



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103180342 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 26

(21) 申请号 201180052064. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 10. 27

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

12/913, 300 2010. 10. 27 US

A61P 31/18 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 04. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/068905 2011. 10. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02012/055980 EN 2012. 05. 03

(71) 申请人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛涅 - 比扬古

(72) 发明人 C · 克林格 - 汉默

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

11314

代理人 程伟

权利要求书3页 说明书39页

序列表47页 附图18页

(54) 发明名称

用于治疗 HIV 的抗体

(57) 摘要

本发明涉及能够结合 CXCR4、而且还能诱导 CXCR4 同源二聚体的构象改变,并能够抑制 HIV-1 原代分离株在 PBMC 中复制的分离的抗体、或其衍生物或抗原结合片段。更特别地,本发明涉及特异于 CXCR4 蛋白的 515H7 和 301aE5 单克隆抗体,以及其用于治疗 HIV 感染的用途。本发明还覆盖包含这些抗体的药物组合物以及用于选择这些抗体的方法。

1. 一种分离的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其包括至少一个互补决定区 CDR,所述互补决定区 CDR 选自包括 IMGT 编号系统所定义的氨基酸序列 SEQ ID No. 1 至 6 和 30 至 33 的 CDR。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中其包括一条轻链和一条重链,所述轻链包括分别包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3;所述重链包括分别包括氨基酸序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中其包括包括氨基酸序列 SEQ ID No. 7 的轻链和包括氨基酸序列 SEQ ID No. 8 的重链。

4. 根据权利要求 2 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中其是嵌合抗体,而且其包括选自 SEQ ID No. 56、57 或 58 的序列的重链,及序列 SEQ ID No. 59 的轻链。

5. 根据权利要求 2 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其是人源化抗体,而且其包括由 SEQ ID No. 64 组成的序列的重链可变区,及选自 SEQ ID No. 65、66、82 或 83 的序列的轻链可变区。

6. 根据权利要求 2 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其是人源化抗体,而且其包括人源化抗体、或其衍生的化合物或功能性片段,其包括选自 SEQ ID No. 67、68 或 69 的序列的重链,及选自 SEQ ID No. 70、71、84 或 85 的序列的轻链。

7. 根据权利要求 2 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,所述功能性片段由片段 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc、双特异性抗体、或通过化学修饰而延长了半衰期的任意片段组成。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其是包括氨基酸序列 SEQ ID No. 54 的 scFv。

9. 根据权利要求 1 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其包括一条轻链和一条重链,所述轻链包括分别包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1、2 和 30 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3;所述重链包括分别包括氨基酸序列 SEQ ID No. 31、32 和 33 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。

10. 根据权利要求 9 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一,其中,其包括包括氨基酸序列 SEQ ID No. 34 的轻链和包括氨基酸序列 SEQ ID No. 35 的重链。

11. 一种分离的核酸,其中,其选自下列核酸:

a) 编码如权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或衍生物的之一的核酸、DNA 或 RNA;

b) 包括 DNA 序列的核酸,该 DNA 序列选自由 SEQ ID No. 14 至 19 和 41 至 45 组成的 CDR 序列;

c) 包括 DNA 序列的核酸,该 DNA 序列选自由 SEQ ID No. 20、21、46、47、72、73、74、86 和 87 组成的重链和轻链可变结构域序列;

d) 包括 DNA 序列的核酸,该 DNA 序列选自由 SEQ ID No. 60 至 63、75 至 79、88 和 89 组成的重链和轻链序列;

e) 包括由 SEQ ID No. 55 组成的 DNA 序列的核酸;

f) 如 b)、c)、d) 或 e) 中所限定的核酸的相应 RNA 核酸;

- g) 如 a)、b)、c)、d) 和 e) 中所限定的核酸的互补核酸 ; 及
- h) 至少 18 个核苷酸的核酸, 其能够在高严谨度条件下与 SEQ ID No. 14 至 19 和 41 至 45 序列的 CDR 的至少一个杂交。
12. 一种载体, 其包括如权利要求 11 所要求的核酸。
13. 一种宿主细胞, 其包括如权利要求 12 所要求的载体。
14. 一种除人以外的转基因动物, 其包括至少一个转化有权利要求 12 所要求的载体的细胞。
15. 一种用于生产如权利要求 1 至 10 的任一项所要求的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一的方法, 其中所述方法包括下列阶段 :
- a) 在基质中及合适的培养条件下培养如权利要求 13 所要求的细胞 ; 及
- b) 从培养基质或所述培养细胞中回收由此产生的所述抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一。
16. 一种通过权利要求 15 所要求的方法可获得的或获得的抗体、或其功能性片段或衍生物之一。
17. 作为药物的根据权利要求 1 至 10 和 16 所述的抗体。
18. 根据权利要求 1 至 10 或 16 至 17 所述的抗体、或其功能性片段或衍生物之一, 其中, 其抑制 HIV-1KON 原代分离株在 PBMC 中的复制, 其 IC_{90} 为至少 $5 \mu g/ml$, 优选至少 $10 \mu g/ml$ 。
19. 一种组合物, 其包括通过如权利要求 1 至 10 和 16 至 18 的任一项所要求的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一组成的化合物作为活性成分。
20. 作为药物的如权利要求 19 所要求的组合物。
21. 根据权利要求 19 和 20 所要求的组合物, 用于预防或用于治疗 HIV 感染。
22. 根据权利要求 21 所要求的组合物, 其中所述 HIV 感染是 X4 向性 HIV 感染。
23. 根据权利要求 21 所要求的组合物, 其中所述 HIV 感染是 X4/R5 向性 HIV 感染。
24. 根据权利要求 19 至 23 所述的组合物, 其中, 其包括选自能特异性抑制 HIV 进入和 / 或复制的化合物至少第二抗 HIV 化合物。
25. 根据权利要求 24 所述的组合物, 其中, 所述至少第二抗 HIV 化合物选自抗逆转录病毒药物如 HIV 蛋白酶抑制剂 (PI)、核苷 / 核苷酸 HIV 逆转录酶抑制剂 (NRTI/NtRTI)、非核苷 HIV 逆转录酶抑制剂 (NNRTI)、HIV 进入抑制剂、HIV 整合酶抑制剂。
26. 根据权利要求 24 或 25 所述的组合物, 其中所述至少第二抗 HIV 化合物是抗 CCR5 化合物。
27. 根据权利要求 26 所述的组合物, 其中所述抗 CCR5 化合物是马拉维诺。
28. 用于筛选和 / 或鉴定作为 CXCR4 拮抗剂抗病毒试剂的分子的方法, 包括步骤 :
- a) 选择表达 CXCR4 的细胞,
- b) 孵育所述细胞和权利要求 1 至 10 或 16 至 18 所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一, 及
- c) 评估检验的分子抑制抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一与 CXCR4 之间结合的能力, 及
- d) 选择能够产生所述抑制的分子。

29. 根据权利要求 1 至 10 和 16 任一项所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一，和 / 或根据权利要求 19 至 27 任一项所述的组合物在制备用于抑制 HIV 复制的药物中的用途。

30. 根据权利要求 1 至 10 和 16 任一项所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一，和 / 或根据权利要求 19 至 27 任一项所述的组合物在制备用于 HIV 疾病的预防或治疗的药物中的用途。

31. 一种用于预防或治疗 HIV 的方法，其中所述方法包括由向有需要的患者施用根据权利要求 1 至 10 和 16 任一项所述的抗体、或其抗原结合片段或衍生物之一，和 / 或根据权利要求 19 至 27 任一项所述的组合物组成的步骤。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中方法还包括由向所述患者施用抗 CCR5 化合物组成的步骤。

用于治疗 HIV 的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及能够特异性结合于趋化因子受体(CXCR)的新抗体,特别是嵌合的和人源化的鼠单克隆抗体,以及编码此抗体的氨基酸和核酸序列。从一方面讲,本发明涉及能够特异性结合于 CXCR4 并具有对抗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的强活性的新抗体、功能性片段或衍生物。本发明还包括这种抗体、功能性片段或衍生物作为预防和 / 或治疗性治疗 HIV 感染的药物的用途。

背景技术

[0002] 趋化因子是小的、分泌肽,其控制着(特别是免疫反应期间)白细胞沿配体化学梯度(被称为趋化因子梯度)的迁移(Zlotnick A. 等人,2000)。基于其 NH₂-端半胱氨酸残基的位置、及与 G 蛋白偶联受体(其两个主要亚家族被命名为 CCR 和 CXCR)的结合,将趋化因子分为两个主要的亚家族,CC 和 CXC。到目前为止,发现了超过 50 个人趋化因子和 18 个趋化因子受体。

[0003] 趋化因子受体家族的若干成员作为主要受体 CD4 的共受体发挥作用,使得 HIV1 型的不同株能够进入细胞,主要的共受体是 CCR5 和 CXCR4。T 细胞向性 X4HIV-1 使用 CD4 和 CXCR4 进入细胞,而巨噬细胞向性 R5HIV-1 使用 CD4 和 CCR5。双向性株能使用 CXCR4 和 CCR5 作为共受体。其它趋化因子受体中的 CCR3、CCR2、CCR8、CXCR6、CXCR7、CX3CR1 能作为 HIV 株更限制亚群的共受体发挥作用。

[0004] SDF-1 (CXCR4 的天然配体)以及 CCR5 的 CCL3、CCL4、CCL4-L1 和 CCL5 配体能够抑制 HIV-1 不同株引起的细胞融合和感染。这些发现促进了靶向趋化因子受体的抗 HIV 治疗的发展,导致 CCR5 小分子拮抗剂马拉维诺(maraviroc) (CELSENTRI®)获准与其它抗 HIV-1 试剂组合用于 CCR5 向性 HIV-1 感染的患者。然而,马拉维诺不能用于被双向性 HIV-1 感染的患者或者被 CXCR4 向性 HIV-1 感染的患者(VIDAL2009)。因此,对于通过鉴定能抑制 X4 向性 HIV 复制的 CXCR4 拮抗剂在 X4 向性和双向性 HIV 感染的患者中扩展此类治疗有明确的医学需求。

[0005] 趋化因子受体 4 (也被称为融合素、CD184、LESTR 或 HUMSTR)以包括 352 个或 360 个氨基酸的两种同种型形式存在。残基 Asn11 是糖基化的,残基 Tyr21 被加入硫酸盐基团所修饰,而 Cys109 和 186 在受体的细胞外部分以二硫键桥相结合(Juarez J. 等人,2004)。

[0006] 不同类型正常组织、初始(naïve)、非记忆性 T 细胞、调节性 T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、内皮细胞、原代单核细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、CD34+ 造血干细胞均表达此受体,而且在心脏、结肠、肝、肾和脑中以低水平表达。CXCR4 在白细胞运输、B 细胞淋巴细胞生成和髓细胞生成中起关键作用。

[0007] 到目前为止所描述的 CXCR4 受体的唯一配体是间质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 或 CXCL12。SDF-1 在淋巴结、骨髓、肝、肺中大量分泌,而肾、脑和皮肤分泌程度较少。CXCR4 还被拮抗性趋化因子,人单纯疱疹病毒 III 型所编码的病毒巨噬细胞炎症蛋白 II(vMIP-II),所识别。

[0008] 如前面所提及的,CXCR4 受体是 T 细胞向性 HIV-1 分离株(X4 病毒)的主要共受体。干扰此受体将以很有效的方式抑制 X4 病毒复制。

发明内容

[0009] 本发明的一个发明性方面是生成抑制 HIV 复制的小鼠单克隆抗体(Mab)。本发明包括能结合于 CXCR4 同源二聚体并具有抗 HIV 感染的强活性的 CXCR4Mab515H7(或其片段)。发明还包括能结合于 CXCR4 同源二聚体并具有抗 HIV 感染的强活性的 CXCR4Mab301aE5(或其片段)。

[0010] 令人吃惊的是,发明人已设法生成单克隆抗体,该抗体能够结合于 CXCR4,并且能够诱导 CXCR4 同源二聚体的构象变化,而且能抑制原代分离株 X4-HIV-1 在 PBMC 中的复制。更特别的是,本发明的抗体还能够抑制原代分离株 X4/R5-HIV-1 在 PBMC 中的复制。

[0011] 优选地,CXCR4 化合物是选自如下的两个人 CXCR4 同种型之一:

[0012] - 趋化因子(C-X-C 基序)受体 4 同种型 b[人(Homo sapiens)],具有 Genbank 登录号 NP_003458 所描述的序列 SEQ ID No. 27:

[0013] MEGISITYSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGN GLVILVMGYQKK LRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFC KAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNS QRPRKLLAEKVVYVGVWIPA LLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYC I IISKLSHSGKHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIIKQGCEFENT VHKWISITEALAFFHC CLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRG GHSSVSTESESSSFHSS;

[0014] - 趋化因子(C-X-C 基序)受体 4 同种型 a[人],具有 Genbank 登录号 NP_001008540 所描述的序列 SEQ ID No. 28:

[0015] MSIPLPLLQIYTSNDYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGI VGNGLVILVMG YQKKLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGN FLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVH ATNSQRPRKLLAEKVVYVGVW IPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVIL SC YCIIISKLSHSGKHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIIKQGCEFE NTVHKWISITEALA FFHCCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGK RGGHSSVSTESESSSFHSS;

[0016] - 可选的转录剪接变体或其天然变体,其与具有 SEQ ID No. 27 或 28 的这些 b 或 a 同种型中的一个具有至少 95% 的同一性;及

[0017] - 其片段,其能够被其天然配体间质细胞衍生因子 1(SDF-1)所特异性识别,并且具有优选至少 100、150 和 200 个氨基酸的长度。

[0018] CXCR2 选自如下:

[0019] - 白介素 8 受体 β [人],具有 Genbank 登录号 NP_001548 所描述的序列 SEQ ID No. 29:

[0020] MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLDAAPEPESLEINKYFVVIIY ALVFLLSLLGNSL VMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPPIWAASKVN GWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDR YLAIVHATRILTQKRYLVKFIC LSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGF I VPLLIMLFCYGFTRLTLFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADT LMRTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCNPLIYAFIQKFRHGLLKILAIH GLISKDSLKPDSRPSFVGSSSGHTSTTL;

[0021] - 可选的转录剪接变体或其天然变体,与具有 SEQ ID No. 29 的这种白介素 8 受体

β 具有至少 95% 的同一性 ; 及

[0022] - 其片段, 能够被 IL-8 所特异性识别, 并且具有优选至少 100、150 和 200 个氨基酸的长度。

[0023] 发明还包括用于选择具有抗 HIV 活性的化合物或能用于制备治疗 HIV 感染的组合物的化合物的方法, 特征在于所述方法包括步骤 :

[0024] 第一方面中, 本发明的主题是用于生成和选择根据本发明的抗体的方法。

[0025] 更特别的是, 本发明涉及用于选择能够抑制 HIV 复制的抗 CXCR4 抗体或其功能性片段或衍生物之一的方法, 包括下列步骤 :

[0026] i) 筛选生成的抗体及选择能特异结合于 CXCR4 的抗体 ;

[0027] ii) 检验步骤 i) 所选的抗体, 并选择能结合外周血单核细胞 (PBMC) 的抗体,

[0028] iii) 检验步骤 ii) 所选的抗体, 并选择能结合于 CXCR4 同源二聚体的抗体, 并且随后

[0029] iv) 检验步骤 iii) 所选的抗体, 并选择能抑制原代分离株 X4- 向性 HIV-1 在 PBMC 中复制的抗体。

[0030] 在另一实施方式中, 发明涉及用于选择能抑制 HIV 复制的抗 CXCR4 抗体或其功能性片段或衍生物之一的方法, 包括下列步骤 :

[0031] i) 筛选生成的抗体及选择能特异结合于 CXCR4 的抗体 ;

[0032] ii) 检验步骤 i) 所选的抗体, 并选择能结合外周血单核细胞 (PBMC) 的抗体,

[0033] iii) 检验步骤 ii) 所选的抗体, 并选择能结合于 CXCR4 同源二聚体的抗体, 并且随后

[0034] iv) 检验步骤 iii) 所选的抗体, 并选择能抑制原代分离株 X4- 向性 HIV-1 在 PBMC 中复制和 / 或能抑制原代分离株 X4/R5- 向性 HIV-1 在 PBMC 中复制的抗体。

[0035] 抗体的生成可以通过本领域技术人员所知的任意方法实现, 如例如, 将骨髓瘤细胞与来自免疫小鼠或与所选骨髓瘤细胞兼容的其它物种的脾细胞相融合 [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256 : 495-497]。免疫动物可包括带有免疫球蛋白基因座其之后直接生产人类抗体的转基因小鼠。另一可能的实施方式可以包括使用噬菌体展示技术来筛选文库。

[0036] 筛选步骤 i) 和 ii) 可以通过本领域技术人员所知的任意方法或过程来实现。作为非限制性实例, 可以提到 ELISA、BIAcore、免疫组化、使用 CXCR4 表达细胞膜提取物或纯化的 CXCR4 的蛋白印迹分析、FACS 分析及功能筛选。优选的方法包括通过 FACS 分析在 CXCR4 转染子上 (步骤 1) 和至少在 PBMC 上 (步骤 2) 进行筛选以确保生产的抗体也能识别靶标细胞表面的天然 CXCR4 受体构象。在下列实施例中更精确描述此方法。

[0037] 筛选步骤 iii) 可以通过本领域技术人员所知的任意方法或过程来实现。作为非限制性但优选的实例, 可以提及的是在来自 CXCR4 转染细胞或 PBMC 的膜提取物上使用目标抗体进行的蛋白印迹和 / 或免疫沉淀技术。

[0038] 筛选步骤 iv) 可以通过本领域技术人员所知的任意方法或过程来实现。作为非限制性但优选的实例, 可以提及的是包括抗体筛选的方法, 通过使用 Ho11 等人所述的规程 (J. Immunol. 2004, 173, 6274-83) 筛选有能力抑制 X4 原代 HIV-1 和 / 或 X4/R5 原代 HIV-1 分离株在 PBMC 中复制的抗体。

[0039] 在本发明方法的筛选步骤 iii) 的优选实施方式中, 所述步骤 iii) 包括通过 BRET 分析在表达 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP 的细胞上评估抗体, 并且选择能抑制至少 40%、优选 45%、50%、55% 和最优选 60%BRET 信号的抗体。

[0040] BRET 技术是被称为蛋白质二聚体化的代表技术 [Angers 等人, PNAS, 2000, 97 : 3684-89]。

[0041] 在方法的步骤 iii) 中所用的 BRET 技术, 为本领域技术人员所熟知, 并在下列实施例中有详细描述。更特别的是, BRET (生物荧光共振能量转移) 是在生物荧光供体 (海肾荧光素酶 (Rluc)) 和荧光受体 GFP (绿色荧光蛋白) 或 YFP (黄色荧光蛋白) 突变体间发生的非辐射性能量转移。在本案例中使用 EYFP (增强型黄色荧光蛋白)。转移效率取决于供体和受体之间的方向和距离。那么, 只有当两个分子靠近 (1-10nm) 时才能发生能量转移。此性质被用于生成蛋白质-蛋白质相互作用分析。事实上, 为了研究两个配偶体 (partner) 间的相互作用, 一般第一个融合于海肾荧光素酶而第二个融合于 GFP 的黄色突变体。融合蛋白一般 (但不一定) 表达于哺乳动物细胞。在其膜渗透性底物 (腔肠素 (coelenterazine)) 存在时, Rluc 发射蓝光。如果 GFP 突变体距离 Rluc 不足 10nm, 会发生能量转移并能检测到额外的黄色信号。BRET 信号被测定为受体所发射的光与供体所发射的光的比例。因此, 随着两个融合蛋白被拉近或构象变化使得 Rluc 和 GFP 突变体更靠近的时候, BRET 信号将会增强。

[0042] 如果在优选实施方式中包括 BRET 分析, 可以使用本领域技术人员所知的任意方法测量 CXCR4 二聚体的构象变化。可提及下列技术, 不受限制: FRET (荧光共振能量转移)、HTRF (均相时间分辨荧光)、FLIM (荧光寿命成像显微镜) 或 SW-FCCS (单波长荧光交叉相关光谱)。

[0043] 也可使用其它经典技术, 如共免疫沉淀、 α 筛选、化学交联、双杂交、亲和层析、ELISA 或 Far 蛋白印迹。

[0044] 在根据发明所述方法的具体方面中, 步骤 iii) 包括通过 BRET 分析在表达 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP 两者的细胞上评估抗体, 并且选择能抑制至少 40%BRET 信号的抗体。

[0045] 在第二方面中, 本发明的主题是通过所述方法获得的分离抗体或其功能性片段或衍生物之一。所述抗体或其所述片段或衍生物之一, 能够特异性结合人 CXCR4, 所述抗体也能诱导 CXCR4 同源二聚体构象变化。

[0046] 从文献中可知 CXCR4Mab 之类 (例如克隆 A120) 能够抑制 HIV-1 实验株 (X4HIV-1_{NL4-3}) 进入 PBMC (Tanaka R. 等人, J. Virol. 2001, 75, 11534-11543)。而且, 也知道 CXCR4Mab 能抑制 HIV-1X4 原代分离株进入表达 CXCR4 的细胞系。反过来, 从未公布过能抑制在其自然环境中的此类病毒 (即不只是在实验室病毒或细胞系中) 的抗体。无论如何, 本发明的新颖且非显而易见的方面是 CXCR4Mab 能抑制 HIV-1X4 原代分离株进入 PBMC。

[0047] 表达“功能性片段及衍生物”和“抗原结合片段和衍生物”是相似的, 且将随后在本说明中详细定义。

[0048] 此处应理解的是本发明不涉及天然形式的抗体, 那就是说抗体并不在其天然环境中, 但能够通过自天然来源纯化而将其分离或获得, 或者另外通过遗传重组、或者通过化学合成获得, 并且因此抗体能包含此后所描述的非天然氨基酸。

[0049] 更特别的是,根据发明的另一方面,要求保护分离的抗体或其功能性片段或衍生物之一,所述抗体特征在于:它们包括至少一个互补决定区 CDR,该 CDR 选自包括如通过 IMGT 编号系统所定义的氨基酸序列 SEQ ID No. 1 至 6 和 30 至 33 的 CDR。

[0050] 根据第一方面,本发明涉及分离的抗体、或其功能性片段或衍生物,包括选自根据 IMGT 编号系统所定义的序列 SEQ ID No. 1 至 6 的 CDR 的至少一个 CDR,或者其序列与序列 SEQ ID No. 1 至 6 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个 CDR。

[0051] 根据第二方面,本发明涉及分离的抗体、或其功能性片段或衍生物,包括选自根据 IMGT 编号系统所定义的序列 SEQ ID No. 1、2 和 30 至 33 的 CDR 的至少一个 CDR,或者其序列与序列 SEQ ID No. 1、2 和 30 至 33 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个 CDR。

[0052] 抗体的“功能性片段”或“抗原结合片段”意指,特别是,抗体片段,如片段 Fv、scFv (sc= 单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 或双特异抗体、或其半衰期被延长的任意片段。此功能性片段将在随后的本说明中详细描述。

[0053] 抗体的“衍生化合物”或“衍生物”意指,特别是,为保持其识别 CXCR4 的活性、由肽支架和原始抗体至少一个 CDR 构成的结合蛋白质。此衍生化合物,为本领域技术人员所熟知,将在随后的本说明中更详细描述。

[0054] 更优选的是,根据本发明,本发明包括通过遗传重组或化学合成获得的特别是嵌合或人源化的抗体、其衍生化合物或其功能性片段。

[0055] 根据优选的实施方式,根据本发明所述的抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于其由单克隆抗体组成。

[0056] 应了解“单克隆抗体”意指来自于几乎同源抗体群的抗体。更特别指,群中的个体抗体(除一些可能以最小比例发现的天然产生的突变以外)是相同的。换句话说,单克隆抗体由来自于单个细胞克隆(例如杂交瘤、转染有编码同源抗体的 DNA 分子的真核宿主细胞、转染有编码同源抗体的 DNA 分子的原核宿主细胞等)生长的同源抗体构成,并且一般以一类且仅一类和亚类的重链、及仅一个类型的轻链为特征。单克隆抗体是高度特异的并针对单一抗原。此外,与通常包括针对各种决定簇或表位的各种抗体的多克隆抗体制备物相对比,各单克隆抗体针对单一的抗原表位。

[0057] 更特别的是,根据本发明的第一优选实施方式,抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于其包括含有选自 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的至少一个 CDR 的轻链,其中:

[0058] -CDR-L1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1、

[0059] -CDR-L2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 2、

[0060] -CDR-L3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 3。

[0061] 根据另一实施方式,发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有序列 SEQ ID No. 1、2 或 3 的三个 CDR 中至少一个、或与序列 SEQ ID No. 1、2 或 3 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的轻链。

[0062] 发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征还在于其包括含有 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链,其中 CDR-L1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1, CDR-L2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 2 而且 CDR-L3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 3。

[0063] 在另一实施方式中,本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 7 或与序列 SEQ ID No. 7 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的轻链序列。

[0064] 根据发明的第二个优选实施方式,抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于其包括含有选自 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的至少一个 CDR 的轻链,其中:

[0065] -CDR-L1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1,

[0066] -CDR-L2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 2,

[0067] -CDR-L3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 30。

[0068] 根据另一实施方式,发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于它们包括含有序列 SEQ ID No. 1、2 或 30 的三个 CDR 中至少一个、或与序列 SEQ ID No. 1、2 或 30 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的轻链。

[0069] 本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征还在于其包括含有 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链,其中 CDR-L1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1, CDR-L2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 2 且 CDR-L3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 30。

[0070] 在另一实施方式中,发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 34 或与序列 SEQ ID No. 34 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的轻链序列。

[0071] 更特别的是,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有选自 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的至少一个 CDR 的重链,其中:

[0072] -CDR-H1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 4,

[0073] -CDR-H2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 5,

[0074] -CDR-H3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 6。

[0075] 根据另一实施方式,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有序列 SEQ ID No. 4、5 或 6 的三个 CDR 中至少一个、或与序列 SEQ ID No. 4、5 或 6 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的重链。

[0076] 根据另一具体的实施方式,抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的重链,其中 CDR-H1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 4, CDR-H2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 5 且 CDR-H3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 6。

[0077] 在另一实施方式中,本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 8、或与序列 SEQ ID No. 8 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的重链序列。

[0078] 更特别的是,本发明的抗体、其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有选自 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的至少一个 CDR 的重链,其中:

[0079] -CDR-H1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 31,

[0080] -CDR-H2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 32,

[0081] -CDR-H3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 33。

[0082] 根据另一实施方式,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段之一,特征在于其包括含有序列 SEQ ID No. 31、32 或 33 三个 CDR 的至少一个、或与序列 SEQ ID No. 31、32 或 33 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的重

链。

[0083] 根据另一具体实施方式,抗体、其衍生物或功能性片段之一,特征在于其包括含有 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的重链,其中 CDR-H1 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 31, CDR-H2 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 32 且 CDR-H3 包括氨基酸序列 SEQ ID No. 33。

[0084] 在另一实施方式中,本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 35、或与序列 SEQ ID No. 35 进行最佳比对后具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的至少一个序列的重链序列。

[0085] 本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括一条轻链和一条重链,其中该轻链包括分别含有氨基酸序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3,该重链包括分别含有氨基酸序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。

[0086] 最后,本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征还在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 7 的轻链和含有氨基酸序列 SEQ ID No. 8 的重链。

[0087] 本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征在于其包括一条轻链和一条重链,该轻链包括分别含有氨基酸序列 SEQ ID No. 1、2 和 30 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3,该重链包括分别含有氨基酸序列 SEQ ID No. 31、32 和 33 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。

[0088] 最后,本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一,特征还在于其包括含有氨基酸序列 SEQ ID No. 34 的轻链和含有氨基酸序列 SEQ ID No. 35 的重链。

[0089] 在本说明书中,术语“多肽”、“多肽序列”、“肽”和“附着至抗体化合物或其序列的蛋白质”可互换。

[0090] 在此必须理解,本发明不涉及天然形式的抗体,即抗体并不取自其天然环境,但能够通过从天然来源纯化而将其分离或获得,或者通过遗传重组或化学合成获得,并且因此抗体能携带下面所描述的非天然氨基酸。

[0091] 在第一个实施方式中,互补决定区或 CDR,意指 Kabat 等人所定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高可变区(Kabat 等人, *Sequences of proteins of immunological interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 及以后的版本)。有三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。此处,取决于情况,术语“CDR”和“CDRs”用于指示一个或多个、或甚至全部包含负责其识别的抗原或表位的抗体结合亲和性的大多数氨基酸残基的区域。

