



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112119090 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 13

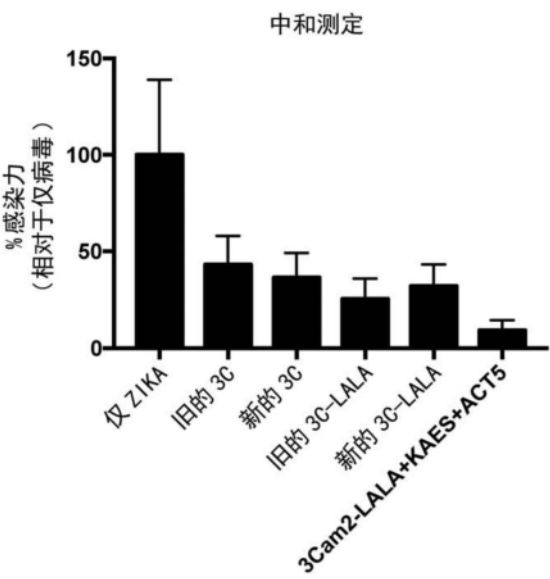
(21) 申请号 201980032525.4	古幸儿
(22) 申请日 2019.03.15	(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112119090 A	公司 11021
(43) 申请公布日 2020.12.22	专利代理师 柴云峰 张莹
(30) 优先权数据 10201802164Y 2018.03.15 SG	(51) Int.Cl. C07K 16/10 (2006.01) A61K 39/42 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.11.13	(56) 对比文件 WO 2017212291 A1,2017.12.14 CN 107586336 A,2018.01.16 CN 106279409 A,2017.01.04 Yiu-Wing Kam,et al..Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections.《JCI insight》.2017,第2卷 (第8期),第1-10页.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/SG2019/050145 2019.03.15	审查员 王烟岚
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/177543 EN 2019.09.19	权利要求书1页 说明书76页 序列表50页 附图21页
(73) 专利权人 中外制药株式会社 地址 日本国东京都 专利权人 新加坡科技研究局	
(72) 发明人 卡贾·芬克 汪正一 伍芳葆 劳伦特·雷尼亚 三瓶全次郎	

(54) 发明名称

对寨卡病毒具有交叉反应性的抗登革热病毒抗体及使用方法

(57) 摘要

本公开提供对寨卡病毒 (ZIKV) 具有交叉反应性的抗登革热病毒 (抗DENV) 抗体及其制备和使用方法。该抗DENV抗体具有包括治疗或预防 ZIKV感染的用途。另外,所要求保护的抗体可以进一步包含含有LALA、KAES和ACT5突变的变体Fc区。



1. 抗体在制备用于治疗或预防寨卡病毒感染的药物中的用途,其中,所述抗体包含SEQ ID NO: 6的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列,其中所述抗体还包含SEQ ID NO: 59的氨基酸序列。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含如SEQ ID NO: 6所示的VH序列,并具有如SEQ ID NO: 59所示的人IgG1 CH序列;和如SEQ ID NO: 7所示的VL序列,并具有如SEQ ID NO: 60所示的人CL序列。

对寨卡病毒具有交叉反应性的抗登革热病毒抗体及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗寨卡病毒抗体及其使用方法。

背景技术

[0002] 登革热是最常见的节肢动物传播的病毒性疾病。引起登革热的病毒(或在本文中称为DENV)可分为四种不同的感染性血清型,诸如DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。登革热感染的症状包括发烧、肌肉疼痛、头痛、低血小板数和低白细胞数、凝血紊乱、出血和血管渗漏,其可导致登革热休克综合征。当一个人在之前的登革热感染后暴露于登革热病毒时,抗病毒抗体可以增强病毒进入宿主细胞的摄取,并且患者发生严重形式的登革热的风险更高。然而,严重形式的登革热也可在第一次感染期间发生。

[0003] 虽然是迄今为止最常见的节肢动物传播的病毒性疾病,但却没有可用于治疗登革热的药物。关于登革热作为疾病的方法主要是针对感染的预防和/或治疗以缓解症状。

[0004] 疫苗和抗体治疗剂目前正在开发中以预防和治疗病毒感染。然而,基于抗体的治疗并非没有风险。一种这样的风险是抗体依赖性增强(ADE),其发生在非中和抗病毒抗体促进病毒进入宿主细胞时,导致细胞中的感染性增加(Expert Rev Anti Infect Ther (2013) 11, 1147-1157)。针对ADE的最常见的机制是病毒-抗体复合物通过抗体的Fc部分与细胞表面上的Fc受体(FcR)的相互作用。ADE可以增强正常轻微的病毒感染,成为危及生命的疾病。据报道,在Fc区中具有突变以防止与Fc γ R结合的抗DENV抗体未能增强DENV感染(WO2010/043977)。然而,仍然需要不增加感染的抗体依赖性增强的风险的抗体治疗。

[0005] DENV-特异性抗体对寨卡病毒的交叉反应性已有报道于文献[JCI Insight.2017; 2(8).doi:10.1172/jci.insight.92428.]。也已证明DENV-特异性Abs可增强寨卡感染[Nature.2016;536(7614):48-53.doi:10.1038/nature18938,Nat Immunol.2016;17(9):1102-8.]。

发明内容

[0006] 本发明提供抗DENV抗体、含有变体Fc区的多肽及其使用方法。

[0007] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体结合至DENV E蛋白。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体包含:

[0008] (a) (i) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L(SEQ ID NO:42), (ii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为D,S或E,X₂为D或A(SEQ ID NO:45),及 (iii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R(SEQ ID NO:41);

[0009] (b) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为N或Y,X₂为I或M(SEQ ID NO:40), (ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R(SEQ ID NO:41),及 (iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L(SEQ ID NO:42);

[0010] (c) (i) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SX_1YX_2H , 其中 X_1 为N或Y, X_2 为I或M (SEQ ID NO: 40), (ii) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 $VINPRGGSX_1X_2SAQKFQG$, 其中 X_1 为T或R, X_2 为A或R (SEQ ID NO: 41), (iii) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 $GGX_1ALFYDSYTPX_2DX_3GSWWFDP$, 其中 X_1 为R或E, X_2 为R或F, X_3 为G, D或L (SEQ ID NO: 42), (iv) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 $QASQX_1IRX_2YLN$, 其中 X_1 为D或E, X_2 为K或Q (SEQ ID NO: 43); (v) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 $DASX_1LXX_2$, 其中 X_1 为N或E, X_2 为T或F (SEQ ID NO: 44); 及 (vi) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 $QQFX_1X_2LPIT$, 其中 X_1 为D, S或E, X_2 为D或A (SEQ ID NO: 45); 或

[0011] (d) (i) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 $QASQX_1IRX_2YLN$, 其中 X_1 为D或E, X_2 为K或Q (SEQ ID NO: 43); (ii) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 $DASX_1LXX_2$, 其中 X_1 为N或E, X_2 为T或F (SEQ ID NO: 44); 及 (iii) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 $QQFX_1X_2LPIT$, 其中 X_1 为D, S或E, X_2 为D或A (SEQ ID NO: 45)。在一些实施方案中, 本发明的抗体不是包含以下各项的抗体: (i) HVR-H1, 其包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列, (ii) HVR-H2, 其包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列, (iii) HVR-H3, 其包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列, (iv) HVR-L1, 其包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列, (v) HVR-L2, 其包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列, 及 (vi) HVR-L3, 其包含SEQ ID NO: 27的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗-DNVE抗体包含:

[0013] (a) (i) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (ii) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列, 及 (iii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列;

[0014] (b) (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, 及 (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列;

[0015] (c) (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (iv) HVR-L1, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列; (v) HVR-L2, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列; 及 (vi) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列;

[0016] (d) (i) HVR-L1, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列; (ii) HVR-L2, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列; 及 (iii) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 8-10中任一个的VL序列; 或

[0017] (e) (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2-6中任一个的VH序列, (iv) HVR-L1, 其来自SEQ ID NO: 7中任一个的VL序列; (v) HVR-L2, 其来自SEQ ID NO: 7中任一个的VL序列; 及 (vi) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 7中任一个的VL序列。

[0018] 在一些实施方案中, 本发明的抗体不是包含以下各项的抗体: (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 1的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 1的VH序列, (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 1的VH序列, (iv) HVR-L1, 其来自SEQ ID NO: 7的VL序列, (v) HVR-L2, 其来自SEQ ID NO: 7的VL序列, 及 (vi) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 7的VL序列。

[0019] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗DENV抗体进一步包含重链可变结构域框架: 包含SEQ ID NO: 31的氨基酸序列的FR1, 包含SEQ ID NO: 32的氨基酸序列的FR2, 包含SEQ ID NO: 33或34的氨基酸序列的FR3, 包含SEQ ID NO: 35的氨基酸序列的FR4。在一些实施方案中, 本发明的分离的抗DENV抗体进一步包含轻链可变结构域框架: 包含SEQ ID NO:

36的氨基酸序列的FR1,包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的FR2,包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的FR3,包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的FR4。

[0020] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体包含(a)与SEQ ID NO:2-6中任一个的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列;(b)与SEQ ID NO:8-10中任一个的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列;(c)SEQ ID NO:2-6中任一个的VH序列及SEQ ID NO:8-10中任一个的VL序列;或(d)SEQ ID NO:2-6中任一个的VH序列及SEQ ID NO:7中任一个的VL序列。

[0021] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体为人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体为结合至DENV或DENV E蛋白的抗体片段。在一些实施方案中,本发明的分离的抗DENV抗体为全长IgG抗体。

[0022] 在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体的Fc区包含根据EU编号的位置234处的Ala及位置235处的Ala。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体的Fc区可选自本文所描述的变体Fc区。

[0023] 本发明还提供编码本发明的抗DENV抗体的分离的核酸。本发明还提供包含本发明的核酸的宿主细胞。本发明还提供制备抗体的方法,包含培养本发明的宿主细胞以便制备抗体。

[0024] 本发明还提供包含本发明的抗DENV抗体及药学上可接受载体的药物制剂。

[0025] 本发明的抗DENV抗体可用作药物。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体可用于治疗DENV感染。

[0026] 本发明的抗DENV抗体可用于制备药物。在一些实施方案中,该药物用于治疗DENV感染。

[0027] 本发明还提供治疗患有DENV感染的个体的方法。在一些实施方案中,该方法包含向该个体施用有效量之本发明的抗DENV抗体。在一些实施方案中,该方法进一步包含向该个体施用另外的治疗剂,例如下文所述。

[0028] 在一些实施方案中,本发明的变体Fc区包含亲本Fc区中的至少一个氨基酸改变。在进一步的实施方案中,当与亲本Fc区比较时,变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R-结合活性。在进一步的实施方案中,当与亲本Fc区比较时,变体Fc区不具有实质性降低的C1q-结合活性。

[0029] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的变体Fc区包含位置234处的Ala,位置235处的Ala。进一步的实施方案中,根据EU编号,变体Fc区包含下述(a)-(c)中任一个的氨基酸改变:(a)位置267、268及324,(b)位置236、267、268、324及332,以及(c)位置326及333;。

[0030] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的变体Fc区包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置267处的Glu,(b)位置268处的Phe,(c)位置324处的Thr,(d)位置236处的Ala,(e)位置332处的Glu,(f)位置326处的Ala、Asp、Glu、Met或Trp,及(g)位置333处的Ser。

[0031] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的变体Fc区进一步包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置434处的Ala,(b)位置434处的Ala,位置436处的Thr,位置438处

的Arg,及位置440处的Glu,(c)位置428处的Leu,位置434处的Ala,位置436处的Thr,位置438处的Arg,及位置440处的Glu,及(d)位置428处的Leu,位置434处的Ala,位置438处的Arg,及位置440处的Glu。

[0032] 在一些实施方案中,本发明的变体Fc区包含单独或组合地任何氨基酸改变,如表4所述。在一些实施方案中,本发明所述的亲本Fc区衍生自人类IgG1。本发明提供多肽,其包含SEQ ID NO:51-59任一个的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽为抗体。进一步的实施方案中,抗体为抗病毒抗体。在进一步的实施方案中,抗体包含衍生自本文所述的抗DENV抗体的可变区。

[0034] 在进一步的实施方案中,抗体包含:

[0035] (a) (i)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,及(iii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

[0036] (b) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,及(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

[0037] (c) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或

[0038] (d) (i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0039] 在进一步的实施方案中,抗体包含:

[0040] (a) (i)HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii)HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列,及(iii)HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0041] (b) (i)HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii)HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,及(iii)HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0042] (c) (i)HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii)HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii)HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv)HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(v)HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(vi)HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;

[0043] (d) (i)HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(ii)HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(iii)HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;或

[0044] (e) (i)HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii)HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii)HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv)HVR-L1,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;(v)HVR-L2,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;及(vi)HVR-L3,其来自SEQ ID NO:7的VL序列。

[0045] 本发明还提供编码包含本发明的变体Fc区的多肽的分离的核酸。本发明还提供包含本发明的核酸的宿主细胞。本发明还提供制备包含变体Fc区的多肽的方法,该方法包含培养本发明的宿主以便制备该多肽。

[0046] 本发明还提供包含多肽及药学上可接受载体的药物制剂,该多肽包含本发明的变

体Fc区。

[0047] 本发明的包含变体Fc区的多肽可用作药物。在一些实施方案中,本发明的包含变体Fc区的多肽可用于治疗病毒感染。

[0048] 本发明的包含变体Fc区的多肽可用于制备药物。在一些实施方案中,该药物用于治疗病毒感染。

[0049] 本发明还提供治疗患有病毒感染的个体的方法。在一些实施方案中,该方法包含向该个体施用有效量的包含本发明的变体Fc区的多肽。

[0050] 本发明还提供本文所描述的抗DENV抗体,进一步包含含有本发明的变体Fc区的多肽。

[0051] 在一方面,本发明提供用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法。

[0052] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法包含施用结合寨卡病毒的抗体。

[0053] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0054] (a) (i) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L (SEQ ID NO:42), (ii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为D,S或E,X₂为D或A (SEQ ID NO:45),及 (iii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R (SEQ ID NO:41);

[0055] (b) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为N或Y,X₂为I或M (SEQ ID NO:40), (ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R (SEQ ID NO:41),及 (iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L (SEQ ID NO:42);

[0056] (c) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为N或Y,X₂为I或M (SEQ ID NO:40), (ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R (SEQ ID NO:41), (iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L (SEQ ID NO:42), (iv) HVR-L1,其包含氨基酸序列QASQX₁IRX₂YLN,其中X₁为D或E,X₂为K或Q (SEQ ID NO:43); (v) HVR-L2,其包含氨基酸序列DASX₁LKX₂,其中X₁为N或E,X₂为T或F (SEQ ID NO:44);及 (vi) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为D,S或E,X₂为D或A (SEQ ID NO:45);或

