DY	153	16	3
IGHV4_11*S4 664	IGHD4- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHSSTYVAPVDY	154	13	7
IGHV4_2C*F 124	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ASAKGRLAPLDY	155	12	8

[0243]

IGHV4_11*S5 305	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ANWADYFDY	156	9	1
IGHV4_2C*F 124	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 1*01	ARDPVITITRERFD V	157	16	10
IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARDQRTGPFDY	158	11	1
IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 1*01	IGHJ6*0 1	ARQAFAGPTDS	159	11	6
IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 3*01	IGHJ5- 2*02	ARRGPVNWNGSSLD V	160	15	4
IGHV3_1W*F 134	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	TRDRADSWNFHDYF DY	161	16	3
IGHV4_11*S5 305	IGHD6- 5*01	IGHJ4*0 1	AKIAVAGPVDY	162	11	4
IGHV4_2C*F 124	IGHD2- 3*01	IGHJ5- 2*02	ATTYSGSDYYRLDV	163	14	6
IGHV1_2B*F 134	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARPSLWGAAFDY	164	13	4
IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ARIGAAGPGDY	165	11	11
IGHV4_11*S9 724	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 2*02	AKYWGDYYGYSSL DV	166	15	6
IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	ARVEVVGPTGY	167	11	9
IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 4*01	IGHJ4*0 1	ARRYSGSYSPFDC	168	13	3

[0244]

IGHV4_11*S6 427	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	AREGMGCTGSGCSIS FDY	169	18	0
IGHV4_11*S9 724	IGHD5- 3*01	IGHJ4*0 1	ARQGYSGYSLFDY	170	13	7
IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASEIAGGPVDY	171	11	3
IGHV4_11*S5 305	IGHD6- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARDSSGWPWDNRFD V	172	15	4
IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 3*01	IGHJ4*0 1	ARVTGRIAPFDY	173	12	4
IGHV5_1A*F 124	IGHD3- 2*01	IGHJ6*0 1	ATNIWTGYSFYGL DS	174	16	18
IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ6*0 1	AREGRIHPLDS	175	11	31
IGHV3_4I*F1 30	IGHD4- 1*01	IGHJ6*0 1	AKDHDYGGGLDS	176	12	3
IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKSSGSWEVDY	177	12	5
IGHV4_11*S5 891	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 1*01	ARHAYYNIWTGYST NRFDV	178	19	0
IGHV5_1A*F 124	IGHD6- 3*01	IGHJ5- 1*01	AEGSGSWNGRFGV	179	13	3
IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 1*01	ATGRYYGGSYYGDR FDV	180	17	7

[0245]

IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 6*01	IGHJ4*0 1	AKCSSSSTGLDY	181	12	3
IGHV1_2B*F 134	IGHD1- 7*01	IGHJ4*0 1	ARDRSVTPFSWVEY YFDY	182	18	6
IGHV4_5L*F 134	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	VRVVKYGPLDY	183	11	2
IGHV4_11*S3 915	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 2*02	ARNPPYYNLWTGYY THSLDV	184	20	2
IGHV4_1F*F 130	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	1
IGHV4_11*S3 915	IGHD2- 3*01	IGHJ4*0 1	AREGYCSYTYCSNL FEF	185	17	4
IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARARIAAPFDY	186	11	6
IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	ARAGRMAATDY	187	11	5
IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	VRDVTLGPIDN	188	11	3
IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 4*01	IGHJ6*0 1	AREGRIQPLDS	189	11	4
IGHV3_4I*F1 30	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	AKCRNWNDFA Y	190	11	4
IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVHRGGPFDY	191	11	9
IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARGGRVHPMDY	192	11	6

[0246]

IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARGGPVSPFDY	193	11	9
IGHV4_11*S4 664	IGHD4- 2*01	IGHJ5- 1*01	ARGQRVAPFDV	194	11	8
IGHV5_1A*F 124	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	AKETYEDDYGYYSL GYNRFDV	195	21	2
IGHV5_1F*F 134	IGHD1- 7*01	IGHJ4*0 1	ASAWREHLPIDY	196	12	7
IGHV3_1Z*F 134	IGHD3- 3*01	IGHJ6*0 1	ARDLYPGVINPSGLD S	197	16	4

[0247] 表7(续):从经RC1-4fi11 VLP免疫的猕猴产生的抗体序列

[0248]

NHP 5						
VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGSSYYQPEYFEF	198	16	9
IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGSSYYQPEYFEF	198	16	10
IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	VRDKGSSYYQPEYFEF	199	16	7
IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDY	200	11	11
IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDY	200	11	11
IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDC	201	11	7
IGHV5_1C* F130	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	AKGGDNYYDSGYDDY	202	16	0

[0249]

IGHV4_3N*	IGHD3-	IGHJ4*				
F133	3*01	01	ARNRGWGDLVFDY	203	13	3
IGHV5_1H*	IGHD6-	IGHJ4*				
F132	1*01	01	AKVLSGWFWDYFDY	204	14	8
IGHV4_11*	IGHD6-	IGHJ4*				
S4664	5*01	01	ARLAVAGPVDY	205	11	5
IGHV3_3F*	IGHD6-	IGHJ6*				
F132	1*01	01	ARGSSGWYGSGLDS	206	14	7
IGHV4_1U*	IGHD1-	IGHJ5-				
F130	1*01	1*01	ARDHIESWNKVNWFDV	207	16	7
IGHV1_1G*	IGHD6-	IGHJ1*				
F133	3*01	01	ATYSGSWYAEYFEF	208	14	1
IGHV5_1F*	IGHD2-	IGHJ4*				
F134	3*01	01	AKQEDYNFWSSYFLPDY	209	17	1
IGHV1_1G*	IGHD6-	IGHJ4*				
F133	1*01	01	ARDSSGWYEGFDY	210	13	1
IGHV1_53*	IGHD3-	IGHJ4*				
S2078	1*01	01	ATGRYYGPSWAIFDY	211	15	3
IGHV4_11*	IGHD1-	IGHJ4*				
S4290	8*01	01	ARDGNFGPIDY	212	11	4
IGHV7_1A*		IGHJ5-				
F124		1*01	ASGPNWFDV	213	9	7
IGHV5_1C*	IGHD2-	IGHJ4*				
F130	5*01	01	AKSETDFWTSYYFNY	214	15	8
IGHV4_2M*	IGHD2-	IGHJ5-	ARDICSGSGCYWYRDN			
F130	5*01	1*01	WFDV	215	20	1

[0250]

IGHV4_1T* F130	IGHD2- 1*01	IGHJ4* 01	ASNRRIAPLDY	216	11	6
IGHV7_1A* F124	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ASGRYYFDY	217	9	5
IGHV3_3F* F132	IGHD4- 3*01	IGHJ1* 01	ARDRTVTPNRGYFEF	218	15	8
IGHV1_2B* F134	IGHD6- 5*01	IGHJ6* 01	ARDGPYSGGWSELDS	219	15	1
IGHV4_5F* F132	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARWEYSGNWGLDY	220	13	22
IGHV4_11* S5305	IGHD6- 2*01	IGHJ3* 01	ARSTSSWPRTSDAFDF	221	16	1
IGHV3_4I*F 130	IGHD6- 2*01	IGHJ4* 01	AKKRSSWSRIDY	222	12	1
IGHV3_3F* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARDGSGWRRVTFDY	223	14	10
IGHV7_1A* F124	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ATGRNYFDY	224	9	4
IGHV3_4I*F 130	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	AKTGAVTTGFDY	225	12	4
IGHV4_11* S0762	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARLVGGSGYYYIGD	226	14	0
IGHV3_1B* F124	IGHD6- 2*01	IGHJ4* 01	AKVPYSSWSHFDY	227	13	6

[0251]

IGHV3_2M* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	TSPRMRYSSGSFDY	228	14	3
IGHV1_2B* F134	IGHD4- 2*01	IGHJ4* 01	ARVRGYSGYSFFDY	229	14	0
IGHV3_4S* F133	IGHD6- 2*01	IGHJ5- 1*01	SRGSTWSGDWFDV	230	13	7
IGHV3_3O* F130	IGHD4- 4*01	IGHJ5- 1*01	TKRLAYSNPYNRFDV	231	15	2
IGHV3_2W* F134	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARGGVGLDDVTYYYSGS YYYHRTSFDY	232	27	1
IGHV4_2M* F130	IGHD5- 2*01	IGHJ5- 1*01	AGDRGGYNYGFTDNWF DV	233	18	5
IGHV3_2C* F133	IGHD3- 4*01	IGHJ4* 01	TRGTAYYNFWSNSSPGY FDY	234	20	3
IGHV3_4V* F133	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGSSYYQPESFEF	235	16	8
IGHV4_1N* F130	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ARRYEDDYGYYPGP NIAGTTRGVEE	236	27	6
IGHV4_1I*F 130	IGHD6- 2*01	IGHJ3* 01	ARSTSSWPRTSDAFDF	221	16	1
NHP 6						
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFD V	237	18	4
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFD V	237	18	1
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFD V	237	18	1
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFD V	237	18	6

[0252]

IGHV4_11* S5305	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	ARLAVAGPFDY	238	11	5
IGHV4_11* S5305	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	ARLGVAGPLDY	239	11	2
IGHV1_2B* F134	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ATYKTIDY	240	8	3
IGHV1_2B* F134	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ASYKNIDY	241	8	1
IGHV4_11* S9280	IGHD4- 1*01	IGHJ4* 01	ARDRHGIPFDY	242	11	2
IGHV1_2B* F134	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARSRGYWGDLFDF	243	13	0
IGHV3_45* S5348	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARLSGWGDFRIDY	244	13	2
IGHV1_53* S2078	IGHD2- 1*01	IGHJ5- 1*01	ATGIWFDV	245	8	4
IGHV3_45* S5257	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ARANNGGYFDY	246	11	6
IGHV1_2B* F134	IGHD4- 1*01	IGHJ2* 01	ARMTTVAAFGGYFDL	247	15	5
IGHV7_1A* F124	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ASGGNYADY	248	9	1
IGHV4_11* S4664	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARRLSRRYFDY	249	11	0
IGHV3_2L* F132	IGHD2- 4*01	IGHJ4* 01	TREFCSGIYCYAPFDY	250	16	0

[0253]

IGHV1_2B* F134	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 2*02	ASFKTLDV	251	8	3
IGHV5_1F* F134	IGHD5- 1*01	IGHJ4* 01	AKGVGGFSYSYPHY	252	14	8
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 4*01	IGHJ4* 01	ARDGHYNFWSPPGY	253	14	5
IGHV4_11* S9724	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARAEDEDDYGSFDV	254	14	6
IGHV4_11* S5305	IGHD6- 1*01	IGHJ3* 01	ARLGSSGWYRDDAFDF	255	16	3
IGHV3_1C* F124	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	AKPRGRWLEDY	256	11	7
IGHV3_1V* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	TRPRQYSTGDY	257	11	0
IGHV3_1C* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	AKMGGRGYSSYGPVFD Y	258	17	2
IGHV4_11* S4129	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ARIVTRGPFDY	259	11	3
IGHV3_45* S5257	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	ARDVTTRVVIIDHRFDV	260	17	1
IGHV7_1A* F124	IGHD6- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARQLGGGQTDREFDV	261	14	3
IGHV7_1A* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	ARQAYSNYPDY	262	11	3
IGHV3_4I*F 130	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	VKLREKWETRGD	263	12	4

[0254]

IGHV5_1F* F134	IGHD4- 1*01	IGHJ5- 1*01	AKSYGSMSNRFDV	264	13	3
IGHV4_11* S4664	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARVIRLGPFDY	265	11	2
IGHV4_11* S4129	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARETFEGDDYGYYYTPD NWFDV	266	22	3
IGHV3_2P* F133	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	AKSGNSGSWNYFDY	267	14	9
IGHV3_45* S5348	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARRRGWGDYFDY	268	13	1
IGHV1_53* S2078	IGHD3- 1*01	IGHJ1* 01	ATGFSMITVALFDF	269	14	1
IGHV4_11* S4359	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ASQGYEDDYAYWAFKF DY	270	18	1
IGHV4_11* S4664	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARSPGIVAPFDY	271	12	10
IGHV7_A*F 132	IGHD4- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARSRSGSNSESFRDV	272	15	5
IGHV7_1A* F124	IGHD6- 3*01	IGHJ2* 01	ARPLYSGNWNVYWYFD L	273	17	4
IGHV4_11* S4290	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARDGWGGWTIDY	274	12	3
IGHV4_11* S9724	IGHD4- 1*01	IGHJ4* 01	ARSGYGSGGTFDY	275	13	4

[0255]