[0092] 在第二实施方式中,通过 CDR 区域或 CDR(s),意指如 IMGT 所定义的免疫球蛋白重链和轻链的高可变区。

[0093] IMGT 唯一编号被规定用于比较任何抗原受体、链类型或物种的可变结构域 [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. 和 Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]。在 IMGT 唯一编号中,保守氨基酸总具有同样位点,例如半胱氨酸 23 (第一 CYS)、色氨酸 41 (保守的 -TRP)、疏水氨基酸 89、半胱氨酸 104 (第二 CYS)、苯丙氨酸或色氨酸 118 (J-PHE 或 J-TRP)。IMGT 唯一编号提供了框架区域 (FR1-IMGT:1 至 26 位, FR2-IMGT:39 至 55 位, FR3-IMGT:66 至 104 位和 FR4-IMGT:118 至 128 位) 和互补决定区 (CDR1-IMGT:27 至 38, CDR2-IMGT:56 至 65 和 CDR3-IMGT:105 至 117) 的标准化划界。因为空位代表

空置的位置, CDR-IMGT 长度(显示在括号之间并以点分开, 例如 [8. 8. 13]) 成为重要的信息。IMGT 唯一编号被用于 2D 图呈现, 指定为 IMGT Colliers de Perles[Ruiz, M. 和 Lefranc, M. -P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. 和 Lefranc, M. -P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], 及 IMGT/3D 结构 -DB 的 3D 结构中 [Kaas, Q., Ruiz, M. 和 Lefranc, M. -P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]。

[0094] 存在三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。根据情况, 在此使用的术语 CDR 目的在于指示这些区域之一或几个、或甚至这些区域的全部, 其包含负责抗体对于其识别的抗原或表位的亲和性结合的大多数氨基酸残基。

[0095] 为了更清晰, 应该理解下列说明中及更特别在表 2 和 3 中, 以 IMGT 编号系统和 Kabat 编号系统定义 CDR。

[0096] 根据如上定义的 IMGT 系统, 以 IMGT 编号系统定义 CDR, 而根据如上定义的 Kabat 系统, 以 Kabat 编号系统定义 CDR。

[0097] 更特别的是, 关于被称为 515H7 的抗体, CDR-L1 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 1 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 9 构成。关于 CDR-L2, 其由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 2 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 10 构成。CDR-L3 由两种编号系统中的每个的 SEQ ID No. 3 构成。对于重链, CDR-H1 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 4 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 11 构成。CDR-H2 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 5 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 12 构成。最后, CDR-H3 包括 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 6, 而其由 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 13 构成。

[0098] 然后, 关于被称为 301aE5 的抗体, CDR-L1 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 1 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 9 构成。关于 CDR-L2, 其由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 2 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 36 构成。CDR-L3 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 30 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 37 构成。对于重链, CDR-H1 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 31 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 38 构成。CDR-H2 由 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 32 和 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 39 构成。最后, CDR-H3 包括 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 33, 而其由 Kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 40 构成。

[0099] 在本发明的含义中, 两个核酸或氨基酸序列之间的“百分比同一性”意指待比较的两条序列间相同核苷酸或氨基酸残基的百分比, 其在最佳比对后获得, 此百分比是纯粹统计上的, 两条序列间的差异沿其长度随机分布。两条核酸或氨基酸序列的比较传统上通过在其最佳比对后比较序列来进行, 所述比较能通过节段(segment)或通过使用“对比窗口”来执行。除了手动比较之外, 通过 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (1981) [Ad. App. Math. 2 :482]、通过 Needleman 和 Wunsch 的局部同源性算法 (1970) [J. Mol. Biol. 48 : 443]、通过 Pearson 和 Lipman 的相似性搜索法 (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444] 或通过使用这些算法的计算机软件 (Wisconsin 遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, 遗传学计算组, 575 Science Dr., Madison, WI, 或通过比较软件 BLAST NR 或 BLAST P) 可以进行待比较的序列的最佳比对。

[0100] 通过比较两个最佳比对的序列确定两个核酸或氨基酸序列之间的百分比同一性, 其中待比较的核酸或氨基酸序列, 相较于用于两条序列间最佳比对的参考序列, 可以有添

加或删除。通过确定两条序列间(优选两条完整序列间)相同氨基酸核苷酸或残基的位点的数目计算百分比同一性,将相同位点数除以比对窗口的总位点数并将结果乘以 100 以获得两条序列间的百分比同一性。

[0101] 例如,可以用缺省参数使用(特别是参数“开放空位罚分”:5,和“延伸空位罚分”:2;所选矩阵是例如程序提出的“BLOSUM62”矩阵)在网页 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 上可用的 BLAST 程序,“BLAST2 序列”(Tatusova 等人,“Blast2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMS Microbiol.,1999, Lett. 174 :247 - 250);直接用程序计算待比较的两条序列之间的百分比同一性。

[0102] 对于显示出与参考氨基酸序列有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%同一性的氨基酸序列,优选的实例包括包含参考序列、某些修饰(特别是删除、插入或取代至少一个氨基酸、截短或延长)的那些。在一个或多个连续或不连续的氨基酸被取代的情况下,优选在取代中所取代的氨基酸被“等价”氨基酸所代替。在此,表达“等价氨基酸”意指可能取代一个结构氨基酸、而不改变相应抗体生物学活性的任意氨基酸,以及下面定义的那些具体实施例的任意氨基酸。

[0103] 可以根据其与它们所取代的氨基酸的结构同源性、或者根据可能生成的各种抗体间生物活性比较检验的结果来确定等价氨基酸。

[0104] 作为非限制性实例,下面表 1 总结了可能执行而不导致相应修饰的抗体生物活性显著变化的可能取代;在同一条件下自然可以做相反的取代。

[0105] 表 1

[0106]

起始残基	取代
Ala(A)	Val, Gly, Pro
Arg(R)	Lys, His
Asn(N)	Gln
Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(G)	Asp
Gly(G)	Ala
His(H)	Arg
Ile(I)	Leu

Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0107]

[0108] 在具体实施方式中,本发明涉及鼠抗体、或其衍生化合物或功能性片段。

[0109] 如上所见,本发明还涉及衍生自本发明所述抗体的任意化合物。

[0110] 更特别的是,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于,所述衍生化合物由含有其上嫁接有至少一个 CDR 的肽支架的结合蛋白质构成,以此方式保留最初抗体的全部或部分互补位识别属性。

[0111] 本发明所述 CDR 序列中的一个或多个序列还可出现在各种免疫球蛋白支架上。在此情况下,蛋白质序列使其能够重新建立有利于嫁接的 CDR 折叠的肽骨架,使 CDR 能保留其互补位抗原识别属性。

[0112] 通常,本领域技术人员知道怎样确定蛋白质支架的类型,于蛋白质支架上嫁接至少一个来自起始抗体的 CDR。更特别的是,已知要选择的此类支架必须满足最大数目的如下标准 (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13 :167-187) :

[0113] - 系统发育的保守性好 ;

[0114] - 已知三维结构 (如本领域技术人员所知的,例如,通过晶体学、NMR 光谱或任何其它技术) ;

[0115] - 尺寸小 ;

[0116] - 少有或没有转录后修饰 ;和 / 或

[0117] - 容易生产、表达和纯化。

[0118] 此类蛋白质支架的起源可以是但不限于选自如下的结构:纤维连接蛋白并优选纤维连接蛋白 III 型结构域 10、载脂蛋白、anticalin (无对应译文) (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74 (4) :257 - 75)、来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白 A 结构域 B 的蛋白质 Z、硫氧还蛋白 A 或带重复基序如“锚蛋白重复” (Kohl 等人, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“狢狢重复”,“富含亮氨酸重复”和“三十四肽重复”的蛋

白质。

[0119] 还应提及的是衍生自毒素(如例如来自蝎子、昆虫、植物、软体动物等的毒素)及神经一氧化氮合酶的蛋白质抑制因子(PIN)的支架。

[0120] 此类杂合构建体的实例(无意于限制)是在 PIN 的一个环中插入抗 CD4 抗体的 CDR-H1 (重链)(即 13B8.2),新结合蛋白质因而获得保持与起始抗体同样的结合性质(Bes 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344)。在单纯地说明性基础上,也提及了在新制癌菌素的一个环上嫁接抗溶菌酶 VHH 抗体的 CDR-H3 (重链)(Nicaise 等人, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891)。

[0121] 最后,如上所述,此类肽支架可包括至少一个来自起始抗体的 CDR。优选地,但不是必需地,本领域技术人员会选自至少一个来自重链的 CDR,已知重链是负责抗体特异性的主要因素。对于本领域技术人员来说选择一个或多个相关 CDR 是显而易见的,因此他们将选择适当的已知技术(Bes 等人, FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

[0122] 本发明的具体方面涉及用于选择衍生自根据本发明的抗体的化合物的方法,所述衍生化合物能够体外和 / 或体内抑制 HIV 细胞进入,并且所述衍生化合物包括其上嫁接了至少一个抗体 CDR 的肽支架,该方法特征在于其包括下列步骤:

[0123] a) 将由肽支架构成的化合物与包含 HIV1 型和 PBMC 的生物样本在体外接触放置,其中肽支架上嫁接了至少一个抗体 CDR);及

[0124] b) 如果所述化合物能够抑制 HIV-1 复制,选择所述化合物,

[0125] 并且,特征在于所述至少一个嫁接的 CDR 选自下列 CDR:序列 SEQ ID No. 1 至 6 和 30 至 33、或者进行最佳比对后与序列 SEQ ID No. 1 至 6 和 30 至 33 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 同一性的序列。

[0126] 根据优选模式,方法可包括步骤 a) 将含有其上嫁接至少两个或三个抗体 CDR 的肽支架的化合物在体外接触放置。

[0127] 根据此方法的甚至更优选的模式,肽支架选自其结构在如上提及过的支架或结合蛋白质。

[0128] 显而易见,这些实施例无意于限制,而且应认为对于本领域技术人员是已知的或显而易见的任意其它结构涵盖于本专利申请所赋予的保护范围内。

[0129] 本发明因而涉及抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于肽支架选自蛋白质,该蛋白质是 a) 系统发育上非常保守, b) 有强壮的体系结构, c) 有人们熟知的 3D 分子组织, d) 尺寸小和 / 或 e) 含有可通过删除和 / 或插入而进行修饰的、但不改变稳定性性质的区域。

[0130] 根据优选的实施方式,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于所述肽支架选自 i) 来自纤维连接蛋白,优选纤维连接蛋白 3 型结构域 10、载脂蛋白、anticalin、来自金黄色葡萄球菌蛋白 A 结构域 B 的蛋白质 Z、硫氧还蛋白 A 或带重复基序如“锚蛋白重复”(Kohl 等人, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“犹徐重复”、“富含亮氨酸重复”和“三十四肽重复”的蛋白质的支架、或 iii) 神经一氧化氮合酶蛋白质抑制因子(PIN)。

[0131] 发明的另一方面涉及上述抗体的功能性片段。

[0132] 更特别的是,本发明靶向抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于所述功能

性片段是选自片段 Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc 和双特异抗体、或其半衰期被延长的任意片段如聚乙二醇化片段。

[0133] 根据本发明的抗体的此类功能性片段由例如片段 Fv、scFv (sc= 单链)、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv-Fc 或双特异抗体、或通过化学修饰,如添加聚亚烷基二醇如聚乙二醇(聚乙二醇化),(聚乙二醇化片段被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 和 Fab'-PEG),或通过并入脂质体、微球或 PLGA 中来提高其半衰期的任意片段组成,所述片段具有至少一个本发明的特征 CDR(特别是其能够表现出一般方式、甚至部分其所来自的抗体的活性)。

[0134] 优选地,所述功能性片段包含或包括来源抗体的可变重链或轻链部分序列,所述部分序列足以保留与其所来自的抗体相同的结合特异性以及其所来自的抗体的,优选至少等于 1/100、更优选至少 1/10,足够的亲和性。

[0135] 此类功能性片段含有其所来自的抗体序列的至少五个氨基酸、优选 6、7、8、10、15、25、50 或 100 个连续的氨基酸。

[0136] 优选地,这些功能性片段为 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc 或双特异抗体的类型,其通常具有与其所来自的抗体相同的结合特异性。根据本发明,本发明的抗体片段可以通过如酶消化(包括胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)和/或通过化学还原切割二硫键的方法从上述抗体中获得。抗体片段还能通过本领域技术人员也知道的重组遗传技术或通过由例如自动肽合成仪(如 Applied BioSystems 等销售的那些)进行肽合成来获得。

[0137] 为了更清晰,下面表 2 总结了对应于本发明的抗体的各种氨基酸序列。

[0138] 表 2 (其中 Mu. = 小鼠)

[0139]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
515H7	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11

[0140]

301aE5		CDR-H2		12
		CDR-H3		13
			小鼠可变结构域	7
		小鼠可变结构域		8
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	30
		CDR-H1		31
		CDR-H2		32
		CDR-H3		33
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	36
			CDR-L3	37
		CDR-H1		38
		CDR-H2		39
		CDR-H3		40
			小鼠可变结构域	34
		小鼠可变结构域		35

[0141] 本发明的抗体对象的另一特别重要的方面在于，它们不发挥效应物功能，如抗体依赖性细胞细胞毒效应 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0142] 更特别的是，作为实例，本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一，没有对于 Fc γ R (I、II 或 III) 或对于 C1q、或对于两者的亲和性。

[0143] 对于本领域技术人员来说这意味着，在结构上，本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一没有 Fc 部分或者其 Fc 部分没有能够行使效应物功能的正常糖基化。

[0144] 此后果是本发明的抗体优选选自 IgG4 或 IgG2 同种型，更优选 IgG4。

[0145] 类似地，优选片段是没有 ADCC 的片段，例如 Fv、scFv (sc 即单链)、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或双特异抗体、或通过化学修饰如添加聚亚烷基二醇如聚乙二醇 (“聚乙二醇化”) (聚乙二醇化片段被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG) (“PEG”即聚乙二醇)、或通过并入脂质体提高了其半衰期的任意片段。

[0146] 更特别的是，来自于抗体 515H7 的本发明的优选功能性片段是 scFv，在此称为 515H7scFv-Ck 片段，包括氨基酸序列 SEQ ID No. 54。

[0147] 对应于所述 scFv 的核苷酸序列包括序列 SEQ ID No. 55。

[0148] 本发明的另一具体方面涉及嵌合抗体、或其衍生化合物或功能性片段，特征在于所述抗体也包括来自于与小鼠、特别是人类异源物种的抗体的轻链和重链恒定区。

[0149] 然而本发明另一具体方面涉及人源化抗体、或其衍生化合物或功能性片段，特征在于来自人类抗体的轻链和重链的恒定区分别为 λ 或 κ 区及 γ 2 或优选 γ 4 区。

[0150] 本发明的抗体还包括嵌合或人源化抗体。

[0151] 嵌合抗体是一种抗体，其包含来自于给定物种抗体的天然可变区 (轻链和重链) 与

异源于所述给定物种的物种的抗体轻链和重链的恒定区的组合。

[0152] 可以通过使用重组遗传技术制备抗体或其嵌合片段。例如,可以通过克隆含有启动子和编码本发明非人类(特别是鼠)单克隆抗体可变区的序列、及编码人类抗体恒定区的序列的重组 DNA 来生产嵌合抗体。根据本发明的由一个此类重组基因编码的嵌合抗体可以是例如小鼠-人嵌合体,来自鼠 DNA 的可变区决定这种抗体的特异性,而来自人 DNA 的恒定区决定其同种型。参考 Verhoeyn 等人(BioEssays, 8:74, 1988)的用于制备嵌合抗体的方法。

[0153] 在此处下面表 3 中总结了根据本发明的嵌合抗体 515H7(被称为 c515H7 或 C515H7)的各种重链和轻链的氨基酸序列。

[0154] 表 3 (其中 c= 嵌合)

[0155]	抗体 c515H7	重链	轻链	SEQ ID NO.
	完整序列(无 信号肽)	cVH (G4wt)	-	56
		cVH (G4PRO)	-	57
		cVH (G2 wt)	-	58
		-	cVL-Ck	59

[0156] 对应于所述抗体 c515H7 重链 SEQ ID No. 56 至 58 和轻链 SEQ ID No. 59 的核苷酸序列分别与序列 SEQ ID No. 60 至 63 (重链)和 SEQ ID No. 64 (轻链)相对应。

[0157] 在优选实施方式中,从其 C 端赖氨酸残基删除重链序列(如在来自 Lonza 的最初 pConPlus 载体系列中所见:pConPlus γ 4 Δ K、pConPlus γ 4PRO Δ K&pConPlus γ 2 Δ K)。

[0158] 而且, G4PRO 重链对应于人类 IgG4 同种型,其在铰链区携带一个突变以避免半抗体的形成。在来自 Lonza 的亲本 pConPlus γ 4PRO Δ K 中发现有此突变 [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody. Mol Immunol. (1993) ;30(1) :105-108]。

[0159] 更特别的是,本发明涉及嵌合抗体重链,特征在于其包括与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别含有序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 构成。

[0160] 更特别的是,本发明涉及嵌合抗体轻链,特征在于其包括与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别含有序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 构成。

[0161] 更特别的是,本发明涉及嵌合抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于其包括重链和轻链,每条链含有与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别含有序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的重链的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3、和分别含有序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的轻链的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 构成。

[0162] 在另一实施方式中,本发明涉及嵌合抗体、或其衍生化合物或功能性片段,包括由 SEQ ID No. 8 构成的重链可变区序列和序列 SEQ ID No. 7 的轻链可变区。

[0163] 还在另一实施方式中,本发明涉及嵌合抗体、或其衍生化合物或功能性片段,包括

选自 SEQ ID No. 56、57 或 58 的重链序列、和序列 SEQ ID No. 59 的轻链。

[0164] 在优选实施方式中,嵌合抗体 c515H7VH(G4wt)/VL-Ck、或其衍生化合物或功能性片段,根据本发明,包括序列 SEQ ID No. 56 的重链可变区和序列 SEQ ID No. 59 的轻链可变区。

[0165] 在优选实施方式中,嵌合抗体 c515H7VH(G4PRO)/VL-Ck、或其衍生化合物或功能性片段,根据本发明,包括序列 SEQ ID No. 57 的重链可变区和序列 SEQ ID No. 59 的轻链可变区。

[0166] 在优选实施方式中,嵌合抗体 c515H7VH(G2wt)/VL-Ck、或其衍生化合物或功能性片段,根据本发明,包括序列 SEQ ID No. 58 的重链可变区和序列 SEQ ID No. 59 的轻链可变区。

[0167] “人源化抗体”意指含有来自于非人类来源的抗体的 CDR 区域的抗体,抗体分子的其它部分来源于一个(或几个)人类抗体。此外,某些骨架区段残基(称作 FR)能被修饰以保持结合亲和性(Jones 等人, Nature, 321 :522-525, 1986 ;Verhoeyen 等人, Science, 239 :1534-1536, 1988 ;Riechmann 等人, Nature, 332 :323-327, 1988)。

[0168] 本发明的人源化抗体或其片段能够以本领域技术人员已知的技术(如,例如在文献 Singer 等人, J. Immun., 150 :2844-2857, 1992 ;Mountain 等人, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10 :1-142, 1992 ;和 Bebbington 等人, Bio/Technology, 10 :169-175, 1992 中所述的那些)制备。优选此类人源化抗体用于包括体外诊断或体内预防和 / 或治疗性治疗的方法。本领域技术人员还知道的其它人源化技术如,例如, PDL 在专利 EP0 451 216、EP0 682 040、EP0 939 127、EP0 566 647 或 US5, 530, 101、US6, 180, 370、US5, 585, 089 和 US5, 693, 761 中所述的“CDR 嫁接”技术。还能引用美国专利 5, 639, 641 或 6, 054, 297、5, 886, 152 和 5, 877, 293。

[0169] 此外,发明还涉及由上述鼠抗体产生的人源化抗体。

[0170] 以优选的方式,来自人类抗体的轻链和重链恒定区分别是 λ 或 κ 及 $\gamma 2$ 或优选 $\gamma 4$ 区域。

[0171] 更特别的是,本发明涉及人源化抗体重链,特征在于其包括 i) 与人类抗体重链相应框架区同源的框架区,及 ii) 与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别包含序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 构成。

[0172] 在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体重链,其包括由 SEQ ID No. 64 构成的序列的可变区。

[0173] 还有在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体重链,其包括选自 SEQ ID No. 67、68、69 和 95 的完整序列。

[0174] 更特别的是,发明涉及人源化抗体轻链,特征在于其包括 i) 与人类抗体轻链相应框架区同源的框架区,及 ii) 与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别包含序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 构成。

[0175] 在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体轻链,其包括选自 SEQ ID No. 65、66、82 或 83 的序列的可变区。

[0176] 还有在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体轻链,其包括选自 SEQ ID No. 70、71、84 或 85 的完整序列。

[0177] 更特别的是,本发明涉及人源化抗体、或其衍生化合物或功能性片段,特征在于其包括重链和轻链,每条链具有 i) 与人类抗体相应框架区同源的框架区,及 ii) 与来自于不同哺乳动物物种的抗体相应 CDR 同源的 CDR,其中所述 CDR,根据 IMGT,由分别包含序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 的重链的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3、和分别包含序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 的轻链的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 构成。

[0178] 在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体、或其衍生化合物或功能性片段,其包括由 SEQ ID No. 64 构成的重链可变区序列、及选自 SEQ ID No. 65、66、82 或 83 的序列的轻链可变区。

[0179] 还有在另一实施方式中,本发明涉及人源化抗体、或其衍生化合物或功能性片段,其包括选自 SEQ ID No. 67、68、69 或 95 的序列的重链、及选自 SEQ ID No. 70、71、84 或 85 的序列的轻链。

[0180] 在优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4wt)/VL2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 67 的重链和序列 SEQ ID No. 70 的轻链。

[0181] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4PRO)/VL2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 68 的重链和序列 SEQ ID No. 70 的轻链。

[0182] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G2wt)/VL2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 69 的重链和序列 SEQ ID No. 70 的轻链。

[0183] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4wt)/VL2.1-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 67 的重链和序列 SEQ ID No. 71 的轻链。

[0184] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4PRO)/VL2.1-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 68 的重链和序列 SEQ ID No. 71 的轻链。

[0185] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G2wt)/VL2.1-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 69 的重链和序列 SEQ ID No. 71 的轻链。

[0186] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4wt)/VL2.2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 67 的重链和序列 SEQ ID No. 84 的轻链。

[0187] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4PRO)/VL2.2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 68 的重链和序列 SEQ ID No. 84 的轻链。

[0188] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G2wt)/VL2.2-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No. 69 的重链和序列 SEQ ID No. 84 的轻链。

[0189] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4wt)/VL2.3-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No.67 的重链和序列 SEQ ID No.85 的轻链。

[0190] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G4PRO)/VL2.3-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No.68 的重链和序列 SEQ ID No.85 的轻链。

[0191] 在另一优选实施方式中,根据本发明,人源化抗体 Hz515H7VH1D76N(G2wt)/VL2.3-Ck 或其衍生化合物或功能性片段,包括序列 SEQ ID No.69 的重链和序列 SEQ ID No.85 的轻链。

[0192] 此处下方表 4 总结了根据发明所述的,分别为人源化抗体 515H7 不同重链和轻链可变结构域及全长(或完整)的氨基酸序列。

[0193] 表 4 (其中 Hz= 人源化)

[0194]	抗 体	重链	轻链	SEQ ID NO.
	Hz515H7			
	可变结构域	VH1 D76N	-	64
		-	VL2	65
[0195]		-	VL2.1	66
		-	VL2.2	82
		-	VL2.3	83
	完整序列 (无信号肽)	VH1 D76N (G4wt)	-	67
		VH1 D76N (G4PRO)	-	68
		VH1 D76N (G2 wt)	-	69
		-	VL2-Ck	70
		-	VL2.1-Ck	71
		-	VL2.2-Ck	84
		-	VL2.3-Ck	85

[0196] 在优选实施方式中,从其 C 端赖氨酸残基删除重链序列(如来自 Lonza 的原始 pConPlus 载体系列中所见:pConPlus γ 4 Δ K、pConPlus γ 4PRO Δ K 及 pConPlus γ 2 Δ K)。

[0197] 而且, G4PRO 重链对应于人类 IgG4 同种型,其在铰链区携带一个突变以避免形成半抗体。此突变在来自 Lonza 的亲本 pConPlus γ 4PRO Δ K 中发现 [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody. Mol Immunol. (1993) ;30(1) :105-108]。

[0198] 特别地,此处提供了命名为 hz515H7IgG4 的人源化抗体,其包含人 IgG4 同种型的重链,所述重链具有 SEQ ID NO :95 代表的序列。

[0199] 作为实例,为避免疑问,表达“VH1”类似于表达“VH 变体 1”、“VH 变体 1”、“VH Var1”或“VH var1”)。

[0200] 必须理解上述例证 VH/VL 组合不是限制性的。当然,本领域技术人员能够重排本

说明中公布的所有 VH 和 VL,而无需过度负担并无需使用创造性技巧。

[0201] 本发明的一个新方面涉及分离的核酸,特征在于其选自下列核酸(包括任意简并遗传密码):

[0202] a) 核酸(DNA 或 RNA),其编码根据本发明的抗体或其功能性片段或衍生物之一;

[0203] b) 核酸,其包括选自由 SEQ ID No. 14 至 19 及 41 至 45 组成的序列的 DNA 序列;

[0204] c) 核酸,其包括选自由 SEQ ID No. 20、21、46 和 47 组成的序列的 DNA 序列;

[0205] d) 如 b) 或 c) 中定义的核酸的相应 RNA 核酸;

[0206] e) 如 a)、b) 及 c) 中定义的核酸的互补核酸;以及

[0207] f) 至少 18 个核苷酸的核酸,其能够在高严谨度条件下与序列 SEQ ID No. 14 至 19 和 41 至 45 的至少一个 CDR 杂交。

[0208] 下面表 5 总结了关于本发明抗体的各种核苷酸序列。

[0209] 表 5 (其中 Mu. = 鼠)

[0210]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
515H7	IMGT		CDR-L1	14
			CDR-L2	15
			CDR-L3	16
		CDR-H1		17
		CDR-H2		18
		CDR-H3		19
	Kabat		CDR-L1	22
			CDR-L2	23
			CDR-L3	16
		CDR-H1		24
		CDR-H2		25
		CDR-H3		26
			小鼠可变结构域	20
		小鼠可变结构域		21
301aE5	IMGT		CDR-L1	41
			CDR-L2	15
			CDR-L3	42
		CDR-H1		43
		CDR-H2		44
		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	48
			CDR-L2	49
			CDR-L3	50
		CDR-H1		51
		CDR-H2		52
		CDR-H3		53
			小鼠可变结构域	46
		小鼠可变结构域		47

[0211] 在本说明中互换使用的术语“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”，“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”，意指核苷酸精确序列，无论修饰与否，其定义核酸的片段或区域，包含或不含非天然核苷酸，且是双链 DNA、单链 DNA 或是所述 DNA 的转录产物。

[0212] 此处还包括本发明不涉及在其天然染色体环境(即处于天然状态)中的核苷酸序列。本发明的序列已经分离和 / 或纯化，即它们(例如以一个拷贝)直接或间接取样，其环境已经至少部分被修饰。在此还应提及通过重组遗传学(例如以宿主细胞的方式)获得、或通过化学合成获得的分离核酸。

[0213] “在与优选序列最佳比对后显示有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 百分比同一性的核酸序列”意指核酸序列(相对于参考核酸序列)显示尤其是定点的某些修饰，例如特

别是删除、截短、延长、嵌合融合和 / 或取代。优选的是,这些序列编码与参考序列相同的氨基酸序列(这涉及遗传密码的简并)、或是优选在高度严谨条件下有可能与参考序列特异杂交的互补序列,特别是下面定义的那些。

[0214] 在高度严谨条件下杂交意指,在此方式下选择涉及温度和离子强度的条件以使其能允许两条互补 DNA 片段间维持杂交。在单纯说明性基础上,上述出于限定多核苷酸片段目的的杂交步骤的高度严谨条件是有利的,如下。

[0215] 在两个步骤中进行 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交:(1) 在 42° C、在磷酸盐缓冲液(20mM,pH7.5,包含 5X SSC(1X SSC 对应于 0.15M NaCl+0.015M 柠檬酸钠的溶液)、50% 甲酰胺、7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、10X Denhardt's、5% 硫酸葡聚糖和 1% 的鲑精 DNA)中预杂交三个小时;(2)在取决于探针长度的温度(即,对于大于 100 核苷酸长的探针是 42° C)下进行初始杂交 20 小时,然后在 20° C、在 2X SSC+2%SDS 中进行两次 20 分钟洗涤,在 20° C、在 0.1X SSC+0.1%SDS 中进行一次 20 分钟洗涤。对于大于 100 核苷酸长的探针,在 60° C、在 0.1X SSC+0.1%SDS 中进行最后的洗涤 30 分钟。对于长些或短些的寡核苷酸,本领域技术人员能依据 Sambrook 等人所述的程序(Molecular cloning:a laboratory manual,Cold Spring Harbor Laboratory;第三版,2001)针对特定尺寸的多核苷酸调整上述高度严谨杂交条件。