[0057] (d) (i) HVR-L1,其包含氨基酸序列QASQX₁IRX₂YLN,其中X₁为D或E,X₂为K或Q (SEQ ID NO:43); (ii) HVR-L2,其包含氨基酸序列DASX₁LKX₂,其中X₁为N或E,X₂为T或F (SEQ ID NO:44);及 (iii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为D,S或E,X₂为D或A (SEQ ID NO:45)。在一些实施方案中,本发明的抗体不为包含以下各项的抗体: (i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列, (ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列, (iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列, (iv) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, (v) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,及 (vi) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0058] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体进一步包含重链可变结构域框架:包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的FR1,包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的FR2,包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列的FR3,包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的FR4。在一些实

施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体进一步包含轻链可变结构域框架:包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的FR1,包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的FR2,包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的FR3,包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的FR4。

[0059] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含(a)与SEQ ID NO:2-6中任一个的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列;(b)与SEQ ID NO:8-10中任一个的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列;(c)SEQ ID NO:2-6中任一个的VH序列及SEQ ID NO:8-10中任一个的VL序列;或(d)SEQ ID NO:2-6中任一个的VL序列。

[0060] 本发明还提供治疗寨卡感染的方法。在一些实施方案中,该方法包含向个体施用有效量的本发明的抗寨卡抗体。

[0061] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区包含位置234处的Ala、位置235处的Ala。进一步的实施方案中,变体Fc区包含下述(a)至(c)中任一个的氨基酸改变:(a)位置267、268及324,(b)位置236、267、268、324及332,及(c)位置326及333。

[0062] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置267处的Glu,(b)位置268处的Phe,(c)位置324处的Thr,(d)位置236处的Ala,(e)位置332处的Glu,(f)位置326处的Ala、Asp、Glu、Met或Trp,及(g)位置333处的Ser。

[0063] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区进一步包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置434处的Ala,(b)位置434处的Ala、位置436处的Thr、位置438处的Arg及位置440处的Glu,(c)位置428处的Leu、位置434处的Ala、位置436处的Thr、位置438处的Arg及位置440处的Glu,及(d)位置428处的Leu、位置434处的Ala、位置438处的Arg及位置440处的Glu。

[0064] 本发明提供多肽,其包含SEQ ID NO:51-59中任一个的氨基酸序列。

[0065] 进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0066] (a) (i)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,及(iii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

[0067] (b) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,及(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

[0068] (c) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或

[0069] (d) (i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0070] 在进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:选自由3CH1047(SEQ ID NO:6)和3CH1049(SEQ ID NO:95)组成的组的VH变体序列,并具有选自由SG182(SEQ ID NO:46)、SG1095(SEQ ID NO:54)和SG1106(SEQ ID NO:59)组成的组的人IgG1 CH序列;和选自由3CL(SEQ ID NO:7)和3CL633(SEQ ID NO:98)组成的组的VL变体序列,并具有CL序列SK1(SEQ ID NO:60)。

附图说明

[0071] 图1 (A) - (D) 显示如实施例2中所述的针对DENV-1E蛋白 (A)、DENV-2E蛋白 (B)、DENV-3E蛋白 (C) 和DENV-4E蛋白 (D) 的抗DENV抗体3C和3Cam的**BIACORE**[®] 传感图。

[0072] 图2显示如实施例4中所述的具有不同Fc变体的抗体针对人C1q的结合亲和力。通过ELISA测量结合活性。测试的Fc变体是: WT、LALA+KWES、LALA+EFT+AE、LALA+EFT和LALA。

[0073] 图3显示如实施例4中所述的具有不同Fc变体的抗体针对人C1q的结合亲和力。通过ELISA测量结合活性。测试的Fc变体是: WT、LALA、LALA+KWES、LALA+KAES、LALA+KDES、LALA+KEES和LALA+KMES。

[0074] 图4显示如实施例4中所述的具有不同Fc变体的抗体针对人C1q的结合亲和力。通过ELISA测量结合活性。测试的Fc变体是: WT、LALA、LALA+ACT3、LALA+ACT5、LALA+KAES、LALA+ACT3+KAES和LALA+ACT5+KAES。

[0075] 图5显示如实施例4中所述的具有不同Fc变体的抗体针对小鼠C1q的结合亲和力。通过ELISA测量结合活性。测试的Fc变体是: WT、LALA、LALA+ACT3、LALA+ACT5、LALA+KAES、LALA+ACT3+KAES和LALA+ACT5+KAES。

[0076] 图6 (a) - (h) 显示如实施例5中所述的Fc变体与人Fc γ R结合的Biacore分析。测试的Fc变体是: WT (在图中描述为WT IgG)、KWES、EFT+AE、EFT、KAES、LALA+KWES、LALA+EFT+AE、LALA+EFT、LALA、LALA+ACT3、LALA+ACT5、LALA+KAES、LALA+KAES+ACT3和LALA+KAES+ACT5。针对与Fc γ R的结合测试这些Fc变体, 包括: (a) 人Fc γ R1a, (b) 人Fc γ R2a等位基因变体167H, (c) 人Fc γ R2a等位基因变体167R, (d) 人Fc γ R2b, (e) 人Fc γ R3a等位基因变体158F, (f) 人Fc γ R3a等位基因变体158V, (g) 人Fc γ R3b等位基因变体NA1, 和 (h) 人Fc γ R3b等位基因变体NA2。每种Fc变体均以具有Fc变体的单独抗体 (描述为仅Ab) 的形式以及以抗体和三聚体CD154抗原形成的免疫复合物 (描述为CD154IC) 的形式进行评估。

[0077] 图7 (a) - (d) 显示如实施例5中所述的Fc变体与小鼠Fc γ R结合的Biacore分析。测试的Fc变体是: WT (在图中描述为WT IgG)、KWES、EFT+AE、EFT、KAES、LALA+KWES、LALA+EFT+AE、LALA+EFT、LALA、LALA+ACT3、LALA+ACT5、LALA+KAES、LALA+KAES+ACT3和LALA+KAES+ACT5。针对与Fc γ R的结合测试这些Fc变体, 包括: (a) 小鼠Fc γ R1, (b) 小鼠Fc γ R2b, (c) 小鼠Fc γ R3, 和 (d) 小鼠Fc γ R4。每种Fc变体均以具有Fc变体的单独抗体 (描述为仅Ab) 的形式以及以抗体和三聚体CD154抗原形成的免疫复合物 (描述为CD154IC) 的形式进行评估。

[0078] 图8显示如实施例5中所述的Fc变体与人FcRn结合的Biacore分析。测试的Fc变体是: WT (在图中描述为hIgG1)、LALA、LALA+ACT3、LALA+ACT5、LALA+KAES、LALA+KAES+ACT3和LALA+KAES+ACT5。每种Fc变体均以具有Fc变体的单独抗体 (描述为仅Ab) 的形式以及以抗体和三聚体CD154抗原形成的免疫复合物 (描述为CD154IC) 的形式进行评估。

[0079] 图9显示如实施例6中所述的在AG129小鼠中DENV-2病毒感染后第3天的病毒血症。在病毒感染后第2天施用抗DENV抗体3C和3Cam与WT (描述为hIgG1) 的Fc变体、LALA以及LALA+KAES的组合, 或作为阴性对照的PBS。

[0080] 图10显示在AG129小鼠中DENV1-4病毒感染后第3日的病毒血症, 如实施例6所述。病毒感染后第2日施用与相同的Fc变体 (LALA+KAES) 组合的抗DENV抗体3C及3Cam或作为阴性对照的P1缓冲液。LOD: 检测极限。各符号表示来自一只小鼠的病毒血症。使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 测试计算组间的显著差异。

[0081] 图11显示在AG129小鼠中DENV2病毒感染后第3日的病毒血症,如实施例6所述。病毒感染后第2日施用抗DENV抗体3Cam2-LALA及3Cam2-LALA+KAES或作为阴性对照的P1缓冲液。

[0082] 图12 (A) - (D) 显示如实施例2中所述的针对DENV-1E蛋白 (A)、DENV-2E蛋白 (B)、DENV-3E蛋白 (C) 和DENV-4E蛋白 (D) 的抗DENV抗体3C和3Cam2的BIACORE[®]传感图。

[0083] 图13 (A) - (B) 显示利用BHK-21-DC-SIGN细胞的寨卡病毒中和测定。使用寨卡病毒株KF993678。各数据点来自一个测量。在第一实验 (A) 中,3Cam2-LALA+KAES+ACT5的近似NT50为0.33 μ g/mL且3C-LALA+KAES+ACT5的近似NT50为5.33 μ g/mL。在第二实验 (B) 中,3Cam2-LALA+KAES+ACT5的近似NT50为0.93 μ g/mL。

[0084] 图14 (A) - (B) 显示对于寨卡病毒的K562细胞ADE测定。使用寨卡病毒株KF993678。A) 对于3Cam2的野生型版本可观察到增强,但对于其Fc变体3Cam2-LALA+KAES及3Cam2-LALA+KAES+ACT5则未观察到。INFECTED:无抗体添加。显示n=2的平均值 $\pm$ 误差(范围)。B) 利用新批次的3Cam2-LALA+KAES+ACT5重复实验,利用3Cam2的野生型版本作为对照。显示n=2的平均值 $\pm$ 误差(范围)。

[0085] 图15显示针对寨卡病毒感染的体内功效。将小鼠用寨卡病毒i.p.感染且于感染后二日用100 μ g的3Cam2-LALA+KAES+ACT5 (3Cam2-SG1106) 或3C-LALA+KAES+ACT5 (3C-SG1106) i.v.处理。使用P1缓冲液作为对照。每个点表示一只小鼠,并显示平均值 $\pm$ SD。使用Kruskal Wallis测试显著性,*: $p>0.05$,**: $p>0.005$ 。

[0086] 图16显示经寨卡病毒感染的IFNAR小鼠在抗体处理后的存活。将小鼠用寨卡病毒i.p.感染且于感染后二日利用100 μ g的3Cam2-LALA+KAES+ACT5或3C-LALA+KAES+ACT5 i.v.处理。使用P1缓冲液作为对照。显示了感染后40日各组的存活百分比。

[0087] 图17显示3C、3C-LALA及3Cam2-LALA+KAES+ACT5单克隆抗体对ZIKV的结合活性。结合ELISA在经纯化的ZIKV病毒体上成曲线。

[0088] 图18显示3C、3C-LALA及3Cam2-LALA+KAES+ACT5人类抗体针对ZIKV的体外中和活性。显示了病毒与抗体温育,相较于仅单独病毒的相对感染性。使用了两个不同批次的3C及3C-LALA(旧的和新的)。

[0089] 图19 (A) 至 (B) 显示抗体处理在IFN α R KO小鼠中预防ZIKV-诱发的先天性发育不良。(A) 来自模拟感染小鼠 (a),施用同种型抗体的ZIKV-感染小鼠 (b),用3C-LALA处理的ZIKV-感染的小鼠 (c),及用3Cam2-LALA+KAES+ACT5处理的ZIKV-感染的小鼠 (d) 的代表性胎儿。(B) 各组 (n) 中的胎儿重量:全身重 (a) 及头重 (b)。每个点表示1个胎儿。

[0090] 图20 (a) - (d) 显示抗体处理显著地降低由母体至胎儿的ZIKV传输。羊水 (a)、胎盘 (b)、胎儿脑 (c) 及胎儿肝 (d) 中的病毒载量。每个点表示1个胎儿,各组中n $\geq$ 7。

[0091] 本发明实施方案详述

[0092] 本文描述或引用的技术和程序通常被本领域技术人员使用常规方法学很好地理解和使用,诸如,例如以下文献中广泛利用的方法学: Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual第三版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel等编, (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor编. (1995)), Harlow和Lane编 (1988)

Antibodies, A Laboratory Manual, 和 Animal Cell Culture (R.I. Freshney 编 (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 编, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis 编, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney) 编, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather 和 P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths 和 D.G. Newell 编, 1993-8) J. Wiley 和 Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller 和 M.P. Calos 编, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等编, 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 等编, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley 和 Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway 和 P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty. 编, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd 和 C. Dean 编, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow 和 D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 和 J.D. Capra 编, Harwood Academic Publishers, 1995); 以及 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita 等编, J.B. Lippincott Company, 1993)。

[0093] I. 定义

[0094] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第二版, J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), 和 March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第四版, John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992), 为本领域技术人员提供本申请中使用的许多术语的一般指南。本文引用的所有参考文献, 包括专利申请和出版物, 均通过引用以其整体并入。

[0095] 出于解释本说明书的目的, 将应用以下定义, 并且在适当时, 以单数使用的术语也将包括复数的, 反之亦然。需理解, 本文使用的技术仅用于描述特定实施方案的目的, 而不是限制性的。如果下面列出的任何定义与通过引用并入本文的任何文件冲突, 则以以下列出的定义为准。

[0096] 用于本文目的的“受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域 (VL) 框架或重链可变结构域 (VH) 框架的氨基酸序列的框架, 如下文定义的。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列, 或者它可以含有氨基酸序列改变。在一些实施方案中, 氨基酸变化的数量为 10 或更少、9 或更少、8 或更少、7 或更少、6 或更少、5 或更少、4 或更少、3 或更少或 2 或更少。在一些实施方案中, VL 受体人框架在序列上与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0097] “亲和力”指分子 (例如, 抗体) 的单个结合位点与其结合配偶体 (partner) (例如抗原) 之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明, 否则如本文所用, “结合亲和力”是指内在结合亲和力, 其反映结合对的成员 (例如, 抗体和抗原) 之间的 1:1 相互作用。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力一般可由解离常数 (Kd) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量, 包括本文所述的那些。用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案描述

如下。

[0098] “亲和力成熟的”抗体是指在一个或更多个高变区 (HVR) 中具有一个或更多个改变的抗体,与不具有这种改变的亲本抗体相比,这种改变导致抗体针对抗原的亲和力提高。

[0099] 术语“抗DENV抗体”和“结合DENV的抗体”是指能够以足够的亲和力结合DENV的抗体,使得该抗体可用作靶向DENV的诊断和/或治疗剂。抗体可以与DENV的E蛋白结合。术语“抗DENV E蛋白抗体”和“结合DENV E蛋白的抗体”是指能够以足够的亲和力结合DENV E蛋白的抗体,使得该抗体可用作靶向DENV的诊断和/或治疗剂。在一个实施方案中,例如通过放射免疫测定法 (RIA) 测量,抗DENV E蛋白抗体与不相关蛋白 (其不是DENV E蛋白) 的结合程度小于抗体与DENV E蛋白结合的约10%。在某些实施方案中,结合DENV和/或DENV E蛋白的抗体具有1微M或更小、100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、0.1nM或更小、0.01nM或更小或0.001nM或更小 (例如 10^{-8} M或更小,例如 10^{-8} M至 10^{-13} M,例如 10^{-9} M至 10^{-13} M) 的解离常数 (Kd)。在某些实施方案中,抗DENV抗体结合DENV的表位,所述表位在来自不同血清型的DENV中是保守的。在某些实施方案中,抗DENV E蛋白抗体结合DENV E蛋白的表位,所述表位在来自不同血清型的DENV E中是保守的。