IGHV1_53* S2078	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ATTPGYCSSTYCRFDY	276	16	0
IGHV1_53* S2078	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ATKNYYDSGYHLSGEYF EF	277	19	4
IGHV3_4I*F 130	IGHD1- 2*01	IGHJ5- 1*01	AQCPEYSWNMGWFDV	278	15	2
IGHV4_11* S3915	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 1*01	ASPFYGS GYYTRRFDV	279	16	9
IGHV4_5B* F133	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	ARDGYYS GDYYRHNWF AV	280	18	5
IGHV4_11* S4290	IGHD2- 1*01	IGHJ4* 01	ARDCVDAFDY	281	10	0
IGHV1_53* S2078	IGHD1- 3*01	IGHJ4* 01	ATGYNWNDPFDY	282	12	2
IGHV5_1E* F133	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	TKVEGGYWG DYHRFDV	283	16	5

[0256] 表8:λ基因的使用

[0257]

	IGLV124*4	IGLV3-21*01 人类
IGLV124*4		93.8
IGLV3-21*01 人类	93.8	
	IGLV132*15	IGLV2-8*01 人类
IGLV132*15		90.6
IGLV2-8*01 人类	90.6	

[0258] 表9:由经RC1-4f111 VLP免疫的猕猴产生的含DSS基序的抗体序列

[0259]

NHP 1					
VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSAWV	287	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSVRV	288	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSARV	289	11	4
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSXQV	290	11	6
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	5
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	7
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDNSLSAHV	291	11	3
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	1
IGLV124*30	IGLJ1*01	LSYDSSLSAHI	293	11	10
IGLV124*30	IGLJ1*01	LSYDSSLSAHI	293	11	12
IGLV124*43	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	2
IGLV124*43	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	1
IGLV124*30	IGLJ2*01	GAWDSSLSAGL	295	11	27
IGLV124*41	IGLJ3*01	SAWDSSLSDEL	296	11	2
IGLV132*20	IGLJ3*01	AAWDDSLSGVL	297	11	4
IGLV124*30	IGLJ2*01	ETWDYSLNGPL	298	11	21
IGLV124*24	IGLJ6*01	YSGDDNNDV	299	9	2
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSGHI	300	11	2
IGLV130*2	IGLJ6*01	QWTTTDV	301	7	82

[0260]

IGLV130*2	IGLJ3*01	CSYTTSNTLL	302	10	2
IGLV124*30	IGLJ3*01	ETWDYSLNGPL	298	11	22
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSVHYI	303	12	2
IGLV130*31	IGLJ2*01	SSYASSSTWV	304	10	1
NHP 5					
VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSALL	306	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVF	307	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	4
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSARL	308	11	5
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSNVL	309	11	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSGVL	310	11	4
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNSLSAVL	311	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNNLSAVL	312	11	7
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	6
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSYLSAGL	316	11	9
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
IGLV132*9	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	13
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	2
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDNSLSDDV	317	11	3
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	5
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSALV	318	11	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSNLSAHVL	319	12	3

[0261]

IGLV132*12	IGLJ3*01	QSFDSNLSIHLL	320	12	4
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAHVL	321	12	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAHVL	321	12	3
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	1
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	7
IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSSGGTHVL	323	11	29
IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGPV	324	11	1
IGLV132*11	IGLJ3*01	QVWDSRSDHPL	325	11	8
IGLV124*38	IGLJ1*01	MIWHNNASI	326	9	4
IGLV132*43	IGLJ2*01	WLYYSGGHGL	327	10	4
IGLV130*33	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	8
IGLV130*21	IGLJ6*01	QVWDSSSDHHDV	328	12	4
NHP 6					
VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSAWV	287	11	4
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	4
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLRAQV	329	11	7
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	10
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	0
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLTAGL	330	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	5
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLSAGL	331	11	2
IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLKGVV	332	11	10
IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGVV	333	11	3

[0262]

IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLNGWV	334	11	4
IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGPL	335	11	3
IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNVWA	336	9	5
IGLV132*21	IGLJ2*01	VIWHNNVWA	337	9	6
IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNAWI	338	9	3
IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNAWV	339	9	5
IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	4
IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	2
IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	3
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDNSLSAYI	341	11	6
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSILSSYI	342	11	7
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSL SAYI	322	11	4
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSRLSADV	343	11	13
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSL SAHV	286	11	3
IGLV132*33	IGLJ2*01	QVWDGSTKYAGL	344	12	13
IGLV132*33	IGLJ2*01	QVWDDSTNYAGL	345	12	16
IGLV124*30	IGLJ3*01	GAWDSSLSALL	346	11	20
IGLV124*30	IGLJ3*01	GAWDSSLSALL	346	11	20
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSDVL	347	11	4
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSL SAQL	348	11	1
IGLV132*21	IGLJ3*01	MIWHEDDFVL	349	10	24
IGLV130*33	IGLJ2*01	GAWDSSLSAHWV	350	12	28
IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	24
IGLV132*15	IGLJ1*01	SSYVGSGTYI	352	10	6
IGLV132*15	IGLJ2*01	SSYAGSGTGL	353	10	2

[0263]

IGLV130*2	IGLJ2*01	CSYTTSNTLI	354	10	4
IGLV124*17	IGLJ2*01	QVWDISSDHPV	355	11	2
IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSSAHPV	356	11	1
IGLV124*17	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	6
IGLV130*33	IGLJ1*01	QSYDSSLSAHYI	357	12	9
IGLV132*29	IGLJ2*01	QSADSSGNHWV	358	11	23
IGLV132*27	IGLJ6*01	QTWTTGIHV	359	9	75
IGLV124*3	IGLJ2*01	GSYRTGATFL	360	10	17
IGLV124*6	IGLJ1*01	SSYAGSNTFI	361	10	2
IGLV132*11	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	7
IGLV130*33	IGLJ3*01	QSYDGSLSAQL	363	11	11
IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSDHPL	364	9	3
NHP 8					
VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	Nt mut.
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSTLSGGL	365	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGGL	366	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNTLSAGL	367	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLVGL	368	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLTAGL	369	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNNLSAQV	370	11	6

[0264]

IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLSAGL	331	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSARV	371	11	5
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	4
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	0
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDISLSAGL	372	11	3
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNILNAGL	373	11	4
IGLV132*12	IGLJ2*01	HSYDSSLSAQV	374	11	2
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNLSAVL	311	11	2
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	4
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSALL	306	11	5
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNLSAVI	375	11	5
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSXVL	376	11	3
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	0
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAQL	348	11	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSGVL	310	11	1
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSRLSALL	377	11	5
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVV	378	11	5
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNLSAVL	311	11	2
IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNLSALL	379	11	3
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	4
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	4
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSALV	318	11	1
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	4
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	5
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSXXXHV	380	11	3
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	2
IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSTHV	381	11	9

[0265]

IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLTADV	382	11	4
IGLV132*1	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	1
IGLV132*15	IGLJ1*01	SSYAGSGTYI	384	10	2
IGLV132*15	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	5
IGLV132*15	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	6
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSRLSAHV	385	11	6
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	4
IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYHSSLRAYI	386	11	5
IGLV124*3	IGLJ1*01	RSYRSGRTNI	387	10	4
IGLV124*3	IGLJ1*01	CSYRSGDTLI	388	10	4
IGLV124*3	IGLJ2*01	YSYRSGNTLV	389	10	3
IGLV124*3	IGLJ2*01	CSYRSGSTFL	390	10	2
IGLV130*2	IGLJ1*01	CSYTTSSTFI	391	10	2
IGLV130*2	IGLJ1*01	CSYTTSSTFI	391	10	2
IGLV132*1	IGLJ2*01	SSYAGINTLV	392	10	1
IGLV132*15	IGLJ2*01	SSYAGSNTFL	393	10	9
IGLV132*17	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	15
IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	28
IGLV124*4	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	1
IGLV124*4	IGLJ2*01	QVWDISSDHPV	355	11	5
IGLV130*21	IGLJ6*01	QVWDSSSDHPV	394	11	2
IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	0
IGLV130*21	IGLJ1*01	QVWDSSNDHYI	395	11	2
IGLV132*37	IGLJ2*01	AAWDDRLSGWV	396	11	1
IGLV132*2	IGLJ2*01	CSYTSGSTWV	397	10	4

[0266]

IGLV132*17	IGLJ6*01	DSWDSSGTLV	398	10	29
IGLV124*30	IGLJ2*01	LSYDSSLSAGL	399	11	12
IGLV132*33	IGLJ3*01	QVWDSSSDHVL	400	11	3
IGLV132*11	IGLJ1*01	QVWDNSSDHVI	401	11	10
IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSCK	402	8	2
IGLV132*29	IGLJ2*01	QSADSSGNHWV	358	11	24
IGLV124*30	IGLJ1*01	SAWDSSLSAYI	403	11	33
IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSRLRVNWV	404	12	2
IGLV130*2	IGLJ3*01	CSYTTSNTLL	302	10	3
IGLV130*21	IGLJ3*01	QVWDSSSDHVL	400	11	1
IGLV124*30	IGLJ2*01	GAWDSSLSAGL	295	11	19
IGLV132*11	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	5
IGLV130*35	IGLJ2*01	EAWDRSLSAWV	405	11	34
IGLV124*30	IGLJ1*01	DTWDNSLNGYI	406	11	20

[0267]

表 10: 具有与 iGL V3-聚糖斑 bNab 的 CDR13 相似的 CDR13 的猕猴 GC 抗体

抗体	格式	细胞	NH P	VH	DH	JH	nt mut	CDRH3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	VL	JL	nt mut	CD RL3	SEQ ID NO:	长度 (AA)	V3-GL SPEC.	方法
874	Fab	LN	1	IgHV3 _2N*F _134	IgH D6- 6*0 _1	IgHJ 1*0 _1	5	AKSPWG QSTSFYEY FEF	134	16	IgLV 124*4 _3	IgLJ 3*0 _1	1	QV WD SSS DHP _L	294	11	是	OCTET/SP R/冷冻-EM
876	Ig	LN	1	IgHV3 _2N*F _134	IgH D6- 6*0 _1	IgHJ 1*0 _1	4	AKSPWG QSSSFYEY FEF	133	16	IgLV 124*4 _3	IgLJ 3*0 _1	2	QV WD SSS DHP _L	294	11	是	ELISA
890	Ig	LN	1	IgHV1 _2B*F _134	IgH D1- 7*0 _1	IgHJ 4*0 _1	6	ARDRSVT PFSWVEY YFDY	182	18	IgLV 132*1 _2	IgLJ 2*0 _1	7	QSY DSS LSA _GL	285	11	是	ELISA
890	Fab	LN	1	IgHV1 _2B*F _134	IgH D1- 7*0 _1	IgHJ 4*0 _1	6	ARDRSVT PFSWVEY YFDY	182	18	IgLV 132*1 _2	IgLJ 2*0 _1	7	QSY DSS LSA _GL	285	11	是	OCTET

[0268]

893	Ig	LN	1	IgHV1 _53*S2 078	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 1*0 1	2	ATGPYW GDYYGR YFEL	145	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	3	QSY DNS LSA HV	291	11	是	ELISA
893	Fab	LN	1	IgHV1 _53*S2 078	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 1*0 1	2	ATGPYW GDYYGR YFEL	145	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	3	QSY DNS LSA HV	291	11	是	OCTET
897	Ig	LN	1	IgHV4 _11*S5 305	IgH D6- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	4	ARDSSG WPWDNR FDV	172	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	6	QSY DNS LSA QV	433	11	是	ELISA
897	Fab	LN	1	IgHV4 _11*S5 305	IgH D6- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	4	ARDSSG WPWDNR FDV	172	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	6	QSY DNS LSA QV	433	11	是	OCTET/SP R/冷冻-EM
901	Fab	LN	1	IgHV5 _1A*F 124	IgH D3- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKETYED DYGYS LGYNRFD V	195	21	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	5	QSY DSS LSA GL	285	11	是	OCTET
933	Ig	LN	8	IgHV7 _1A*F 124	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	5	ARLGEYS WNSIGYF DY	407	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA HL	314	11	是	ELISA

[0269]

934	Ig	LN	8	IgHV3_3F*F1 32	IgH D1- 8*0 1	IgHJ 4*0 1	10	ARGGY SGRVFDD Y	408	14	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	0	QSY DSS LSG HL	284	11	是	ELISA
935	Ig	LN	8	IgHV4_3I*F1 32	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	ARHSGW GDPYLD V	409	13	IgLV 132*1 1	IgLJ 2*0 1	6	QV WD SSS DH WV	362	11	是	ELISA
936	Ig	LN	8	IgHV4_6G*F 124	IgH D6- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	14	AINSGSW NYYFDY	410	13	IgLV 130*2 1	IgLJ 6*0 1	2	QV WD SSS DHP V	394	11	是	ELISA
937	Ig	LN	8	IgHV3_1T*F 132	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 1*0 1	1	TSDPATY SWNEYFE F	411	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	2	QSY DNS LSA VL	311	11	是	ELISA
938	Ig	LN	8	IgHV5_1H*F 132	IgH D6- 5*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	1	AKEDGG WSNNRV DV	412	14	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	1	QSY DSS LSA QL	348	11	是	ELISA
986	Fab	LN	8	IgHV5_1F*F1 34		IgHJ 5- 1	3	AKGRGY NRFDV	413	11	IgLV 130*2 1	IgLJ 1*0 1	3	QV WD SSN	395	11	是	ELISA