[0216] 本发明还包括分离的核酸分子,特征在于其选自下列核酸:

[0217] a) 核酸(DNA 或 RNA),根据本发明,编码人源化抗体重链、或其衍生化合物或功能性片段;

[0218] b) 核酸(DNA 或 RNA),根据本发明,编码人源化抗体轻链、或其衍生化合物或功能性片段;

[0219] c) 核酸(DNA 或 RNA),根据本发明,编码人源化抗体、或其衍生化合物或功能性片段;

[0220] d) 互补于如 a)、b) 或 c) 所限定的核酸的核酸;

[0221] e) 至少 18 个核苷酸的核酸,能够在高度严谨条件下与包括核酸序列 SEQ ID No. 72 或 75 至 77 的至少一条重链杂交;

[0222] f) 至少 18 个核苷酸的核酸,能够在高度严谨条件下与包括核酸序列 SEQ ID No. 73、74、86、87 或 78、79、88、89 的至少一条轻链杂交。

[0223] 其后表 6 分别总结了根据本发明所述的人源化抗体 515H7 的不同重链和轻链可变结构域和全长(或完整)的核苷酸序列。

[0224] 表 6 (其中 Hz= 人源化)

[0225]

抗体 Hz515H7	重链	轻链	SEQ ID NO.
可变结构域	VH1 D76N	-	72
	-	VL2	73
	-	VL2.1	74
	-	VL2.2	86
	-	VL2.3	87
完整序列 (无信号肽)	VH1 D76N (G4wt)	-	75
	VH1 D76N (G4PRO)	-	76
	VH1 D76N (G2 wt)	-	77
	-	VL2-Ck	78
	-	VL2.1-Ck	79
	-	VL2.2-Ck	88
	-	VL2.3-Ck	89

[0226] 此处下面的表 7 总结了根据本发明所述的嵌合抗体 515H7 的不同重链和轻链的核苷酸序列。

[0227] 表 7 (其中 c= 嵌合)

[0228]

抗体 c515H7	重链	轻链	SEQ ID NO.
完整序列 (无信号肽)	cVH (G4wt)	-	60
	cVH (G4PRO)	-	61
	cVH (G2 wt)	-	62
	-	cVL-Ck	63

[0229] 换句话讲,本发明涉及分离的核酸,特征在于其选自下列核酸:

[0230] a) 核酸(DNA 或 RNA),编码根据本发明的抗体或其功能性片段或衍生物之一;

[0231] b) 核酸,包括选自由序列 SEQ ID No. 14 至 19 及 41 至 45 构成的 CDR 序列的 DNA 序列;

[0232] c) 核酸,包括选自由 SEQ ID No. 20、21、46、47、72、73、74、86 和 87 构成的重链和轻链可变结构域序列的 DNA 序列;

[0233] d) 核酸,包括选自由 SEQ ID No. 60 至 63、75 至 79、88、89 和 94 构成的重链和轻链序列的 DNA 序列;

[0234] e) 核酸,包括由 SEQ ID No. 55 构成的 DNA 序列;

[0235] f) 如 b)、c)、d) 或 e) 中限定的核酸的相应 RNA 核酸;

[0236] g) 如 a)、b)、c)、d) 和 e) 中限定的核酸的互补核酸;及

[0237] h) 至少 18 个核苷酸的核酸,能够在高严谨度条件下与序列 SEQ ID No. 14 至 19 和 41 至 45 的至少一个 CDR 杂交。

[0238] 本发明还涉及包括本发明所述的核酸的载体。

[0239] 本发明尤其靶向包含此类核苷酸序列的克隆和 / 或表达载体。

[0240] 本发明的载体优选包含在给定宿主细胞中允许核苷酸序列表达和 / 或分泌的元件。因而载体必须包含启动子、翻译起始和终止信号、还有适当的转录调控区。它必须能够在宿主细胞中以稳定的方式维持,并且任选地具有指导翻译蛋白质分泌的特异信号。根据所用的宿主细胞,本领域技术人员能选择和优化这些不同元件。为了此目的,核苷酸序列能被插入至所选宿主内的自主复制载体,或者是所选宿主的整合性载体。

[0241] 此类载体以本领域技术人员通常使用的方法制备,而且产生的克隆能以如脂质转染、电穿孔、热激或化学方法的标准方法引入至适当的宿主。

[0242] 载体是(例如)质粒或病毒来源的载体。它们被用于转化宿主细胞以克隆或表达本发明的核苷酸序列。

[0243] 本发明还包括转化有本发明所述载体或包括本发明所述载体的宿主细胞。

[0244] 宿主细胞能选自原核或真核系统,如细菌细胞例如,还有酵母细胞或动物细胞,特别是哺乳动物细胞。还能使用昆虫或植物细胞。

[0245] 除了人类,本发明还涉及具有根据本发明所述的转化细胞的动物。

[0246] 本发明的另一方面涉及用于生产根据本发明所述的抗体、或其功能性片段之一的方法,其特征在于所述方法包括下列步骤:

[0247] a) 在基质中及在适当培养条件下培养根据本发明所述的宿主细胞;及

[0248] b) 如此从培养基质或从所述培养细胞中回收生产的所述抗体、或其功能性片段之一。

[0249] 根据本发明所述的转化细胞可用于制备根据本发明所述的重组多肽的方法。本发明还包括制备根据本发明所述重组形式的多肽的方法,特征在于所述方法使用根据本发明所述的载体和 / 或转化有根据发明所述的载体的细胞。优选地,转化有根据发明所述的载体的细胞在允许前述多肽得以表达和所述重组肽得以回收的条件下培养。

[0250] 如已提及的,宿主细胞能选自原核或真核系统。特别是,可能鉴定有利于在此原核或真核系统中分泌的本发明的核苷酸序列。携带这样序列的根据发明所述的载体因此能有利地用于生产待分泌的重组蛋白质。事实上,蛋白质在细胞培养物上清中而非在宿主细胞内存在的事实将有利于这些目标重组蛋白质的纯化。

[0251] 本发明的多肽还能通过化学合成制备。一种此类制备方法也是发明的对象。本领域技术人员知道用于化学合成的方法,如通过浓集片段或通过传统溶液中合成的固相技术(特别见 Steward 等人,1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 第二版)或部分固相技术。发明也包括通过化学合成获得并能够包含相应非天然氨基酸的多肽。

[0252] 本发明还包括通过发明的方法可能获得的抗体、或其衍生物或功能性片段。

[0253] 根据另一方面,本发明涉及如上所述的抗体,此外特征在于抗体能特异结合人趋化因子家族受体和 / 或能特异抑制 X4- 向性 HIV 复制。

[0254] 根据另一方面,本发明涉及如上所述的抗体,此外特征在于抗体能特异结合于人趋化因子家族受体和 / 或能特异抑制 X4/R5- 向性 HIV 复制。

[0255] 根据新实施方式,本发明涉及抗体、或其衍生物或功能性片段,其由双特异性的抗体构成,意思是抗体包括能够与 HIV 细胞进入相关的任何受体(如,例如,CCR5、CD4、CXCR4 (除本发明抗体外,即靶向另一表位)或 CCR3、CCR2、CCR8、CXCR6、CXCR7、CX3CR1)相

相互作用的第二基序。

[0256] 双特异性或双功能抗体组成了第二代单克隆抗体,其中在同一分子中组合了两种不同的可变区(Hollinger 和 Bohlen,1999, *Cancer and metastasis*, rev. 18 :411-419)。关于其靶向细胞表面若干分子的能力,在诊断和治疗领域中均阐明了抗体的效用;此类抗体可以化学方法(Glennie MJ 等人,1987, *J. Immunol.* 139,2367 - 2375 ;Repp R. 等人,1995, *J. Hemat.* ,377-382)或体细胞的方法(Staerz U. D. 和 Bevan M. J. ,1986, *PNAS*83, 1453-1457 ;Suresh M. R. 等人,1986, *Method Enzymol.* ,121 :210-228)、而且优选以遗传工程技术(该技术能迫使所得抗体的异源二聚体化并因此有利于所得抗体的纯化(Merchand 等,1998, *Nature Biotech.* ,16 :677-681))获得。

[0257] 这些双特异性抗体能被构建成为整个 IgG、双特异性 Fab' 2、Fab' PEG、双特异抗体或双特异性 scFv,也可以成为如上所述的四价双特异性抗体(其中对于每个靶向的抗原存在着两个结合位点(Park 等人,2000, *Mol. Immunol.* ,37(18) :1123-30)或其片段。

[0258] 除了保证双特异性抗体生产和施用比生产两个特异性抗体更便宜的经济利益之外,此类双特异性抗体的使用具有降低治疗毒性的优势。事实上,双特异性抗体的使用使得降低循环抗体的总量及由此产生的可能的毒性成为可能。

[0259] 在本发明的优选实施方式中,双特异性抗体是二价或四价抗体。

[0260] 最后,本发明涉及作为药物的上述抗体或其功能性片段或衍生物之一。

[0261] 本发明还涉及药物组合物,其包括由本发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一构成的化合物作为活性组分。优选地,所述抗体补充有赋形剂和 / 或药学上可接受的载体。

[0262] 发明还涉及作为药物的如上所述组合物。

[0263] 在本发明的一个具体方面,抗体、或其功能性片段或衍生物之一,抑制 HIV-1KON 原代分离株在 PBMC 中的复制,具有 IC₉₀ 为至少 5 μ g/ml、优选至少 10 μ g/ml。

[0264] 本发明还包括根据发明所述的抗体或组合物用于制备预防或治疗 HIV 感染的药和 / 或药物的用途。

[0265] 更特别的是,作为非限制性实例,所述 HIV 感染为 X4- 向性 HIV 感染。

[0266] 在另一实施方式中,作为非限制性实例,所述 HIV 感染为 X4/R5- 向性 HIV 感染。

[0267] 本发明还涉及根据发明所述的,优选人源化的,抗体、或其功能性片段或衍生物、和 / 或组合物用于制备抑制 HIV 复制的药物的用途。通常,本发明涉及(优选人源化的)抗体、或其功能性片段或衍生物、和 / 或组合物用于制备 HIV 疾病预防或治疗的药物的用途。

[0268] 在本说明书中,“药物载体”意指参与药物组合物的化合物、或化合物组合,该物质不导致二级反应,并且例如该物质有利于活性化合物的施用、增加其在有机体中的寿命和 / 或效果、提高其在溶液中的溶解度或改善其储存。此类药物载体众所周知,并且根据所选活性化合物的性质和施用途径,本领域技术人员可对其进行调整。

[0269] 优选的是,此化合物将以系统方式、特别是以静脉内、肌肉内、皮内、腹腔内、皮下、阴道内或口服途径施用。更优选的是,由根据发明所述的抗体组成的组合物以一定时间内同样间隔的多剂量施用。

[0270] 其施用途径、剂量规划和最佳盖伦制剂形式(galenic forms)能根据建立适合于患者的治疗时通常要考虑的标准(如,例如患者的年龄或体重、他的总体状况的严重性、他

的治疗耐受性和所经历的副作用)来确定。

[0271] 本发明还涉及组合物,其作为组合产物以同时、分开或延伸的方式使用,另外包括抗 HIV 抗体、或抗 HIV 细胞进入抗体、或抗 HIV 复制抗体、其它针对 CXCR4 的抗体。

[0272] 根据另一实施方式,本发明还涉及如上所述的药物组合物,其包括至少第二抗 HIV 化合物,该化合物选自能特异抑制 HIV 进入和 / 或复制的化合物(如本发明描述的那些以外的抗 CCR5、抗 CD4 化合物和抗 CXCR4 化合物,或本领域技术人员已知的任意其它抗 HIV 化合物)。

[0273] 另外互补于发明的另一实施方式由如上所述的组合物构成,该组合物作为同时、分开或延伸使用的组合或偶联产物,由抗 HIV 化合物组成。

[0274] “同时使用”意指施用包括在单剂量形式中的组合物的两种化合物。

[0275] “分开使用”意指同时施用包括在不同剂量形式中的组合物的两种化合物。

[0276] “延伸使用”意指连续施用两种组合物的化合物,每种包括在不同剂量形式中。

[0277] 通常,根据发明所述的组合物大大提高了 HIV 治疗的有效性。换句话说,以意想不到的方式通过施用抗 HIV 试剂增强了发明抗体的治疗效果。本发明的组合物产生的另一主要后期优势在于,有可能使用更低有效剂量的活性组分,从而有可能避免或降低副作用(特别是抗 HIV 试剂的作用)出现的风险。而且,此组合物使得更快地实现期望的治疗效果成为可能。

[0278] “治疗性抗 HIV 试剂”意指一种物质,当其施用于患者时,它治疗或预防了患者内 HIV 复制。此类试剂的非限制性实例包括“抗逆转录病毒药物如 HIV 蛋白酶抑制剂(PI)、核苷 / 核苷酸 HIV 逆转录酶抑制剂(NRTI/NtRTI)非核苷类 HIV 逆转录酶抑制剂(NNRTI)、HIV 进入抑制剂、HIV 整合酶抑制剂”。

[0279] 在(例如)VIDAL 中、在关于“抗 HIV 化合物”的化合物所在的页上引用了此类试剂;参考此文献引用的抗 HIV 化合物在此引用作为非限制性优选抗 HIV 试剂。

[0280] HIV 蛋白酶抑制剂意指能抑制 HIV 蛋白酶活性的任意物质。此类 HIV 蛋白酶抑制剂的实例包括,但不限于,甲磺酸沙奎那韦或 SQV (Invirase®)、茚地那韦或 IDV (Crixivan®)、利托那韦或 RTV (Norvir®)、奈非那韦或 NFV (Viracept®)、安普那韦 (Agenerase®, Prozei®)、洛匹那韦 / 利托那韦或 LPV/r (Kaletra®, Aluvia®)、阿扎那韦或 ATV (Reyataz®, Zrivada®)、福沙那韦或 FPV (Lexiva®, Telzir®)、替拉那韦或 TPV (Aptivus®)、达芦那韦或 DRV (Prezista®)。

[0281] HIV 核苷或核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI)意指一种物质,它是阻断 HIV RNA 逆转录的核苷或核苷酸类似物。NRTI 的实例包括,但不限于,齐多夫定或 AZT、ZDV (Retrovir/combivir/trixivir®)、地达诺新或 ddi (Videx®)、扎西他滨 (HIVID®)、司他夫定或 d4T (Zerit®)、拉米夫定或 3TC (Epivir/combivir/epzicom/trixivir®)、阿巴卡韦或 ABC (Ziagen/trixivir/epzicom®)、替诺福韦酯(Tenofovir disoproxil fumarate)或 TDF (Viread/atripla/truvada®)、恩曲他滨或 FTC (Emtriva/ atripla/ truvada®)。

[0282] 非核苷 HIV 逆转录酶抑制剂(NNRTI)意指一种物质,它能阻断 HIV RNA 逆转录但不是核苷或核苷酸类似物。NNRTI 的实例包括,但不限于,奈韦拉平或 NVP (Viramune®)、

依非韦伦或 EFV (**Sustiva/ atipla®**, **Stocrin®**)、地拉韦啉或 DLV (**Rescriptor®**) 和依曲韦林 (Etravirine) 或 ETR (**Intelence®**)。

[0283] HIV 进入抑制剂意指阻断 HIV 细胞进入的一种物质。HIV 进入抑制剂的实例包括, 但不限于, 恩夫韦或 T20 (**Fuzeon®**)、马拉维诺或 MVC (**Celsentri®**, **Celzentry®**)。

[0284] HIV 整合酶抑制剂意指抑制 HIV 整合酶活性的一种物质。整合酶抑制剂的实例包括, 但不限于, 雷特格韦或 RAL (**Isentress®**)。

[0285] 此类试剂也是(例如)属于 VIDAL 中所述的同一类药物的化合物, 现今在临床病例中的同一类药物例如(但不限于) Vicriviroc (无对应译文)、PRO140、TNX-355、AMD070、Racivir (无对应译文)、阿力他滨(Apricitabine)、艾夫他滨(Elvucitabine)、弗洛维啉(Flosalvudine)、利匹维林(Rilpivirine)、雷格特维(Elvitegravir)。

[0286] 此类试剂也是(例如)属于其它潜在类药物的化合物, 如(但不限于)成熟抑制剂(Bevirimat)、 β -半乳糖神经酰胺糖苷类似物、碳水化合物结合试剂、RNA 酶 H 抑制剂、HIV 基因表达抑制剂、潜伏性 T 细胞的 HIV 释放的刺激物(丙戊酸...)。

[0287] 在特别优选的实施方式中, 作为组合产物的所述发明组合物特征在于, 所述抗 HIV 试剂化学结合于所述抗体以便同时使用。

[0288] 为了有利于所述抗 HIV 试剂和根据发明所述的抗体间的结合, 可以在要结合的两个化合物之间引入间隔物分子, 如聚亚烷基二醇聚乙二醇或氨基酸; 或者, 在另一实施方式中, 能使用所述抗 HIV 试剂的活性衍生物(其中已引入能与所述抗体反应的功能)。这些结合技术为本领域研究人员所熟知, 并且将不在本说明书中更详细讨论。

[0289] 还优选的是, 形成所述缀合物的发明所述抗体选自其功能性片段、特别是丢失其 Fc 组分的片段(如 scFV 片段)。

[0290] 根据发明所述, 本发明还涉及用作药物的作为组合产物的组合物, 或涉及抗 CXCR4Mab/ 抗 HIV 药物缀合物。

[0291] 优选的是, 所述作为组合产物的组合物或所述缀合物将补充有赋形剂和 / 或药物载体。

[0292] 因而, 本发明涉及抗体、或其功能性片段或衍生物之一用于制备特异性靶向对 HIV 复制具有生物活性的化合物的药物的用途。

[0293] 在另一个实施方式中, 本发明还涉及用于 HIV 预防或治疗的方法, 其中所述方法包括由向有其需要的患者施用根据本发明的抗体或抗原结合片段或衍生物之一和 / 或组合物组成的步骤。

[0294] 更特别地, 根据本发明的方法还包括由向所述患者施用抗 CCR5 化合物如马拉维诺组成的步骤。

[0295] 如前面所说明的, CXCR4Mab515H7 和 301aE5 具有对抗 HIV-1 在 PBMC 中复制的强活性, 所以此类抗体能被用于筛选分析以鉴定治疗 HIV-1 感染的 CXCR4 拮抗剂抗病毒试剂。在这些分析的第一步, 表达 CXCR4 的细胞与 Mab515H7 和 / 或 301aE5 孵育, 并且随后评估分子抑制 Mab515H7 和 / 或 301aE5 结合的潜力。在此类型分析中使用的细胞可以是转染的细胞系如 CHO-CXCR4、NIH3T3-CXCR4 或 CXCR4 转染的人细胞系如 U373-MAGI-CXCR4、表达 CXCR4 的人细胞系如 NALM6 或原代细胞如 PBMC。用以筛选抑制 Mab515H7 和 / 或 301a5 在 CXCR4

表达细胞上结合的 CXCR4 拮抗剂的方法可以是 Zhao Q 等人描述的基于细胞的竞争性酶联免疫吸收分析(ELISA) (AIDS Research And Human Retroviruses, 2003, 19, pp947-955) 或使用如 Juarez J. 等人描述的荧光激活细胞分选(FACS) 的方法(Leukemia 2003, 17, pp1294-1300)。

[0296] 因此,在发明的一具体方面,涉及用于筛选和/或鉴定作为 CXCR4 拮抗剂抗病毒试剂的分子的方法,包括步骤:

[0297] a) 选择表达 CXCR4 的细胞,

[0298] b) 所述细胞与发明的抗体、或其功能性片段或衍生物之一孵育,并且

[0299] c) 评估检验分子对于抗体、或其功能性片段或衍生物之一与 CXCR4 结合的潜在抑制,并且

[0300] d) 选择能产生所述抑制的分子。

[0301] 在另一具体实施方式中,能加入下列步骤 e):

[0302] e) 在 HIV-1 复制分析中检验这些分子。

[0303] 发明的其它特征和优势在说明书中以实施例和图进一步呈现,图注显示如下。

附图说明

[0304] 图 1A 和 1B 显示单核细胞和淋巴细胞上 CXCR4 表达的设门(gating)策略。

[0305] 图 1A :T 细胞用 CD3-PE 抗体染色。

[0306] 图 1B :单核细胞用 CD14-PE 抗体染色。

[0307] 图 2A 和 2B 显示抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 在单核细胞和 T 淋巴细胞上的结合。

[0308] 图 3A 和 3B 经由在 HEK293 细胞中的生物荧光共振能量转移(BRET)法,分别显示通过 SDF-1 和通过抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 调节 CXCR4 受体二聚体。

[0309] 图 4A 和 4B 和图 5 显示了抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1 分离株 KON(X4 病毒)在人 PBMC 中复制的能力。

[0310] 图 6A、6B 和 6C 显示了在 CHO-CXCR4 细胞中以 Mab515H7 (图 6A)、301aE5 (图 6B) 和 c515H7 (图 6C) 抑制 SDF-1 诱导的钙释放。

[0311] 图 7 和 8 显示了抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1X4 病毒原代分离株 MN (图 7) 和 92UG024 (图 8) 在人 PBMC 中复制的能力。

[0312] 图 9 显示了抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1X4 病毒原代分离株 KON、MN 和 92UG024 在人 PBMC 中复制的能力。

[0313] 图 10 和 11 显示了抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制双向性 HIV-1X4/R5 病毒原代分离株 89.6 在人 PBMC 中复制的能力。

[0314] 图 12 显示了 Mab c515H7 与马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 89.6 (双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中复制的有益效果。

[0315] 图 13 显示了 Mab c515H7 与马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 UG93067 (双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中复制的有益效果。

[0316] 图 14 显示了抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1X4 病毒原代分离株 KON 在人 PBMC 中复制的能力。

[0317] 图 15 通过 FACS 分析阐明了 c515H7Mab 的结合特异性。

[0318] 图 16 通过生物荧光共振能量转移(BRET)法阐明了 c515H7Mab 对于 CXCR4 同源二聚体的效果。

[0319] 图 17 :515H7 重链可变结构域与人生殖系 IGHV3-49*04 和 IGHJ4*01 的氨基酸序列比对。515H7VH 氨基酸序列与所选人受体框架序列相比对。VH Var1 (VH1) 序列对应于 515H7VH 结构域的人源化变体。在 76 位的单回复突变以粗体显示。

[0320] 图 18 :515H7 轻链与人生殖系 IGKV4-1*01 和 IGKJ1*01 的氨基酸序列比对。515H7VL 氨基酸序列与所选人受体框架序列相比对。VL Var2. 1、Var2. 2 和 Var2. 3 序列对应于人源化 515H7VL Var2 (带有粗体显示的突变残基)的实施人源化变体。Var2. 1 和 Var2. 2 携带另外 4 个人源化残基,而 Var2. 3 包含另外 5 个人类残基。

[0321] 图 19 :以嵌合 515H7 和人源化 515H7 的不同变体交叉阻断生物素化鼠抗体 515H7。以流式细胞术使用 CXCR4 转染的 NIH3T3 细胞评估 515H7 人源化变体(hz515H7)交叉阻断亲本鼠抗体 515H7 的活性。将人源化变体的活性与嵌合 515H7 相比。变体 VH1 与嵌合 VL (cVL) 组合的交叉阻断活性与嵌合的活性非常类似(A)。当与 VL 的变体 2 组合时,确定 VH 变体 1 (VH1,无回复突变的变体)的活性没有降低(B)。

[0322] 图 20 :以嵌合 515H7 和人源化 515H7 的不同变体抑制生物素化 SDF-1 结合。以流式细胞术使用细胞系 RAMOS 评估 515H7 人源化变体(hz515H7)抑制 SDF-1 结合的能力。将人源化变体的抑制能力与嵌合 515H7 相比。人源化变体 hz515H7VH1D76N VL2 具有和嵌合抗体类似的抑制 SDF-1 结合的能力。人源化抗体片段 hz515VH1VL2 在抑制 SDF-1 结合于 RAMOS 细胞中有完全活性。

[0323] 图 21 显示了人源化 515H7Mab (hz515H7VH1D76N VL2, hz515H7VH1D76N VL2. 1, hz515H7VH1D76N VL2. 2 和 hz515H7VH1D76N VL2. 3) 特异结合于 NIH3T3-CXCR4 上的 CXCR4。

[0324] 图 22 通过生物荧光共振能量转移(BRET)法,显示了人源化 515H7Mab (hz515H7VH1D76N VL2, hz515H7VH1D76N VL2. 1, hz515H7VH1D76N VL2. 2 和 hz515H7VH1D76N VL2. 3) 对 CXCR4 同源二聚体的效果。

[0325] 图 23 显示了抗 CXCR4Mab hz515H7 在 MT-4 细胞中抑制 X4HIV-1_{IIIB} 诱导的致细胞病变的能力。

[0326] 图 24 显示了抗 CXCR4Mab hz515H7 抑制 HIV-1X4 病毒原代分离株 KON 在人 PBMC 中复制的能力。

[0327] 图 25 显示了 Mab hz515H7 与马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 89.6 (双向性 X4/R5 病毒)在人 PBMC 中复制的有益效果。

[0328] 图 26 显示了 Mab hz515H7 与马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 UG93067 (双向性 X4/R5 病毒)在人 PBMC 中复制的有益效果。

[0329] 图 27 显示了抗 CXCR Mab hz515H7IgG4 抑制 HIV-1X4 病毒原代分离株 KON 在人 PBMC 中复制的能力。

[0330] 图 28 显示了 Mab hz515H7IgG4 与马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 89.6 (双向性 X4/R5 病毒)在人 PBMC 中复制的有益效果。

具体实施方式

[0331] 实施例 1 :生成抗人 CXCR4 的单克隆抗体(Mab)

[0332] 为了生成 CXCR4 的单克隆抗体,以重组 NIH3T3-CXCR4 细胞和 / 或对应于 CXCR4 胞外 N 端和环的肽免疫 Balb/c 小鼠。以在完全弗氏佐剂中的抗原对 6-16 周龄的小鼠皮下 (s. c.) 免疫一次,然后以在不完全弗氏佐剂中的抗原皮下免疫 2 至 6 次。以眼眶后取血监测免疫反应。以 ELISA (如下所述) 筛选血清,并且具有更高滴度抗 CXCR4 抗体的小鼠被用于融合。小鼠在被处死之前两天以抗原静脉注射进行加强,然后摘除脾脏。

[0333] -ELISA

[0334] 为选择生产抗 CXCR4 抗体的小鼠,以 ELISA 检验来自免疫小鼠的血清。简单讲,以 5 μ g 等量肽 /mL 的缀合至 BSA 的纯化 [1-41]N 端肽包被微孔板,100 μ L/ 孔,在 4° C 孵育过夜,然后以 250 μ L/ 孔的 PBS 中的 0.5% 明胶封闭。向每孔中加入 CXCR4 免疫小鼠的血浆稀释物并在 37° C 孵育 2 小时。以 PBS 洗涤板并随后用缀合至 HRP 的羊抗鼠 IgG 抗体 (Jackson Laboratories) 在 37° C 孵育 1 小时。洗涤后,以 TMB 底物呈现板,5 分钟后通过添加 100 μ L/ 孔 1M H₂SO₄ 终止反应。生成最高滴度抗 CXCR4 抗体的小鼠被用于抗体生成。

[0335] -生产抗 CXCR4 的 Mab 的杂交瘤的生成

[0336] 产生最高滴度抗 CXCR4 抗体的 Balb/c 小鼠分离出的小鼠脾细胞用 PEG 融合至小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0。以大约 1x10⁵/ 孔将细胞铺于微孔板,然后在包括 ultra 培养基 (ultra culture medium) +2mM L- 谷氨酰胺 +1mM 丙酮酸钠 +1 $\times$ HAT 的选择培养基中孵育两周。然后以 ELISA 筛选孔中的抗 CXCR4 单克隆 IgG 抗体。然后通过限制性稀释亚克隆至少两次分泌抗体的杂交瘤,体外培养以生成抗体用于进一步分析。

[0337] 实施例 2 :通过 FACS 分析鉴定抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 的 (NIH3T3-CXCR4 转染子) 结合特异性

[0338] 在此实验中,通过 FACS 分析检查抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 与人 CXCR4(hCXCR4) 的特异性结合。