[0100] 术语“抗寨卡病毒抗体”、“抗寨卡抗体”、“抗-ZIKV抗体”及“结合寨卡病毒的抗体”是指能以充分的亲和力结合寨卡病毒的抗体,使得该抗体可用于作为靶向寨卡病毒的诊断、预防和/或治疗剂。术语“抗-ZIKV抗体”及“抗DENV抗体”可交换使用,指能结合ZIKV病毒及DENV的抗体。

[0101] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 和抗体片段,只要它们显示出期望的抗原结合活性。

[0102] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞毒性的一种形式,其中分泌的Ig结合到某些细胞毒性细胞 (例如NK细胞、中性粒细胞和巨噬细胞) 上存在的Fc受体 (FcR) 上,使这些细胞毒性效应物细胞特异性结合至携带抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细胞。用于介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991) 的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估感兴趣的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利No.5,500,362或5,821,337或美国专利No.6,737,056 (Presta) 中所述的测定。用于此类测定的有效效应细胞包括PBMC和NK细胞。备选地,或另外,感兴趣的分子的ADCC活性可以在体内例如在动物模型 (诸如公开于Clynes等PNAS (USA) 95:652-656 (1998) 的动物模型) 中评估。

[0103] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含与完整抗体结合的抗原结合的完整抗体的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子 (例如scFv); 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0104] 作为参照抗体的“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中阻断参照抗体与其抗原结合的抗体,相反,参照抗体在竞争测定中阻断抗体与其抗原的结合。本文提供了示例性竞争测定。

[0105] “C1q”是包含免疫球蛋白Fc区的结合位点的多肽。C1q与两种丝氨酸蛋白酶C1r和C1s一起形成复合物C1,其是补体依赖性细胞毒性 (CDC) 途径的第一组分。人C1q可以从例如

从Quidel, San Diego, CA商业购买。

[0106] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的抗体。

[0107] 抗体的“类”是指其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要类别的抗体: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0108] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活通过补体系统的第一组分(C1q)与(适当亚类的)抗体的结合来启动,所述抗体与其同源抗原结合。为了评估补体激活,进行CDC测定,例如,如Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996) 中所述。具有改变的Fc区氨基酸序列和提高或降低的C1q结合能力的多肽变体(具有变体Fc区的多肽)描述于例如美国专利No. 6,194,551 B1和WO 1999/51642中。还见,例如Idusogie等J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)。

[0109] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、²¹²Pb和Lu的放射性同位素);化疗剂或药物(例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;诸如核溶酶的酶及其片段;抗生素;毒素诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及下面公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0110] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,所述抗体Fc区随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B细胞激活。

[0111] 药剂(例如药物制剂)的“有效量”,是指在必要的剂量和时间段上有效实现期望治疗或预防结果的量。

[0112] 术语“表位”包括能够被抗体结合的任何决定簇。表位是抗原的区域,其被靶向该抗原的抗体结合,并且包括直接接触抗体的特定氨基酸。表位决定簇可以包括分子(诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基)的化学活性表面基团,并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常,对特定靶抗原特异的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中靶抗原上的表位。

[0113] “Fc受体”或“FcR”描述了结合抗体Fc区的受体。在一些实施方案中,FcR是天然人FcR。在一些实施方案中,FcR是结合IgG抗体的(γ 受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和备选剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要在其细胞质结构域中不同的相似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(见,例如Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)。)FcR综述于,例如Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994);以及de Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)。本文的术语“FcR”涵盖其他

FcR,包括将来要鉴定的FcR。

[0114] 术语“Fc受体”或“FcR”也包括新生儿受体,FcRn,其负责转运母体IgG至胎儿(Guyer等,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994))和免疫球蛋白内稳态的调节。测量与FcRn结合的方法是已知的(见,例如Ghetie and Ward.,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等,Nature Biotechnology 15(7):637-640(1997);Hinton等,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等)。可以在例如表达人FcRn的转基因小鼠或经转染的人细胞系中,或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类中测定体内与人FcRn的结合和人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期。WO 2000/42072(Presta)描述了具有与FcR的改善或减弱的结合的抗体变体。还见,例如,Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0115] 本文所用的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的含有恒定区的至少一部分的C末端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226或自Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(残基446-447)可以存在或不存在。除非本文另有规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号依照EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所描述。

[0116] 术语“包含Fc区的抗体”是指包含Fc区的抗体。可以例如在抗体纯化期间或通过编码抗体的核酸的重组工程去除Fc区的C-末端赖氨酸(残基447)或甘氨酸-赖氨酸(残基446-447)。因此,包含根据此发明的具有Fc区的抗体的组合物可以包含具有G446-K447的,具有G446且不具有K447的,去除了所有G446-K447的抗体,或者上述三种类型抗体的混合物。

[0117] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变域残基。可变结构域的FR一般由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下列顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0118] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指具有与天然抗体结构基本相似的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0119] “功能性Fc区”拥有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性效应子功能包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调等。这种效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合,并且可以使用例如,在本文的定义中公开的各种测定法测定。

[0120] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文包括具有与在初始经转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变后代。

[0121] “人抗体”是拥有与由人或人细胞产生的抗体、或衍生自利用人抗体全集或其它人抗体编码序列的非人源的抗体对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0122] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基

酸残基的框架。一般地,人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变结构域序列的亚组。通常,序列亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD (1991),vols.1-3的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组是如Kabat等,同上中所述的亚组 κ I。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组是如Kabat等,同上中所述的亚组III。

[0123] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上全部可变域,在其中全部的或基本上全部的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部的或基本上全部的FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”,是指已经历人源化的抗体。

[0124] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中在序列上是高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的每个区。抗体一般包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文示例性的HVR包括:

[0125] (a) 出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)处的高可变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0126] (b) 出现在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)处的CDR(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0127] (c) 出现在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)及93-101(H3)处的抗原接触(MacCallum等人J.Mol.Biol.262:732-745(1996));及

[0128] (d) (a)、(b)、和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)及94-102(H3)。

[0129] 除非另有说明,可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)依照Kabat等,同上中所述的编号。

[0130] “免疫缀合物”是与一种或更多种异源分子缀合的抗体,包括但不限于细胞毒剂。

[0131] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马),灵长类动物(例如人和诸如猴的非人灵长类动物),兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0132] “分离的”抗体是指已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述,见例如Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0133] “分离的”核酸是指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0134] “编码抗体的分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一种或更多种核酸分子,包括在单一载体或单独的载体中的这种核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一

个或更多个位置的这种核酸分子。

[0135] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,构成群体的个体抗体是一致的和/或结合相同的表位,除了可能的变体抗体,例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生,这些变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法和用于制备本文所述单克隆抗体的其他示例性方法。

[0136] “裸抗体”是指未与异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0137] “天然抗体”是指具有各种结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键键合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N-末端到C-末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,接着是三个恒定结构域(CH1,CH2和CH3)。类似地,从N-末端到C-末端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,然后是恒定轻(CL)结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列,抗体的轻链可以被分配为两种类型(称为kappa(κ)和lambda(λ))中的一种。

[0138] “天然序列Fc区”包含与在自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列的人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。

[0139] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的说明书,其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0140] 相对于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,在比对序列和引入缺口后,如果必要的话,实现最大百分比序列同一性,并且不将任何保守置换认为是序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)软件或GENETYX(注册商标)(Genetyx Co.,Ltd.)。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0141] ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech股份有限公司编写,并且源代码已经与美国版权局华盛顿D.C.,20559的用户文件一起提交,其注册在美国版权登记号TXU510087下。ALIGN-2程序可从加州南旧金山Genentech股份有限公司公开获得,或者可以从源代码编译。应当编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字化UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,且不变。在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A对、与、或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可以备选地表示为具有或包含对、与或针对给定氨基酸序列B一定的%氨基酸序列同一性的给定的氨基酸序列A),如下计算:

[0142] 100乘以分数X/Y

[0143] 其中X是通过序列比对程序ALIGN-2在A和B的程序的比对中得分为相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中氨基酸残基的总数。会理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。除非另外具体陈述,否则本文使用的所有%氨基酸序列同一性值如前一段中所述的均使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0144] 术语“药物制剂”指制剂,其所处形式使得容许其中含有的活性成分的生物学活性是有效的,且不含对会接受制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分的制剂。

[0145] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0146] 除非另有说明,本文所用的术语“DENV E蛋白”是指来自任何DENV血清型(包括DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4)的任何天然DENV E蛋白。DENV基因组编码三种结构(衣壳(C)、前膜/膜(prM/M)和包膜(E))和七种非结构(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5)蛋白。E蛋白,一种约55kDa的糖蛋白,在病毒粒子成熟之前作为具有PrM蛋白的异二聚体存在。E蛋白胞外域的X射线晶体学研究已经揭示了通过螺旋茎锚和两个反平行跨膜结构域与病毒膜连接的三个不同的 β -桶(beta-barrel)结构域。结构域III(EDIII)采用免疫球蛋白样折叠,并且已被认为在受体相互作用中起关键作用。结构域II(EDII)是由两个长的类指结构组成的细长结构域,在尖端含有高度保守的13个氨基酸融合环(EDII-FL),并参与E蛋白的膜融合和二聚化。中心结构域(结构域I;EDI)是九链 β -桶,其分别通过一个和四个柔性接头与EDIII和EDII连接。E蛋白在病毒的生命周期中对病毒组装、受体附着、进入、病毒融合和可能的免疫逃避很重要,因此是在病毒颗粒上采用几种不同构象和排列所需的动态蛋白质。该术语涵盖“全长”的未加工的DENV E蛋白以及源自细胞中的加工的任何形式的DENV E蛋白。该术语还包括天然存在的DENV E蛋白,例如血清型变体和准种。

[0147] 如本文所用,“寨卡(Zika)病毒(ZIKV)”为病毒家族黄病毒科的成员。它由白天活跃的伊蚊(*Aedes mosquitoes*),如埃及伊蚊(*A.aegypti*)和白纹伊蚊(*A.albopictus*)传播。ZIKV基因组编码单一的3419个氨基酸的多蛋白,该蛋白被病毒丝氨酸和细胞弗林蛋白酶分解为功能性结构域:衣壳(C)、膜前体(prM)、包膜(E)和7个非结构蛋白(NS)。

[0148] 本文所用的短语“实质性减少”、“实质性增加”或“实质性不同”是指两个数值之间的足够程度的差异(通常一个与分子相关,另一个与参照/比较分子相关),使得本领域技术人员将认为两个值之间的差异在由所述值(例如,Kd值)测量的生物学特征背景下具有统计显著性。

[0149] 如本文所用,“治疗”(及其语法变体,例如“进行治疗”)是指试图改变所治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理期间进行。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减弱、预防转移、疾病进展速度的降低、疾病状态的改善或减轻、缓解或预后的改善。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

[0150] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链中涉及抗体结合抗原的结构域。天然抗体的重链和轻链可变结构域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每个结构域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)(见例如Kindt等Kuby Immunology,第6版,

W.H.Freeman和Co.,第91页(2007).)单个VH或VL结构域可以足以赋予抗原结合特异性。另外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域筛选互补VL或VH域的文库来分离结合特定抗原的抗体。见例如,Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0151] “变体Fc区”包含通过至少一个氨基酸修饰(改变),优选一个或更多个氨基酸置换而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。优选地,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸置换,例如,天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中的约1至约10个氨基酸置换,和优选地约1个至约5个氨基酸置换。本文的变体Fc区优选具有与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区至少约80%的同源性,且最优选地与其至少约90%的同源性,更优选地与其至少约95%的同源性。

[0152] 如本文所使用的,术语“载体”指能够传播与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体及整合入已接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够引导它们可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0153] II.组合物及方法

[0154] 在一个方面,本发明部分基于抗DENV抗体及其用途。在某些实施方案中,提供了与DENV和/或DENV E蛋白结合的抗体。本发明的抗体可用于例如诊断或治疗DENV感染。

[0155] 在一个方面,本发明部分基于包含变体Fc区的多肽及其用途。在某些实施方案中,提供了包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性的变体Fc区的多肽。在某些实施方案中,提供了包含不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区的多肽。在特定的实施方案中,本发明的多肽是抗体。包含本发明的变体Fc区的多肽可用于例如病毒感染的诊断或治疗。

[0156] 在一方面,本发明部分基于抗-ZIKV抗体及其用途。在某些实施方案中,提供了结合ZIKV的抗体。在某些实施方案中,提供了对DENV具有交叉反应性的抗-ZIKV抗体。

[0157] 在一方面,本发明部分基于用于治疗或预防寨卡感染的方法,包含施用结合ZIKV的抗体。在一方面,本发明部分基于用于抑制寨卡病毒从怀孕的母体传递到胎儿的方法,其包括施用结合ZIKV的抗体。在一方面,本发明部分基于用于预防先天性寨卡综合征的方法,其包括施用结合ZIKV的抗体。在一方面,本发明部分基于用于抑制胎儿重量(例如整个婴儿、头部等)减少的方法,其包括施用结合ZIKV的抗体。

[0158] 在一个实例中,术语“先天性寨卡综合征”是指出生缺陷的独特模式,这种模式对于出生前被寨卡病毒感染的胎儿和婴儿是独特的。如本领域技术人员将理解的,患有先天性寨卡综合征的受试者可能表现出以下症状,例如但不限于先天性发育缺陷、小头畸形、头骨已部分塌陷的严重小头畸形、具有特定脑损伤模式的脑组织减少,包括皮质下钙化、对眼后的损伤(包括黄斑瘢痕和局灶性色素性视网膜斑驳)、先天性挛缩(如畸形足或关节挛缩)、出生后很快限制身体运动的张力过强等。相信本文所述抗体的施用将预防先天性寨卡综合征的至少一种(或至少两种或至少三种或至少四种或全部)症状。例如,本文所述的抗体可防止胎儿或婴儿在出生前感染寨卡病毒,从而抑制胎儿重量的减轻(例如整个婴儿、头部等)。

[0159] 在一方面,本节(II.组合物及方法)中所述的术语“抗DENV抗体”可以用来指代能够结合ZIKV的抗体(“抗ZIKV抗体”),只要该抗体能够结合DENV和ZIKV。在一方面,本发明提