[0270]

987	Ig	LN	8	IgHV7 _1A*F 124	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	1*0 1	8	VRQGYSS WYNSLD V	414	14	IgLV 130*2 1	IgLJ 3*0 1	2	QV WD SSS DH VL	400	11	是	ELISA
987	Fab	LN	8	IgHV7 _1A*F 124	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2		8	VRQGYSS WYNSLD V	414	14	IgLV 130*2 1	IgLJ 3*0 1	2	QV WD SSS DH VL	400	11	是	ELISA
988	Ig	LN	8	IgHV3 _4J*F1 32	IgH D5- 2*0 1	IgHJ 4*0 1		18	ARDMRDI AAGGYT YGYFDY	415	19	IgLV 130*2 1	IgLJ 2*0 1	2	QV WD SSC K	402	8	是	ELISA
988	Fab	LN	8	IgHV3 _4J*F1 32	IgH D5- 2*0 1	IgHJ 4*0 1		18	ARDMRDI AAGGYT YGYFDY	415	19	IgLV 130*2 1	IgLJ 2*0 1	2	QV WD SSC K	402	8	是	ELISA
990	Ig	LN	8	IgHV3 _3F*F1 32	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 1*0 1		10	VRDPSITP GPSYNRF DV	416	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LSA HV	286	11	是	ELISA

[0271]

990	Fab	LN	8	IgHV3 _3F*F1 32	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	10	VRDPSITP GPSYNRF DV	416	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LSA HV	286	11	是	ELISA
992	Ig	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKGVYG STNRFDV	417	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	ND	ELISA
992	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKGVYG LTNRFDV	418	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	ND	ELISA
996	Ig	LN	8	IgHV3 _3O*F 130	IgH D3- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	5	TKEGGPE YYNIWT GWNRF V	419	20	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA LV	318	11	是	ELISA
997	Ig	LN	8	IgHV4 _3M*F 133	IgH D2- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	AGGYLLF PLGYNLS DV	420	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA HV	286	11	是	ELISA
997	Fab	LN	8	IgHV4 _3M*F 133	IgH D2- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	AGGYLLF PLGYNLS DV	420	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA HV	286	11	是	OCTET

[0272]

998	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 3*0 1	1	AKGGGPP SWNDPF DF	421	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	3	QSY DSS LSA WV	315	11	ND	ELISA
1000	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	4	AKNGPPY WGMGDY	422	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA GL	285	11	是	ELISA
1000	Ig	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	4	AKNGPPY WGMGDY	422	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA GL	285	11	是	ELISA
1002	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D6- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	2	AKDRGR GGSWSL GNDY	423	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	4	QSY DNI LNA GL	373	11	是	ELISA
1003	Ig	LN	8	IgHV3 _1I*F1 30	IgH D3- 1*0 1	IgHJ 4*0 1	5	AKGGED DYIYYT GADY	424	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSA WV	315	11	是	ELISA
1004	Ig	LN	8	IgHV4 _3M*F 133	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	3	ARGLNF WSGYWG HNSLDV	425	19	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LTA DV	382	11	是	ELISA

[0273]

1005	Ig	LN	8	IgHV4 _11*S4 970	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	14	ARDYSS WPTYNSL DV	426	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	2	QSY DNS LSA VL	311	11	是	ELISA
1013	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D2- 1*0 1	IgHJ 4*0 1	1	AKSTLLR RSLDY	427	12	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	4	QSY DSS LSA VL	305	11	ND	ELISA
1053	Ig	LN	5	IgHV5 _1C*F 130	IgH D2- 5*0 1	IgHJ 4*0 1	1	AKSETDF WTSYYF NY	214	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA QV	313	11	是	ELISA
1054	Ig	LN	5	IgHV1 _2B*F 134	IgH D6- 5*0 1	IgHJ 6*0 1	2	ARDGPYS GGWSEL DS	219	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	是	ELISA
1061	Ig	LN	6	IgHV1 _53*S2 078	IgH D2- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	0	ATTPGYC SSTYCRF DY	276	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 1*0 1	7	QSY DSI LSS YI	342	11	是	ELISA
1062	Ig	LN	6	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D5- 1*0 1	IgHJ 4*0 1	4	AKGVGG FSYSYPH Y	252	14	IgLV 132*1 2	IgLJ 1*0 1	5	QSY DSS LSA YI	322	11	是	ELISA

[0274]

1063	Ig	LN	6	IgHV1 _2B*F 134	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 2*0 1	5	ARMTTV AAFGGYF DL	247	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	6	QSY DSS LSD VL	347	11	是	ELISA
1064	Ig	LN	6	IgHV3 _1V*F 124	IgH D4- 4*0 1	IgHJ 4*0 1	36	TRPRQYS TGDY	257	11	IgLV 124*1 7	IgLJ 2*0 1	2	QV WDI SSD HPV	355	11	是	ELISA
1068	Ig	LN	6	IgHV1 _53*S2 078	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 1*0 1	4	ATKNYY DSGYHLS GEYFEF	277	19	IgLV 130*3 3	IgLJ 3*0 1	11	QSY DGS LSA QL	363	11	是	ELISA
1169	Ig	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D2- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKDGGPS GSYYYG GRFDV	428	18	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	ND	ELISA
1169	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D2- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKDGGPS GSYYYR GRFDV	429	18	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	ND	OCTET
1170	Ig	LN	8	IgHV1 _2G*F 130	IgH D2- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	7	ARGGGH SSFDF	430	11	IgLV 132*1	IgLJ 2*0 1	2	SSY AGI NTL V	392	10	是	ELISA

[0275]

1170	Fab	LN	8	IgHV1 _1P*F1 33	IgH D2- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	7	ARGGGH SSSDF	430	11	IgLV 132*1 1	IgLJ 2*0 1	2	SSY AGI NTL V	392	10	是	ELISA/OCT ET
1177	Fab	LN	6	IgHV4 _5N*F 133	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	10	ARSRGS NSESFRD V	272	15	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY VGS GTY I	352	10	ND	ELISA/OCT ET
1178	Fab	LN	6	IgHV4 _11*S9 280	IgH D1- 8*0 1	IgHJ 3*0 1	0	ARDSYK DSPAFDF	431	13	IgLV 124*6	IgLJ 1*0 1	2	SSY AGS NTF I	361	10	ND	ELISA/OCT ET
1180	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	5	AKDQTD LDWLLY GGFDY	432	17	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	是	ELISA/OCT ET

[0276] 表11:含Q_{xx}DSS基序的bNab (“Q_{xx}DSS”公开为SEQ ID NO:20)

[0277]

bNAb	VH	VL	CDRL3 (MT)	SEQ ID NO:	CDRL3 (iGL)	SEQ ID NO:
PGT121	4-59	L3-21	HIWDSRVPTKWV	434	QVWDSSSDHPWV	445
PGT122	4-59	L3-21	HIWDSRRPTNWV	435	QVWDSSSDHPWV	445
PGT123	4-59	L3-21	HIYDARGGTNWV	436	QVWDSSSDHPWV	445
10-1074	4-59	L3-21	HMWDSRSGFSWS	437	QVWDSSSDHPWV	445
PGT124	4-59	L3-21	MWDSRSGFSWS	438	QVWDSSSDHPWV	445
BG18	4-4	L3-25	QSSDTSDSYKM	439		
PGT125	4-39	L2-8	GSLVGNWDVI	440	SSYAGSNXXX	446
PGT126	4-39	L2-8	SSLVGNWDVI	441	SSYAGSNXXX	446
PGT127	4-39	L2-8	SSLVGNWDVI	441	SSYAGSNXXX	446
PGT128	4-39	L2-8	GSLVGNWDVI	440	SSYAGSNXXX	446
PGT130	4-39	L2-8	SSLFGRWDVV	442	SSYAGSNXXX	446
PGT131	4-39	L2-8	SSLSGRWDIV	443	SSYAGSNXXX	446
DH270.6	1-2	L2-23	SFGGSATVV	444	SYAGSSTVI	447

[0278] 表12:PCR引物

[0279]

重链				
		引物名称	引物序列	SEQ ID NO:
第一 PCR	正向	p1350	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	448
		p1351	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	449
			CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCA	450
		p1352	G	
		p1353	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	451
		VH5 LEADER-A	TTCTCCAAGGAGTCTGT	452
		VH3 LEADER-A	TAAAAGGTGTCCAGTGT	453
		VH3 LEADER-AB	TAAGAGGTGTCCAGTGT	454
		VH3 LEADER-C	TAGAAGGTGTCCAGTGT	455
		VH4 LEADER-D	ATGAAACATCTGTGGTTCTT	456
		VH3 LEADER-E	TACAAGGTGTCCAGTGT	457
		VH3 LEADER-F	TTAAAGCTGTCCAGTGT	458
	反向	3'SalI.JH1/4/5	GCTGAGGAGACGGTGACCAG	459

[0280]

第二 PCR		3'SalI.JH2	<i>GCTGAGGAGATGGTGATTGGG</i>	460
		3'SalI.JH3	<i>GCTGAAGAGACGGTGACCCTG</i>	461
		3'SalI.JH6	<i>GCTGAGGAGACGGTGACGACG</i>	462
	正向	p1355	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG	463
		p1356	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	464
		p1357	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAG	465
		p1358	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG	466
		p1359	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	467
		p1360	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG	468
		p1361	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	469
		p1362	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG	468
		p1363	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG	470
		p1364	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	471
		p1365	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	472
		p1366	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG	473
		p1367	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG	474
	反向	p1370	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCAG	475
		p1371	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAA GAGACGGTGACCATTG	476
		p1372	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCAG	475
		p1373	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCGTG	477

测序		RM_FWD_T4_Se q	GTAGCAACTGCAACCGGTGT	478
集落 PCR	正向	Ab-sense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
	反向	p1354	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	480
	测序	Ab-sense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
轻链 (Igλ)				
		引物名称	引物序列	SEQ ID NO:
第一 PCR	正向	p1394	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG	481
		p1395	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG	482
		p1396	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	483
		p1397	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	484
		p1398	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	485
		p1399	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	486
		p1400	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	487
	反向	p1401	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG	488
第二 PCR	正向	p1402	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTG GGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG	489
		p1403	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTG GGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG	490
		p1404	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT GACCTCCTATGAGCTGACWCAG	491
		p1405	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTCT CTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	492
		p1406	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTTG GGCCAATTTTATGCTGACTCAG	493
		p1407	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCCAA TTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG	494
	反向	p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG	495
测序		p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG	495
集落 PCR	正向	Ab-sense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
	反向	p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG	495
	测序	Ab-sense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479

[0281]