[0339] 以 10 μ g/ml 单克隆抗体 515H7 和 301aE5 孵育 NIH3T3 和 NIH3T3-hCXCR4 转染细胞。然后以 1%BSA/PBS/0.01%NaN₃ 洗涤细胞。接着,向细胞中加入 Alexa- 标记的二抗并使其在 4° C 孵育 20 分钟。然后再洗涤细胞两次。在第二次洗涤之后,进行 FACS 分析。在下面表 8 中提供了这些结合研究结果, [以 FACS 获得的平均荧光强度 (MFI)] 显示出抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 特异性结合人 CXCR4-NIH3T3 转染细胞系,而对于亲本 NIH3T3 细胞无识别。

[0340] 表 8

[0341]		NIH3T3 (MFI)	NIH3T3-CXCR4 (MFI)
	克隆 515H7 (10 μ g/ml)	16	2752
	克隆 301aE5 (10 μ g/ml)	21	1367

[0342] 实施例 3 :通过 FACS 分析鉴定抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 与外周血单核细胞 (PBMC) 的结合

[0343] 从健康供体中收集血块黄层的血液。100 μ l 全血与以标明的浓度的抗人 CXCR4 抗体 (克隆 515H7 和 301aE5) 在 4° C 孵育 20 分钟。在 PBS-BSA1%-NaN₃0.01% 中洗涤血液三次,并与 1:500 稀释的山羊抗人 Alexa488IgG (Invitrogen) 在 4° C 孵育 20 分钟。然后洗涤细胞并与 CD14-PE (Caltag) 或 CD3-PE (Caltag) 在 4° C 孵育 10 分钟,并且洗

涤三次。室温下以高产量裂解溶液(Caltag)裂解红细胞 10 分钟。立即用 Facscalibur (Becton-Dickinson) 分析细胞。于 CD14 阳性细胞上进行单核细胞的 CXCR4 表达及在 CD3 阳性的细胞上进行 T 细胞的 CXCR4 表达(图 1)。结果表示为抗原结合能力(ABC)。

[0344] 如图 2A 和 2B 中所显示, 抗人 CXCR4 克隆 515H7 和 301aE5 染色的 T 淋巴细胞(图 2A) 和单核细胞(图 2B), 说明了 515H7 和 301aE5Mab 能够识别单核细胞和 T 淋巴细胞细胞表面表达的天然形式的 CXCR4。

[0345] 实施例 4 : 通过生物荧光共振能量转移(BRET) 法, 515H7 和 301aE5Mab 对于 CXCR4 同源二聚体的效果

[0346] 此功能分析允许在 CXCR4 同源二聚体水平上评估 SDF-1 和 / 或 515H7Mab 结合 CXCR4 受体引起的构象变化。

[0347] 通过用传统分子生物学技术, 将用于调查相互作用配偶体的表达载体构建为带有相应染料(海肾荧光素酶, Rluc 和黄色荧光蛋白, YFP) 的融合蛋白质。在进行 BRET 实验之前两天, 以编码相应 BRET 配偶体 : [CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP] 的表达载体瞬时转染 HEK293 细胞以研究 CXCR4 同源二聚体化。一天后, 细胞分散于多聚赖氨酸预包被的白色 96MW 板的完全培养基质 [添加 10%FBS 的 DMEM] 中。先在 37° C 以 5%CO₂ 培养细胞以使得细胞附着至板上。然后以 200 μl DMEM/ 孔使细胞饥饿过夜。恰在 BRET 实验之前, 去除 DMEM 并且以 PBS 快速洗涤细胞。然后在加入终体积 50 μl 的 5 μM 腔肠素(coelenterazine)H (有或无 300nMSDF-1) 之前, 在含或不含抗体的 PBS 中、在 37° C 下孵育细胞 10 分钟。在 37° C 又孵育 10 分钟后, 使用 Mithras LB940 多标记阅读仪(Berthold) 起始 485nm 和 530nm 处的光发射获取(1s/ 波长 / 孔, 室温下重复 15 次)。

[0348] 如前所述进行 BRET 比的计算(Angers 等人, 2000): $[(\text{发射}_{530\text{nm}}) - (\text{发射}_{485\text{nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{发射}_{485\text{nm}})$, 此处对于同样实验条件下的只表达 Rluc 融合蛋白质的细胞, $\text{Cf} = (\text{发射}_{530\text{nm}}) / (\text{发射}_{485\text{nm}})$ 。简化此方程, 显示 BRET 比相当于两个 BRET 配偶体存在时得到的 530/485nm 比(以同样实验条件下分析中只有融合于 Rluc 的配偶体存在时得到的 530/485nm 比进行校正)。为可读性起见, 结果表示为 milliBRET 单位(mBU); mBU 对应于 BRET 比乘以 1000。

[0349] 接头蛋白与融合于 CXCR4 受体的受体蛋白质的空间接近性导致 SDF-1 (300nM) 提高了约 20% 的 BRET 信号, 可能表明 CXCR4/CXCR4 同源二聚体的形成或事先存在的二聚体的构象变化(图 3A 和 B)。515H7 和 301aE5Mab 能够调节 SDF-1 诱导的 CXCR4 同源二聚体的构象变化(对于 515H7 和 301aE5, 抑制了 69% 的 SDF-1 诱导的 BRET 升高, 图 3A 和 B)。515H7 和 301aE5Mab 还能够自身调节 CXCR4/CXCR4 的空间接近性, 表明 515H7 和 301aE5Mab 对于 CXCR4/CXCR4 同源二聚体构象的影响(图 3A 和 3B)。

[0350] 实施例 5 : 以抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1 原代分离株 KON (X4 病毒) 在人 PBMC 中的复制

[0351] 来自 HIV-1 血清阴性的正常供体的 PBMC, 以 Ficol1-Hypaque 梯度离心分离自血块黄层或通过细胞单采法。PBMC 在含 PHA 的 RPMI1640 细胞培养基质(含 25mM HEPES、5mM 青霉素(10000U/ml)-链霉素(10000 μg/ml)、2mM L-谷氨酰胺、添加有 10% 热灭活 FCS)中进行活化, 并用作单周期中和试验中的细胞靶。通过 FACS 实验分析病毒 p24 抗原的细胞内染色, 检测原代人 PBMC 中的 HIV-1 复制。简单讲, 25 μl 每孔的不同稀释度的 Mab515H7、301aE5 和 12G5 (R&D 系统)或培养基质作为对照(RPMI1640, 10%FCS, 0.1%IL-2), 在 37° C 与 25 μl 每

孔的 HIV-1KON X4 原代分离株稀释物孵育 1 小时,一式两份。PHA- 活化的人 PBMC (25 μ l/孔) 以 20×10^6 细胞 / 孔加入到 96 孔板(U- 底, Costar3599) 中的 Mab/ 病毒混合物中,并在 RPMI1640 10%FCS 和 0.1%IL-2 中、在 37° C 下培养 24 至 36 小时。引入由不含 Mab 的培养基质中未感染 PBMC 构成的对照。为检测 HIV 感染的 PBMC,以流式细胞术进行病毒 p24 抗原的细胞内染色和分析。根据厂商的方法使用 Cytofix/Cytoperm 试剂盒(Becton Dickinson) 固定细胞并使其渗透,并以 1/160 稀释使用的荧光抗 p24Mab(克隆 KC57-Coulter Beckman) 在黑暗中、4° C 下孵育 10 分钟进行染色。在 PBS-3%FCS 基质中洗涤之后,在流式细胞术分析前在 PBS 中稀释 PBMC。通过在活细胞群上设门 20,000 个事件确定不同样本中 p24 阳性细胞百分数。分析活细胞亚群相对于未感染细胞背景染色的 p24 表达。在减去模拟感染细胞背景事件之后得到 p24 抗原阳性值。中和百分数被定义为与不含 Mab 的对照感染孔相比 p24 阳性细胞的减少。中和滴度被定义为允许感染细胞百分数有 90% 降低的 Mab 稀释度。将抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 与已知作为 HIV 复制的抗 CXCR4Mab 参考的 12G5Mab 相比较。如图 4A 和 B 和 5 所示,抗 CXCR4Mab515H7 和 301aE5 分别能以 10 μ g/ml (66nM) 和 150 μ g/ml (1 μ M) 的 IC₉₀ 抑制 HIV-1KON 原代分离株在 PBMC 中的复制,而 12G5Mab 不能抑制 HIV-1KON 原代分离株在 PBMC 中的复制(图 4A)。

[0352] 实施例 6 :CXCR4 受体介导的细胞内钙库的流动

[0353] 此功能分析被设计用于监控经由刺激磷酸酯酶 C 通路的 CXCR4 受体信号,该信号诱导钙从内质网细胞内储存中释放。

[0354] 通过以携带有人 CXCR4 受体整个编码序列(RefSeq NM_003467) 的哺乳动物表达载体转染初始 CHO-K1 细胞(ATCC CCL-61),获得了稳定和组成型表达人 CXCR4 受体的 CHO-K1 细胞。在完全培养基 [添加有 5% 胎牛血清(FCS) 和 500 μ g/ml 遗传毒素的 DMEM-Ham's F12] 中繁殖细胞。以 100,000 细胞 / 孔的密度在合适培养基中细胞铺于黑色 96MW 板。在进行实验之前将细胞饥饿过夜。在上样缓冲液 [HBSS1x, HEPES20mM, 丙磺舒酸 25mM] 中、以荧光钙染料(Fluo-4No Wash, Invitrogen US) 在 37° C 装载细胞 30 分钟,然后在 25° C 装载细胞 30 分钟。通过直接注射每个细胞完成 SDF-1 刺激。对于拮抗实验,在 SDF-1 之前至少 10 分钟直接将 10 μ l Mab 溶液加入至上样缓冲液。在多重模式荧光微孔板阅读器 Mithras LB940 (Berthold) 上用下列设置完成动力学荧光测定 :在 485nm 处激发,在 535nm 处发射,10000 任意单位的激发能量。每秒中以 0.1 秒记录每孔的荧光并在 SDF-1 注射之前记录 20 秒的时间(基础信号)。然后注射 20 μ l SDF-1,并随后记录 2 分钟时长的数据。每个实验情况进行一式两份。首先通过减去基础荧光及没有细胞的对照孔所发出的荧光校正每孔的值。相对数据表达为 SDF-1 (100nM) 所得的最大刺激的百分数。

[0355] SDF-1 (100nM) 在重组 CHO/CXCR4 中诱导了细胞内钙的快速而强烈的释放,而在初始 CHO-K1 细胞中未检测到荧光信号。在以 SDF-1 刺激时最大强度达到超过基础荧光 140% 以上并在大约 40 秒时观察到(图 6A、6B 和 6C)。Mab515H7 (133nM) (图 6A)和 c515H7 (133nM) (图 6C)产生了对于 SDF-1 (100nM)诱导的钙信号的强烈抑制。Mab301aE5 (133nM) (图 6B) 产生了对于 SDF-1 (100nM) 诱导的钙信号的部分抑制。

[0356] 实施例 7 :以抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1 原代分离株 KON、MN 与 92UG024 (X4 病毒) 在人 PBMC 中的复制

[0357] 单周期中和分析

[0358] 此分析使用相应浓缩和稀释的原代分离株 KON、MN 和 92UG024 在 36 小时内进行,以保证在感染 2 天之后能检测到 2% 感染的 CD4T 淋巴细胞。

[0359] 二十五微升不同稀释的 Mab515H7、c515H7 和 301aE5 在 37° C 下与 25 μ l 病毒孵育 1 小时。人 PBMC (25 μ l) 以 20×10^6 细胞 /ml 加入到 96 孔板(U 底, Costar3599) 中的 Mab/ 病毒混合物并在 RPMI164010%FCS 和 20U/ml IL-2 (R&D 系统, Minneapolis, MN) 中培养 36 小时。

[0360] 在培养 2 天后,以病毒 p24 抗原的细胞内染色来检测 HIV 感染的淋巴细胞。根据厂商建议使用 Cytofix/Cytoperm 和 Perm/Wash 试剂盒(BD Biosciences) 固定细胞并使其渗透,并以加入在 Perm/Wash 溶液中 1/160 稀释使用的荧光抗 p24Mab (FITC- 或 PE- 抗 p24, 克隆 KC57 ;Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) 在 4° C 染色 15 分钟。在含有 3%FBS 的 PBS 中洗涤后,于流式细胞术(LSRII ;BD Biosciences) 以 DIVA 软件(BD Biosciences) 分析之前,在 300 μ l PBS 中稀释 PBMC。通过以前向和侧向散射参数鉴定的活细胞群中设门 20,000 个事件来确定不同样本中 p24 阳性细胞的百分数。用活 / 死溶液试剂盒(Invitrogen)分析活细胞亚群。在减去模拟感染的细胞中的背景事件后得到 p24 抗原阳性值。

[0361] 中和百分数被定义为与无 Mab 的对照感染孔相比 p24 阳性细胞的减少。中和滴度被定义为使得感染细胞的百分数降低 90% 的抗体浓度(一式三份进行的系列稀释之间的插值)。

[0362] 如图 7、8 和 9 所示,抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 能抑制 HIV-1X4MN、KON 和 92UG024 原代分离株在 PBMC 中的复制。在表 9 中总结(以 μ g/ml 表示的) IC 的结果。

[0363] 表 9

[0364]

	KON			MN			92UG024		
	感染细胞的抑制%			感染细胞的抑制%			感染细胞的抑制%		
	90	80	50	90	80	50	90	80	50
301aE5	>150	>150	150	>150	150	1	>150	150	50
515H7	15	8	1	10	1.5	<1.5	10	3	0.5
C515H7	20	10	1.5	15	1	<1.5	15	3	<1.5

[0365] 实施例 8 :以抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 抑制 HIV-1 原代分离株 89.6(双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中的复制

[0366] 单周期中和分析

[0367] 此分析使用相应浓缩和稀释的原代分离株 89.6 在 36 小时内进行,以保证在感染 2 天之后能检测到 2% 感染的 CD4T 淋巴细胞。

[0368] 二十五微升不同稀释的 Mab515H7、c515H7 和 301aE5 在 37° C 下与 25 μ l 病毒孵育 1 小时。人 PBMC (25 μ l) 以 20×10^6 细胞 /ml 加入到 96 孔板(U 底, Costar3599) 中的 Mab/ 病毒混合物并在 RPMI164010%FCS 和 20U/ml IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中培养 36 小时。

[0369] 在培养 2 天后,以病毒 p24 抗原的细胞内染色来检测 HIV 感染的淋巴细胞。根据厂商建议使用 Cytofix/Cytoperm 和 Perm/Wash 试剂盒(BD Biosciences) 固定细胞并使

其渗透,并以加入在 Perm/Wash 溶液中 1/160 稀释使用的荧光抗 p24Mab (FITC- 或 PE- 抗 p24, 克隆 KC57 ;Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) 在 4° C 染色 15 分钟。在含有 3%FBS 的 PBS 中洗涤后,于流式细胞术(LSR II ;BD Biosciences)以 DIVA 软件(BD Biosciences)分析之前,在 300 μ l PBS 中稀释 PBMC。通过以前向和侧向散射参数鉴定的活细胞群中设门 20,000 个事件来确定不同样本中的 p24 阳性细胞的百分数。用活 / 死溶液试剂盒(Invitrogen)分析活细胞亚群。在减去模拟感染的细胞中的背景事件后得到 p24 抗原阳性值。

[0370] 中和百分数被定义为与无 Mab 的对照感染孔相比, p24 阳性细胞的减少。中和滴度被定义为使得感染细胞的百分数降低 90% 的抗体浓度(一式三份进行的系列稀释之间的插值)。

[0371] 如图 10 和 11 所示,抗 CXCR4Mab515H7、c515H7 和 301aE5 能抑制 HIV-189.6 原代分离株在 PBMC 中的复制。在表 10 中总结(以 μ g/ml 表示的) IC 的结果。

[0372] 表 10

[0373]

	89.6		
	感染细胞的抑制%		
	90	80	50
301aE5	>150	150	20
515H7	15	1.5	<1.5
C515H7	10	1.5	<1.5

[0374] 实施例 9 :以抗 CXCR4Mab c515H7 与抗 CCR5 分子马拉维诺组合抑制 HIV-1 原代分离株 89.6 和 UG93067 (双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中的复制

[0375] 中和分析,分析 HIV 原代分离株在原代 PBMC 上的多轮复制

[0376] 此分析(将系列稀释的 c515H7Mab 或马拉维诺或两者的组合与系列稀释的病毒组合)分析了 PBMC(外周血单核细胞)上的多轮感染。简单讲,在预水化 96 孔过滤板(1.25 μ m 孔径, Durapor DV ;Millipore, Molsheim, 法国)中,4 份 25 μ l 等份的系列稀释(两倍)的 c515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的每一个与 25 μ l 系列稀释的病毒孵育。在含稀释的 c515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的滴定的同样板上进行病毒的对照滴定(25 μ l RPMI 代替稀释的 c515H7Mab 或马拉维诺)。在 37° C 下 1 小时之后,加入 4×10^6 细胞 /ml 浓度的 25 μ l PHA 刺激的 PBMC (来自五名健康供体的 PHA 活化 PBMC 的集合)以实现 75 μ l 终培养体积的 RPMI、10% 胎牛血清(FCS)和每毫升 20IU 的白介素 2 (IL-2) (R&D 系统)。在 37° C 下 24 小时之后,加入 100 μ l 同样的培养基质。在第 4 天以过滤进行两次洗涤(每次 200 μ l RPMI)以去除 c515H7Mab 和马拉维诺,并加入 200 μ l 新鲜培养基质。在第 7 天,以 ELISA 测定培养上清中 p24 的存在并与阴性对照(以稀释病毒感染并维持在 10^{-6} M 齐多夫定 [AZT] 中的培养物)的相比以确定阳性孔。使用一式四份孔来确定每个稀释的 c515H7Mab 或马拉维诺或两者组合不存在(V_0)和存在(V_n)时的病毒滴度(50% 组织培养感染剂量 [TCID₅₀])。中和滴度被定义为导致病毒滴度降低 90% ($V_n/V_0=0.1$) 的 c515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的稀释。

[0377] 如图 12 所示, c515H7Mab 以 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 IC_{90} 抑制双向性 X4R5 病毒 89.6 复制(图 12)。50 $\mu\text{g/ml}$ 马拉维诺未达到 IC_{90} 抑制活性(图 12)。而且, 向抗体 515H7 中加入 $2 \mu\text{g/ml}$ 马拉维诺增强了 c515H7Mab 的抑制活性, 其 IC_{90} 为 $0.2 \mu\text{g/ml}$ (图 12)。

[0378] 使用不同稀释的两个分子和另一双向性病毒 UG93067 评估了 c515H7Mab 和马拉维诺组合的有益效果。如图 13 所示, Mab c515H7 和马拉维诺的抑制活性类似。这些结果表明病毒 UG93067 使用 CCR5 或 CXCR4 受体的能力是可比较的。使用 UG93067 病毒能证实更好的活性, 只有这些 X4 抑制剂(c515H7Mab)和 R5 抑制剂(马拉维诺)的组合(各 $10 \mu\text{g/ml}$)使得病毒滴度降低 90% (图 13)。

[0379] 实施例 10 :抗 CXCR4 嵌合 Mab c515H7 的生产

[0380] 设计嵌合形式的小鼠 515H7Mab :它对应于目标小鼠抗体的轻链和重链可变结构域, 遗传上融合于人 C κ 和 IgG1/IgG2/IgG4 恒定区。通过使用 HEK293/EBNA 系统和 pCEP4 表达载体(InVitrogen, US)瞬时转染来生产重组 Mab。

[0381] 在上述说明书中描述了各自的氨基酸和核苷酸序列。而且, 如上表 3 公开 IgG2 和 4 同种型序列(IgG4 是优选同种型), 在此还提及了 IgG1 同种型重链序列即 c515H7VH(G1wt) (其对应于氨基酸序列 SEQ ID No. 80 和核苷酸序列 SEQ ID No. 81)。

[0382] 以全局基因合成(Genecust, 卢森堡)合成对应于 515H7Mab 轻链和重链可变结构域的整个核苷酸序列。将其亚克隆到携带人 IgG1/IgG2/IgG4 免疫球蛋白轻链 [C κ] 或重链 [CH1- 铰链 -CH2-CH3] 恒定区的整个编码序列的 pCEP4 载体(InVitrogen, 美国)中。根据实验手册(Sambrook 和 Russel, 2001)所述的传统分子生物学技术或根据供应商指示来进行所有克隆步骤。每个遗传构建体经 Big Dye 末端循环测序试剂盒(Applied Biosystems, 美国)以核苷酸测序充分验证, 并使用 3100 遗传分析仪(Applied Biosystems, 美国)分析。

[0383] 在定轨摇床(110rpm 转速)上、在添加 6mM 谷氨酰胺的 50ml 无血清培养基质 Excell293 (SAFC Biosciences)中于 250ml 摇瓶中常规生长适应悬浮的 HEK293EBNA 细胞(InVitrogen, 美国)。使用在水中制备的终浓度 1mg/ml 的线性 25kDa 聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences)与质粒 DNA (终浓度为 $1.25 \mu\text{g/ml}$, 重链与轻链质粒比例为 1:1)混合, 以 2×10^6 细胞 /ml 进行瞬时转染。在转染后 4 小时, 以一体积新鲜培养基质稀释培养物以实现终细胞密度为 10^6 细胞 /ml。基于细胞存活力和 Mab 生产监测培养过程。一般来讲, 维持培养 4 到 5 天。在蛋白质 A 树脂(GE Healthcare, 美国)上使用传统层析法纯化 Mab。以适合于功能评估的水平生产 Mab。生产水平通常为纯化 Mab 在 6 至 15mg/l 之间。

[0384] 实施例 11 :以 FACS 分析鉴定抗 CXCR4 嵌合 Mab c515H7 的结合特异性

[0385] 在此实验中, 以 FACS 分析检查抗 CXCR4 嵌合 Mab c515H7 对人 CXCR4 的特异结合。

[0386] NIH3T3-hCXCR4 转染细胞与剂量范围自 $0 \mu\text{g/ml}$ 至 $10 \mu\text{g/ml}$ 的单克隆抗体 c515H7 孵育。然后以 1%BSA/PBS/0.01%Na₃ 洗涤细胞。接下来, 向细胞中加入 Alexa- 标记的二抗并使其在 4°C 孵育 20 分钟。然后再洗涤细胞两次。在第二次洗涤后, 进行 FACS 分析。图 15 提供了此结合研究结果, 显示抗 CXCR4 嵌合 Mab c515H7 特异性结合于人 CXCR4-NIH3T3 转染细胞系。在 NIH3T3 野生型细胞中未检测到结合(数据未显示)。

[0387] 实施例 12 :通过生物荧光共振能量转移(BRET)法检测 c515H7Mab 对于 CXCR4 同源二聚体的效果

[0388] 此功能分析允许在 CXCR4 同源二聚体水平上评估 SDF-1 和 / 或 c515H7Mab 结合于

CXCR4 受体诱导的构象变化。

[0389] 通过使用传统分子生物学技术,将用于调研相互作用配偶体的表达载体构建为带有相应染料(海肾荧光素酶, Rluc 和黄色荧光蛋白, YFP) 的融合蛋白质。在进行 BRET 实验前两天,以编码相应 BRET 配偶体:[CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP] 的表达载体瞬时转染 HEK293 细胞以研究 CXCR4 同源二聚体化。一天后,在多聚赖氨酸预包被的白色 96MW 板上分散细胞于完全培养基 [添加有 10%FBS 的 DMEM]。首先在 37° C 下、以 5%CO₂ 培养细胞以使得细胞附着至板上。然后以 200 μl DMEM/孔使细胞饥饿过夜。就在 BRET 实验前,去除 DMEM 并以 PBS 快速洗涤细胞。然后在 37° C 下、在有或没有抗体的 PBS 中孵育细胞 10 分钟,然后加入终体积 50 μl 的 5 μM 腔肠素 H(含或不含 100nM SDF-1)。在 37° C 下再孵育 10 分钟之后,使用 Mithras LB940 多标记阅读仪(Berthold)起始 485nm 和 530nm 的光发射获取(1 秒/波长/孔,在室温下重复 15 次)。

[0390] 如前所述进行 BRET 比的计算(Angers 等人,2000):
$$\frac{[(\text{发射}_{530\text{nm}}) - (\text{发射}_{485\text{nm}}) \times \text{Cf}]}{(\text{发射}_{485\text{nm}})}$$
,此处对于同样实验条件下的只表达 Rluc 融合蛋白质的细胞, $\text{Cf} = \frac{(\text{发射}_{530\text{nm}})}{(\text{发射}_{485\text{nm}})}$ 。简化此方程,显示 BRET 比相当于两个 BRET 配偶体存在时得到的 530/485nm 比(以同样实验条件下分析中只有融合于 Rluc 的配偶体存在时得到的 530/485nm 比进行校正)。为便于可读性,结果表示成 milliBRET 单位(mBU);mBU 对应于 BRET 比乘以 1000。

[0391] 供体与融合于 CXCR4 受体的受体蛋白质的空间接近性导致 SDF1 (100nM) 提高了约 10% 的 BRET 信号,可能表明 CXCR4/CXCR4 同源二聚体形成或预先存在的二聚体的构象变化(图 16)。Mab c515H7 能够调节 SDF-1 诱导的 CXCR4 同源二聚体的构象变化(抑制 SDF-1 诱导 BRET 增高的 96%,图 16)。Mab c515H7 也能自身调节 CXCR4/CXCR4 空间接近性,表明此 Mab 对于 CXCR4/CXCR4 同源二聚体构象的影响(图 16)。

[0392] 实施例 13:使用表达 CD4 和 CXCR4 或 CCR5 的 GFP 转导人骨肉瘤细胞(GHOST) 体外评估 Mab515H7 抗 HIV-1 活性。

[0393] 为了确定 CXCR4515H7Mab 的特异性,我们使用表达 CD4 和 CXCR4 或 CCR5 的 GHOST 细胞评估此 Mab 的抗 HIV-1 活性。

[0394] 在 48 小时内,使用 X4HIV-1LAI 病毒(与表达 CXCR4 的 Ghost 细胞)或 R5HIV-1BaL 病毒(与表达 CCR5 的 Ghost 细胞)进行此分析。于添加有 10%FCS 的 Dulbecco 培养基中,铺被 500 μl Ghost 细胞(2.5×10^5 细胞/ml)24 小时。在 37° C 下孵育不同稀释的 Mab515H7 1 小时,并且随后向细胞中加入稀释的 HIV-1LAI 病毒(1/10) 和 HIV-1BaL 病毒(1/7) 48 小时。细胞经胰蛋白酶消化并以 1×PBS 洗涤。在黑暗中、+4° C 下向细胞沉淀物加入 300 μl 1.5% 多聚甲醛 2 小时,以固定细胞并灭活病毒。以流式细胞术分析 GFP 阳性细胞并计算 HIV-1 感染的抑制。

[0395] 感染细胞的抑制百分数被定义为与无 Mab 的对照感染孔相比较。表 11 中总结了 IC 结果(以 μg/ml 为单位),抗 CXCR4Mab515H7 能够抑制 HIV-1X4Lai 病毒在表达 CXCR4 的 Ghost 细胞中的感染,然而在抑制 HIV-1R5BaL 病毒在 CCR5 表达的 Ghost 细胞中的感染中完全没有活性。

[0396] 表 11

[0397]

GHOST CXCR4/LAI 病毒				GHOST CCR5/BaL 病毒		
感染细胞的抑制%				感染细胞的抑制%		
90	80	50		90	80	50
515H7	0.5	0.1	0.08	>75	>75	>75

[0398] 实施例 14 :515H7 抗 CXCR4 小鼠抗体的人源化和所述 h515H7 片段的生成

[0399] 一般程序

[0400] 通过应用 CDR 嫁接的整体规则进行 515H7 抗 CXCR4 抗体的人源化。通过应用 IMGT 唯一编号方案及 IMGT 文库和工具 (Lefranc, 1997 - www.imgt.org) 进行 CDR 和框架 (FR) 区域的免疫遗传分析和定义。

[0401] 在稳定转染人 CXCR4 的 NIH3T3 细胞系上确定 515H7 人源化变体的结合。以和生物素化小鼠抗体竞争的分析来评估结合活性。在第二次尝试中, 评估人源化抗体抑制生物素化 SDF-1 与 RAMOS 细胞结合的能力。选择 RAMOS 细胞, 因为其高表达 CXCR4 和低表达 CXCR7 和 SDF-1。

[0402] 用这些分析来鉴定抗 CXCR4 抗体的重组人源化版本。可变结构域与人 IgG1/k 恒定结构域格式化并被克隆至哺乳动物表达载体 pCEP。在 HEK293 细胞中瞬时表达重组 IgG1/k - 衍生的抗体。过滤表达培养上清并使用蛋白质 A 琼脂糖纯化抗体。在 PBS 中重新缓冲纯化的抗体并以 ELISA 确定抗体浓度。