供了用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法,包括施用结合寨卡病毒的抗体(“抗ZIKV抗体”)。在一方面,本发明提供了抑制寨卡病毒从怀孕的母体传递到胎儿的方法,其包括施用结合寨卡病毒的抗体。

[0160] A. 示例性抗DENV抗体及包括变体Fc区的多肽

[0161] 在一方面,本发明提供结合DENV和/或DENV E蛋白的分离的抗体。在某些实施方案中,抗DENV抗体阻断DENV和/或DENV E蛋白与宿主细胞的结合。在某些实施方案中,抗DENV抗体抑制DENV进入宿主细胞。在某些实施方案中,抗DENV抗体结合整个DENV颗粒。在进一步的实施方案中,抗体与整个DENV颗粒的结合比结合单体DENV E蛋白更好。在某些实施方案中,本发明的抗DENV抗体结合和/或中和选自自由DENV血清型1 (DENV-1), DENV血清型2 (DENV-2), DENV血清型3 (DENV-3) 和DENV血清型4 (DENV-4) 组成的组中的至少一种、至少两种、至少三种或所有四种DENV血清型。在某些实施方案中,抗DENV抗体结合和/或中和衍生自选自自由DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4组成的组中的至少一种、至少两种、至少三种或所有四种DENV血清型的DENV E蛋白。“血清型”是指病毒物种内的不同变异。

[0162] 在一方面,本发明提供结合ZIKV的分离的抗体。在一些实施方案中,抗-ZIKV抗体阻断ZIKV与宿主细胞的结合。在一些实施方案中,抗-ZIKV抗体抑制ZIKV进入宿主细胞。在一些实施方案中,抗-ZIKV抗体对DENV具有交叉反应性。在一方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11-12中任一项的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13-15中任一项的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16-20中任一项的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21-23中任一项的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24-26中任一项的氨基酸序列;及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27-30中任一项的氨基酸序列。

[0163] 在另一方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列。

[0164] 在另一方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0165] 在另一方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列; (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0166] 在一方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH VHR序列: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11-12中任一项的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13-15中任一项的氨基酸序列;及 (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16-

20中任一项的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:16-20中任一项的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3和含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。在进一步的实施方案中,抗体包含含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3,含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3,和含SEQ ID NO:13-15中任何一个的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含(a)含SEQ ID NO:11-12中任何一个的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:13-15中任何一个的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3。

[0167] 在另一个方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列:(a)含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3和含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。在进一步的实施方案中,抗体包含含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3,含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3,和含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,所述抗体包含(a)含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3。

[0168] 在另一个方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列:(a)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3和含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,所述抗体包含含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3和含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L3。在进一步的实施方案中,抗体包含含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3,含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3,和含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3,含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L3,和含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,所述抗体包含(a)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3。

[0169] 在另一个方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列:(a)含SEQ ID NO:21-23中任何一个的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:24-26中任何一个的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,抗体包含(a)含SEQ ID NO:21-23中任何一个的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:24-26中任何一个的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。

[0170] 在另一个方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列:(a)含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,所述抗体包含(a)含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:44的氨基

酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。

[0171] 在另一个方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列:(a)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,所述抗体包含(a)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0172] 另一方面,本发明的抗体包含(a)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域:(i)含SEQ ID NO:11-12中任何一个的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)含SEQ ID NO:13-15中任何一个的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域:(i)含SEQ ID NO:21-23中任何一个的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)含SEQ ID NO:24-26中任何一个的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。

[0173] 另一方面,本发明的抗体包含(a)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域:(i)含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域:(i)含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。

[0174] 另一方面,本发明的抗体包含(a)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域:(i)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域:(i)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0175] 另一方面,本发明的抗体包含(a)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域:(i)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域:(i)含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L3。

[0176] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含(a)含SEQ ID NO:11-12中任何一个的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:13-15中任何一个的氨基酸序列的HVR-H2;(c)含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3;(d)含SEQ ID NO:21-23中任何一个的氨基酸序列的HVR-L1;(e)含SEQ ID NO:24-26中任何一个的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。

[0177] 在另一方面,本发明提供抗体,其包含(a)含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H1,(b)含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H2,(c)含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3,(d)含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L1,(e)含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-

L2,和(f)含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。

[0178] 在另一方面,本发明提供抗体,其包含(a)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2;(c)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3;(d)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1;(e)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0179] 在另一方面,本发明提供抗体,其包含(a)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1,(b)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,(c)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3,(d)含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L1,(e)含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L3。

[0180] 在某些实施方案中,如上提供的抗DENV抗体的任何一个或更多个氨基酸在以下HVR位置处被置换:(a)在HVR-H1(SEQ ID NO:11)中,在位置2和4处;(b)在HVR-H2(SEQ ID NO:13)中,在位置9和10处;(c)在HVR-H3(SEQ ID NO:16)中,在位置3、14和16处;(d)在HVR-L1(SEQ ID NO:21)中,在位置5和8处;(e)在HVR-L2(SEQ ID NO:24)中,在位置4和7处;(f)在HVR-L3(SEQ ID NO:27)中,在位置4和5处。

[0181] 在某些实施方案中,抗DENV抗体的一个或更多个氨基酸置换是保守置换,如本文提供的。在某些实施方案中,可以对任何一个或更多个以下置换进行任意组合:(a)HVR-H1(SEQ ID NO:11),N2Y;I4M;(b)HVR-H2(SEQ ID NO:13),T9R;A10R;(c)HVR-H3(SEQ ID NO:16),R3E;R14F;G16D或L;(d)HVR-L1(SEQ ID NO:21),D5E;K8Q;(e)HVR-L2(SEQ ID NO:24),N4E;T7F;以及(f)HVR-L3(SEQ ID NO:27),D4S或E;D5A。

[0182] 上述置换的所有可能组合分别由针对HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的SEQ ID NO:40、41、42、43、44和45的共有序列涵盖。

[0183] 在进一步的实施方案中,本发明的抗DENV抗体不是包含(i)含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2,(iii)含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H3,(iv)含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L1,(v)含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L2,和(vi)含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L3的抗体。

[0184] 在另一个方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR:(a)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1;(b)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2;(c)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3;(d)来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L1;(e)来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L2;和(f)来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3;

[0185] 在另一个方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR:(a)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1;(b)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2;(c)来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3;(d)来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L1;(e)来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L2;和(f)来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L3。

[0186] 在另一个方面,本发明提供抗DENV抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR:(a)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1;(b)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2;(c)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3;(d)来自SEQ ID NO:10的VL序

列的HVR-L1; (e) 含SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L2; 和(f) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。

[0187] 在另一个方面, 本发明提供抗DENV抗体, 其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自如下各项的HVR: (a) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1; (b) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2; (c) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3; (d) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L1; (e) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L2; 和(f) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3。

[0188] 在一个方面, 本发明提供了抗体, 其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列: (a) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1; (b) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2; 和(c) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3。在一个实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3。在另一个实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3和来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3和来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L3。在进一步的实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3, 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3, 和来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3, 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L3, 和来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中, 所述抗体包含(a) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1; (b) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2; 和(c) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3。

[0189] 在一个方面, 本发明提供了抗体, 其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列: (a) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1; (b) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2; 和(c) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3。在一个实施方案中, 所述抗体包含来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3。在另一个实施方案中, 抗体包含来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3和来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 抗体包含来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3和来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3。在进一步的实施方案中, 抗体包含来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3, 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3, 和来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中, 抗体包含来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3, 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3, 和来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中, 抗体包含(a) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1; (b) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2; (c) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3。

[0190] 在一个方面, 本发明提供了抗体, 其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列: (a) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L1; (b) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L2; 和(c) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3。在一个实施方案中, 所述抗体包含(a) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L1; (b) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L2; 和(c) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3。

[0191] 在另一个方面, 本发明提供了抗体, 其包含选自以下各项的至少一个、至少两个、

或全部三个VL HVR序列：(a) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L1；(b) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L2；和(c) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。在一个实施方案中，抗体包含(a) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L1；(b) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L2；和(c) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。

[0192] 在另一方面，本发明的抗体包含(a) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域：(i) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1，(ii) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2，和(iii) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3；和(b) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域：(i) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L1，(ii) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L2，和(iii) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3。

[0193] 在另一方面，本发明的抗体包含(a) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域：(i) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1，(ii) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2，和(iii) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3；和(b) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域：(i) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L1，(ii) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L2，和(iii) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L3。

[0194] 在另一方面，本发明的抗体包含(a) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域：(i) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1，(ii) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2，和(iii) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3；和(b) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域：(i) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L1，(ii) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L2，和(iii) 来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。

[0195] 在另一方面，本发明的抗体包含(a) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VH HVR序列的VH结构域：(i) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1，(ii) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2，和(iii) 来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3；和(b) 含选自以下各项的至少一个、至少两个、或全部三个VL HVR序列的VL结构域：(i) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L1，(ii) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L2，和(iii) 来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3。

[0196] 在另一个方面，本发明提供抗体，其包含(a) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1；(b) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2；(c) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3；(d) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L1；(e) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L2；和(f) 来自SEQ ID NO:8-10中任何一个的VL序列的HVR-L3；

[0197] 在另一个方面，本发明提供抗体，其包含(a) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H1；(b) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H2；(c) 来自SEQ ID NO:2-6中任何一个的VH序列的HVR-H3；(d) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L1；(e) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的VL序列的HVR-L2；和(f) 来自SEQ ID NO:7中任何一个的

VL序列的HVR-L3。

[0198] 在另一个方面,本发明提供抗体,其包含(a)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1;(b)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2;(c)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3;(d)来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L1;(e)含SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L2;和(f)来自SEQ ID NO:10的VL序列的HVR-L3。

[0199] 在另一个方面,本发明提供抗体,其包含(a)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H1;(b)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H2;(c)来自SEQ ID NO:6的VH序列的HVR-H3;(d)来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L1;(e)含SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L2;和(f)来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3。

[0200] 在进一步的实施方案中,发明的抗DENV抗体不是包含以下各项的抗体:(i)来自SEQ ID NO:1的VH序列的HVR-H1,(ii)来自SEQ ID NO:1的VH序列的HVR-H2,(iii)来自SEQ ID NO:1的VH序列的HVR-H3,(iv)来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L1,(v)来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L2,和(vi)来自SEQ ID NO:7的VL序列的HVR-L3。

[0201] 在任何上述实施方案中,抗DENV抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗DENV抗体包含如任何上述实施方案中的HVR,并且还包含受体人框架,例如,人免疫球蛋白框架或人共有框架。在另一个实施方案中,抗DENV抗体包含如任何上述实施方案中的HVR,并且还包含含有FR序列的VH或VL。在进一步的实施方案中,抗DENV抗体包含以下重链和/或轻链可变结构域FR序列:对于重链可变结构域,FR1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,FR2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,FR3包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列,FR4包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。对于轻链可变结构域,FR1包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,FR2包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,FR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,FR4包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0202] 在另一方面,抗DENV抗体包含与SEQ ID NO:2-6中任何一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗DENV抗体保留结合至DENV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:2-6中任何一个中,总共1至10个氨基酸已经被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID NO:2-6中任何一个中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中,VH包含选自以下各项的一个、两个或三个HVR,(a)含SEQ ID NO:11-12中任何一个的氨基酸序列的HVR-H1,(b)含SEQ ID NO:13-15中任何一个的氨基酸序列的HVR-H2,和(c)含SEQ ID NO:16-20中任何一个的氨基酸序列的HVR-H3。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0203] 在另一方面,抗DENV抗体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗DENV抗体保留结合至DENV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:6中,

总共1至10个氨基酸已被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID NO:6中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体的实施方案中,VH包含选自以下各项的一个、两个或三个HVR:(a)含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1,(b)含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(c)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0204] 在另一方面,提供抗DENV抗体,其包含与SEQ ID NO:8-10中任何一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗DENV抗体保留结合至DENV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:8-10中任何一个中,总共1至10个氨基酸已被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID No:8-10中任何一个中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中,VL包含选自以下各项的一个、两个或三个HVR,(a)含SEQ ID NO:21-23中任何一个的氨基酸序列的HVR-L1;(b)含SEQ ID NO:24-26中任何一个的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)含SEQ ID NO:27-30中任何一个的氨基酸序列的HVR-L3。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0205] 在另一方面,提供了抗DENV抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗DENV抗体保留结合至DENV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:10中,总共1至10个氨基酸已被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID NO:10中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体的实施方案中,VH包含选自以下各项的一个、两个或三个HVR:(a)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-L1,(b)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L2,和(c)含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0206] 在另一方面,提供了抗DENV抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID No:2-6中任何一个和SEQ ID NO:8-10中任何一个中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID No:2-6中任何一个和SEQ ID NO:7中任何一个中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0207] 在另一方面,提供了抗DENV抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:10中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译

后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0208] 在进一步的方面,本发明提供了与本文提供的抗DENV抗体结合相同表位的抗体。在某些实施方案中,提供了与表位结合的抗体,所述表位包含选自由以下各项组成的组的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种或所有氨基酸:DENV-2E蛋白上的G100、W101、K122、I162、S274、K310、W391和F392。在某些实施方案中,提供了与表位结合的抗体,所述表位包含选自由以下各项组成的组的至少一种、至少两种或全部三种氨基酸:DENV-2E蛋白上的K122、I162和S274。在某些实施方案中,提供了与表位结合的抗体,所述表位进一步包含选自由以下各项组成的组的至少一种氨基酸:G100、W101、K310、W391和F392,当所述表位包含选自由以下各项组成的组的至少一个、至少两个或全部氨基酸:K122、I162和S274。

[0209] 在一方面,本发明提供用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法。在一方面,本发明提供用于抑制寨卡病毒由怀孕的母体传递至胎儿的方法。在一方面,本发明提供用于预防先天性寨卡综合征(例如,先天性发育缺陷、小头畸形等)的方法。在一方面,本发明提供用于抑制降低胎儿重量(例如,整个婴儿、头部等)的方法。

[0210] 在一个实例中,术语“先天性寨卡综合征”是指出生缺陷的独特模式,这种模式对于出生前被寨卡病毒感染的胎儿和婴儿是独特的。如本领域技术人员将理解的,患有先天性寨卡综合征的受试者可能表现出以下症状,例如但不限于先天性发育缺陷、小头畸形、头骨已部分塌陷的严重小头畸形、具有特定脑损伤模式的脑组织减少,包括皮质下钙化、对眼后的损伤(包括黄斑瘢痕和局灶性色素性视网膜斑驳)、先天性挛缩(如畸形足或关节挛缩)、出生后很快限制身体运动的张力过强等。相信本文所述抗体的施用将预防先天性寨卡综合征的至少一种(或至少两种或至少三种或至少四种或全部)症状。例如,本文所述的抗体可防止胎儿或婴儿在出生前感染寨卡病毒,从而抑制胎儿重量(例如整个婴儿、头部等)的减轻。