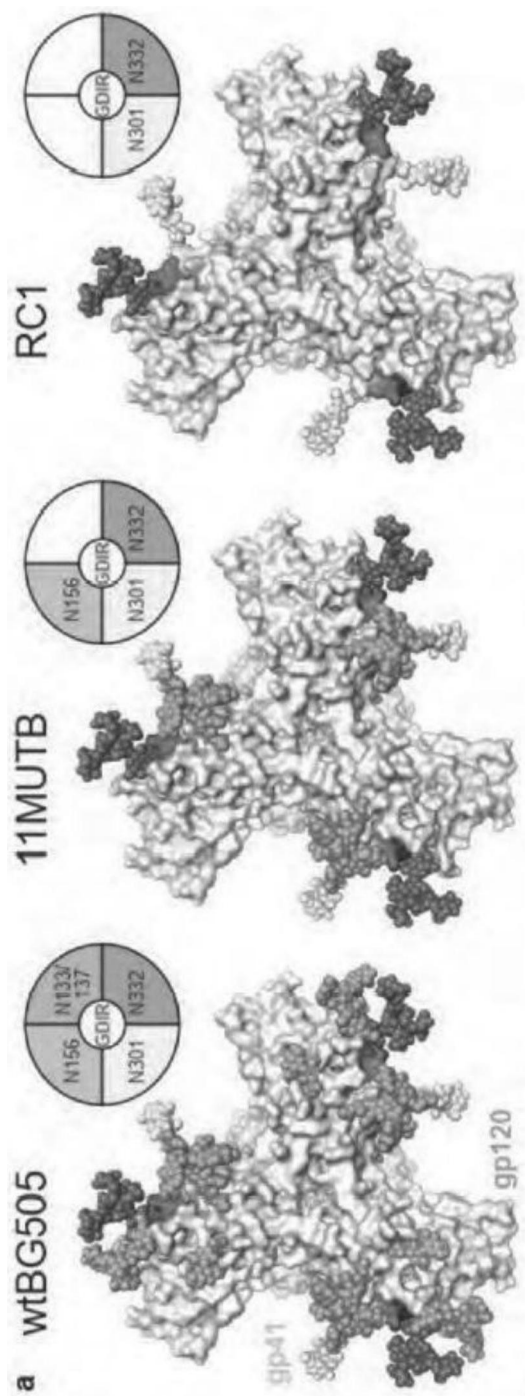


图1a

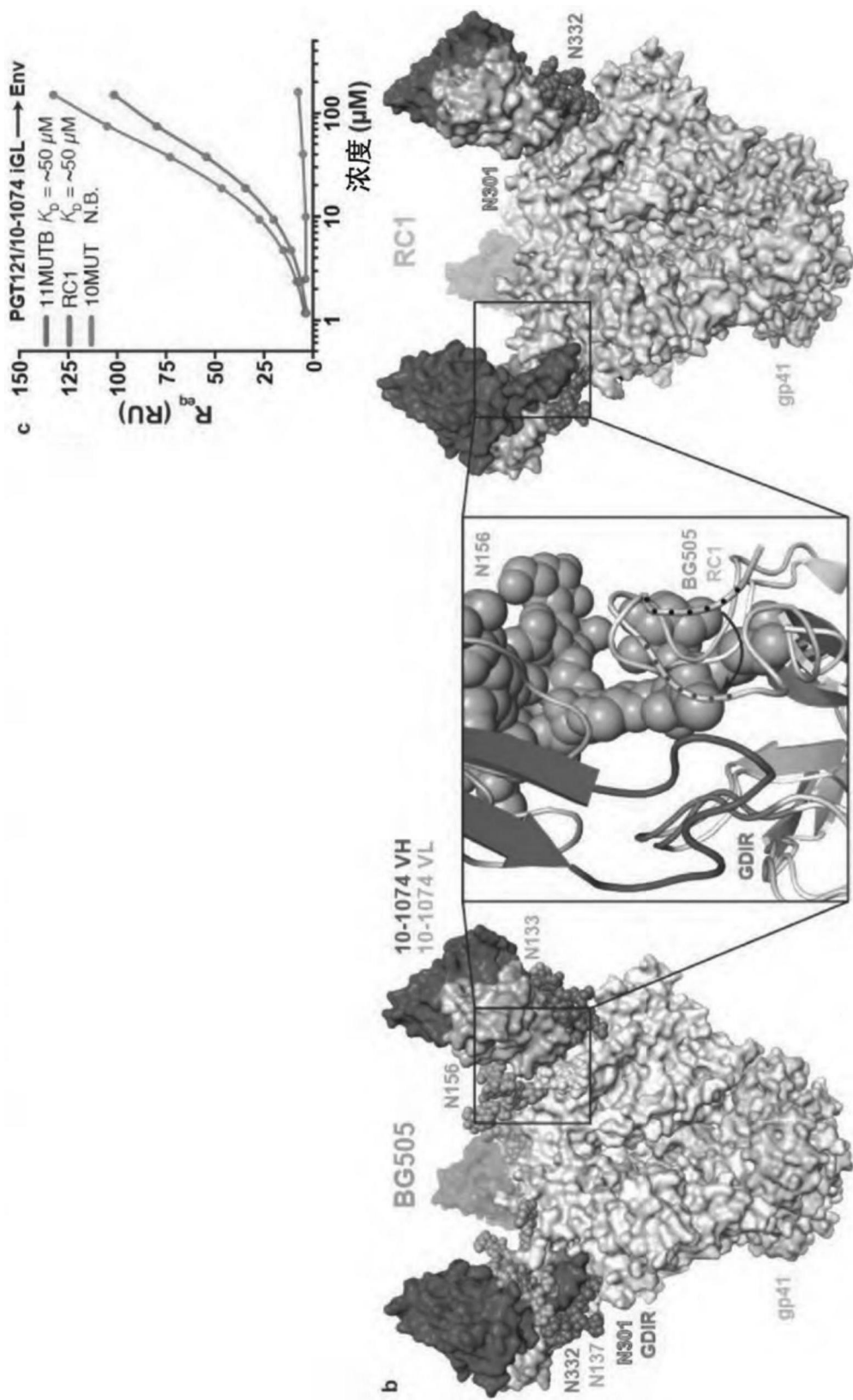


图1b,1c

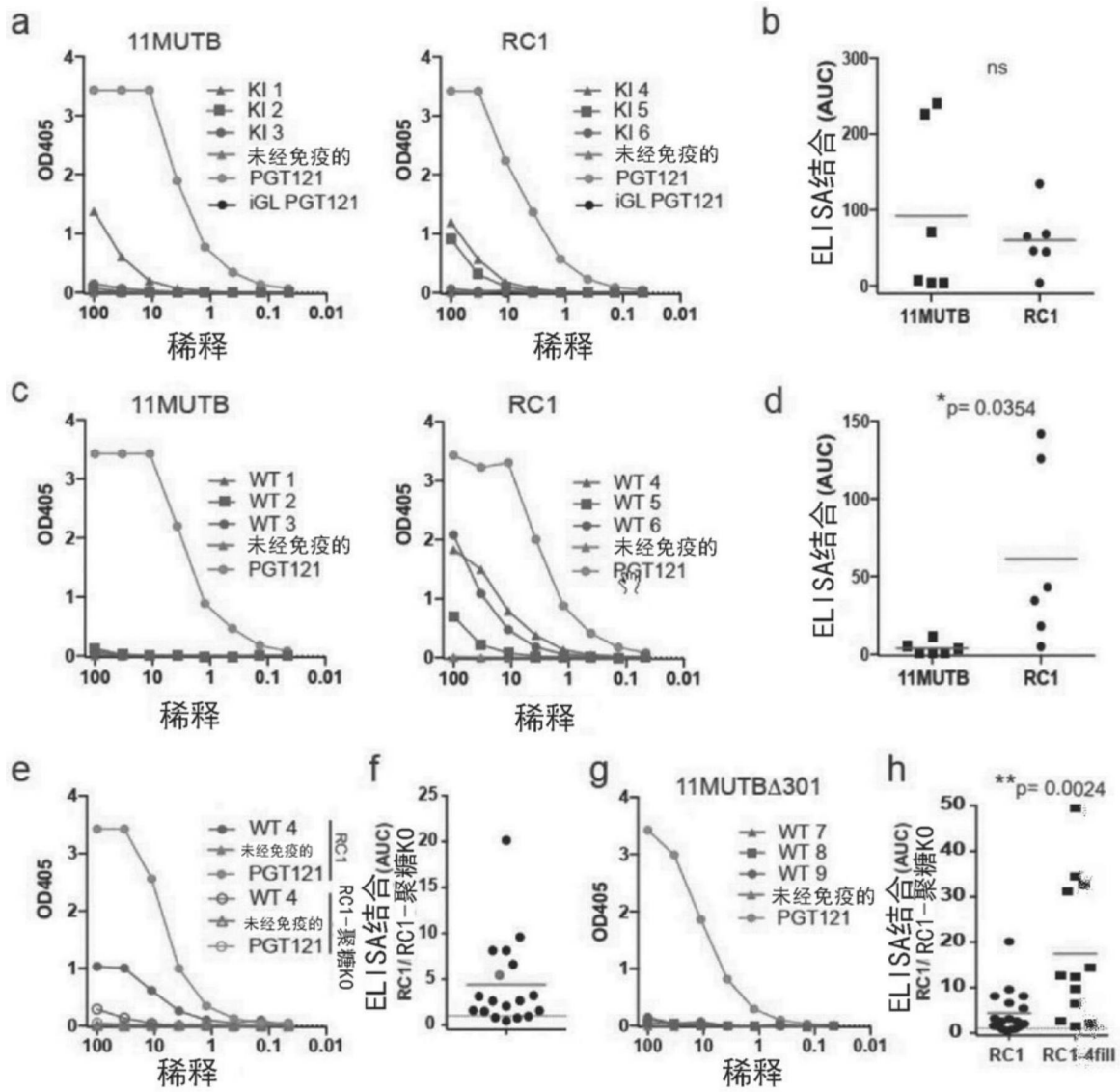


图2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h