[0403] 通过使用特异于人源化抗体可变结构域的寡核苷酸的 PCR 生成重组抗体片段并亚克隆这些片段于大肠杆菌系统。以固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 进行抗体片段的纯化。

[0404] -515H7 可变结构域的人源化

[0405] 图 17 和 18 中阐述了重链和轻链可变结构域的不同序列比对。

[0406] 在第一系列的实验中, 分析了三个首先人源化变体的抗 CXCR4 结合活性。VH 变体 1 (VH1) 和小鼠 VL 组合, 并且评估了这些构建体抑制生物素化小鼠 515H7 亲本抗体结合的能力。VH1 可变结构域的氨基酸序列包括 SEQ ID No. 90 而核苷酸序列包括 SEQ ID No. 91。全长 VH1 氨基酸序列包括 SEQ ID No. 92 而核苷酸序列包括 SEQ ID No. 93。此构建体显示与嵌合抗体类似的与小鼠抗体竞争的能力 (图 19A)。这表明多数人类 VH 变体具有与嵌合抗体相同的结合能力。因此, VH1 与 VL 变体 2 相结合 (图 19B)。

[0407] 在进一步实验中, 确定抗体 515H7 的人源化变体是否抑制 SDF-1 与 CXCR4 表达细胞的结合 (图 20)。通过在流式细胞仪中检测生物素化 SDF-1 评估 h515H7 人源化变体的抑制能力。人源化抗体 h515H7VH1D76N VL2 具有和嵌合 c515H7 类似的抑制 SDF-1 结合的能力。

[0408] 还检验了人源化变体 h515H7VH1VL2 的抗体片段, 并且确定所述抗体片段能够完全抑制 SDF-1 的结合 (图 20)。

[0409] 实施例 15 : 以 FACS 分析鉴定抗 CXCR4 人源化 Mab515H7 结合特异性

[0410] 在此实验中, 以 FACS 分析检查抗 CXCR4 人源化 Mab515H7 对于人 CXCR4 的特异性结合。

[0411] 在黑暗中,在 4° C、100 μ l Facs 缓冲液中将 NIH3T3、hCXCR4 转染的 NIH3T3 与 0 到 10 μ g/mL 人源化 Mab515H7(hz515H7VH1D76N VL2, hz515H7VH1D76N VL2. 1, hz515H7VH1D76N VL2. 2, hz515H7VH1D76N VL2. 3) 孵育 20 分钟。在 Facs 缓冲液洗涤三次后,在黑暗中,在 4° C 将细胞与二抗(羊抗人 Alexa488, 1/500 稀释)孵育 20 分钟。在 Facs 缓冲液中洗涤三次后,在每孔加入碘化丙啶并以 Facs 仅分析活细胞。评价至少 5000 个活细胞以评估每个条件下的荧光强度平均值。

[0412] 图 21 中显示 [以 FACS 获得的平均荧光强度(MFI)], 提供了这些结合研究的结果, 抗 CXCR4 人源化 Mab hz515H7 特异性结合于人 CXCR4-NIH3T3 转染细胞系(NIH3T3 亲本细胞的 MFI=2. 2)。

[0413] 实施例 16 :以生物荧光共振能量转移(BRET)法检测 hz515H7Mab 对于 CXCR4 同源二聚体的效果

[0414] 此功能分析允许在 CXCR4 同源二聚体水平上评估 SDF-1 和 / 或 hz515H7VH1D76N VL2、hz515H7VH1D76N VL2. 1、hz515H7VH1D76N VL2. 2、hz515H7VH1D76N VL2. 3 结合于 CXCR4 受体诱导的构象变化。

[0415] 通过使用传统分子生物学技术,将用于调研相互作用配偶体的表达载体构建为带有相应染料(海肾荧光素酶, Rluc 和黄色荧光蛋白, YFP) 的融合蛋白质。在进行 BRET 实验前两天,以编码相应 BRET 配偶体:[CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP] 的表达载体瞬时转染 HEK293 细胞以研究 CXCR4 同源二聚体化。一天后,在多聚赖氨酸预包被的白色 96MW 板上分散细胞于完全培养基质[添加有 10%FBS 的 DMEM]。首先在 37° C 下、以 5%CO₂ 培养细胞以使得细胞附着至板上。然后以 200 μ l DMEM/ 孔使细胞饥饿过夜。就在 BRET 实验前,去除 DMEM 并以 PBS 快速洗涤细胞。然后在 37° C 下、在有或没有抗体的 PBS 中孵育细胞 10 分钟,然后加入终体积 50 μ l 的 5 μ M 腔肠素 H(含或不含 100nM SDF-1)。在 37° C 下再孵育 10 分钟之后,使用 Mithras LB940 多标记阅读仪(Berthold)起始 485nm 和 530nm 的光发射获取(1 秒 / 波长 / 孔,在室温下重复 15 次)。

[0416] 如前所述进行 BRET 比的计算(Angers 等人,2000):
$$\frac{[(\text{发射}_{530\text{nm}}) - (\text{发射}_{485\text{nm}}) \times \text{Cf}]}{(\text{发射}_{485\text{nm}})}$$
,此处对于同样实验条件下的只表达 Rluc 融合蛋白质的细胞, $\text{Cf} = (\text{发射}_{530\text{nm}}) / (\text{发射}_{485\text{nm}})$ 。简化此方程,显示 BRET 比相当于两个 BRET 配偶体存在时得到的 530/485nm 比(以同样实验条件下分析中只有融合于 Rluc 的配偶体存在时得到的 530/485nm 比进行校正)。为便于可读性,结果表示成 milliBRET 单位(mBU);mBU 对应于 BRET 比例乘以 1000。

[0417] 供体与融合于 CXCR4 受体的受体蛋白质的空间接近性导致 SDF1 (100nM) 提高了约 12% 的 BRET 信号,可能表明 CXCR4/CXCR4 同源二聚体形成或预先存在的二聚体的构象变化(图 22)。

[0418] 515H7 人源化 Mab 能够调节 SDF-1 诱导的 CXCR4 同源二聚体的构象变化,对于 hz515H7VH1D76N-VL2Mab 来讲 SDF-1 诱导的 BRET 增加的抑制百分数约为 88%, hz515H7VH1D76N-VL2. 1Mab 为 65%, hz515H7VH1D76N-VL2. 2Mab 为 33% 而 hz515H7VH1D76N-VL2. 3Mab 为 21% (图 22)。

[0419] 实施例 17 :由抗 CXCR4Mab hz515H7 对 HIV-1_{IIIB} (X4 病毒) 在 MT-4 细胞中复制的抑制

[0420] 在这个分析中, hz515H7Mab 对抗 HIV-1_{IIIB} 的活性是基于 MT-4 细胞中病毒诱导的

致细胞病变的抑制。用组织培养感染计量 50(TCID₅₀)5 倍的 HIV-1_{IIIB} 分离株感染细胞,该病毒剂量在 5 天内降低 90% 活细胞数。在 37° C 吸附 30 分钟后,将感染的细胞在补充有 20% 热失活的胎牛血清(FCS)、100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM 谷氨酰胺的 RPMI1640 基质中调整至 210⁵ 细胞 /ml,接种在 96 孔平底组织培养板中(COSTAR3596)(100 μ l/ 孔),该平板具有 100 μ l 不同浓度的 hz515H7Mab。在第 5 天,用比色反应 MTT 测量细胞活性。通过如下公式计算用 hz515H7Mab 处理的感染细胞保护的百分比:

[0421]

$$\% \text{保护} =$$

[0422]

$$[\text{用 hz515H7 Mab 处理的感染细胞的 OD}_{540}] - [\text{对照 - 感染细胞的 OD}_{540}]$$

$$[\text{对照 - 未感染细胞的 OD}_{540}] - [\text{对照 - 感染细胞的 OD}_{540}]$$

[0423] 如图 23 所示, hz515H7Mab 表现出显著的抗 HIV-1 活性, 因为其能够在 MT-4 细胞中抑制 HIV-1_{IIIB} - 诱导的致细胞病变。

[0424] 实施例 18 : 抗 CXCR4Mab hz515H7 对 HIV-1 原代分离株 KON (X4 病毒) 在人 PBMC 中复制的抑制

[0425] 单周期中和分析

[0426] 此分析使用相应浓缩和稀释的原代分离株 KON 在 36 小时内进行, 以保证在感染 2 天之后能检测到 2% 感染的 CD4T 淋巴细胞。

[0427] 将 25 微升不同稀释的 Mab hz515H7 在 37° C 下与 25 μ l 病毒孵育 1 小时。向 96 孔板(U 底, Costar3599)中的 Mab/ 病毒混合物中加入 20x10⁶ 个细胞 /ml 的人 PBMC(25 μ l), 并在 RPMI164010%FCS 和 20U/ml IL-2(R&D Systems, Minneapolis, MN) 中培养 36 小时。

[0428] 培养 2 天后, 通过病毒 p24Ag 的细胞内染色检测 HIV 感染的淋巴细胞。根据厂商建议使用 Cytofix/Cytoperm 和 Perm/Wash 试剂盒(BD Biosciences)固定细胞并使其渗透, 并以加入在 Perm/Wash 溶液中 1/160 稀释使用的荧光抗 p24Mab (FITC- 或 PE- 抗 p24, 克隆 KC57 ;Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL)在 4° C 染色 15 分钟。在含有 3%FBS 的 PBS 中洗涤后, 于流式细胞术(LSR II ;BD Biosciences)以 DIVA 软件(BD Biosciences)分析之前, 在 300 μ l PBS 中稀释 PBMC。通过以前向和侧向散射参数鉴定的活细胞群中设门 20,000 个事件来确定不同样本中的 p24 阳性细胞的百分数。用活 / 死溶液试剂盒(Invitrogen)分析活细胞亚群。在减去模拟感染的细胞中的背景事件后得到 p24 抗原阳性值。

[0429] 中和的百分比定义为与不具有 Mab 的对照感染孔相比, p24 阳性细胞的降低。中和滴度定义为允许感染细胞的百分比降低的抗体浓度(一式三份进行的系列稀释之间的插值)。

[0430] 如图 24 所示, 抗 CXCR4Mab hz515H7 能够抑制 HIV-1X4KON 原代分离株在 PBMC 中的复制。

[0431] 实施例 19 : 抗 CXCR4Mab hz515H7 和抗 CCR5 分子马拉维诺的组合对 HIV-1 原代分离株 89.6 和 UG93067 (双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中复制的抑制

[0432] 中和分析, 分析 HIV 原代分离株在原代 PBMC 上的多轮复制

[0433] 此分析(将系列稀释的 hz515H7Mab 或马拉维诺或两者的组合与系列稀释的病毒组合)分析了 PBMC(外周血单核细胞)上的多轮感染。简单讲,在预水化 96 孔过滤板(1.25 μ m 孔径, Durapor DV; Millipore, Molsheim, 法国)中,4 份 25 μ l 等份的系列稀释(两倍)的 hz515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的每一个与 25 μ l 系列稀释的病毒孵育。在含稀释的 hz515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的滴定的同样板上进行病毒的对照滴定(25 μ l RPMI 代替稀释的 hz515H7Mab 或马拉维诺)。在 37° C 下 1 小时之后,加入 4×10^6 细胞/ml 浓度的 25 μ l PHA 刺激的 PBMC(来自五名健康供体的 PHA 活化 PBMC 的集合)以实现 75 μ l 终培养体积的 RPMI、10% 胎牛血清(FCS)和每毫升 20IU 的白介素 2(IL-2)(R&D System)。在 37° C 下 24 小时之后,加入 100 μ l 同样的培养基质。在第 4 天以过滤进行两次洗涤(每次 200 μ l RPMI)以去除 hz515H7Mab 和马拉维诺,并加入 200 μ l 新鲜培养基质。在第 7 天,以 ELISA 测定培养上清中 p24 的存在并与阴性对照(以稀释病毒感染并维持在 10^{-6} M 齐多夫定 [AZT] 中的培养物)的相比以确定阳性孔。使用一式四份孔来确定每个稀释的 515H7Mab 或马拉维诺或两者组合不存在(V_0)和存在(V_n)时的病毒滴度(50% 组织培养感染剂量 [TCID₅₀])。中和滴度被定义为导致病毒滴度降低 90% ($V_n/V_0=0.1$) 的 515H7Mab 或马拉维诺或两者组合的稀释。

[0434] 使用双向性病毒 89.6 和 UG93067,使用两个分子的不同稀释度的组合评估了 hz515H7Mab 和马拉维诺之间的可能的协同作用。如图 25 和 26 所示, Mab hz515H7 和马拉维诺的抑制活性是相似的。这些 X4(hz515H7Mab) 和 R5(马拉维诺)抑制剂的组合允许了 PBMC 中 89.6 和 UG93067 双向性 X4/R5 病毒滴度降低了 90% (分别为图 25 和 26)。

[0435] 实施例 20:抗 CXCR4Mab hz515H7IgG4 对 HIV-1 原代分离株 KON (X4 病毒) 在人 PRMC 中的复制的抑制

[0436] 单周期中和分析

[0437] 此分析使用相应浓缩的和稀释的原代分离株 KON 在 36 小时进行,以允许在感染 2 天后检测 2% 的感染的 CD4T 淋巴细胞。

[0438] 将 25 微升不同稀释的 Mab hz515H7IgG4 在 37° C 下与 25 μ l 病毒孵育 1 小时。向 96 孔板(U 底, Costar3599) 中的 Mab/ 病毒混合物中加入 20×10^6 个细胞/ml 的人 PBMC (25 μ l),并在 RPMI164010%FCS 和 20U/ml IL-2(R&D Systems, Minneapolis, MN) 中培养 36 小时。

[0439] 培养 2 天后,通过病毒 p24Ag 的细胞内染色检测 HIV 感染的淋巴细胞。根据厂商建议使用 Cytofix/Cytoperm 和 Perm/Wash 试剂盒(BD Biosciences)固定细胞并使其渗透,并以加入在 Perm/Wash 溶液中 1/160 稀释使用的荧光抗 p24Mab (FITC- 或 PE- 抗 p24, 克隆 KC57; Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL)在 4° C 染色 15 分钟。在含有 3%FBS 的 PBS 中洗涤后,于流式细胞术(LSR II; BD Biosciences)以 DIVA 软件(BD Biosciences)分析之前,在 300 μ l PBS 中稀释 PBMC。通过以前向和侧向散射参数鉴定的活细胞群中设门 20,000 个事件来确定不同样本中的 p24 阳性细胞的百分数。用活/死溶液试剂盒(Invitrogen)分析活细胞亚群。在减去模拟感染的细胞中的背景事件后得到 p24 抗原阳性值。

[0440] 中和的百分比定义为与不具有 Mab 的对照感染孔相比, p24 阳性细胞的降低。中和滴度定义为允许感染细胞的百分比降低的抗体浓度(一式三份进行的系列稀释之间的插

值)。

[0441] 如图 27 所示,抗 CXCR4Mab hz515H7IgG4 能够抑制 HIV-1X4KON 原代分离株在 PBMC 中的复制。

[0442] 实施例 21 :抗 CXCR4Mab hz515H7IgG4 和抗 CCR5 分子马拉维诺的组合对 HIV-1 原代分离株 89.6 (双向性 X4/R5 病毒) 在人 PBMC 中复制的抑制

[0443] 中和分析,分析 HIV 原代分离株在原代 PBMC 上的多轮复制

[0444] 此分析(将系列稀释的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺或两者的组合与系列稀释的病毒组合)分析了 PBMC (外周血单核细胞) 上的多轮感染。简单讲,在预水化 96 孔过滤板 (1.25 μ m 孔径, Durapor Dv ;Millipore, Molsheim, 法国) 中,4 份 25 μ l 等份的系列稀释 (两倍) 的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺或两者组合的每一个与 25 μ l 系列稀释的病毒孵育。在含稀释的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺或两者组合的滴定的同样板上进行病毒的对照滴定 (25 μ l RPMI 代替稀释的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺)。在 37° C 下 1 小时之后,加入 4×10^6 细胞 /ml 浓度的 25 μ l PHA 刺激的 PBMC (来自五名健康供体的 PHA 活化 PBMC 的集合) 以实现 75 μ l 终培养体积的 RPMI、10% 胎牛血清 (FCS) 和每毫升 20IU 的白介素 2 (IL-2) (R&D System)。在 37° C 下 24 小时之后,加入 100 μ l 同样的培养基质。在第 4 天以过滤进行两次洗涤 (每次 200 μ l RPMI) 以去除 hz515H7IgG4Mab 和马拉维诺,并加入 200 μ l 新鲜培养基质。在第 7 天,以 ELISA 测定培养上清中 p24 的存在并与阴性对照 (以稀释病毒感染并维持在 10^{-6} M 齐多夫定 [AZT] 中的培养物) 的相比以确定阳性孔。使用一式四份孔来确定每个稀释的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺或两者组合不存在 (V_0) 和存在 (V_n) 时的病毒滴度 (50% 组织培养感染剂量 [TCID₅₀])。中和滴度被定义为导致病毒滴度降低 90% ($V_n/V_0=0.1$) 的 hz515H7IgG4Mab 或马拉维诺或两者组合的稀释。

[0445] 使用双向性病毒 89.6,使用两个分子的不同稀释度的组合评估了 hz515H7IgG4Mab 和马拉维诺之间的可能的协同作用。如图 28 所示,这些 X4 (hz515H7IgG4Mab) 和 R5 (马拉维诺) 抑制剂的组合允许了 PBMC 中 89.6 双向性 X4/R5 病毒滴度降低了 90% (图 28)。

[0001]

Sequencelisting20130424100755.txt

序列表

<110> 皮埃尔法布雷医药公司

<120> 用于治疗HIV的抗体

<130> 362689D27470

<140> PCT EP2011/068905

<141> 2011-10-27

<150> US 12/913,300

<151> 2010-10-27

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Trp Ala Ser
1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 6

<211> 11

[0002]

Sequencelisting20130424100755.txt

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

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

[0003]

Sequencelisting20130424100755.txt

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Asp Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> 小鼠

[0004]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

<400> 14
cagagtctgt tcaacagtcg aaccgaaag aactac 36

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 15
tgggcatecc 9

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 16
atgcaatctt ttaattctcg gacg 24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 17
gggttcaect tcaatgataa ctac 24

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 18
attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 30

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 19
gcaagagatg tcggttccaa ctactttgac tac 33

<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 20
gacattgtga tgcacagtc tccatctctc ctggtctgtg cagcaggaga gaaggteact 60
atgagctgca aatccagtcg gactctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttgget 120
tggtaaccagc agaagccagg gcagtctctc aaactctga tctactgggc atccgctagg 180
gattctgggg tccctgctcg ctccacaggc agtggatctg agacataatt cactctcacc 240
atcagccgtg tgcaggtgca agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatttt 300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaaa 336

<210> 21
<211> 360
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 21

```

[0005]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

gagggtgaacc tgggtggagtc tggaggagge ttggtacagc ctgggggttc tetgagacte      60
tctctgtcaa cttctgggtt caccctcact gataactaca tgagtgggtt ccgceagcct      120
ccaggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attagaaaca aagctaatgg ttacacaaca      180
gactacagtg catctgtgag gggctgggtt accatctcaa gagataattt ccaaagcate      240
ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga      300
gatgtcgggt ccaactactt tgaactactg ggccaaggca ccactctcac agtctctca      360

<210> 22
<211> 51
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 22
aaatcagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttgc t      51

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 23
tgggcacccg ctagggatc t      21

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 24
gataactaca tgagt      15

<210> 25
<211> 57
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 25
tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagactaca gtgcattctg gagsgt      57

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 26
gatgtcgggt ccaactactt tgaactac      27

<210> 27
<211> 352
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 27
Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1          5          10          15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20          25          30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35          40          45

```

[0006]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
 50          55          60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
 65          70          75          80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
          85          90          95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
          100         105         110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
          115         120         125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
          130         135         140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
          145         150         155         160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
          165         170         175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
          180         185         190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
          195         200         205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
          210         215         220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
          225         230         235         240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
          245         250         255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
          260         265         270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
          275         280         285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
          290         295         300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
          305         310         315         320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
          325         330         335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser

```

[0007]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

340                               345                               350
<210> 28
<211> 356
<212> PRT
<213> 人
<400> 28
Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr
1      5      10      15
Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
20     25     30
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile
35     40     45
Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile
50     55     60
Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr
65     70     75     80
Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro
85     90     95
Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu
100    105    110
Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val
115    120    125
Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His
130    135    140
Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val
145    150    155    160
Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe
165    170    175
Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg
180    185    190
Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile
195    200    205
Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys
210    215    220
Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
225    230    235    240
Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp
245    250    255
Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu

```

[0008]

Sequencelisting20130424100755.txt

260	265	270
Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile		
275	280	285
Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile		
290	295	300
Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala		
305	310	315
Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly		
325	330	335
Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser		
340	345	350
Phe His Ser Ser		
355		
<210> 29		
<211> 360		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 29		
Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys		
1	5	10
Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe		
20	25	30
Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys		
35	40	45
Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu		
50	55	60
Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg		
65	70	75
Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu		
85	90	95
Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp		
100	105	110
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val		
115	120	125
Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg		
130	135	140
Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr		
145	150	155
Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu		

[0009]

Sequencelisting20130424100755.txt

165	170	175
Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val		
180	185	190
Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg		
195	200	205
Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu		
210	215	220
Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys		
225	230	235
Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val		
245	250	255
Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu		
260	265	270
Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg		
275	280	285
Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile		
290	295	300
Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys		
305	310	315
Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser		
325	330	335
Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser		
340	345	350
Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu		
355	360	
<210> 30		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<400> 30		
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr		
1	5	
<210> 31		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<400> 31		
Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly		
1	5	
<210> 32		
<211> 7		

[0010]

SequenceListing20130424100755.txt

<212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 32

Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 33

Ala Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 34

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

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 35
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 35

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

[0011]

Sequencelisting20130424100755.txt

50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 36

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 37

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 38

Asp Tyr Gly Val Tyr
1 5

<210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 39

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 40

Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 41

[0012]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

<211> 36
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 41
cagagtctgt tcaacagtag aaccgaaag aactac 36

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 42
aagcaatctt ataattctcg gacg 24

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 43
gggttctcat taaccgacta tggc 24

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 44
atatgggggtg atggaaccac a 21

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 45
gccaggggta gacagttcgg gtttgaetac 30

<210> 46
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 46
gacattgtga tgcacagtc tccatctccc ctggtctgtg cagcaggaga gaagtcact 60
atgaggtgca aatccagtc gagtcgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttgct 120
tggtaaccaac agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga tcttctgggc atccattagg 180
gaatctgggg tccctgatcg ctccacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggetga agacctgcca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 47
<211> 348
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 47
caggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcaccg tctcagggtt ctcatataac gactatgggt tatactgggt tgcacagcct 120
ccaggaaagg gtcctggagt gctgggaatg atatggggtg atggaaccac agactataat 180

```

[0013]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

tcagctctca aatccagact gagcatcagt aaggacaact ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca ctctgcaaac tgaatgacaca gccaggtatt actgtgccag gggtagacag      300
ttcgggtttg actactgggg ccaaggcacc acgctcacag tctctcca      348

<210> 48
<211> 51
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 48
aaatccagtc agagtctgtt caacagtaga acccgaaaga actacttggc t      51

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 49
tgggcatcca ttagggaatc t      21

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 50
aagcaatctt ataatcttcg gacg      24

<210> 51
<211> 15
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 51
gactatggtg tatac      15

<210> 52
<211> 48
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 52
atgatatggg gtgatggaac cacagactat aattcagctc tcaaatcc      48

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 53
ggtagacagt tcgggtttga ctac      24

<210> 54
<211> 359
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

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

```

[0014]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35              40              45
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
    50              55              60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
    65              70              75              80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
              85              90              95
Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
    100              105              110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ser Gly Ser Gly
    115              120              125
Ser Glu Ser Lys Ser Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
    130              135              140
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser
    145              150              155              160
Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
              165              170              175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
    180              185              190
Ala Arg Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu
    195              200              205
Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
    210              215              220
Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly
    225              230              235              240
Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
    245              250              255
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
    260              265              270
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
    275              280              285
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
    290              295              300
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
    305              310              315              320
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
    325              330              335

```

[0015]

Sequencelisting20130424100755.txt

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 340 345 350

Glu His His His His His His
 355

<210> 55
 <211> 1077
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 55
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggcctt caccctcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggee 120
 cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaaagg ctacaccaca 180
 gactacgcgc ccagcgtgaa ggcccggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg cctgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 caattgaaaa gcagcggcag cggtagcgaa agcaagtcga ccgacatcgt gatgaccag 420
 agcccccagca gcctggccgt gtctctgggc gacggggcca ccatgagctg caagagcagc 480
 cagagcctgt tcaacagccg gacccggaag aactacctgg cctggtatca gcagaagccc 540
 ggccagtcce ccaagetget gatctactgg gccagegcca gagatagcgg cgtgcccgct 600
 cgetttaccg gcagcggcag cgagacctac ttcacctga ccatcagccg ggtgcaggee 660
 gaggacctcg cctgtacta ctgcatgcag agcttcaacc tgcggacctt cggccagggc 720
 accaaggigg agatcaagac gcgtacgggtg gccgetccca gctgttcat ctcccccaca 780
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gtctgtgaa caattctac 840
 ccaggggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 900
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gctgagcag caccctgacc 960
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gtgaggtgac ccaccagggc 1020
 ctgtccagcc cctgaccaa gacttcaac aggggegagc accatcata ccacat 1077

<210> 56
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 56

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

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

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

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

[0016]

SequenceListing20130424100755.txt

```

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100        105        110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115        120        125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130        135        140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145        150        155        160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165        170        175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180        185        190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195        200        205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210        215        220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225        230        235        240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245        250        255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260        265        270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275        280        285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290        295        300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305        310        315        320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325        330        335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340        345        350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355        360        365

```

[0017]

Sequencelisting20130424100755.txt

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 57
<211> 446
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

[0018]

Sequencelisting20130424100755.txt

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 58

<211> 445

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 58

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

[0019]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
    20                25                30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
    35                40                45
Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
    50                55                60
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
    65                70                75                80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
    85                90                95
Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
    100               105               110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
    115               120               125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130               135               140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
    145               150               155               160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
    165               170               175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
    180               185               190
Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
    195               200               205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
    210               215               220
Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
    225               230               235               240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    245               250               255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    260               265               270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    275               280               285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
    290               295               300
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

```

[0020]

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 59
<211> 219
<212> PKT
<213> 小鼠

<400> 59

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

63

Sequencelisting20130424100755.txt

130	135	140	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
145	150	155	160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
	165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
	180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
	195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		

<210> 60
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 60
 gaagtgaacc tgggtggagtc tggcggcgga ctgggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggett caccctcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcacc 240
 ctgtaccctc agatgaacgc cctgcgggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggcagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagacca agggcccaag cgtgttccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccttggtctg cctggtgaag gactacttcc ccagccccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgcctgct gcagagcagc 540
 ggctgttaca gccagagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtacggcc caccctgcc cagctgccc gcccccaggt tcttggggcg acccagcgtg 720
 ttctgttccc cccccagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac ccgagggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcactaac 900
 cgggtggtgt cctgtctgac cgtgtctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagga gatgaccaag 1080
 aaccagggtg cctgacctg tctggtgaag gcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgtta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgtccgt gatgcagag gccctgcaca accactaac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccttggtctg a

[0022]

Sequencelisting20130424100755.txt

<210> 61
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 61
 gaagtgaacc tgggtggagtc tggcgggcgga ctggtgcage ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttgggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctcggggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtccccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagegag 420
 agcacagcgg ccttgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccggt gaccgtgtcc 480
 tggnaacagcg gagccctgac cagcggcggtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgttaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccage aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtaacgcc caccctgccc cccctgcccc gcccccgagt tcttgggggg acccagcgtg 720
 ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatac gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgttgtgtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccagggtec agttcaactg gtaegtggac 840
 ggctgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
 cgggtgggtgt cctgtctgac cgtgctgca caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tctaaggctc ccaacaaggg cctgccaaag agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccttgacctg tctggtgaag ggtttctacc caagcgacat cgcctggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gagcgagcgt tcttctgta cagcaggtg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgttitta gctgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactaac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccttgggctg a 1341

<210> 62
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 62
 gaagtgaacc tgggtggagtc tggcgggcgga ctggtgcage ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttgggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctcggggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtccccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagegag 420
 agcacagcgg ccttgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccggt gaccgtgtcc 480