[0211] 在一些实施方案中,本发明的用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法包含施用结合寨卡病毒的抗体。在一些实施方案中,用于抑制寨卡病毒由怀孕的母体传递至胎儿的方法包含施用结合寨卡病毒的抗体。在一些实施方案中,本发明的用于预防先天性寨卡综合征(例如,先天性发育缺陷、小头畸形等)的方法包含施用结合寨卡病毒的抗体。在一些实施方案中,本发明的用于抑制降低胎儿重量(例如,整个婴儿、头部等)的方法包含施用结合寨卡病毒的抗体。在一个实例中,术语“先天性寨卡综合征”是指出生缺陷的独特模式,这种模式对于出生前被寨卡病毒感染的胎儿和婴儿是独特的。如本领域技术人员将理解的,患有先天性寨卡综合征的受试者可能表现出以下症状,例如但不限于先天性发育缺陷、小头畸形、头骨已部分塌陷的严重小头畸形、具有特定脑损伤模式的脑组织减少(包括皮质下钙化)、对眼后的损伤(包括黄斑瘢痕和局灶性色素性视网膜斑驳)、先天性挛缩(如畸形足或关节挛缩)、出生后很快限制身体运动的张力过强等。相信本文所述抗体的施用将预防先天性寨卡综合征的至少一种(或至少两种或至少三种或至少四种或全部)症状。例如,本文所述的抗体可防止胎儿或婴儿在出生前感染寨卡病毒,从而抑制胎儿重量(例如整个婴儿、头部等)的减轻。

[0212] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体对于登革热病毒具有交叉反应

性。

[0213] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0214] (a) (i) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为带电荷氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,X₃为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,(ii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或极性氨基酸,及(iii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸;

[0215] (b) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为极性氨基酸,X₂为疏水性氨基酸,(ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,及(iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为带电荷氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,X₃为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸;

[0216] (c) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为极性氨基酸,X₂为疏水性氨基酸,(ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为疏水性氨基酸或带电荷氨基酸,(iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为带电荷氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,X₃为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸,(iv) HVR-L1,其包含氨基酸序列QASQX₁IRX₂YLN,其中X₁为带电荷氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或极性氨基酸;(v) HVR-L2,其包含氨基酸序列DASX₁LKX₂,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为极性氨基酸或疏水性氨基酸;及(vi) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸;或

[0217] (d) (i) HVR-L1,其包含氨基酸序列QASQX₁IRX₂YLN,其中X₁为带电荷氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或极性氨基酸;(ii) HVR-L2,其包含氨基酸序列DASX₁LKX₂,其中X₁为极性氨基酸或带电荷氨基酸,X₂为极性氨基酸或疏水性氨基酸;及(iii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为带电荷氨基酸或极性氨基酸,X₂为带电荷氨基酸或疏水性氨基酸。

[0218] 如本领域技术人员将会理解的,带电荷的氨基酸包括精氨酸(R,Arg)、赖氨酸(K,Lys)、天冬氨酸(D,Asp)和谷氨酸(E,Glu);极性氨基酸包括谷氨酰胺(Q,Gln)、天冬酰胺(N,Asn)、组氨酸(H,His)、丝氨酸(S,Ser)、苏氨酸(T,Thr)、酪氨酸(Y,Tyr)、半胱氨酸(C,Cys)和色氨酸(W,Trp);疏水氨基酸包括丙氨酸(Ala,A)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、蛋氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、缬氨酸(Val,V)、脯氨酸(Pro,P)和甘氨酸(Gly,G)。

[0219] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0220] (a) (i) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L(SEQ ID NO:42),(ii) HVR-L3,其包含氨基酸序列QQFX₁X₂LPIT,其中X₁为D、S或E,X₂为D或A(SEQ ID NO:45),及(iii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R(SEQ ID NO:41);

[0221] (b) (i) HVR-H1,其包含氨基酸序列SX₁YX₂H,其中X₁为N或Y,X₂为I或M(SEQ ID NO:40),(ii) HVR-H2,其包含氨基酸序列VINPRGGSX₁X₂SAQKFQG,其中X₁为T或R,X₂为A或R(SEQ ID NO:41),及(iii) HVR-H3,其包含氨基酸序列GGX₁ALFYDSYTPX₂DX₃GSWWFDP,其中X₁为R或E,X₂为R或F,X₃为G,D或L(SEQ ID NO:42);

[0222] (c) (i) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SX_1YX_2H , 其中 X_1 为N或Y, X_2 为I或M (SEQ ID NO: 40), (ii) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 $VINPRGGSX_1X_2SAQKFQG$, 其中 X_1 为T或R, X_2 为A或R (SEQ ID NO: 41), (iii) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 $GGX_1ALFYDSYTPX_2DX_3GSWWFDP$, 其中 X_1 为R或E, X_2 为R或F, X_3 为G、D或L (SEQ ID NO: 42), (iv) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 $QASQX_1IRX_2YLN$, 其中 X_1 为D或E, X_2 为K或Q (SEQ ID NO: 43); (v) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 $DASX_1LKX_2$, 其中 X_1 为N或E, X_2 为T或F (SEQ ID NO: 44); 及 (vi) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 $QQFX_1X_2LPIT$, 其中 X_1 为D, S或E, X_2 为D或A (SEQ ID NO: 45); 或

[0223] (d) (i) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 $QASQX_1IRX_2YLN$, 其中 X_1 为D或E, X_2 为K或Q (SEQ ID NO: 43); (ii) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 $DASX_1LKX_2$, 其中 X_1 为N或E, X_2 为T或F (SEQ ID NO: 44); 及 (iii) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 $QQFX_1X_2LPIT$, 其中 X_1 为D、S或E, X_2 为D或A (SEQ ID NO: 45)。

[0224] 在一些实施方案中, 本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0225] (a) (i) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-L3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 27, 及 (iii) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 15;

[0226] (b) (i) HVR-H1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 15, 及 (iii) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 20;

[0227] (c) (i) HVR-H1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-H2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 15, (iii) HVR-H3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 20, (iv) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 21; (v) HVR-L2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 24; 及 (vi) HVR-L3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 27; 或

[0228] (d) (i) HVR-L1, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 21; (ii) HVR-L2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 24; 及 (iii) HVR-L3, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO: 27。

[0229] 在一些实施方案中, 本发明的抗体不是包含以下各项的抗体: (i) HVR-H1, 其包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列, (ii) HVR-H2, 其包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列, (iii) HVR-H3, 其包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列, (iv) HVR-L1, 其包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列, (v) HVR-L2, 其包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列, 及 (vi) HVR-L3, 其包含SEQ ID NO: 27的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中, 本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0231] (a) (i) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, (ii) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 8、9或10中任一项的VL序列, 及 (iii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列;

[0232] (b) (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, 及 (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列;

[0233] (c) (i) HVR-H1, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, (ii) HVR-H2, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, (iii) HVR-H3, 其来自SEQ ID NO: 2、3、4、5或6中任一项的VH序列, (iv) HVR-L1, 其来自SEQ ID NO: 8、9或10中任一项的VL序列; (v) HVR-L2, 其来自SEQ ID NO: 8、9或10中任一项的VL序列; 及 (vi) HVR-L3, 其来自SEQ ID NO: 8、9或10中任一项的VL序列;

[0234] (d) (i) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:8、9或10中任一项的VL序列;(ii) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:8、9或10中任一项的VL序列;及(iii) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:8、9或10中任一项的VL序列;或

[0235] (e) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:7中任一项的VL序列;(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:7中任一项的VL序列;及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:7中任一项的VL序列。

[0236] 在一些实施方案中,本发明的抗体不是包含以下各项的抗体:(i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:1的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:1的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:1的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:7的VL序列,(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:7的VL序列,及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:7的VL序列。

[0237] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体进一步包含重链可变结构域框架:包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的FR1,包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的FR2,包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列的FR3,包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的FR4。在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体进一步包含轻链可变结构域框架:包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的FR1,包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的FR2,包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的FR3,包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的FR4。

[0238] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含(a)与SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列;(b)与SEQ ID NO:8、9或10中任一项的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列;(c)SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的VH序列及SEQ ID NO:8、9或10中任一项的VL序列;或(d)SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的VH序列及SEQ ID NO:7中任一项的VL序列。

[0239] 在另一方面,抗-ZIKV抗体包含与SEQ ID NO:2-6中任一项的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗-ZIKV抗体保留结合至ZIKV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:2-6的任一项中,总计1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗-ZIKV抗体包含SEQ ID NO:2-6的任一项中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在特别的实施方案中,VH包含选自下述的一个、两个或三个HVR:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,及(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0240] 在另一方面,抗-ZIKV抗体包含与SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项的氨基酸序列具有至少96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗-ZIKV抗体保留结合至ZIKV的能力。

在某些实施方案中,在SEQ ID NO:2、3、4、5或6中任一项中,总计1至10个氨基酸已被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外侧区(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID NO:2、3、4、5或6的任一项中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在特定的实施方案中,VH包含选自下述的一个、两个或三个HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,及(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0241] 在另一方面,提供了抗-ZIKV抗体,其中抗体包含与SEQ ID NO:8、9或10中任一项的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗-ZIKV抗体保留结合至DENV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:8、9或10的任一项中,总计1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外部区域中(即,在FR中)。任选地,抗-ZIKV抗体包含SEQ ID NO:8、9或10的任一项中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在特定的实施方案中,VL包含选自下述的一个、两个或三个HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0242] 在另一方面,提供了抗-ZIKV抗体,其中抗体包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗-ZIKV抗体保留结合至ZIKV的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:10中,总计1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR的外部区域中(即,在FR中)。任选地,抗DENV抗体包含SEQ ID NO:10中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在特定的实施方案中,VL包含选自下述的一个、两个或三个HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0243] 在另一方面,提供了抗-ZIKV抗体,其中抗体包含上述任一个实施方案中的VH,及上述任一个实施方案中的VL。在一个实施方案中,抗体分别包含SEQ ID NO:2、3、4、5或6的任一项中及SEQ ID NO:8、9或10的任一项中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,抗体分别包含SEQ ID NO:2、3、4、5或6的任一项中及SEQ ID NO:7的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0244] 在另一方面,提供了抗-ZIKV抗体,其中抗体包含上述任一个实施方案中的VH,及上述任一个实施方案中的VL。在一个实施方案中,抗体分别包含SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,抗体分别包含SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限

于通过焦谷氨酰化 (pyroglutamylation) 将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0245] 在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:59的恒定重(即,CH)序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:60的恒定轻(即,CL)序列。在一些实施方案中,抗体分别包含SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60的恒定重和恒定轻序列。

[0246] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体为人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体为全长IgG抗体。

[0247] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体的Fc区包含根据EU编号的位置234处的Ala及位置235处的Ala。在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体的Fc区可选自本文中所描述的变体Fc区。

[0248] 本发明还提供包含本发明的抗寨卡抗体及药学上可接受载体的药物制剂。

[0249] 本发明的抗寨卡抗体可用作药物。在一些实施方案中,本发明的抗寨卡体可用于治疗或预防寨卡感染。

[0250] 本发明的抗寨卡体可用于制备药物。在一些实施方案中,该药物用于治疗或预防寨卡感染。

[0251] 本发明还提供治疗患有寨卡感染的个体的方法。在一些实施方案中,该方法包含对个体施用有效量的本发明的抗寨卡体。在一些实施方案中,该方法进一步包含对个体施用另外的治疗剂,例如,如下文所述。

[0252] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区包含亲本Fc区中的至少一个氨基酸改变。在进一步的实施方案中,当与亲本Fc区比较时,变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R-结合活性。在进一步的实施方案中,当与亲本Fc区比较时,变体Fc区不具有实质性降低的C1q-结合活性。

[0253] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区包含根据EU编号的位置234处的Ala、位置235处的Ala。在进一步的实施方案中,根据EU编号,变体Fc区包含下述(a)-(c)中任一个的氨基酸改变:(a)位置267、268及324,(b)位置236、267、268、324及332,及(c)位置326及333。

[0254] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区包含选自以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置267处的Glu,(b)位置268处的Phe,(c)位置324处的Thr,(d)位置236处的Ala,(e)位置332处的Glu,(f)位置326处的Ala、Asp、Glu、Met或Trp,及(g)位置333处的Ser。

[0255] 在一些实施方案中,根据EU编号,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区进一步包含选自以下各项组成的组的氨基酸:(a)位置434处的Ala,(b)位置434处的Ala、位置436处的Thr、位置438处的Arg及位置440处的Glu,(c)位置428处的Leu、位置434处的Ala、位置436处的Thr、位置438处的Arg及位置440处的Glu,及(d)位置428处的Leu、位置434处的Ala、位置438处的Arg及位置440处的Glu。

[0256] 在一些实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体的变体Fc区单独或组合地包含如表4所描述氨基酸改变中的任一个。在一些实施方案中,本发明所描述的亲本Fc区衍生自人IgG1。本发明提供包含SEQ ID NO:51-59中任一项的氨基酸序列的多肽。

[0257] 在进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0258] (a) (i) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,及(iii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

[0259] (b) (i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,及(iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

[0260] (c) (i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,(iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(iv) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(v) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(vi) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或

[0261] (d) (i) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(ii) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(iii) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;

[0262] (e) (i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,及(iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0263] 在进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:

[0264] (a) (i) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列,及(iii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0265] (b) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,及(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0266] (c) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;

[0267] (d) (i) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(ii) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(iii) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;或

[0268] (e) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:7的VL序列。

[0269] 在进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含(i) VH,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,(ii) VL,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,(iii) CH,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列及(iv) CL,其包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0270] 在进一步的实施方案中,本发明的结合寨卡病毒的抗体包含:选自由3CH1047 (3Cam2-LALA+KAES+ACT5的VH;SEQ ID NO:6)和3CH1049 (SEQ ID NO:95)组成的组的VH变体序列,并具有选自由SG182 (WT;SEQ ID NO:46)、SG1095 (SEQ ID NO:54)和SG1106 (3Cam2-LALA+KAES+ACT5的CH;SEQ ID NO:59)组成的组的人IgG1CH序列;和选自由3CL (3Cam2-LALA+KAES+ACT5的VL;SEQ ID NO:7)和3CL633 (SEQ ID NO:98)组成的组的VL变体序列,并具有人CL序列SK1 (3Cam2-LALA+KAES+ACT5的CL;SEQ ID NO:60)。表2及表4中引用及详述了存在的变体及突变体的序列。