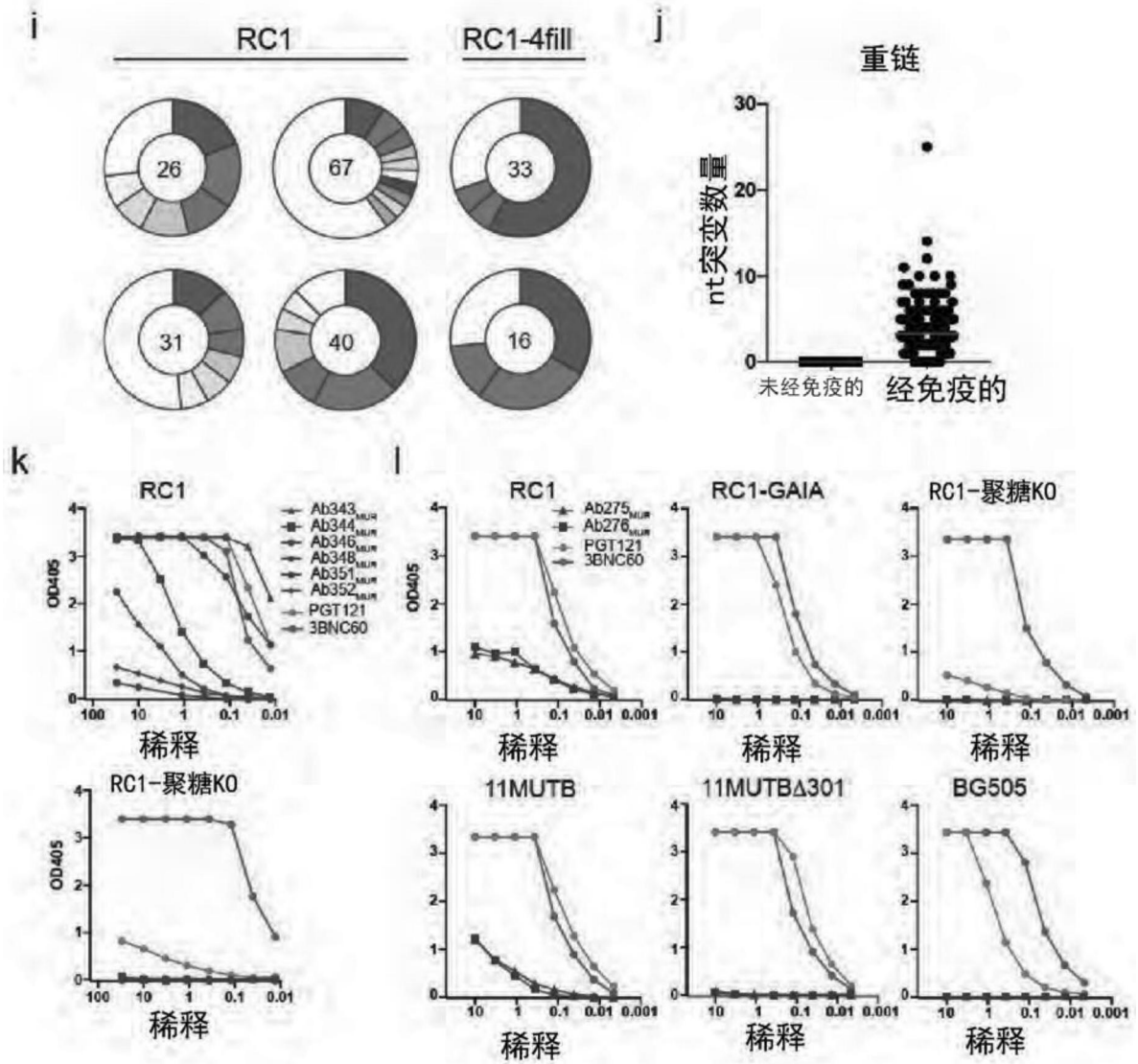


图2i, 2j, 2k, 2l

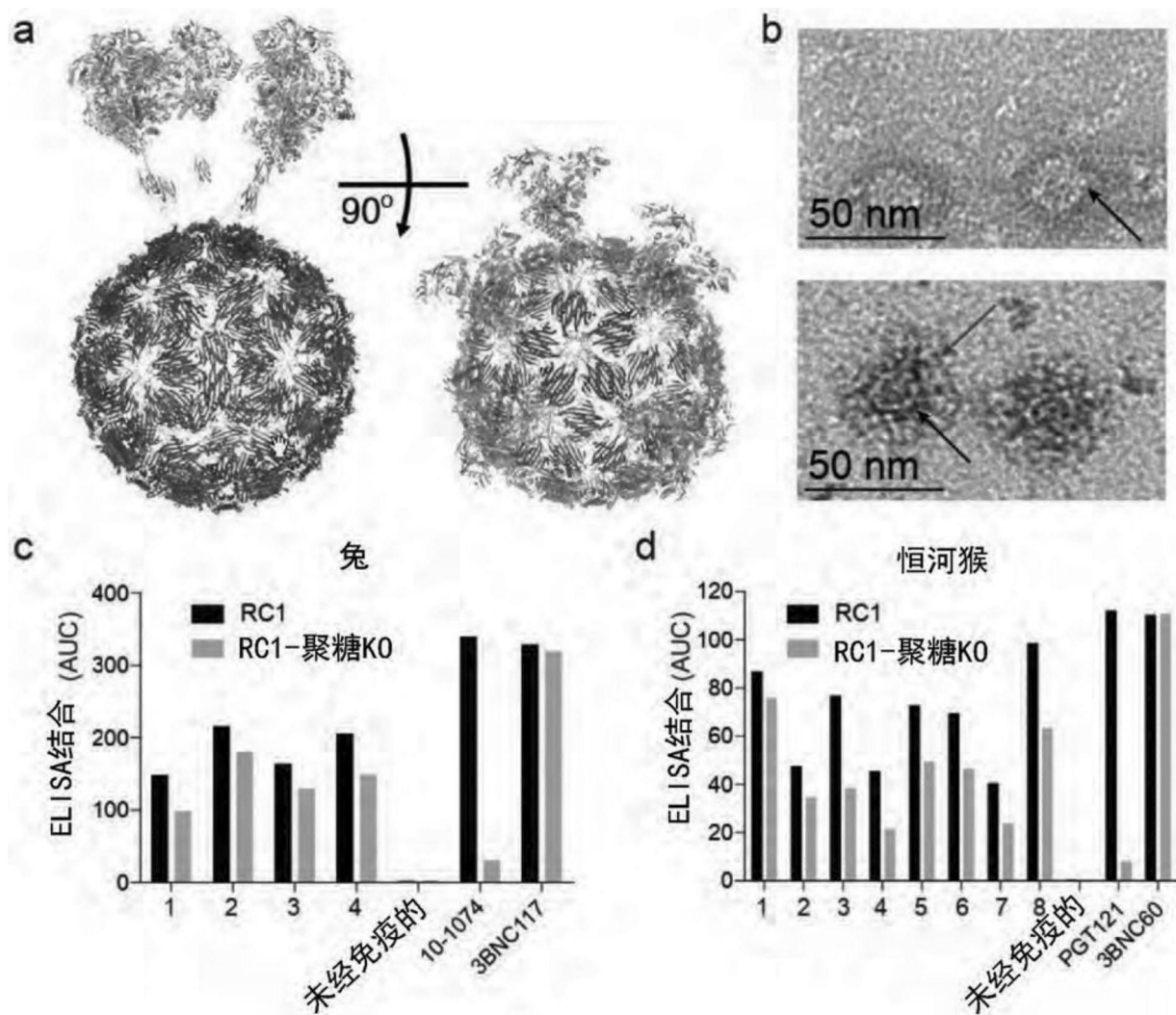


图3a,3b,3c,3d

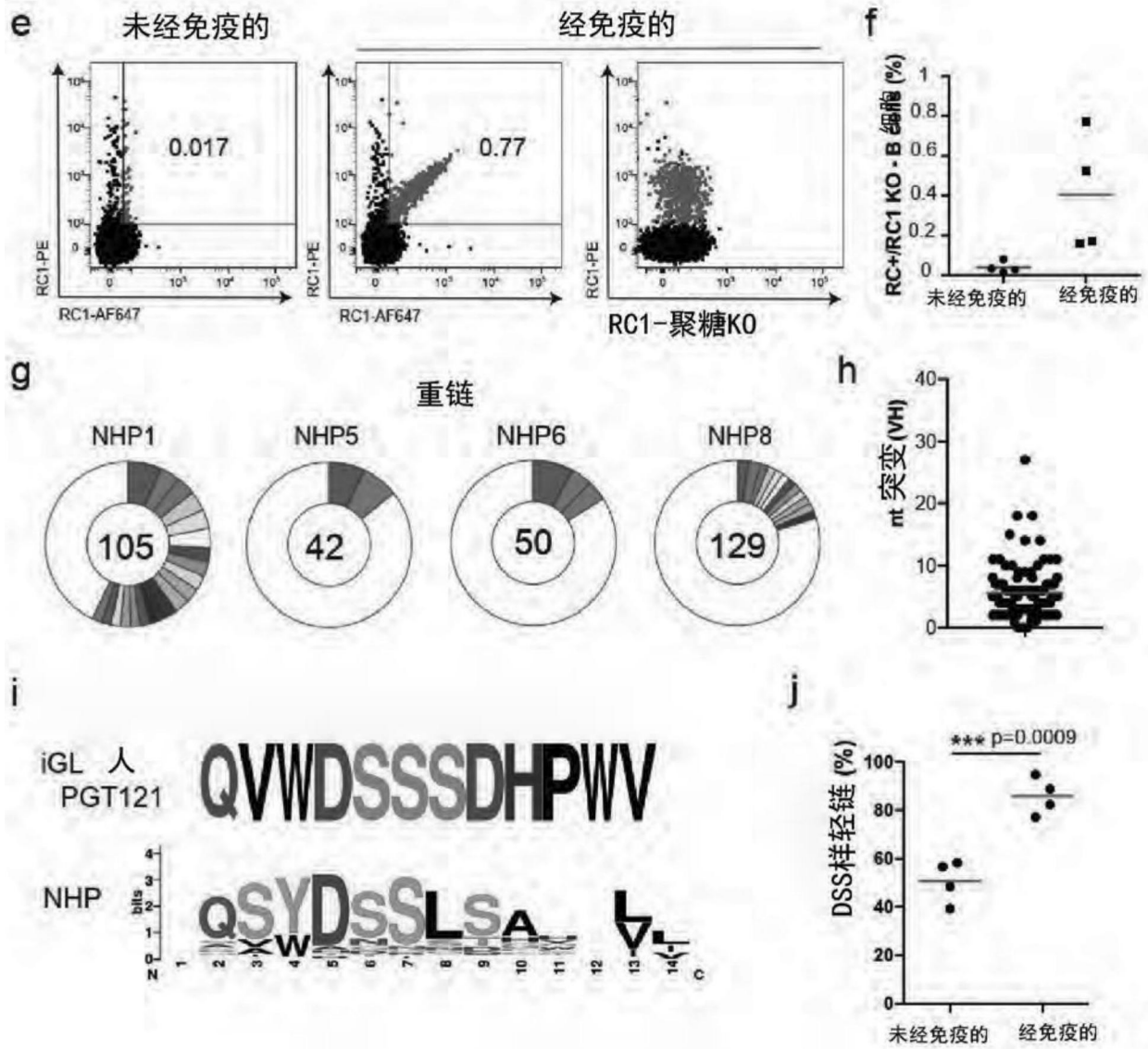


图3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j