[0023]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

tggaaacagcg gagecctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgcctgct gcagagcagc      540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccaagca gcaacttggg caccagacc      600
tacacctgtg acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg      660
aagtgtctgt tggagtgecc cccctgecca gccccccag tggcggacc cagcgtgttc      720
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgacagca gaaccccca ggtgacctgt      780
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc      840
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag caccttcgg      900
gtggtgtccg tctgacctg ggtgcaccag gactggtga acggcaagga gtacaagtgt      960
aaggtctcca acaaggcct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagca gaccaaggga      1020
cagccaagag agccacaggt ctacacctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac      1080
cagggtgtcc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg      1140
gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccacc cccaatgct ggacagcagc      1200
ggcagcttct tccgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagaiggca gcagggcaac      1260
gtgttcagct gctcgtgat gcacgagggc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg      1320
agcctgtccc caggctga      1338

```

<210> 63
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 63
gacatcgtga tgagccagag ccccagcagc ctggcctgt ctgccggcga gaaagtgacc      60
atgagctgca agagcagcca gagectgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc      120
tggtateagc agaagccgg ccagtccccc aagctgtga tctactgggc cagcgcaga      180
gacagcggcg tgcccgcag attcaccggc agcggcagcg agacatactt caccctgacc      240
atcagccggg tgcagccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagag cttaacctg      300
cggacctttg cggcggaac aaagctggaa atcaagcgt cggcggccgc tcccagcgtg      360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgcagcgt ggtgtgtctg      420
ctgaacaact totaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag      480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg      540
agcagcacc tgacctgag caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag      600
gtgaccacc aggcctgtc cagcccgtg accaagagct tcaacaggg cgagtgtga      660

```

<210> 64
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小鼠

```

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20           25           30

```

[0024]

SequenceListing20130424100755.txt

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 66
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

[0025]

SequenceListing20130424100755.txt

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 67
<211> 446
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 67

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

[0026]

Sequencelisting20130424100755.txt

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 68
<211> 446
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 68

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

[0027]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
  50                55                60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100                105                110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115                120                125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130                135                140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145                150                155                160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165                170                175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180                185                190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195                200                205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210                215                220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225                230                235                240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245                250                255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260                265                270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275                280                285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290                295                300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305                310                315                320

```

[0028]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
      325                      330                      335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340                      345                      350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      355                      360                      365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      370                      375                      380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
      385                      390                      395

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405                      410                      415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420                      425                      430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
      435                      440                      445

<210> 69
<211> 445
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 69

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50                      55                      60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100                     105                     110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115                     120                     125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130                     135                     140

```

[0029]

SequenceListing20130424100755.txt

```

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                      150                      155                      160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165                      170                      175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180                      185                      190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195                      200                      205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
210                      215                      220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225                      230                      235                      240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245                      250                      255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260                      265                      270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275                      280                      285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
290                      295                      300

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                      310                      315                      320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325                      330                      335

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340                      345                      350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355                      360                      365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370                      375                      380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385                      390                      395                      400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405                      410                      415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420                      425                      430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435                      440                      445

```

[0030]

Sequencelisting20130424100755.txt

<210> 70
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 71
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 71

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

[0031]

Sequencelisting20130424100755.txt

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 72
<211> 360
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 72
gagggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc cgggcagaag cctgagaactg 60
agctgcaccg ccagcggttt cactttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcttggaaatg ggtgggcttc atccggaaca aggcacaacg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggcaaacag caagagcatt 240
gctacactgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg cegtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 73
<211> 336
<212> DNA

[0032]

Sequencelisting20130424100755.txt

<213> 小鼠

<400> 73

gacatcgtag	tgaccagag	ccccagcag	ctggcgtgt	ctctgggga	gcggccacc	60
atgagctgca	agagcagca	gagccgttc	aacagccga	cccgaagaa	ctacctggc	120
tggtatcagc	agaagcccg	ccagtcctcc	aagctgtga	tctactggc	cagcgcaga	180
gatagcggcg	tgcccgctg	ctttaccgg	agcggcagc	agacctact	cacctgacc	240
atcagccggg	tcagggcga	ggacctcgc	gtgtactact	gcattgcag	cttcaacctg	300
cggaccttgc	gccagggcac	caaggtggag	atcaag			336

<210> 74

<211> 336

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 74

gacatcgtag	tgaccagtc	ccccagctc	ctggcgtgt	ctctgggga	gcggccacc	60
atgtctgca	agtctccca	gtccctgttc	aactccgga	cccgaagaa	ctacctggc	120
tggtatcagc	agaagcccg	ccagccctcc	aagctgtga	tctactggc	ctctgctaga	180
gactctggcg	tgcccgacag	attctccgg	tcggcagcg	agacatact	cacctgacc	240
atctcccg	tcagggcga	ggatctggc	gtgtactact	gcattgcag	cttcaacctg	300
cggaccttgc	gccagggcac	caaggtggaa	atcaag			336

<210> 75

<211> 1341

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 75

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgccggagga	ctggtgcagc	ccggcagaag	cctgagactg	60
agctgcaccg	ccagcggctt	caccttcacc	gacaactaca	tgctctgggt	gcgccaggcc	120
cctggaagg	gcttggaatg	ggtgggttc	atccggaaca	aggccaacgg	ctacaccaca	180
gagtagcccg	ccagcgtgaa	gggcgggttc	acctcagcc	gggacaacag	caagagcatt	240
gcctacctgc	agatgaacag	cctgaaaacc	gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcgccagg	300
gacgtgggca	gcaactactt	cgactactgg	ggccagggca	cactggtgac	cgtgtctagc	360
gccagcacca	agggcccaag	cggtttccc	ctggccccc	gcctcagaag	caccagcgag	420
agcacagccg	ccctgggtcg	cctggtgaag	gactacttcc	ccagcccggt	gacctgtcc	480
tggacagcgc	gagccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	ccgcctgct	gcagagcagc	540
ggcctgtaca	gcctgagcag	cgtggtgacc	gtgcccaaga	gcagcctggg	caccaagacc	600
tacacctgta	acgtggacca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	ggtggagagc	660
aagtagcgcc	cacctgcctc	cagctgcctc	gcccccgagt	tctggggcgg	accagcgig	720
ttctgttcc	cccccaagcc	caaggacacc	ctgatgata	gcagaacccc	cgaggtgacc	780
tggtgtgtgg	tggacgtgtc	ccaggaggac	ccgaggtcc	agticaactg	gtacgtggac	840
ggcgtggagg	tgacaaagc	caagaccaag	cccagagagg	agcagtttaa	cagcacctac	900
cgggtgtgtg	ccgtgtgac	cgtgtgcac	caggactgga	tgaacggcaa	agagtacaag	960
tgttaaggct	ccaacaagg	ccgcccaagc	agcatgaaa	agacctcag	caaggccaag	1020

[0033]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccaccca gccaaagagga gatgaccaag      1080
aaccagggtg cctgacctg tctgtgaag ggcttctacc caagcgacat cgcctggag      1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc      1200
gacggcagct tcttctgta cagcaggetg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc      1260
aacgtcttta gctgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactaac ccagaagagc      1320
ctgagcctgt cctgggctg a      1341

```

<210> 76
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 76
gaggtgcage tgggtgagtc tggcggagga ctggtgcage ccggcagaag cctgagactg      60
agetgcaccc ccagcggett caccctcacc gacaactaca tgtctgggt gcgccaggcc      120
cctggaaagg gcttgaatg ggtgggttc atccggaaca aggccaaagg ctacaccaca      180
gagtacgcgc ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt      240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg      300
gacgtggcca gcaactactt cgaactactg gccagggcca cactggtgac cgtgtctagc      360
gccagcacca agggcccaag cgtgttccc ctggcccccet gctccagaag caaccagcag      420
agcacagccg cctgggctg cctgtgaag gactacttcc ccagcctgt gaccgtgtcc      480
tggaacacgc gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgt gcagagcagc      540
ggcctgtaca gccagagcag cgtgtgtgac gtgccagca gcagcctggg caaccaagacc      600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc      660
aagtacggcc caccctgcc cccctgccc gcccccaggt tcttggcgg acccagcgtg      720
ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgata gcagaacccc caggtgacc      780
tgtgtgttgg tggacgtgtc ccaggaggac cccagggtcc agttcaactg gtacgtggac      840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagttta cagcacctac      900
cgggtgtgt cctgtctgac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag      960
tgtaaggctt ccaacaagg cctgccaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag      1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccaccca gccaaagagga gatgaccaag      1080
aaccagggtg cctgacctg tctgtgaag ggcttctacc caagcgacat cgcctggag      1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc      1200
gacggcagct tcttctgta cagcaggetg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc      1260
aacgtcttta gctgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactaac ccagaagagc      1320
ctgagcctgt cctgggctg a      1341

```

<210> 77
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 77
gaggtgcage tgggtgagtc tggcggagga ctggtgcage ccggcagaag cctgagactg      60
agetgcaccc ccagcggett caccctcacc gacaactaca tgtctgggt gcgccaggcc      120

```

[0034]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgcgc ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtaeta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactacti egactactgg ggccagggea cactggtagc cgtgtctage 360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggcccccet gctccagaag caccagcgag 420
agcacagccg cccfgggcig cctggigaag gactacttcc ccgagcccggt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtagcc gtgccaagca gcaacttcgg caccagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660
aagtgtctgt tggagtgcgc cccctgcccc gcccccaccg tggccggacc cagcgtgttc 720
ctgttccccc ccaagcccaa ggacaccttg atgacagca gaaccccga ggtgacctgt 780
gtgtgtgtgt acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc acaacgcccc gaccaagccc agagaggagc agtttaacag cacttccgg 900
gtgtgttcgc tctgtaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
aaggtctcca acaagggcct gccagccccc atcgaaga ccacagcaa gaccaaggga 1020
cagccaagag agccacaggt ctacaccttg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
cagggtgtcc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcacatgcg cgtggagtgg 1140
gagagcaacg gccagcccca gaacaactac aagaccaccc ccccaatgct ggacagcgac 1200
ggcagcttct tctgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacagggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
agcctgtccc caggctga 1338

```

<210> 78
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 78
gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggca gcgggccacc 60
atgagctgca agagcagcca gacctgttc aacagccga ccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccg ccagtcctcc aagctgtga tctactggc cagcccca 180
gatagcggcg tgcccgctcg ctttaccgga agcggcagcg agacctactt cacctgacc 240
atcagccggg tgcaggcca ggaactcgcc gtgtactact gcatgcagag cttaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggaggag atcaagcgta cggtaggcgc tccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cagcagctg aagagcggca ccgccagcg ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcacccag caggacagca aggaatccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caagggcgac tacgagaagc acaaggigta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagcccggtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

```

<210> 79
 <211> 660

[0035]

Sequencelisting20130424100755.txt

<212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 79
 gacatcgtga tgaccacgac ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
 atgtccctgca agtccctccca gtccctgttc aactcccgga ccgggaagaa ctacctgccc 120
 tggatatcagc agaagecccg ccagccccc aagetgtga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccgggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttaacctg 300
 cggaccttcg gccaggggcac caaggiggaa atcaagcgta cgggtggccgc tccagcgtg 360
 ttcatcttcc ccccaagcga cagacagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcaccc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccaccc agggcctgtc cagcccggtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 80
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 80
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

[0036]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

165
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

```

[0037]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

<210> 81
<211> 1353
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 81
gaagtgaacc tggtagagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg      60
agetgcgcca cctccggett caccttcacc gacaactaca tgagctgggt ggcaccagccc      120
cctggcaagg ccctggaatg getgggcttc atccggaaca aggccaaagg ctacaccacc      180
gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcacc      240
ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggccc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccg      300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc      360
ggcagcacca agggccccc cgtgttcccg ctagccccc gacgaagag caccagcggc      420
ggcaccagcg ccctgggtg cctgggtaag gactacttcc ccgagccgt gaccgtgtcc      480
tggaacagcg gaccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcctgct gcagagcagc      540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagccctggg caccagacc      600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc      660
aagagctgtg acaagacca caccgtcccc ccctgccag ccccccagct gctggcgga      720
cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaacccc      780
gaggtgacct gtgtgtgtg ggaegtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg      840
tactgtgacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac      900
agcacctaca gggtaggtgc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggt gaacggcaag      960
gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaata gaccatcagc      1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacaccc tgccaccag caggagaggag      1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc aagcagacc      1140
gcctgggagt gggagagcaa cgccagccc gagaacaact acaagaccac ccccagtg      1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gacagatgg      1260
cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc      1320
cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag tga      1353

```

```

<210> 82
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

```

```

<400> 82
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1             5             10             15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20            25            30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50            55            60

```

[0038]

Sequencelisting20130424100755.txt

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 84
<211> 219
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

[0039]

SequenceListing20130424100755.txt

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85
<211> 219
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 85

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

[0040]

Sequencelisting20130424100755.txt

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 86
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 86
gacatcgtga tgaccacagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
atgtctctgca agtctctcca gtccctgttc aactcccgga ccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccg ccagccccc aagetgtga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccacag attcaccgga tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctccggg tgcaggcca ggatgtggc gtgtactact gcatgcagtc ctcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 87
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 87
gacatcgtga tgaccacagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
atgtctctgca agtctctcca gtccctgttc aactcccgga ccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccg ccagccccc aagetgtga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccacag attcaccgga tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctccagc tgcaggcca ggatgtggc gtgtactact gcatgcagtc ctcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 88
<211> 657
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 88
gacatcgtga tgaccacagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
atgtctctgca agtctctcca gtccctgttc aactcccgga ccggaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccg ccagccccc aagetgtga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccacag attcaccgga tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240

[0041]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

atctcccggtg tgcagggcga ggaatgtggcc gtgtactact gcattgcagtc cttcaacctg      300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggtaggcgc tcccagcgtg      360
ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg      420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag      480
agcggaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg      540
agcagacccc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag      600
gtgacccacc agggcctgtc cagcccccgt accaagagct tcaacagggg cgagtgc      657

```

<210> 89
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 小鼠

```

<400> 89
gacatcgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc      60
atgtcttcca agtctctcca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc      120
tggtatcage agaagcccg cccagccccc aagetgtga tctactgggc ctctgctaga      180
gactctggcg tgcccagac attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc      240
atctccagcc tgcagggcga ggaatgtggc gtgtactact gcattgcagtc cttcaacctg      300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggtaggcgc tcccagcgtg      360
ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg      420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag      480
agcggaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg      540
agcagacccc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag      600
gtgacccacc agggcctgtc cagcccccgt accaagagct tcaacagggg cgagtgc      657

```

<210> 90
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 90

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

[0042]

Sequencelisting20130424100755.txt

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 91
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccc ccagcggcctt cacccttcacc gacaactaca tgcctctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gccctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggcccaacgg ctacaccaca 180
 gactacgccg ccagcgtgaa gggccggcttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctaccctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 92
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 92

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

[0043]

Sequencelisting20130424100755.txt

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

[0044]

Sequencelisting20130424100755.txt

<210> 93
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 93
 gaggtgcagc tggtaggagtc tggcggagga ctggtagcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggett caccctcacc gacaactaca tgctcctgggt gcgcagggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaaagg ctacaccaca 180
 gactacggcg ccagcgtgaa gggcgggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gectacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacacgc ccgtgtacta ctgcgcagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctage 360
 gccagcaca accggcccaag cgtgttcctg ctgcccaca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccttggtgtg cctggtgaag gactacttcc ccgagccctg gacgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgctgtgt gcagagcagc 540
 ggctgttaca gctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagaccga cactgcccc cctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tctgttccc ccccagccc aaggacccc tgaatgacag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gtccaactgg 840
 tactggagc gctggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggtgtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggaactggt gaacggcaag 960
 gactacaagt gtaagggtgt caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccc ggttacccc tgcacccag caggagggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cgccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gacagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccaggcaag 1350

<210> 94
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 94
 atgaagaigt ggtgaactg ggtgttctg gtcacactgc tgaacggcat ccagtcgag 60
 gtgcagctgg tgaatccgg cggaggcctg gtgcagcctg gcagatccct gagactgtcc 120
 tgcaccgct ccgcttcac ctccacgac aactacatgt cctgggtgag ccaggeccct 180
 ggaaagggcc tggaaiggt ggcttcac cggacaagg ccaacggcta caccacagag 240
 tacgccgcca gctgaaggc ccggttcacc atcagccggg acaacagcaa gacattgcc 300
 tacctgcaga tgaacagcct gaaaaccgag gacaccgccc tgtactactg cgcaggggac 360
 gtgggcagca actacttga ctactgggc cagggcacac tggtagccgt gtctagcgcc 420
 agcacaagg gcccaagcgt gtcccccctg gccccctgct ccagaagcac cagcagagac 480

[0045]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

acagccgcc tgggtgcct ggtgaaggac taattcccc ageccgtgac cgtgtcctgg      540
aacagcggag ccctgaccag cggegtgcac accttcccc cgtgtctga gageageggc      600
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gccgtggcac caagacctac      660
acctgtaacg tggaccacaa gcccageaac accaagggtg acaagagggt ggagagcaag      720
taaggccac cctgcccccc ctgccagcc cccaggccg cggggggacc cagcgtgttc      780
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgacagca gaaccccca ggtgacctgt      840
gtggtggtg acgtgtccca ggaggacccc gaggtccagt tcaactgta cgtggacggc      900
gtggagggtc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag cacctaccgg      960
gtggtgtccg tctgtaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaaga gtacaagtgt     1020
aaggctacca acaaggccct gccaaagcgc atcgaaga ccatcagca ggccaagggc     1080
cagcctagag agccccaggt ctacacctg cccaccagcc aagaggagat gaccaagaac     1140
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa ggcacatgc cgtggagtgg     1200
gagagcaacg gccagcccca gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac     1260
ggcagcttct tctgtacag caggtgacc gtggacaagt ccagatggca ggagggaac     1320
gtctttagct gctccgtgat gcacaggccc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg     1380
agcctgtccc tgggc                                           1395

```

<210> 95
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 95

```

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1           5           10           15

```

```

Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20           25           30

```

```

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

```

```

Thr Asp Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50           55           60

```

```

Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65           70           75           80

```

```

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85           90           95

```

```

Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100          105          110

```

```

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
115          120          125

```

```

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130          135          140

```

[0046]

Sequencelisting20130424100755.txt

```

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145          150          155          160