[0271] 在一些实例中,本发明的结合寨卡病毒的抗体例举在本公开的实施例部分。例如,

本文描述的抗体可以是公开在实施例7中的抗体,例如,但不限于下述变体,(a) 3Cam2,其为DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG182 (SEQ ID NO:46) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60), (b) 3Cam2-LALA+KAES,其为DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG1095 (SEQ ID NO:54) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60), (c) 3Cam2-LALA+KAES+ACT5,其为DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG1106 (SEQ ID NO:59) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60), (d) 3C,其为DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG182 (SEQ ID NO:46) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60), (e) 3C-LALA,其为DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG192 (SEQ ID NO:47) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60), (e) 3C-LALA+KAES+ACT5,其为DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG1106 (SEQ ID NO:59) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60) 等。

[0272] 在本发明进一步的方面中,根据上述任一个实施方案中的抗DENV或抗-ZIKV抗体为单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体及人抗体。在一个实施方案中,抗DENV或抗-ZIKV抗体为抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为全长抗体,例如,如本文所定义的完整IgG1抗体或其他抗体类别或同种型。

[0273] 在进一步的方面中,本发明的抗DENV或抗-ZIKV抗体可具有消除抗体与Fc- γ 受体(Fc γ R)结合的修饰。不希望受理论束缚,消除抗体与Fc- γ 受体结合的修饰可能是有利的,因为与FcR的结合降低可以避免感染的ADE(抗体依赖性增强)现象,其被认为是主要通过与FcR的相互作用介导。在一个实施方案中,本发明的抗DENV抗体的Fc区包含在位置234处的Ala和在位置235处的Ala,根据EU编号。

[0274] 在进一步的方面中,根据上述任一个实施方案中的抗DENV抗体或抗-ZIKV抗体可以并入如以下第1-7节中所述的任何单独或组合的特征:

[0275] 1. 抗体亲和力

[0276] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有1 μ M或更小、100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、0.1nM或更小、0.01nM或更小或0.001nM或更小(例如10⁻⁸M或更小,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如10⁻⁹M至10⁻¹³M)的解离常数(Kd)。

[0277] 在一个实施方案中,通过放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,用感兴趣的抗体的Fab形式及其抗原进行RIA。例如,Fab对抗原的溶液结合亲和力通过以下来测量:在滴定系列的未标记抗原存在下,用最小浓度的(¹²⁵I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原(见,例如Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定条件,将MICROTITER(注册商标)多孔板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH9.6)中的5 μ g/ml的捕获性抗Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后用PBS中的2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温(约23 $^{\circ}$ C)下封闭2至5小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [¹²⁵I]-抗原与感兴趣的Fab的连续稀释液混合(例如,与在Presta等,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中的抗VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后将感兴趣的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长的时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移到捕获板中,在室温下孵育(例如,1小时)。然后除去溶液,用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20(注册商标))洗涤板8次。当板干燥后,加入150 μ l/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20TM;Packard),并在TOPCOUNTTM γ 计数器(Packard)上对板计数10分钟。选择产生小于或等于20%最大结合的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0278] 根据另一个实施方案,使用BIAcore(注册商标)表面等离子体共振测定法测量Kd。

例如,使用BIAcore (注册商标) -2000或BIAcore (注册商标) -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 的测定在25℃下以约10个应答单位 (RU) 用固定化抗原CM5芯片进行。在一个实施方案中,根据供应商的说明,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用pH 4.8的10mM乙酸钠稀释至5μg/mL (~0.2μM), 然后以5μL/分钟的流速注射,以获得偶联蛋白的约10个应答单位 (RU)。注射抗原后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。对于动力学测量,将Fab的两倍连续稀释液 (0.78nM至500nM) 在25℃下以大约25μL/min的流速注射到含有0.05%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20™) 表面活性剂 (PBST) 的PBS中。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型 (BIAcore (注册商标) 评估软件版本3.2) 计算缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 计算为比率 k_{off}/k_{on} 。见例如,Chen等, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。如果上述表面等离子体共振测定的缔合速率超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$, 那么可以通过使用荧光淬灭技术测定结合速率,该技术在增加浓度的抗原存在下在25℃下测量PBS (pH7.2) 中的20nM抗-抗原抗体 (Fab形式) 的荧光发射强度的增加或减少 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通), 如在光谱仪中测量的, 例如带有停流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或带有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计 (ThermoSpectronic)。

[0279] 2. 抗体片段

[0280] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,见Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003)。关于scFv片段的综述,见例如Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore编, (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); 也见WO 93/16185; 以及美国专利No. 5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,见美国专利No. 5,869,046。

[0281] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。见例如,EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 以及Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003) 还描述了三抗体和四抗体。

[0282] 单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 见例如美国专利No. 6,248,516B1)。

[0283] 抗体片段可以通过多种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞 (例如大肠杆菌或噬菌体) 产生,如本文所述。

[0284] 3. 嵌合抗体及人源化抗体

[0285] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利No. 4,816,567; 和Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区 (例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或诸如猴的非人灵长类动物的可变区) 和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是“类别转换的”抗体,其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0286] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)衍生自非人抗体,并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选还包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生HVR残基的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0287] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中进行了综述并进一步描述于,例如,Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);US专利No.5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等,Methods 36:25-34(2005)(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面再塑”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);和Osbourne等,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“导向选择”方法)。

[0288] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区域(见,例如,Sims等J.Immunol.151:2296(1993));衍生自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(见,例如,Carter等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));衍生自筛选FR文库的框架区(见例如,Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0289] 4.人抗体

[0290] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术来生成抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。

[0291] 可通过对转基因动物施用免疫原以制备人抗体,所述转基因动物已被修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其替换内源免疫球蛋白基因座,或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在这种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座一般已被失活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述,见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还可见例如美国专利No.6,075,181和6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利No.5,770,429,其描述了H_UM_{AB}(注册商标)技术;美国专利No.7,041,870,其描述了K-MOUSE(注册商标)技术,和美国专利申请公开文本No.US 2007/0061900,其描述了V_{ELOC1}M_{OUSE}(注册商标)技术。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0292] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);以及Boerner等,J.Immunol.,147:86(1991)。)经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体还描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-

3562 (2006)。其它方法包括例如描述于美国专利No.7,189,826 (其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26 (4):265-268 (2006) (其描述了人-人杂交瘤)的那些。人杂交瘤技术 (Trioma技术) 也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20 (3):927-937 (2005) 及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27 (3):185-91 (2005)。

[0293] 也可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列生成抗体。然后,可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0294] 5. 文库 (library) 衍生的抗体

[0295] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或更多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库并对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如Hoogenboom等,Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编,Human Press,Totowa,NJ,2001) 中并且进一步描述于例如,McCafferty等,Nature 348:552-554;Clackson等,Nature 352:624-628 (1991);Marks等,J.Mol.Biol.581-597 (1992) 中;Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo,编,Human Press,Totowa,NJ,2003) 中;Sidhu等,J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004);Lee等,J.Mol.Biol.340 (5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101 (34):12467-12472 (2004);和Lee等,J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004)。

[0296] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如描述于Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455 (1994) 中。噬菌体通常以单链Fv (scFv) 片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。备选地,可以克隆天然组库 (repertoire) (例如,来自人) 以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的单一抗体来源,而无需任何免疫,如Griffiths等,EMBO J,12:725-734 (1993) 所述。最后,也可以通过自干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成制备天然文库 (naive library),如由Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国专利公开号2005/0079574,2005/0119455,2005/0266000,2007/0117126,2007/0160598,2007/0237764,2007/0292936和2009/0002360。

[0297] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0298] 6. 多特异性抗体

[0299] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如,双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一是针对DENV E蛋白而另一个是针对任何其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合DENV E蛋白的两个不同表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达DENV E蛋白的细胞。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段。

[0300] 用于制备多特异性抗体的技术包括,但不限于,重组共表达具有不同特异性的两

条免疫球蛋白重链-轻链对(见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983);WO 93/08829;和Traunecker等,EMBO J.10:3655(1991))和“杵臼结构(knob-in-hole)”工程改造(例如美国专利号5,731,168)。多特异性抗体还可以通过工程改造用于制备抗体Fc-异二聚体分子的静电转向效应(WO 2009/089004A1);交联两种或更多种抗体或片段(见,例如,美国专利No.4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体(见,例如,Kostelny等,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双抗体”技术用于制备双特异性抗体片段(见,例如,Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(scFv)二聚体(见,例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备例如,如Tutt等J.Immunol.14760(1991)中所述的三特异性抗体来制备。

[0301] 具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程改造的抗体,包括“章鱼抗体”,也包括在本文中(见,例如US 2006/0025576A1)。

[0302] 本文的抗体或片段还包括“双作用Fab”或“DAF”,其包含结合DENV E蛋白的抗原以及另一种不同抗原的结合位点(见US 2008/0069820)。

[0303] 7. 抗体变体

[0304] 在某些实施方案中,涵盖本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失,和/或插入和/或置换。可以进行缺失、插入和置换的任何组合达到最终构建体,条件是最终构建体具有期望特征,例如抗原结合。

[0305] a) 置换、插入及缺失变体

[0306] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的感兴趣的位点包括HVR和FR。保守置换显示在表1中“优选置换”的标题下。更实质的变化提供于表1中“示例性置换”的标题下,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸置换引入感兴趣的抗体中,并针对期望活性(例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选产物。

[0307] [表1]

[0308]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg

Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0309] 氨基酸可根据通常的侧链性质分组：

[0310] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0311] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0312] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0313] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0314] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0315] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0316] 非保守置换会需要用这些类别之一的成员交换另一个类别的成员。

[0317] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体具有某些生物学特性(例如，增加的亲和力、降低的免疫原性)方面的修饰(例如，改善)和/或将基本上保留了亲本抗体的某些生物学特性。示例性的置换变体是亲和力成熟的抗体，其可以方便地生成，例如，使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术，例如本文所述的那些。简而言之，突变一个或多个HVR残基并在噬菌体上展示变体抗体并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0318] 可以在HVR中进行变更(例如，置换)，例如，以改善抗体亲和力。这种变更可以在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基)(见，例如Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008))和/或接触抗原的残基中进行，测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从中重新选择的亲和力成熟已经描述在例如在Hoogenboom等, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法中的任何一种(例如，易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法，其中若干个HVR残基(例如，每次4-6个残基)被随机化。参与抗原结合的HVR残基可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模特异性地鉴定。特别是CDR-H3和CDR-L3常常被靶向。

[0319] 在某些实施方案中，置换，插入或缺失可以在一个或多个HVR内发生，只要这种改变不会显著降低抗体结合抗原的能力。例如，可以在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守变更(例如，如本文提供的保守置换)。例如，这种变更可以在HVR中的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中，每个HVR未变更，或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0320] 一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如由Cunningham和Wells (1989) Science, 244:1081-1085所描述的。在此方法中，鉴定残基或靶残基的组（例如，带电荷的残基诸如arg、asp、his、lys和glu），并用中性或带负电荷的氨基酸（例如，丙氨酸或聚丙氨酸）将其替换以测定抗体和抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始置换表明功能敏感性的氨基酸位置处引入进一步的置换。备选地，或此外，可分析抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为置换的候选被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0321] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至含有100或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基端融合，及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括延长抗体的血浆半衰期的酶（例如对于ADEPT）或多肽与抗体的N或C端的融合物。

[0322] b) 糖基化变体

[0323] 在某些实施方案中，变更本文中提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。向抗体添加或缺失糖基化位点可以通过变更氨基酸序列以便产生或除去一个或多个糖基化位点而方便地完成。

[0324] 在抗体包含Fc区的情况中，可以变更附着于其的碳水化合物。由哺乳动物细胞生成的天然抗体通常包含分支的、双触角寡糖，其一般通过N连接附着于Fc区的CH2结构域的Asn297。见例如，Wright等TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括多种碳水化合物，例如，甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸，以及附着于双触角寡糖结构“茎干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中，可以对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善的性质的抗体变体。

[0325] 在一个实施方案中，提供了抗体变体，其具有缺乏附着（直接或间接）于Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如，此类抗体中的岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过相对于附着于Asn297的所有糖结构（例如，复合的、杂合的和甘露糖的结构）的总和，计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量，如通过MALDI-TOF质谱术测量，例如如描述于WO 2008/077546的。Asn297是指位于Fc区的第297位左右（Fc区残基的EU编号）的天冬酰胺残基；然而，由于抗体中的微小序列变化，Asn297也可位于第297位上游或下游的约+/-3个氨基酸，即第294位和第300位之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。见例如，美国专利公布号US 2003/0157108 (Presta, L.)；US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖化”或“岩藻糖缺陷”抗体变体相关的出版物的实例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki等J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。能够产生去岩藻糖化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的 Lec13 CHO 细胞 (Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；US 专利申请号US2003/0157108A1, Presta, L；和WO2004/056312A1, Adams等，尤其是实施例11)，以及敲除细胞系，诸如敲除 α -1,6-岩藻糖

基转移酶基因FUT8的CHO细胞(见,例如,Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614(2004); Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和W02003/085107)。

[0326] 抗体变体进一步具有二等分型寡糖,例如,其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可以具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的例子描述于例如W0 2003/011878(Jean-Mairet等);美国专利No.6,602,684(Umana等);和US 2005/0123546(Umana等)。还提供了在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如W0 1997/30087(Patel等);W0 1998/58964(Raju,S.);和W0 1999/22764(Raju,S.)。

[0327] c)Fc区变体

[0328] 在某些实施方案中,可以将一个或更多氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或更多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0329] 在某些实施方案中,本发明涵盖拥有一些但不是所有效应子功能的抗体变体,所述效应子功能使其成为用于如下应用的期望候选物,在其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应子功能(诸如ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以测量CDC和/或ADCC活性。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确认抗体是否具有Fc γ R结合(因此有可能具有ADCC活性)和/或FcRn结合能力。用于介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。在Ravetch和Kinet, Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中汇总了造血细胞上的FcR表达。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(见例如Hellstrom,I.等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。备选地,可以采用非放射性测定方法(见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox 96(注册商标)非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。对于此类测定有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或另外,可以在体内例如在动物模型(诸如公开于Clynes等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)的动物模型)中评估目标分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体是否能结合C1q,并且因此具有CDC活性。见例如,W0 2006/029879和W0 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(见例如,Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域中已知的方法来进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(见例如,Petkova,S.B.等,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0330] 具有经修饰的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或更多个的置换的那些(美国专利No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两处或更多处具有置换的Fc突变体,包括残基265和297置换成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。

[0331] 描述了具有与FcR的改变的结合的某些抗体变体(见,例如,美国专利号6,737,

056;W02004/056312,和Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001).)