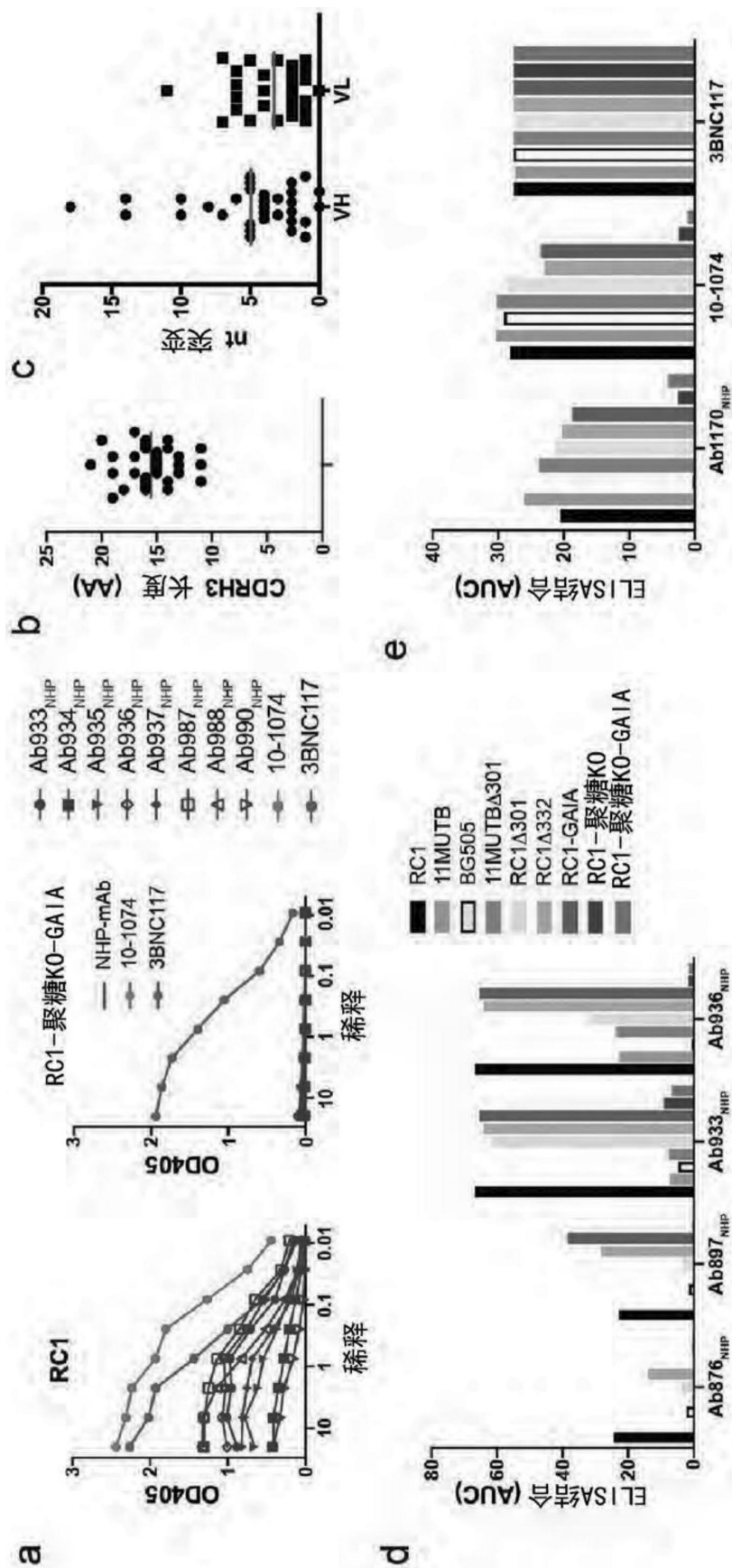


图4a, 4b, 4c, 4d, 4e

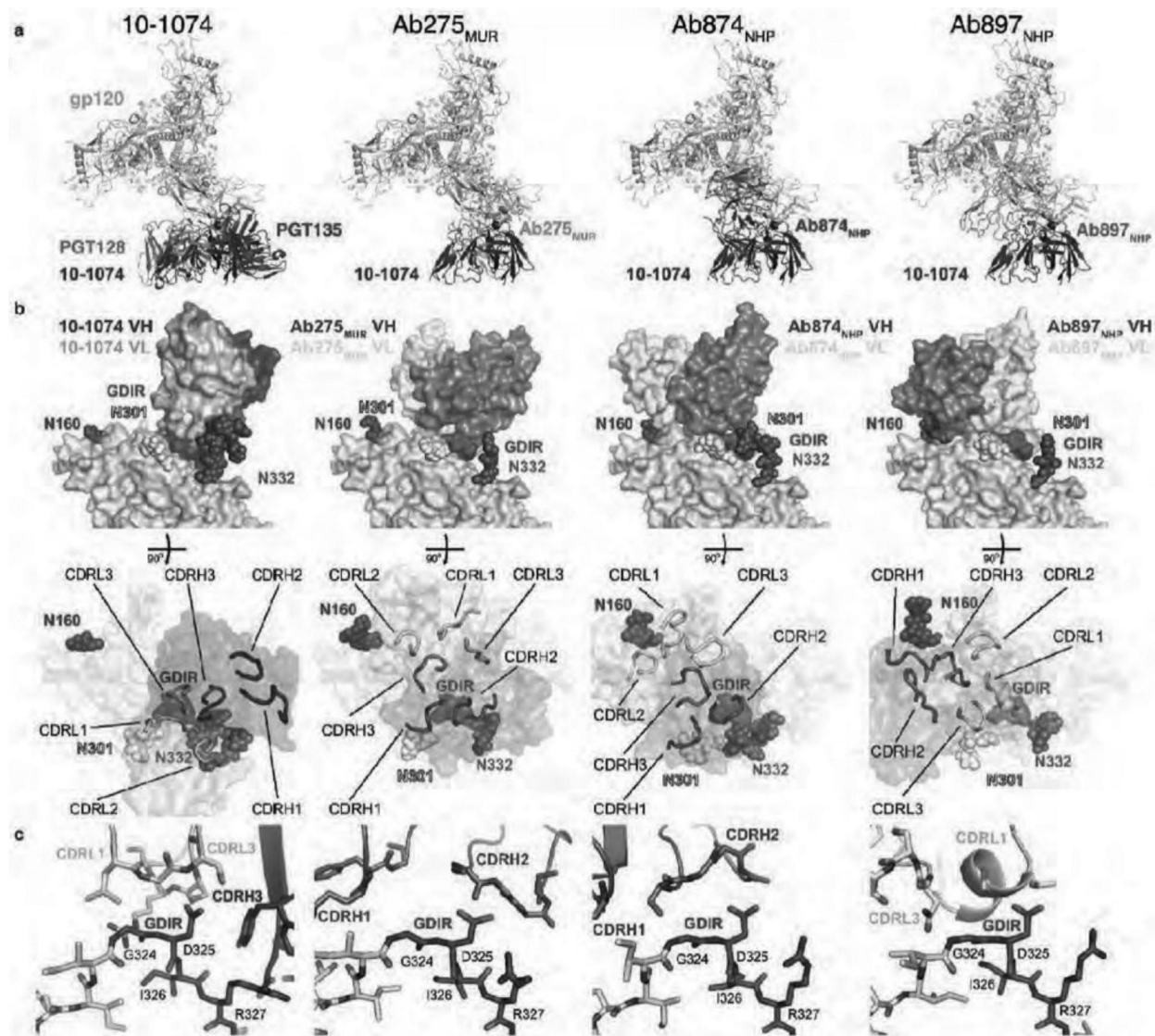


图5a,5b,5c

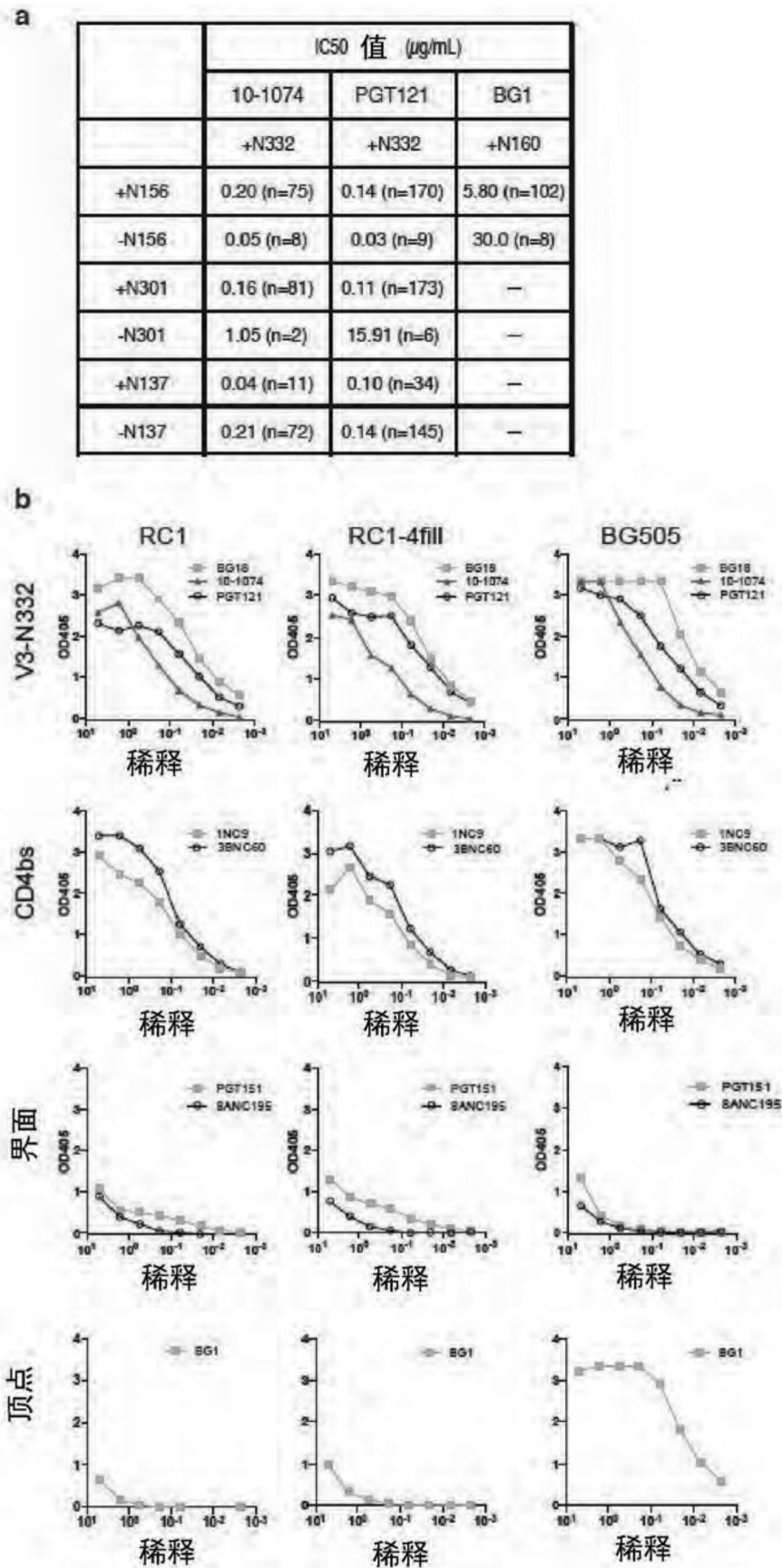


图6a,6b

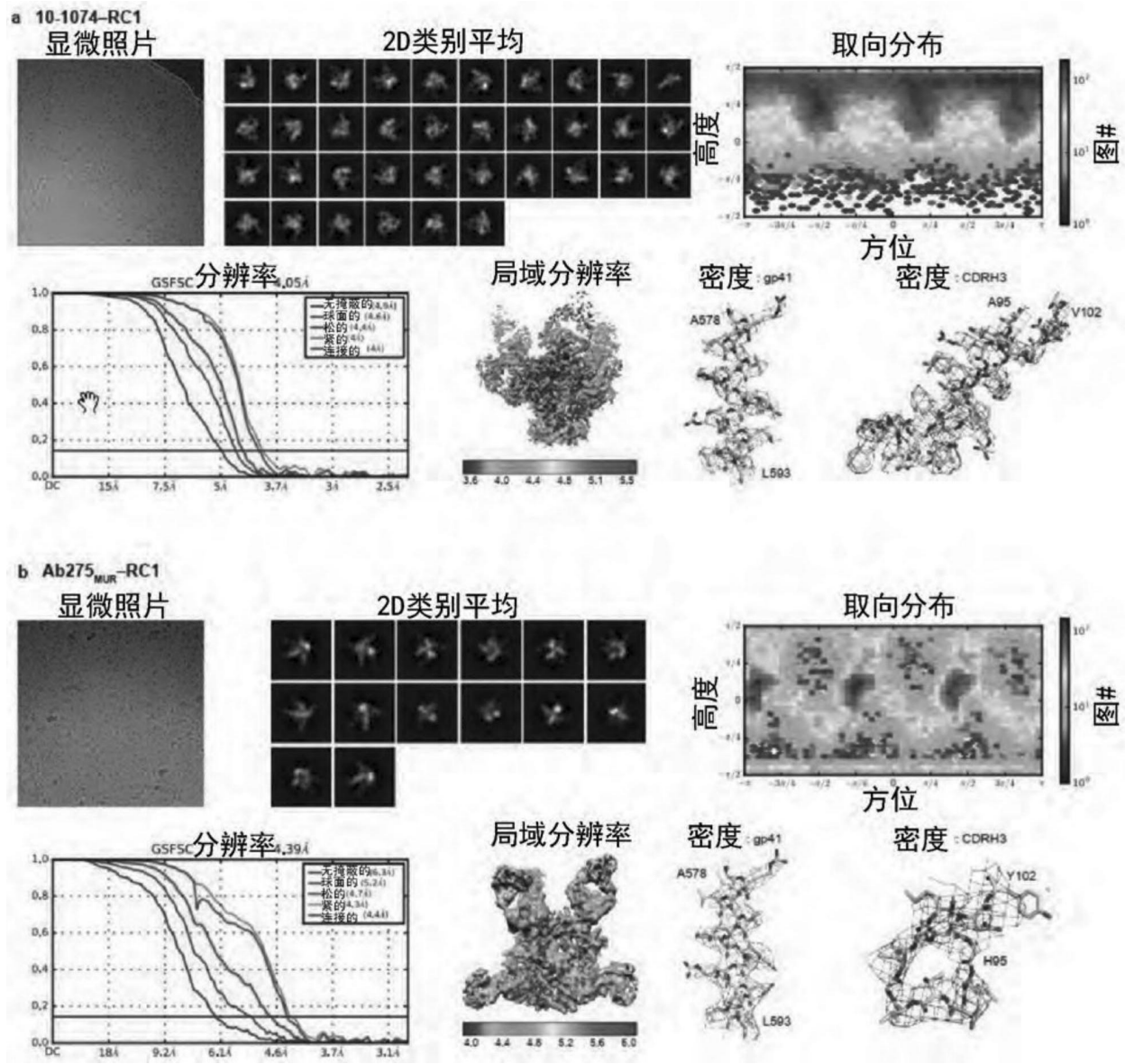


图7a,7b