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
          180          185          190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
          195          200          205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
          210          215          220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225          230          235          240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
          245          250          255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
          260          265          270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
          275          280          285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
          290          295          300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
305          310          315          320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
          325          330          335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
          340          345          350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
          355          360          365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
          370          375          380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385          390          395          400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
          405          410          415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
          420          425          430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

```

[0047]

Sequencelisting20130424100755.txt

435	440	445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
450	455	460
Gly		
465		

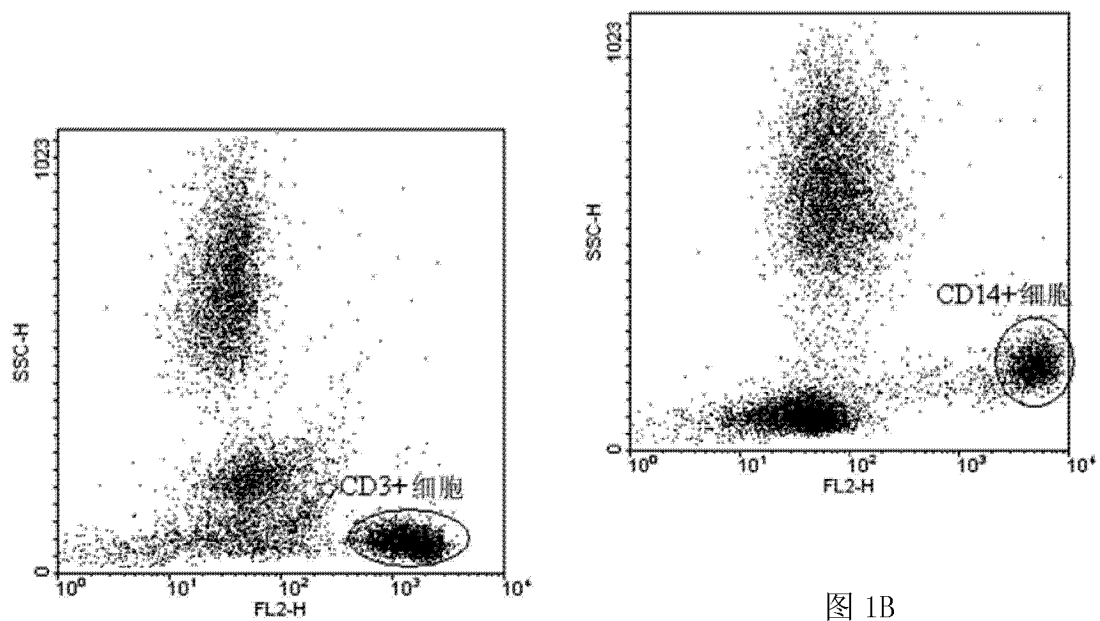


图 1B

图 1A

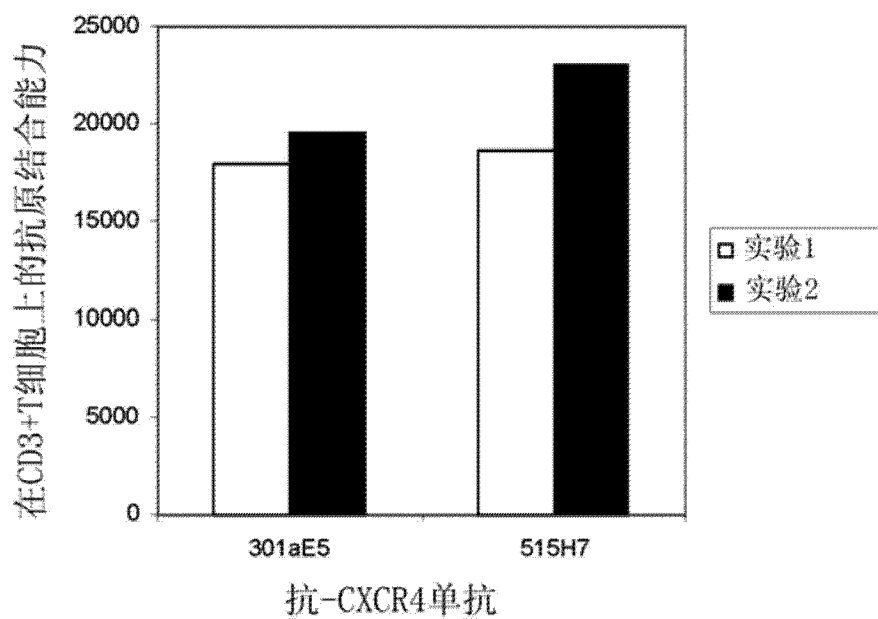


图 2A

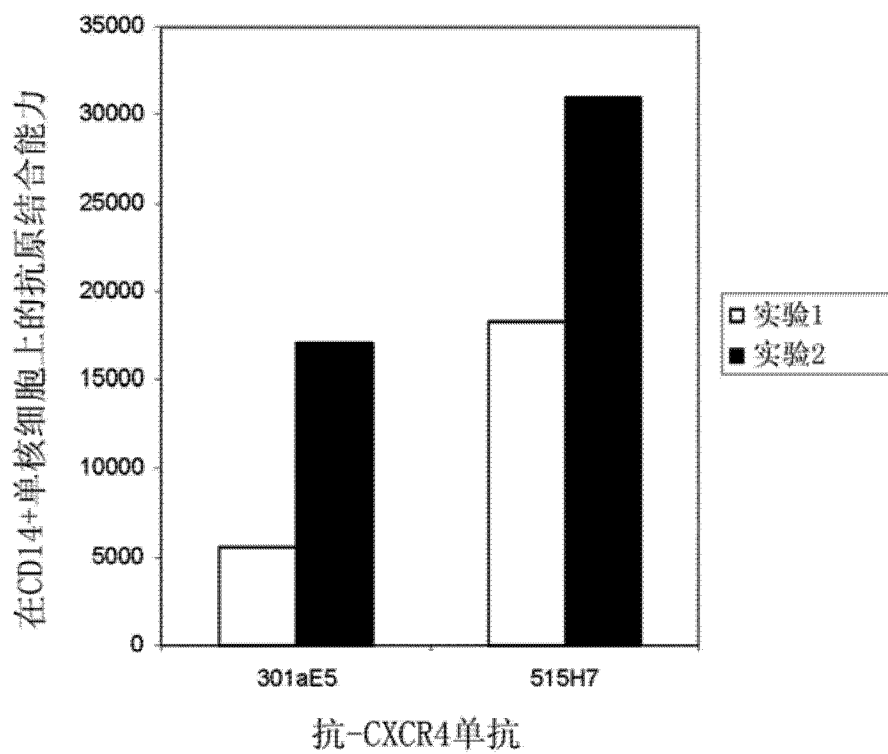


图 2B

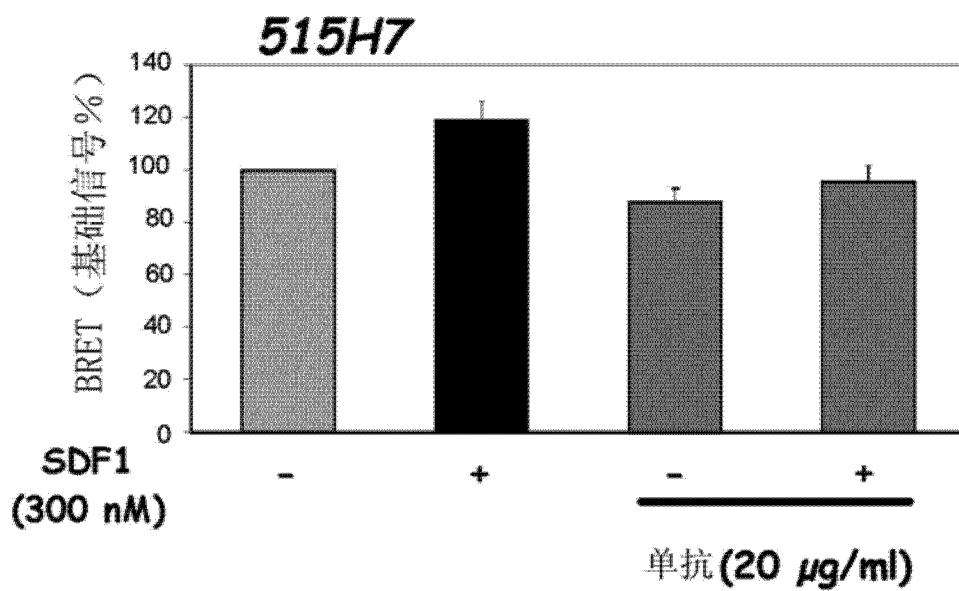


图 3A

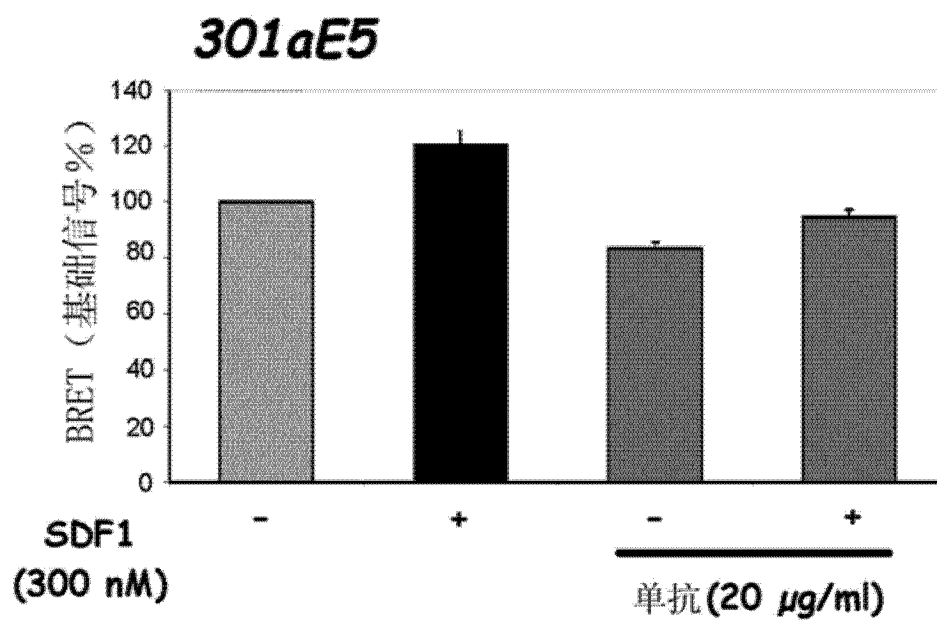


图 3B

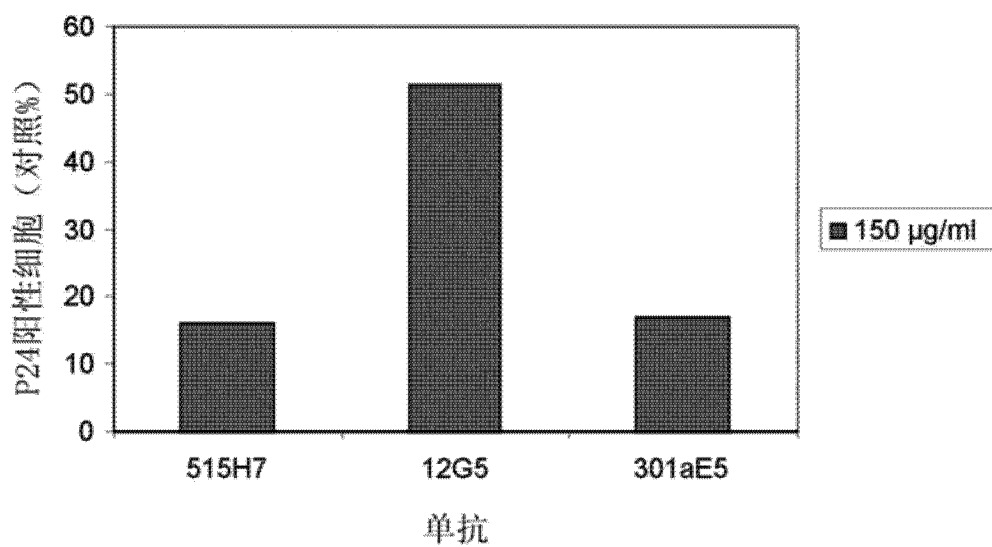


图 4A

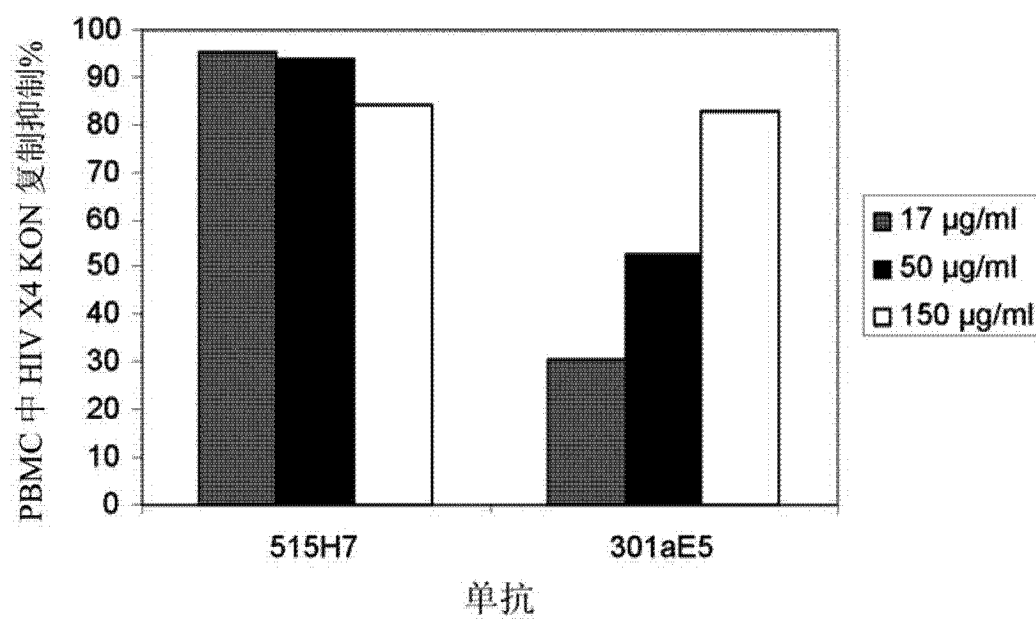


图 4B

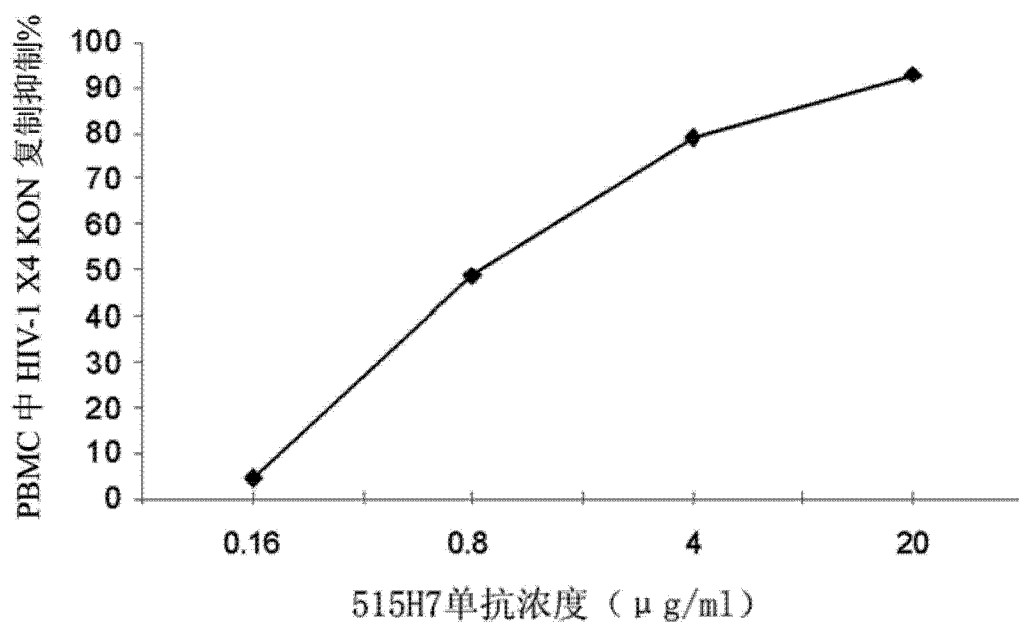


图 5

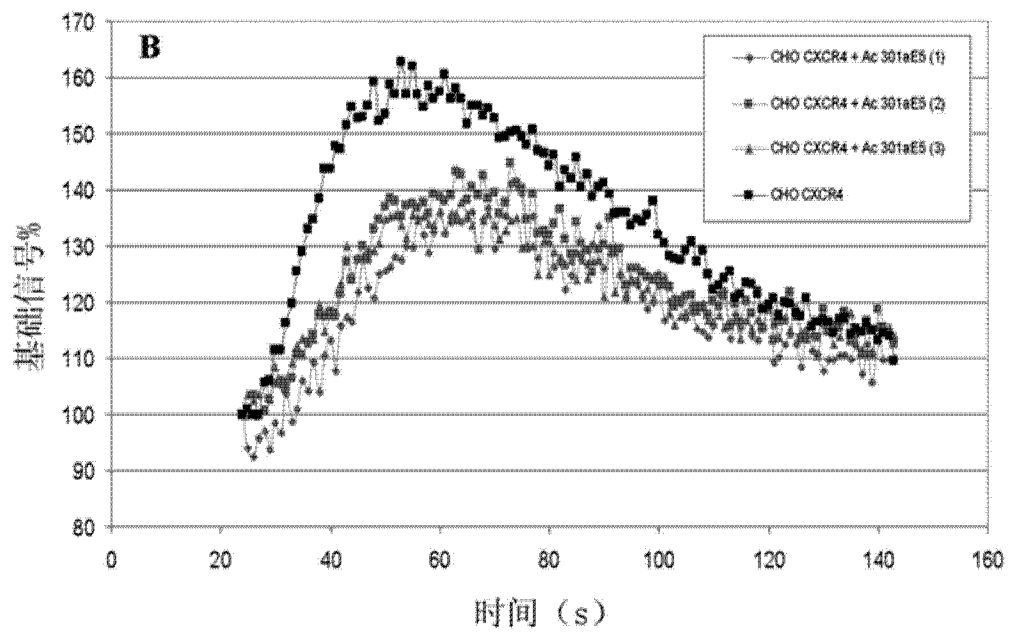
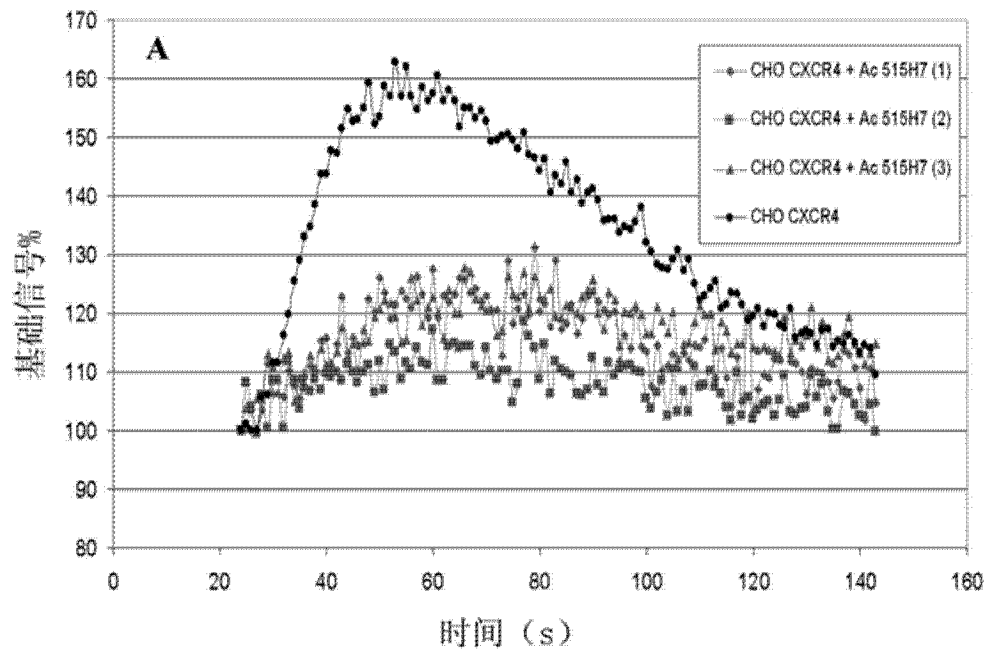


图 6A 和 6B

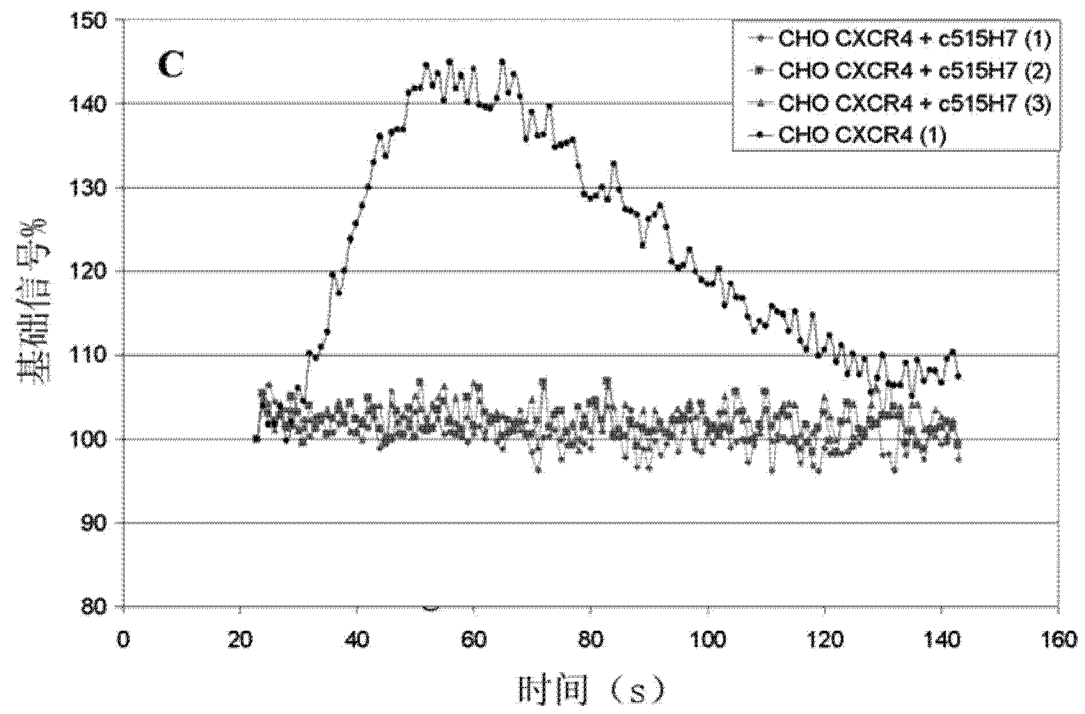


图 6C

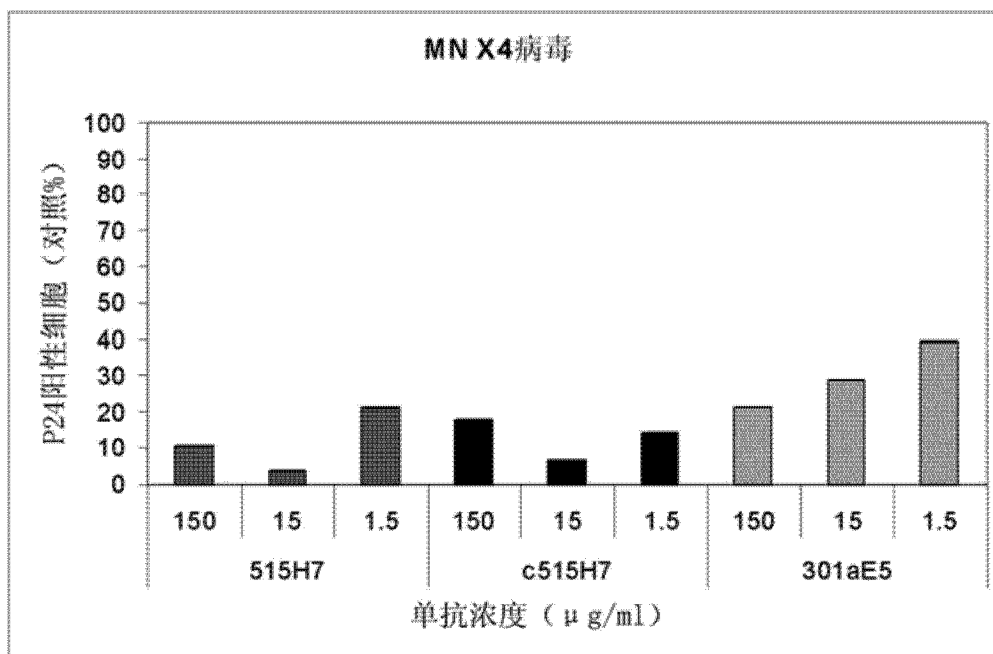


图 7

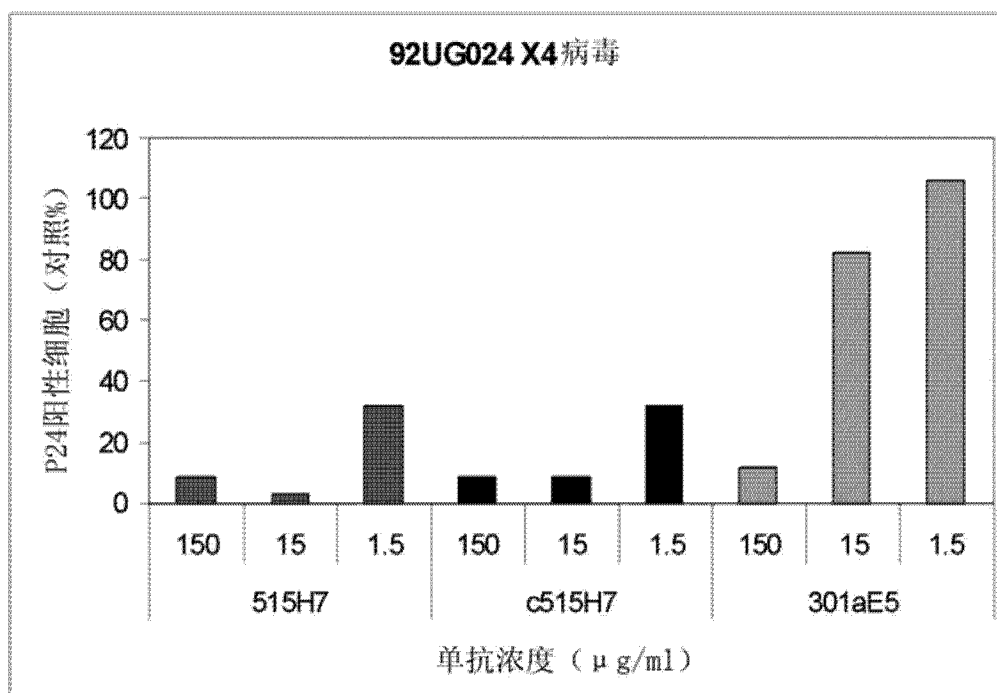


图 8

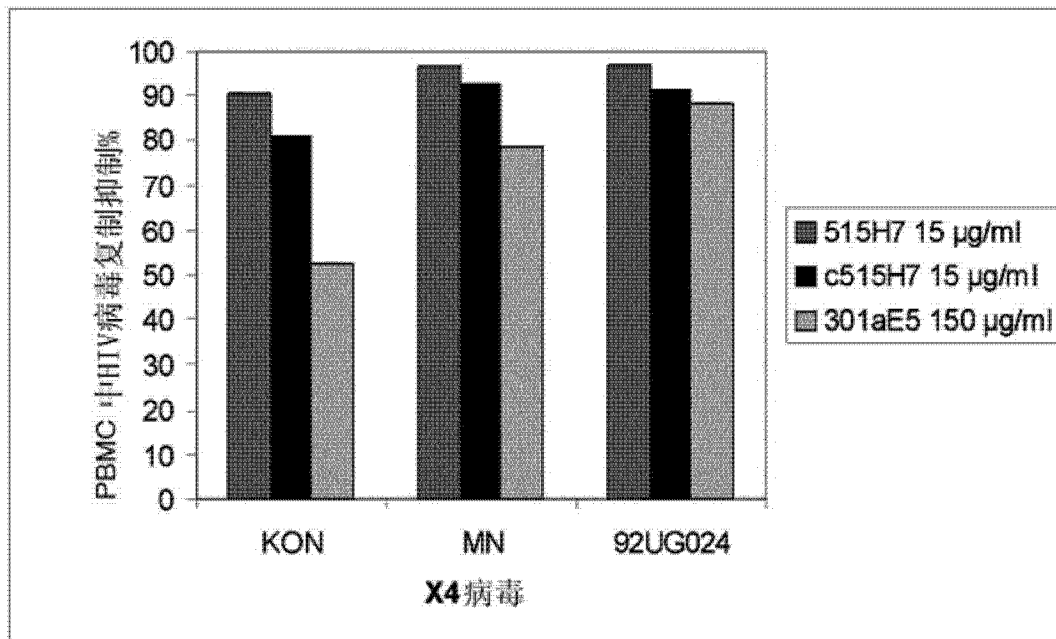


图 9

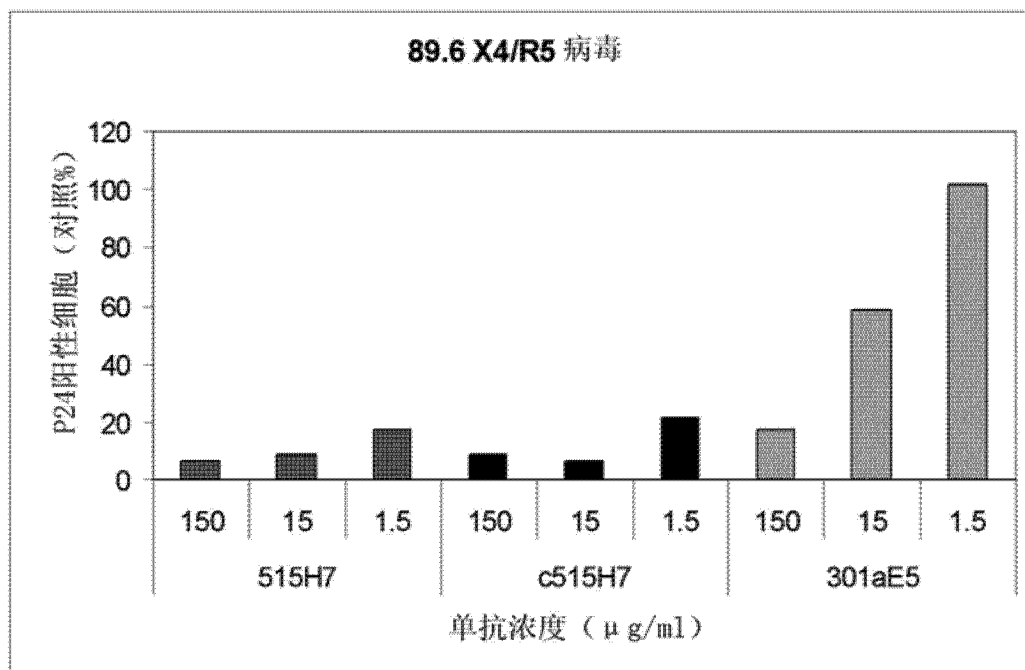


图 10

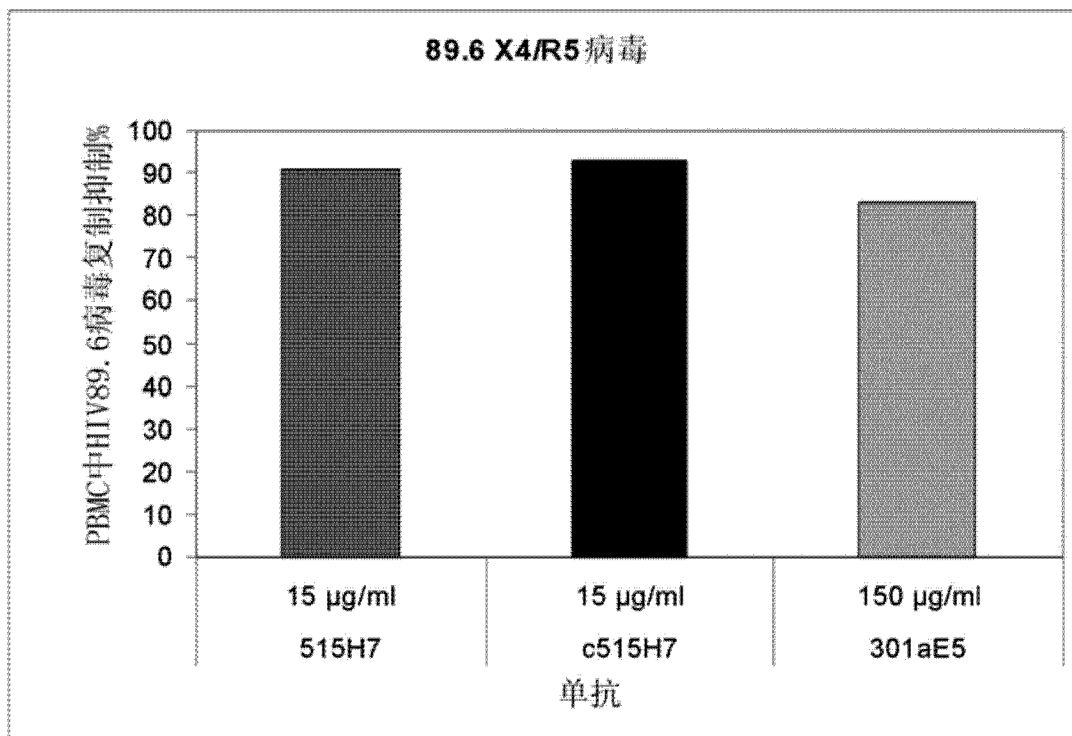


图 11

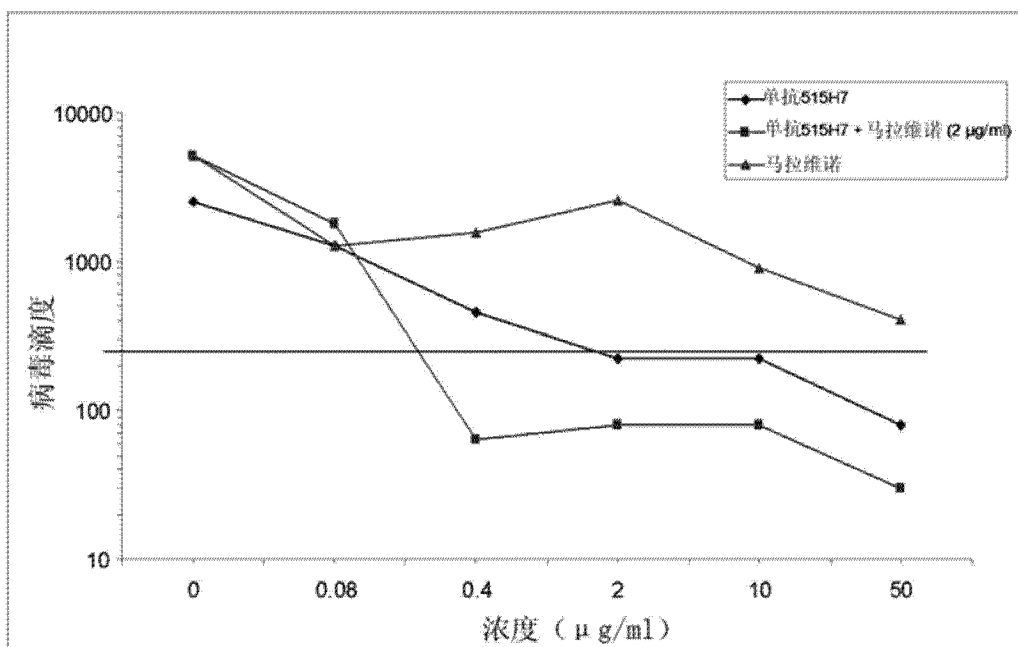


图 12

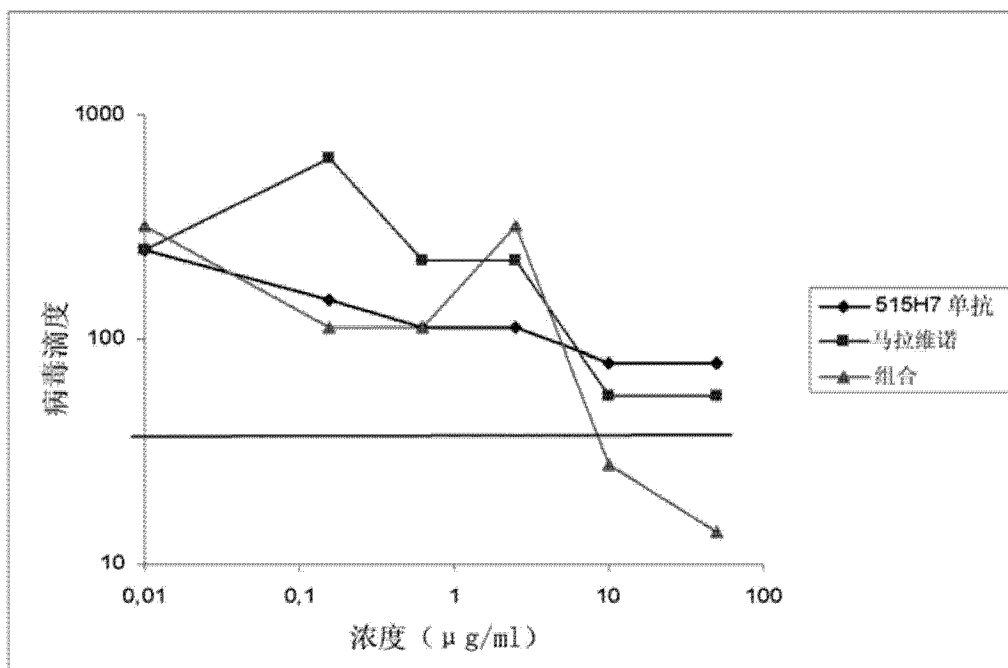


图 13

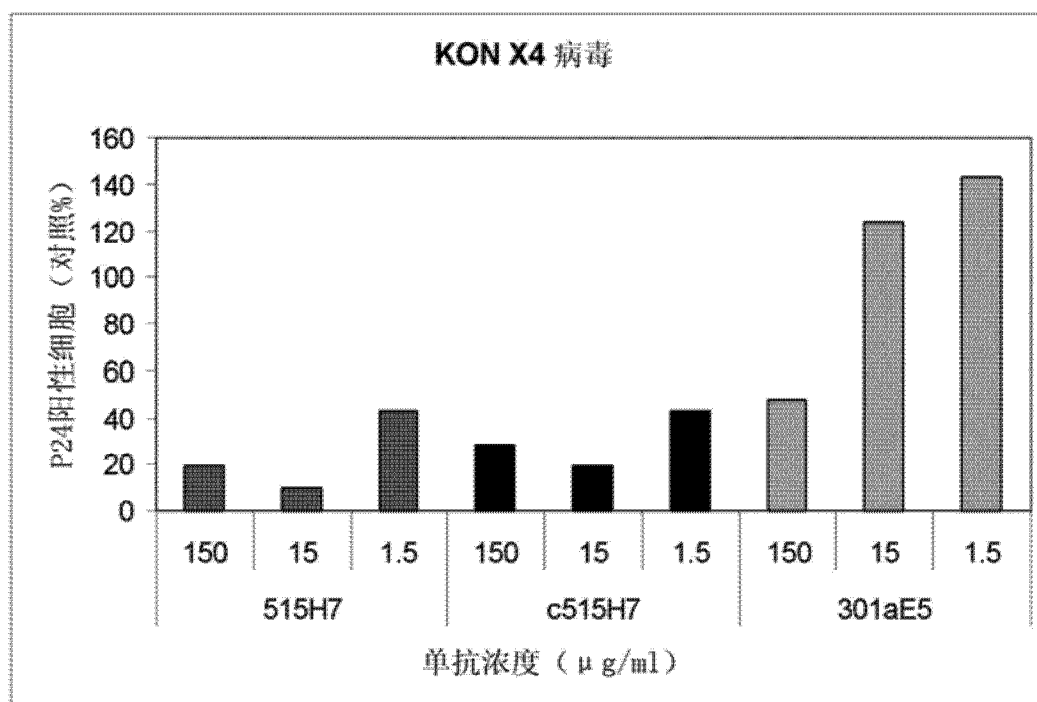


图 14

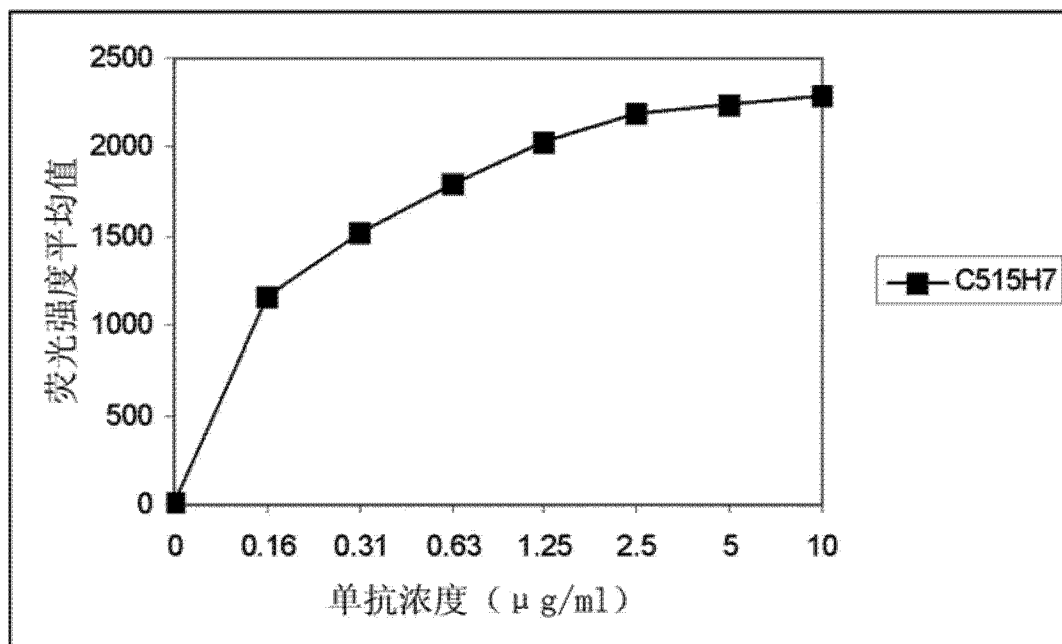


图 15

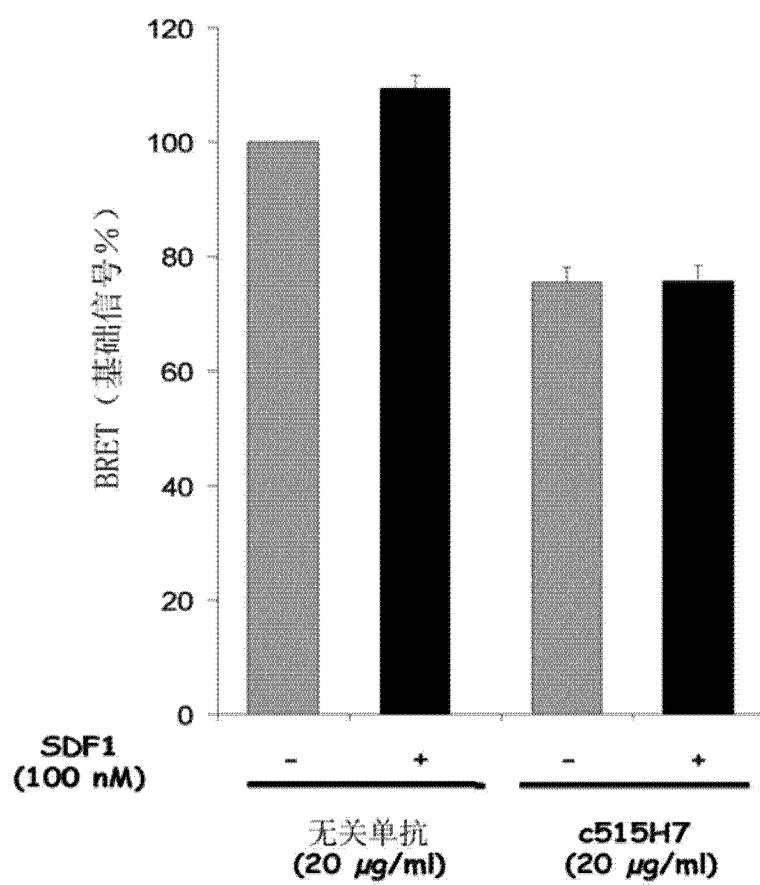


图 16