[0332] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个变更ADCC的氨基酸置换(例如Fc区的第298、333和/或334位(EU残基编号)的置换)的Fc区。

[0333] 在一些实施方案中,在Fc区中进行变更,其导致改变的(即,增加的或降低的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如描述于美国专利No.6,194,551、W0 99/51642,W02011/091078和Idusogie等J.Immunol.164:4178-4184(2000)。

[0334] 具有延长的半衰期和增加的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等),新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含其中具有增加Fc区与FcRn结合的一个或更多个置换的Fc区。这种Fc变体包括在Fc区残基中的以下一个或多个处具有置换的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如,Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。

[0335] 还可见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821;和W0 94/29351(其涉及Fc区变体的其它例子)。

[0336] 在另一个实施方案中,抗体可以包含下文详细描述的本发明的变体Fc区。

[0337] d) 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0338] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如“thioMAbs”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中,经置换的残基出现在抗体的可及位点(accessible site)。通过用半胱氨酸置换那些残基,反应性硫醇基团因此定位在抗体的可及位点并且可以用于将抗体与其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)缀合,以生成免疫缀合物,如本文进一步描述的。在某些实施方案中,以下残基中的任何一个或更多个可以用半胱氨酸置换:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造的抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所述生成。

[0339] e) 抗体衍生物

[0340] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域已知的且易于获得的另外的非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。所述聚合物可以是任意分子量,并且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可基于下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定的条件下的治疗等。

[0341] 在另一个实施方案中,提供了可以通过暴露于辐射而选择性加热的抗体和非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可以是任意波长的,且包括但不限于,不损害普通细胞但可以将非蛋白质部分加热到杀死接近抗体-非蛋白质部分的细胞的温度的波长。

[0342] 在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性的变体Fc区。在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区。在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区。在一些方面,所述多肽是抗体。在一些方面,多肽是Fc融合蛋白。在某些实施方案中,与天然或参照变体序列的Fc区(有时在本文中统称为“亲本”Fc区)中的相应序列相比,变体Fc区包含至少一个氨基酸残基变更(例如,置换)。在某些实施方案中,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R结合活性。在某些实施方案中,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区不具有实质性降低的C1q结合活性。在某些实施方案中,Fc γ R是人Fc γ R、猴Fc γ R(例如,食蟹猴、恒河猴、狨猴、黑猩猩或狒狒Fc γ R)或小鼠Fc γ R。

[0343] 在一个方面,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区对一种或更多种人Fc γ R具有实质性降低的结合活性,所述人Fc γ R包括但不限于,Fc γ RIa、Fc γ RIIa(包括等位基因变体167H和167R)、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa(包括等位基因变体158F和158V)和Fc γ RIIIb(包括等位基因变体NA1和NA2)。在又一个方面,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区对人Fc γ RIa、Fc γ RIIa(包括等位基因变体167H和167R)、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa(包括等位基因变体158F和158V)和Fc γ RIIIb(包括等位基因变体NA1和NA2)具有实质性降低的结合活性。

[0344] 在一个方面,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区对一种或更多种小鼠Fc γ R具有实质性降低的结合活性,所述小鼠Fc γ R包括但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIII和Fc γ RIV。在又一个方面,与亲本Fc区相比,本发明的变体Fc区对小鼠Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIII和Fc γ RIV具有实质性降低的结合活性。

[0345] “Fc γ 受体”(本文中,称为Fc γ 受体、Fc γ R或Fc γ R)是指可以结合IgG1、IgG2、IgG3和IgG4单克隆抗体的Fc区的受体,并且实际上是指由Fc γ 受体基因编码的蛋白质家族的任何成员。在人类中,该家族包括Fc γ RI(CD64),包括同种型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc;Fc γ RII(CD32),其包括同种型Fc γ RIIa(包括同种异型H131(H型)和R131(R型))、Fc γ RIIb(包括Fc γ RIIb-1和Fc γ RIIb-2)和Fc γ RIIc;和Fc γ RIII(CD16),其包括同种型Fc γ RIIIa(包括同种异型V158和F158)和Fc γ RIIIb(包括同种异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb-NA2)和任何人Fc γ R、Fc γ R同种型或尚未发现的同种异型,但不限于此。已报道Fc γ RIIb1和Fc γ RIIb2为人Fc γ RIIb的剪接变体。另外,已经报道了名为Fc γ RIIb3的剪接变体(J Exp Med,1989,170:1369-1385)。除了这些剪接变体之外,人Fc γ RIIb包括在NCBI中登记的所有剪接变体,其为NP_001002273.1、NP_001002274.1、NP_001002275.1、NP_001177757.1和NP_003992.3。此外,人Fc γ RIIb包括每个先前报道的遗传多态性,以及Fc γ RIIb(Arthritis Rheum.48:3242-3252(2003);Kono等,Hum.Mol.Genet.14:2881-2892(2005);和Kyogoju等,Arthritis Rheum.46:1242-1254(2002)),以及将来报告的每个遗传多态性。

[0346] 在Fc γ RIIa中,存在两种同种异型,一种是在其中Fc γ RIIa的位置167处的氨基酸是组氨酸(H型),另一种是在其中位置167处的氨基酸用精氨酸置换(R型)(Warrmerdam, J.Exp.Med.172:19-25(1990))。

[0347] Fc γ R包括人、小鼠、大鼠、兔和猴来源的Fc γ R,但不限于此,并且可以源自任何生物。小鼠Fc γ R包括Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16) 和Fc γ RIV (CD16-2),以及任何小鼠Fc γ R或Fc γ R同种型,但不限于此。

[0348] 人Fc γ RIa的氨基酸序列如SEQ ID NO:69所示;人Fc γ RIIa (167H) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:70所示;人Fc γ RIIa (167R) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:71所示;人Fc γ RIIb的氨基酸序列如SEQ ID NO:72所示;人Fc γ RIIIa (158F) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:73所示;人Fc γ RIIIa (158V) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示;人Fc γ RIIIb (NA1) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示;人Fc γ RIIIb (NA2) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:76所示。

[0349] 小鼠Fc γ RI的氨基酸序列如SEQ ID NO:77所示;小鼠Fc γ RIIb的氨基酸序列如SEQ ID NO:78所示;小鼠Fc γ RIII的氨基酸序列如SEQ ID NO:79所示;小鼠Fc γ RIV的氨基酸序列如SEQ ID NO:80所示。

[0350] 在一个方面,本发明的变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R结合活性,其作为亲本Fc区的Fc γ R结合活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%、小于0.2%或小于0.1%。在一个方面,本发明的变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R结合活性,这意味着[在Fc γ R与变体Fc区相互作用之前和之后改变的传感图的RU值的差]/[在将Fc γ R捕获到传感器芯片之前和之后改变的传感图的RU值的差]的比例小于1、小于0.8、小于0.5、小于0.3、小于0.2、小于0.1、小于0.08、小于0.05、小于0.03、小于0.02、小于0.01、小于0.008、小于0.005、小于0.003、小于0.002或小于0.001。

[0351] 在一个方面,本发明的变体Fc区不具有实质性降低的C1q结合活性,这意味着本发明的变体Fc区和亲本Fc区之间的C1q结合活性的差异作为亲本Fc区的C1q结合活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%或小于5%。

[0352] 在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含具有实质性降低的ADCC活性的变体Fc区。在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含不具有实质性降低的CDC活性的变体Fc区。在一个方面,本发明提供了分离的多肽,其包含具有实质性降低的ADCC活性且不具有实质性降低的CDC活性的变体Fc区。

[0353] 在一个方面,本发明的变体Fc区具有实质性降低的ADCC活性,其作为亲本Fc区的ADCC活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%、小于0.2%或小于0.1%。

[0354] 在一个方面,本发明的变体Fc区不具有实质性降低的CDC活性,这意味着本发明的变体Fc区和亲本Fc区之间的CDC活性的差异作为亲本Fc区的CDC活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%或小于5%。

[0355] 在一个方面,本发明提供了分离的多肽,与包含亲本Fc区的多肽相比,其包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区。在进一步的方面,本发明的多肽包含选自由以下各项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸变更:234、235、236、267、268、324、326、332和333,根据EU编号。

[0356] 在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含在位置234处的Ala、在位置235处的Ala和选自由以下各项组成的组的至

少一个位置的至少一个氨基酸变更:236、267、268、324、326、332和333,根据EU编号。

[0357] 在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含在位置234处的Ala、在位置235处的Ala和进一步地下列(a)-(c)任意一个的氨基酸变更:(a)位置267、268和324;(b)位置236、267、268、324和332;和(c)位置326和333,根据EU编号。

[0358] 在另一方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)在位置267处的Glu;(b)在位置268处的Phe;(c)在位置324处的Thr;(d)在位置236处的Ala;(e)在位置332处的Glu;(f)在位置326处的Ala、Asp、Glu、Met或Trp;以及(g)在位置333处的Ser,根据EU编号。

[0359] 在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala和在位置333处的Ser,根据EU编号。在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Asp和在位置333处的Ser,根据EU编号。在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Glu和在位置333处的Ser,根据EU编号。在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Met和在位置333处的Ser,根据EU编号。在一个方面,具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Trp和在位置333处的Ser,根据EU编号。

[0360] 在另一方面,本发明的变体Fc区可进一步包含选自由以下各项组成的组的至少一个位置的至少一个氨基酸变更:428、434、436、438和440,根据EU编号。

[0361] 在进一步的方面中,变体Fc区还可包含选自由以下各项组成的组的氨基酸:(a)在位置434处的Ala;(b)在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu;(c)在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg、在位置440处的Glu;(d)在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号(还见W02016/125495,其描述了变体Fc区的氨基酸变更和FcRn结合活性之间的关系)。

[0362] 在另一个方面,本发明的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala、在位置333处的Ser、在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号。在另一个方面,本发明的变体Fc区包含以下氨基酸:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala、在位置333处的Ser、在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号。

[0363] 在一个方面,与亲本Fc区相比,优选地,本发明的变体Fc区不具有实质性提高的FcRn结合活性,尤其是在pH7.4时。

[0364] “FcRn”在结构上类似于主要的组织相容性复合物(MHC)I类的多肽,并且与MHC I类分子表现出22%至29%的序列同一性。FcRn表达为由可溶性 β 或与跨膜 α 复合的轻链(β 2

微球蛋白)或重链组成的异二聚体。与MHC一样,FcRn的 α 链含有三个细胞外结构域($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$),并且其短的细胞质结构域将他们锚定在细胞表面。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域与抗体Fc区的FcRn结合结构域相互作用。人FcRn的多核苷酸和氨基酸序列可以例如分别衍生自NM_004107.4和NP_004098.1中所示的前体(含有信号序列)。

[0365] 人FcRn(α 链)的氨基酸序列如SEQ ID NO:81所示;人 $\beta 2$ 微球蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:82所示。

[0366] 在一个方面,优选地,本发明的变体Fc区不具有实质性提高的FcRn结合活性,尤其是在pH7.4时,与亲本Fc区的FcRn结合活性相比,小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于90倍、小于80倍、小于70倍、小于60倍、小于50倍、小于40倍、小于30倍、小于20倍、小于10倍、小于5倍、小于3倍或小于2倍。在一个方面,本发明的变体Fc区不具有实质性提高的FcRn结合活性,尤其是在pH7.4时,这意味着[在FcRn与变体Fc区的相互作用之前和之后改变的传感图的RU值的差]/[在将FcRn捕获到传感器芯片之前和之后改变的传感图的RU值的差]的比率小于0.5、小于0.3、小于0.2、小于0.1、小于0.08、小于0.05、小于0.03、小于0.02、小于0.01、小于0.008、小于0.005、小于0.003、小于0.002或小于0.001。

[0367] 在另一方面,本发明的变体Fc区包含表4中所述的任何单独或组合的氨基酸变更。在另一个方面,本发明的变体Fc区包含至少任何一种表4中描述的氨基酸变更。在另一方面,本发明提供包含SEQ ID NO:51-59中任何一个的氨基酸序列的多肽。

[0368] 在一些实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽是抗体重链恒定区。在一些实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽进一步包含抗原结合结构域。在进一步的实施方案中,所述多肽是抗体重链。在进一步的实施方案中,所述多肽是抗体。在某些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。抗体的来源没有特别限制,但实例包括人抗体、小鼠抗体、大鼠抗体和兔抗体。在进一步的实施方案中,所述多肽是Fc融合蛋白。

[0369] 包含本文所述的变体Fc区的两种或更多种多肽可以包括在一个分子中,其中包含变体Fc区的两个多肽联合,与在抗体中非常相似。抗体的类型不受限制,可以使用IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)和IgM等。

[0370] 在一些实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽是抗体。在进一步的实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽是抗病毒抗体。

[0371] 在进一步的实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽包含含有以下各项的抗体可变区:

[0372] (a) (i)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(ii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,及(iii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

[0373] (b) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,及(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

[0374] (c) (i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,(iv)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(v)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(vi)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或

[0375] (d) (i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;及(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0376] 在进一步的实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽包含含有以下各项的抗体可变区:

[0377] (a) (i) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列,及(iii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0378] (b) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,及(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列;

[0379] (c) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;

[0380] (d) (i) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;(ii) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;及(iii) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:10的VL序列;或

[0381] (e) (i) HVR-H1,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(ii) HVR-H2,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iii) HVR-H3,其来自SEQ ID NO:6的VH序列,(iv) HVR-L1,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;(v) HVR-L2,其来自SEQ ID NO:7的VL序列;及(vi) HVR-L3,其来自SEQ ID NO:7的VL序列。

[0382] 在进一步的实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽包含含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH区和含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL区。在进一步的实施方案中,本发明提供了包含VH区和变体Fc区和VL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:54的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,本发明提供了包含VH区和变体Fc区和VL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,本发明提供了包含VH区和变体Fc区和VL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:59的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0383] 本发明还提供了本文所述的抗DENV抗体,其还包含含有本发明的变体Fc区的多肽。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体包含VH区和变体Fc区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:54的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体包含VH区和变体Fc区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:58的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体包含VH区和变体Fc区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:59的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0384] 在一些实施方案中,本发明的抗DENV抗体包含VH区和变体Fc区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述变体Fc区包含重链中SEQ ID NO:59的氨基酸序列,所述VL区包含轻链中SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0385] 如本文所用的“亲本Fc区”是指在引入本文所述的氨基酸变更之前的Fc区。亲本Fc