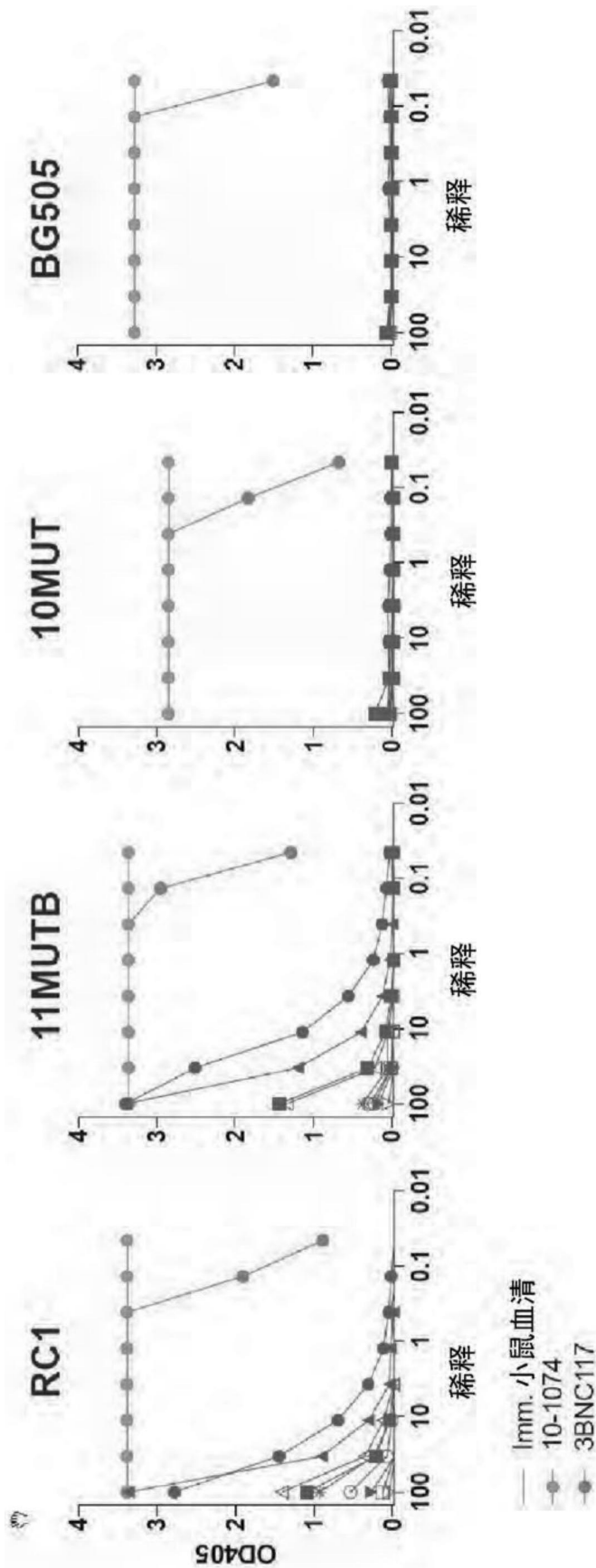


图8

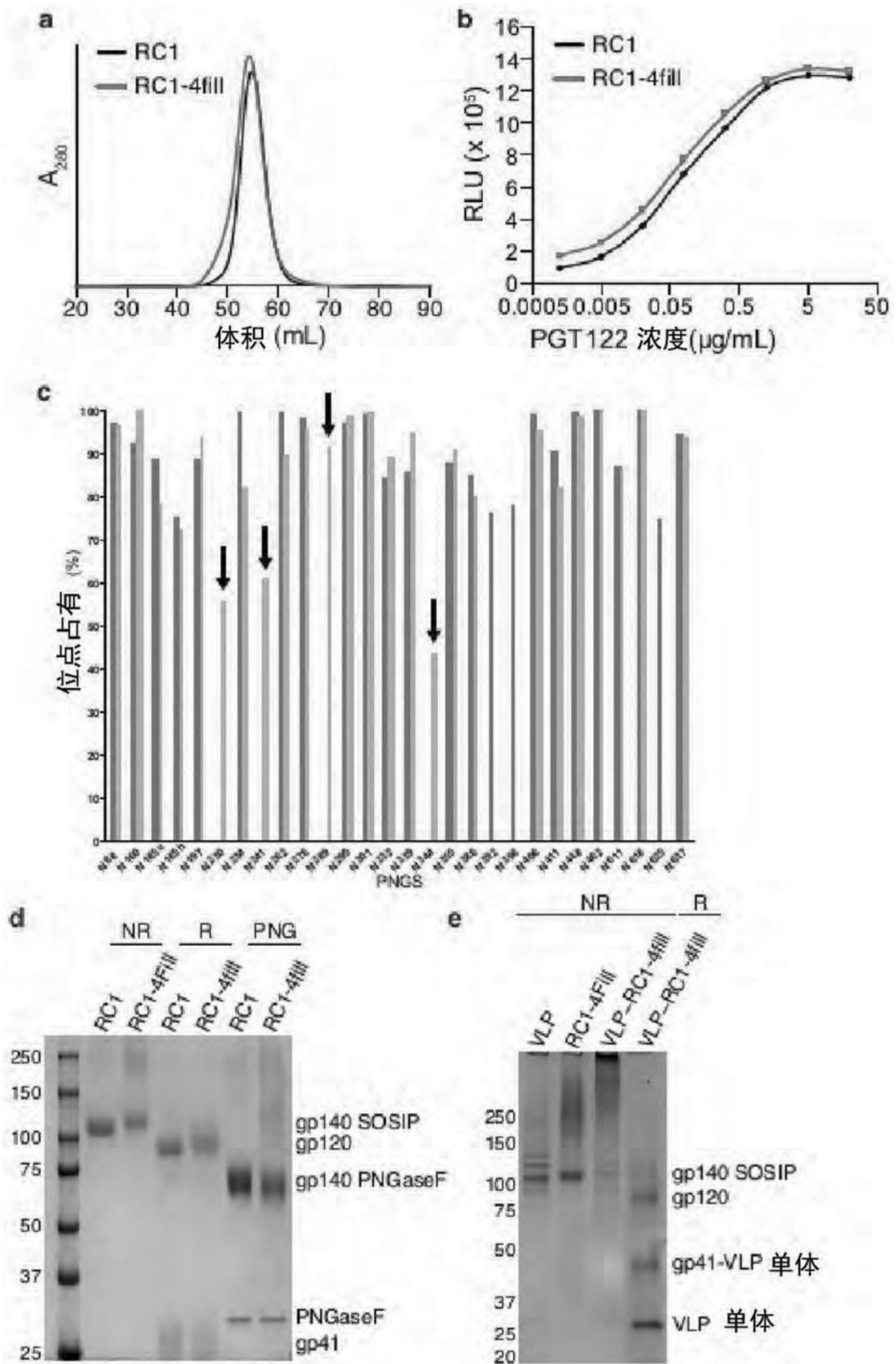


图9a, 9b, 9c, 9d, 9e

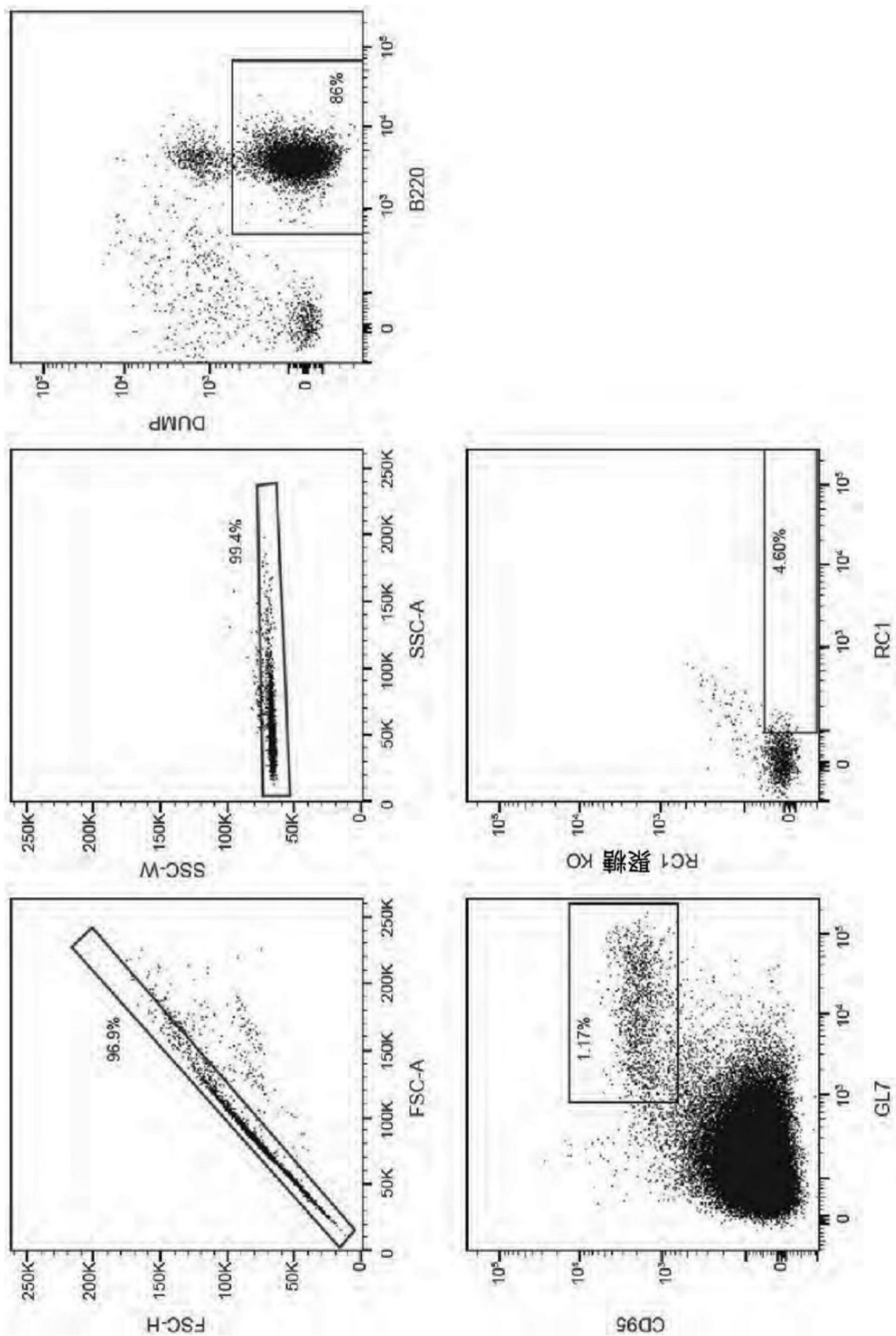


图10

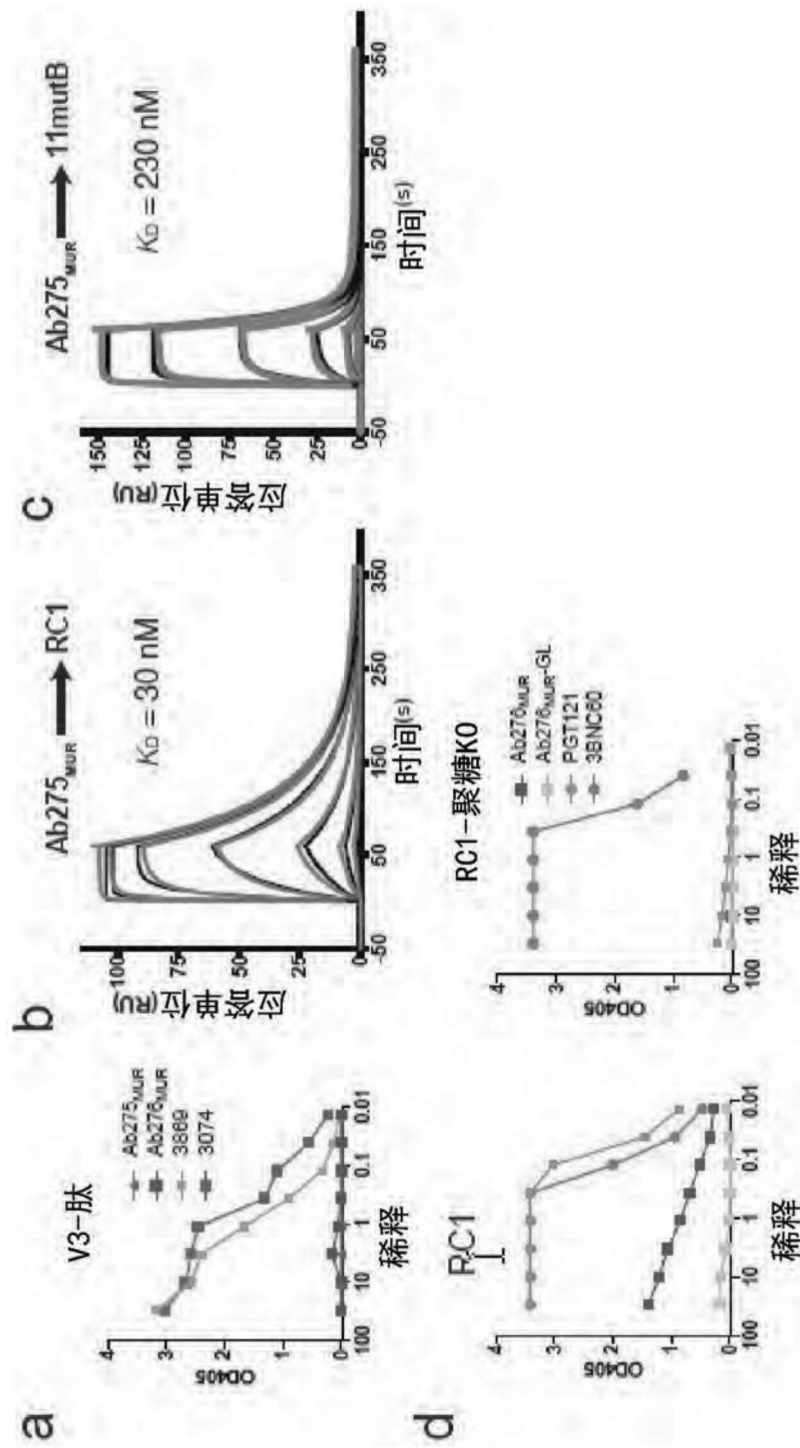


图11a,11b,11c,11d