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VH												
IGHV3-49*04	EVNLVESGG	GLVQPGGSLRLSCTAS	GFTF....TDNY	MSWVRQPPGKALENLGF	IRNKANGYTT	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCTAS	GFTF....GDYA	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRSKAYGTT		
VH1	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCTAS	GFTF....TDNY	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRNKANGYTT							
VH1 D76N	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCTAS	GFTF....TDNY	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRNKANGYTT							
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-116)				FR4-IMGT (116-125)			
	70	80	90	100								
515H7 VH												
IGHV3-49*04	DYSASVR	GRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS	EYAASVK	GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC	TR					
IGHJ4*01								YFDYW	GQGTTLTVSS			
VH1	EYAASVK	GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS								
VH1 D76N	EYAASVK	GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS								

图 17

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL												
IGKV4-1*01	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQSPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	QSVLYSSNNKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQSPKLLIY	WA.....S
VL Var2	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQSPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S
VL Var2.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S
VL Var2.2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S
VL Var2.3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQOKPGQPPKLLIY	WA.....S
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)			
	70	80	90	100								
515H7 VL												
IGKV4-1*01	ARDSGVP	ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK	TRESGVP	DRFTGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC						
IGKH1*01							WT	FGQGTKVEIK				
VL Var2	ARDSGVP	ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK				
VL Var2.1	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK				
VL Var2.2	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK				
VL Var2.3	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK	ARDSGVP	DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK				

图 18

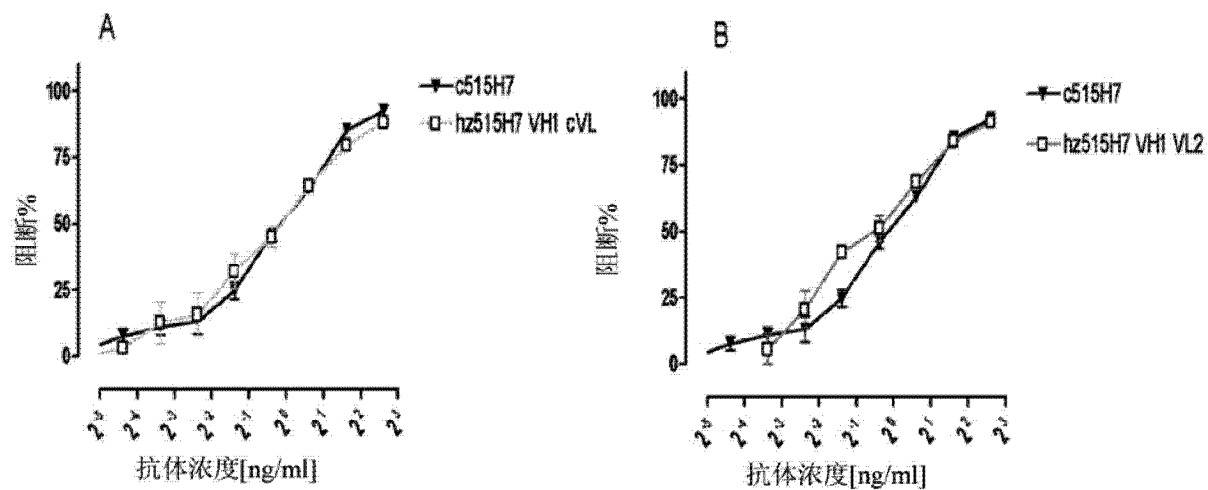


图 19

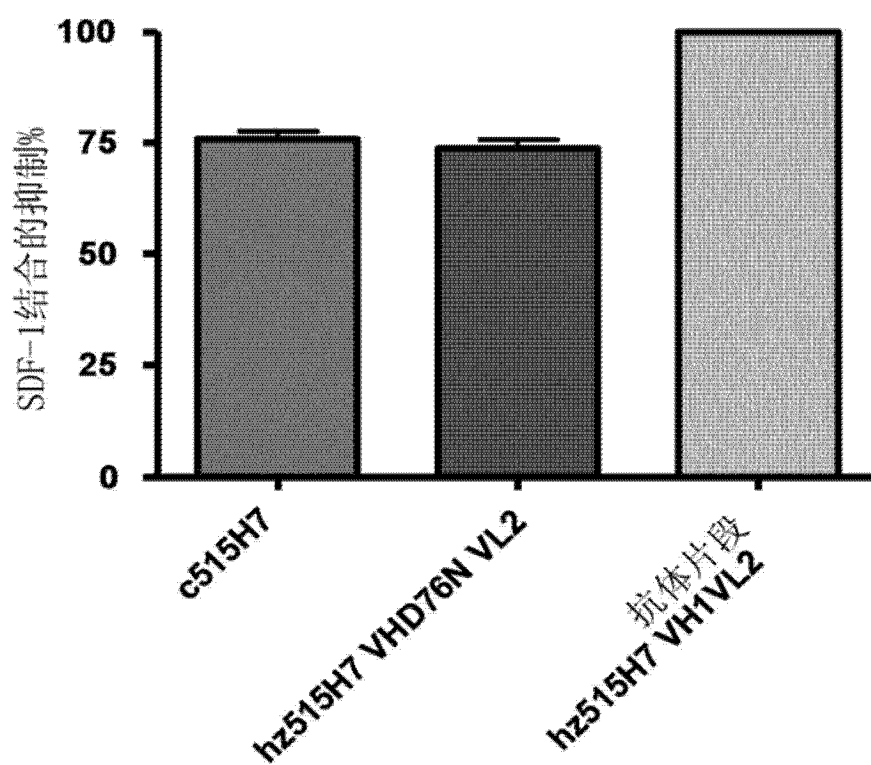


图 20

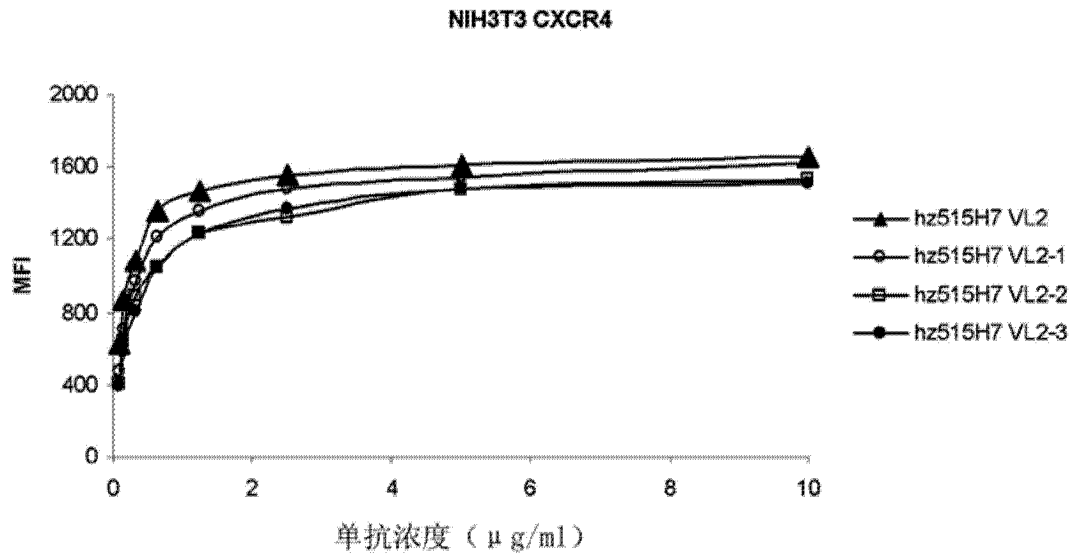


图 21

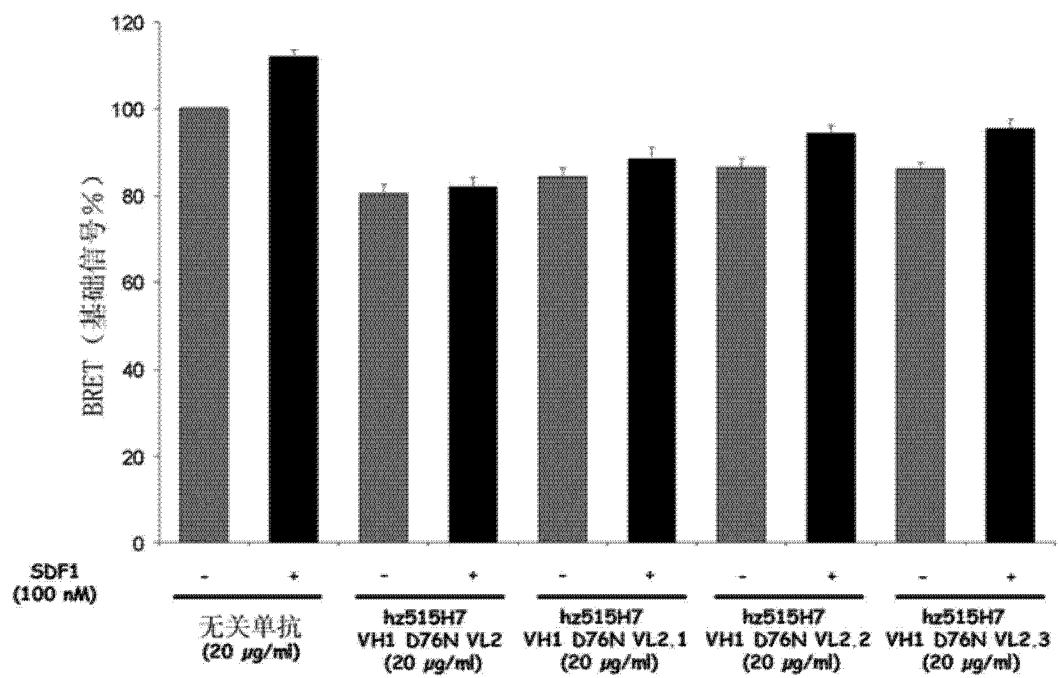


图 22

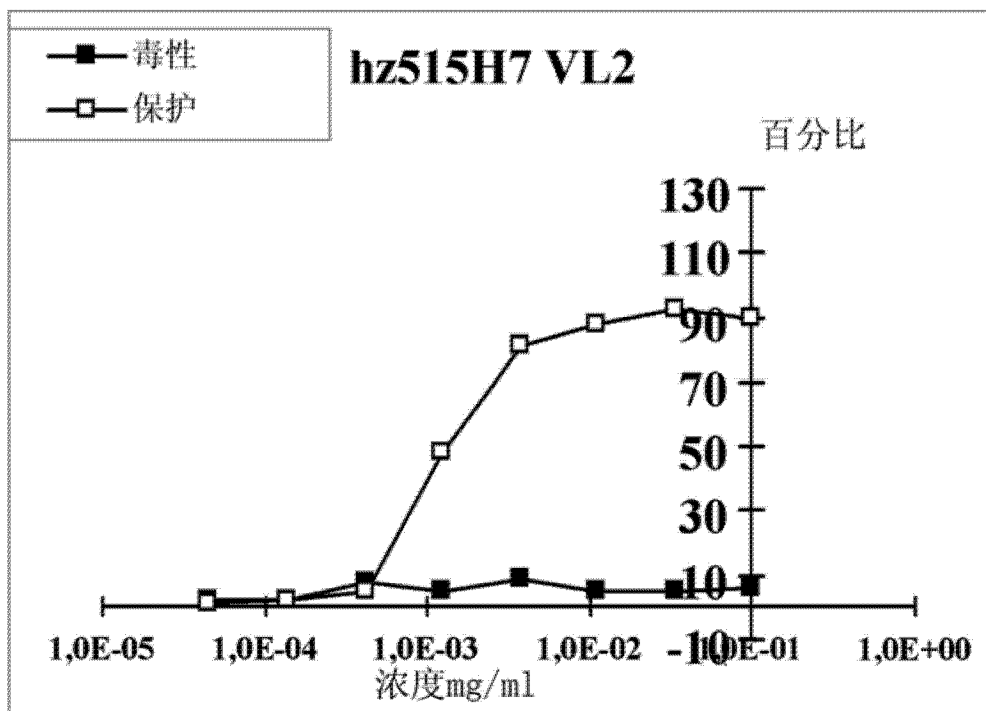


图 23

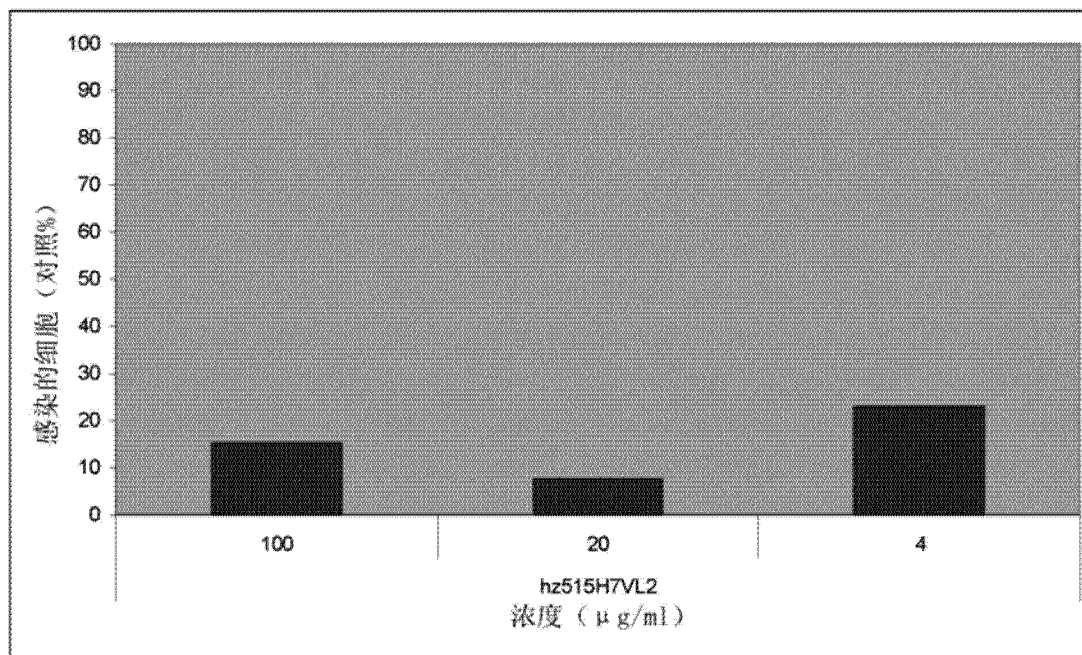


图 24

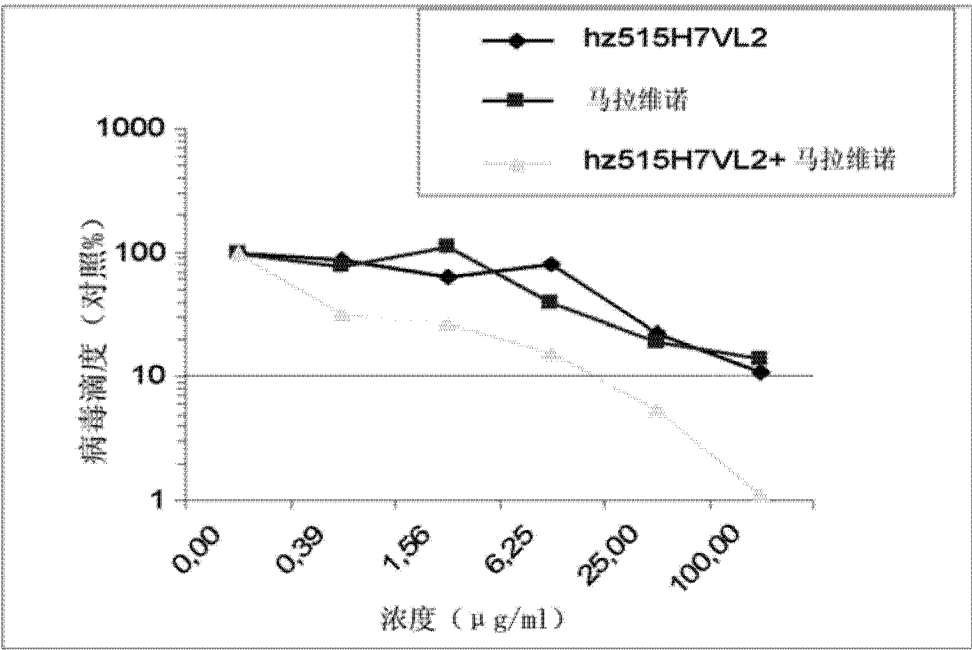


图 25

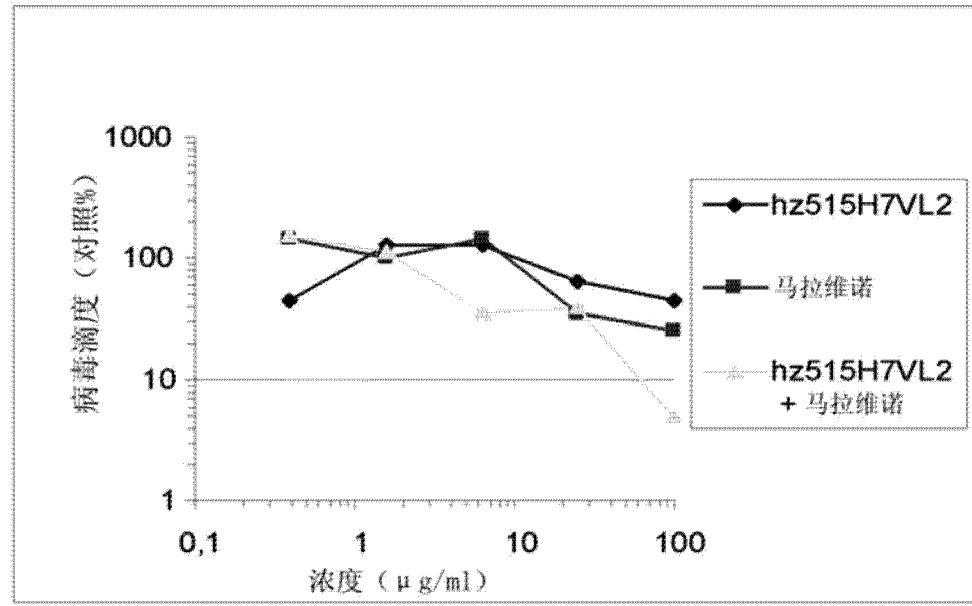


图 26

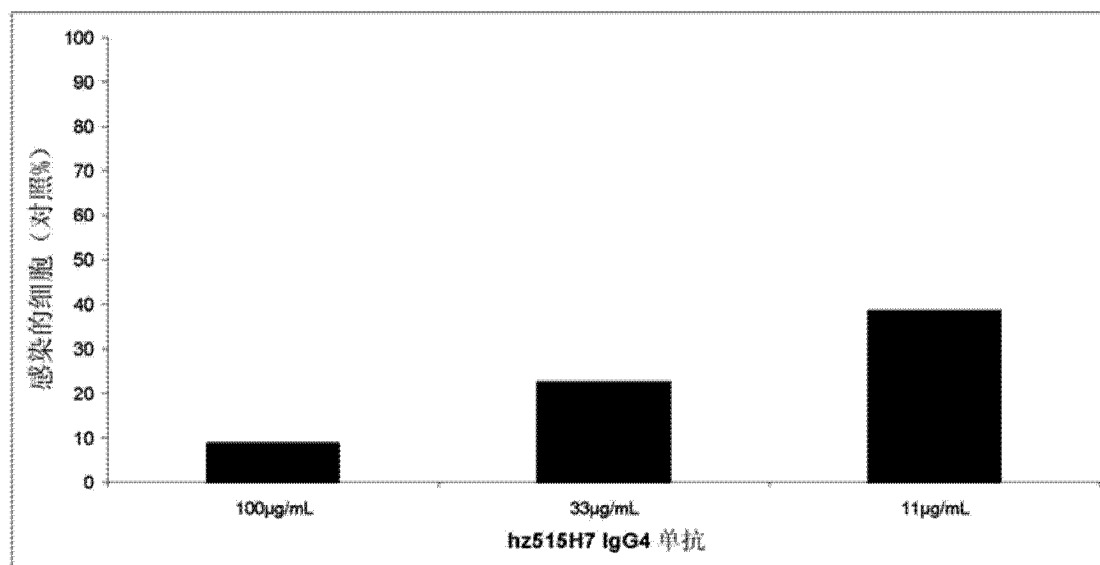


图 27

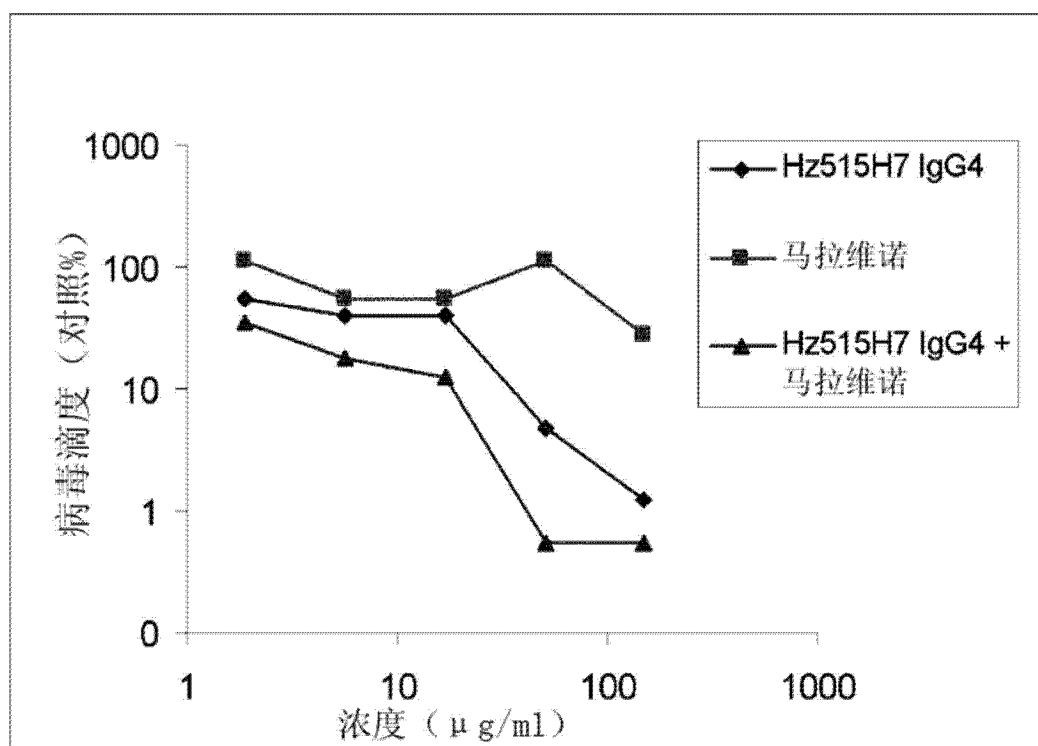


图 28