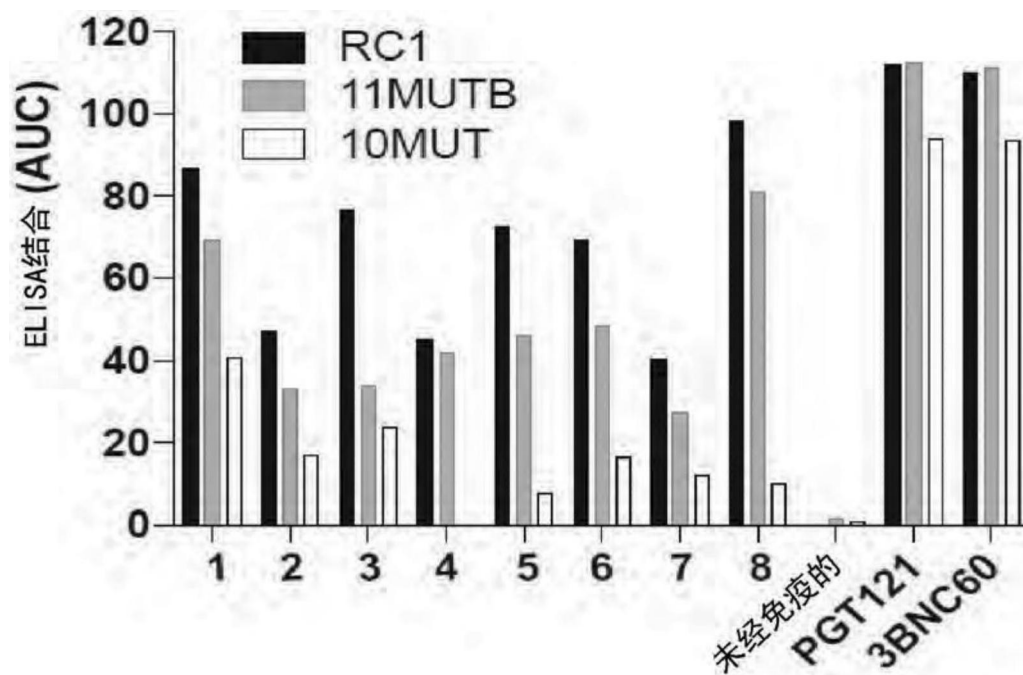


图12

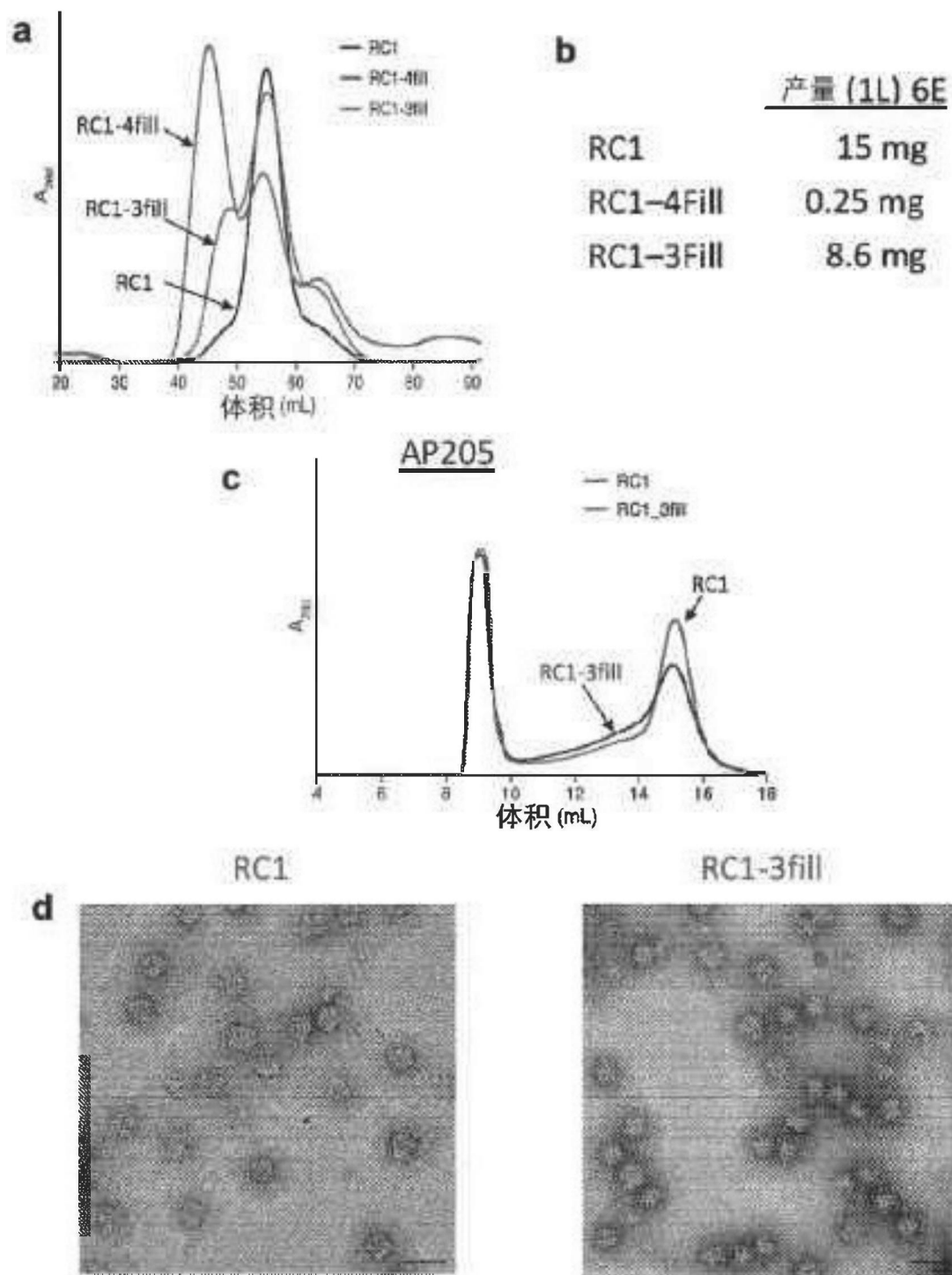


图13a, 13b, 13c和13d

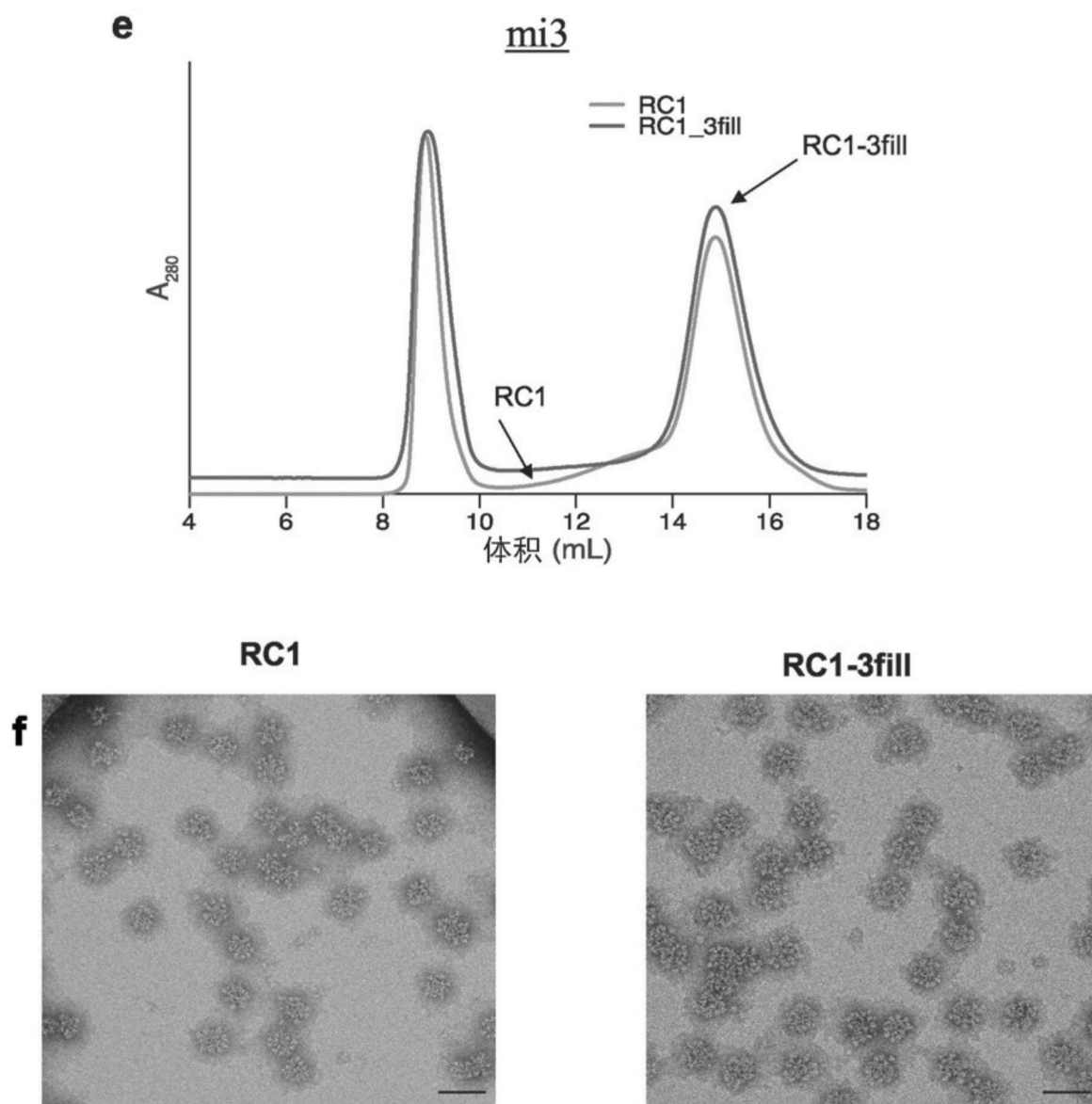


图13e和13f

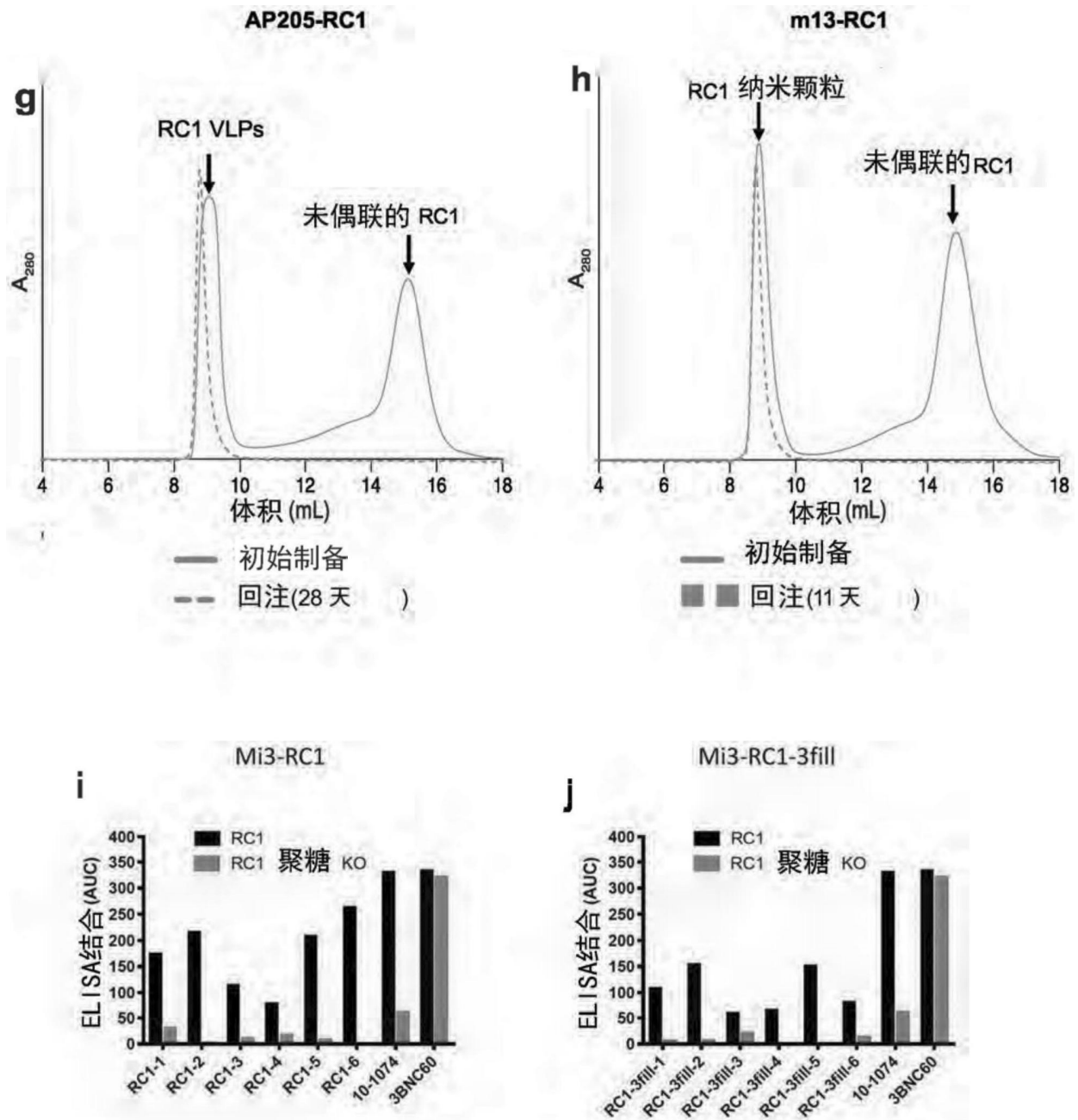


图13g,13h,13i和13j