区的优选实例包括衍生自天然抗体的Fc区。抗体包括,例如IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)和IgM等。抗体可源自人或猴(例如,食蟹猴、恒河猴、狨猴、黑猩猩或狒狒)。天然抗体还可包括天然发生的突变。由遗传多态性引起的多种同种异型IgG序列描述于“免疫学上感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of proteins of immunological interest)”,NIH公开号91-3242,并且它们中的任何一种均可用于本发明。特别地,对于人IgG1,在位置356至358(EU编号)处的氨基酸序列可以是DEL或EEM。亲本Fc区的优选实例包括衍生自人IgG1(SEQ ID NO:83)、人IgG2(SEQ ID NO:84)、人IgG3(SEQ ID NO:85)和人IgG4(SEQ ID NO:86)的重链恒定区的Fc区。亲本Fc区的另一个优选实例是衍生自重链恒定区SG1(SEQ ID NO:87)的Fc区。亲本Fc区的另一个优选实例是衍生自重链恒定区SG182(SEQ ID NO:46)的Fc区。此外,亲本Fc区可以通过将除本文所述的氨基酸变更之外的氨基酸变更添加至衍生自天然抗体的Fc区而产生的Fc区。

[0386] 另外,为其他目的进行的氨基酸变更可以在本文所述的变体Fc区中组合。例如,可添加改善FcRn结合活性的氨基酸置换(Hinton等,J.Immunol.176(1):346-356(2006); Dall'Acqua等,J.Biol.Chem.281(33):23514-23524(2006);Petkova等,Intl.Immunol.18(12):1759-1769(2006);Zalevsky等,Nat.Biotechnol.28(2):157-159(2010);WO 2006/019447;WO 2006/053301;和WO 2009/086320),和用于改善抗体异质性或稳定性的氨基酸置换(WO 2009/041613)。备选地,具有促进抗原清除的性质的多肽,其描述于WO 2011/122011、WO 2012/132067、WO 2013/046704或WO 2013/180201,具有特异性结合至靶组织的性质的多肽,其描述在WO 2013/180200中,具有重复结合至多个抗原分子的性质的多肽,其描述于WO 2009/125825、WO 2012/073992或WO 2013/047752,可与本文所述的变体Fc区组合。备选地,为了赋予对其他抗原的结合能力,EP1752471和EP1772465中公开的氨基酸变更可以在本文所述的变体Fc区的CH3中组合。备选地,为了增加血浆保留,降低恒定区的pI的氨基酸变更(WO2012/016227)可以在本文所述的变体Fc区中组合。备选地,为了促进细胞摄取,提高恒定区的pI的氨基酸变更(WO2014/145159)可以在本文所述的变体Fc区中组合。备选地,为了促进从血浆中消除靶分子,提高恒定区的pI的氨基酸变更(WO2016/125495和WO2016/098357)可以在本文所述的变体Fc区中组合。

[0387] 在酸性pH下增强人FcRn结合活性的氨基酸变更也可以在本文所述的变体Fc区中组合。具体地,此类变更可包括,例如,在位置428处用Leu置换Met,在位置434处用Ser置换Asn,根据EU编号(Nat Biotechnol,2010,28:157-159);在位置434处Ala置换Asn(Drug Metab Dispos,2010年4月;38(4):600-605);在位置252处用Tyr置换Met,在位置254处用Thr置换Ser,在位置256处用Glu置换Thr(J Biol Chem,2006,281:23514-23524);在位置250处用Gln置换Thr以及在位置428处用Leu置换Met(J Immunol,2006,176(1):346-356);在位置434处用His置换Asn(Clin Pharmacol Ther,2011,89(2):283-290),以及描述于WO2010/106180、WO2010/045193、WO2009/058492、WO2008/022152、WO2006/050166、WO2006/053301、WO2006/031370、WO2005/123780、WO2005/047327、WO2005/037867、WO2004/035752、WO2002/060919中的变更,或此类。在另一个实施方案中,此类变更可包括,例如,选自由以下各项组成的组的至少一种变更:在位置428处用Leu置换Met,在位置434处用Ala置换Asn,在位置436处用Thr置换Tyr。这些改变可以进一步包括在位置438处用Arg置换Gln和/或在位置440处用Glu置换Ser(WO2016/125495)。

[0388] 在本发明中,氨基酸变更意味着置换、缺失、添加、插入和修饰中的任何一种或其组合。在本发明中,氨基酸变更可以改写为氨基酸突变。

[0389] 氨基酸变更通过本领域技术人员已知的各种方法产生。这些方法包括定点突变方法(Hashimoto-Gotoh等, *Gene* 152:271-275 (1995); Zoller, *Meth. Enzymol.* 100:468-500 (1983); Kramer等, *Nucleic Acids Res.* 12:9441-9456 (1984)); Kramer和Fritz, *Methods Enzymol.* 154:350-367 (1987); 以及Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985)), PCR突变方法和盒突变方法,但不限于此。

[0390] 引入Fc区的氨基酸变更的数量不受限制。在某些实施方案中,它可以是1、2或更少、3或更少、4或更少、5或更少、6或更少、8或更少、10或更少、12或更少、14或更少、16或更少、18或更少或20或更少。

[0391] 此外,包含本发明的变体Fc区的多肽可以用诸如聚乙二醇(PEG)和细胞毒性物质的各种分子进行化学修饰。本领域已建立了多肽的这种化学修饰的方法。

[0392] 在一些实施方案中,包含本发明的变体Fc区的多肽是包含可以结合任何抗原的结构域的抗体或Fc融合蛋白。可以通过这种抗体和Fc融合蛋白结合的抗原的实例包括但不限于配体(细胞因子、趋化因子等)、受体、癌抗原、病毒抗原、MHC抗原、分化抗原、免疫球蛋白和部分含有免疫球蛋白的免疫复合物。

[0393] B. 重组方法及组合物

[0394] 抗体可以使用重组方法和组合物制备,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供了编码本文所述抗DENV抗体的分离的核酸。在一个实施方案中,抗DENV抗体对于ZIKV具有交叉反应性。在另一个实施方案中,提供了编码包含本文所述的变体Fc区或亲本Fc区的多肽的分离的核酸。此类核酸可以编码包含VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在进一步的实施方案中,提供了包含此类核酸的一种或更多种载体(例如,表达载体)。在进一步的实施方案中,提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞(例如已经用以下各项转化的)包含(1)含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列,或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp2/0细胞)。在一个实施方案中,提供了产生抗DENV抗体的方法,其中该方法包括在适合于表达抗体的条件下培养包含编码如上文提供的抗体的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养液)回收抗体。在另一个实施方案中,提供了制备包含变体Fc区或亲本Fc区的多肽的方法,其中该方法包括在适于表达多肽的条件下,培养包含编码多肽(例如如上所述的抗体、Fc区或变体Fc区)的核酸的宿主细胞,或任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收多肽。

[0395] 对于抗DENV抗体的重组产生,将编码抗体的核酸(例如如上文所描述的)分离,并插入一种或更多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。对于Fc区的重组产生,将编码Fc区的核酸分离,并插入一种或更多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序将此类核酸容易地分离并测序(例如,通过使用寡核苷酸探针来进行,所述寡核苷酸探针能够特异性结合至编码抗体的重和轻链的基因)。

[0396] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适的宿主细胞包括本文中所描述的原核或真

核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,见例如美国专利No.5,648,237、5,789,199和5,840,523(还可见Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254,描述了抗体片段在E.coli.中的表达)。表达后,可以将抗体在可溶性级份中从细菌细胞浆分离,并可以进一步纯化。

[0397] 在原核生物外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是用于抗体编码载体的合适的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”,导致产生具有部分或完全人的糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0398] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株,其可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0399] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。见例如美国专利No.5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(其描述了用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0400] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾细胞系(293或293细胞,如描述于例如Graham et al.,J.Gen Virol.36:59(1977)中的);小仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4细胞,如描述于例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中的);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如描述于例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中的;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,例如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。

[0401] 多克隆抗体优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物中产生。使用双功能剂或衍生剂(例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基共轭)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR,其中R和R¹是不同的烷基)将相关抗原缀合至在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质(例如,钥孔戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)可以是有用的。

[0402] 通过将例如100μg或5μg的蛋白质或缀合物(分别针对兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合并在多个部位皮内注射溶液,针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物(通常是非人哺乳动物)。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用弗氏完全佐剂中的肽或缀合物的原始用量的1/5至1/10加强动物。7至14天后,将动物放血并测定血清的抗体滴度。将动物加强至滴度平稳。优选地,用相同抗原的缀合物加强动物,但所述抗原与不同的蛋白质和/或通过不同的交联剂缀合。缀合物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物制备。

此外,诸如明矾的聚集剂适合用于增强免疫应答。

[0403] 从基本上同质的抗体群体获得单克隆抗体,即除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)之外,包含该群体的各个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”表明抗体的特征不是离散抗体的混合物。

[0404] 例如,单克隆抗体可以使用Kohler等人Nature 256(5517):495-497(1975)首次描述的杂交瘤方法制备。在该杂交瘤方法中,如上文所述,免疫小鼠或其他合适的宿主动物(例如仓鼠),以引发产生或能够产生将特异性结合至用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。备选地,淋巴细胞可以在体外免疫。

[0405] 免疫剂将通常包括抗原蛋白或其融合变体。通常,如果需要人源细胞,则使用外周血淋巴细胞(PBL),或者如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press(1986), pp.59-103)。

[0406] 永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。将如此制备的杂交瘤细胞接种并在合适的培养基(优选地含有一种或更多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质)中生长。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT)),则杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),其为防止缺乏HGPRT的细胞生长的物质。

[0407] 优选的永生化骨髓瘤细胞是有效融合的、通过选择的产生抗体的细胞支持稳定的高水平抗体产生并且对诸如HAT培养基的培养基敏感的那些细胞。在这些之中,优选为小鼠骨髓瘤系,诸如衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤(可获得自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)的那些,和SP-2细胞(以及衍生物,例如X63-Ag8-653)(可获自American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA)。已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor等J. Immunol. 133(6):3001-3005(1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.51-63(1987))。

[0408] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基用于产生针对抗原的单克隆抗体。优选地由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来确定。此类技术和测定在本领域中是已知的。例如,结合亲和力可通过Munson的Scatchard分析来确定, Anal. Biochem. 107(1):220-239(1980)。

[0409] 在鉴定产生具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可通过有限稀释程序亚克隆这些克隆并通过标准方法培养(Goding, 同上中所述)。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在哺乳动物中在体内作为肿瘤生长。

[0410] 通过常规免疫球蛋白纯化程序(诸如,例如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱)将亚克隆分泌的单克隆抗体适当地与培养基、腹水或血清分离。

[0411] 在使用诸如胃蛋白酶的蛋白酶部分消化IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体等后,

通过重新洗脱吸附在蛋白A柱上的级份,可以获得Fc区。蛋白酶没有特别限制,只要其能够消化全长抗体,从而通过适当地设定酶反应条件诸如pH,以限制性方式产生Fab和F(ab')₂,并且实例包括胃蛋白酶和木瓜蛋白酶。

[0412] 此外,本发明提供了一种用于产生包含变体Fc区的多肽的方法,与包含亲本Fc区的多肽相比,所述变体Fc区具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性,所述方法包括将至少一个氨基酸变更引入亲本Fc区。在一些方面中,产生的多肽是抗体。在某些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。在一些方面,产生的多肽是Fc融合蛋白。

[0413] 在一个方面,在上述用于产生多肽的方法中变更至少一个位置的至少一个氨基酸,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,所述至少一个位置选自由以下各项组成的组:234、235、236、267、268、324、326、332和333,根据EU编号。

[0414] 在另一个方面,在上述用于产生多肽的方法中在位置234和235处变更两个氨基酸,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区。

[0415] 在另一个方面,在上述用于产生多肽的方法中变更氨基酸,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,所述变更包括:(a)在位置234和235处的两个氨基酸变更,和(b)选自由以下各项组成的组:236、267、268、324、326、332和333中的至少一个位置处的至少一个氨基酸变更,根据EU编号。

[0416] 在又一个方面,在上述用于产生多肽的方法中变更氨基酸,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,所述变更包括:(a)在位置234和235处的两个氨基酸变更,和(b)下列(i)-(iii)中任意一处的至少一个氨基酸变更:(i)在位置267、268和324处;(ii)在位置236、267、268、324和332处;以及(iii)在位置326和333处,根据EU编号。

[0417] 在又一个方面,在上述用于产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,在各个位置处选自由以下各项组成的组:(a)在位置234处的Ala;(b)在位置235处的Ala;(c)在位置267处的Glu;(d)在位置268处的Phe;(e)位置324处的Thr;(f)在位置236处的Ala;(g)在位置332处的Glu;(h)在位置326处的Ala、Asp、Glu、Met、Trp;和(i)在位置333处的Ser,根据EU编号。

[0418] 在进一步的方面中,在上述用于产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala、在位置333处的Ser;根据EU编号。在又一个方面,在上述用于产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Asp、在位置333处的Ser;根据EU编号。在又一个方面,在上述用于产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Glu、在位置333处的Ser;根据EU编号。在又一个方面,在上述用于

产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Met、在位置333处的Ser;根据EU编号。在又一个方面,在上述用于产生多肽的方法中的氨基酸变更,所述多肽包含具有实质性降低的Fc γ R结合活性且不具有实质性降低的C1q结合活性的变体Fc区,是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Trp、在位置333处的Ser;根据EU编号。

[0419] 在另一个方面,在上述方法中,进一步变更在选自由以下各项组成的组的至少一个位置处的至少一个氨基酸:428、434、436、438和440,根据EU编号。

[0420] 在进一步的方面中,在上述方法中的氨基酸变更进一步选自以下(a) - (d): (a) 在位置434处的Ala; (b) 在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu; (c) 在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg、在位置440处的Glu;以及(d) 在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号(还见W02016/125495,其描述了变体Fc区的氨基酸变更与FcRn结合活性之间的关系)。

[0421] 在进一步的方面中,在上述方法中的氨基酸变更是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala、在位置333处的Ser、在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置436处的Thr、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号。在又一个方面,在上述方法中的氨基酸变更是:在位置234处的Ala、在位置235处的Ala、在位置326处的Ala、在位置333处的Ser、在位置428处的Leu、在位置434处的Ala、在位置438处的Arg和在位置440处的Glu,根据EU编号。

[0422] 在一个方面,与亲本Fc区相比,优选地,本发明的变体Fc区不具有实质性提高的FcRn结合活性,尤其是在pH7.4时。

[0423] 在又一方面,在上述制备方法中的氨基酸变更选自表4中描述的任何单一变更、单一变更的组合或组合变更。

[0424] 包含通过任何上述方法或本领域已知的其他方法产生的变体Fc区的多肽包括在本发明中。

[0425] C. 测定

[0426] 通过本领域中已知的多种测定法,可以对本文中提供的抗DENV抗体就其物理/化学特性和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。

[0427] 通过本领域中已知的多种测定法,可以对本文中提供的变体Fc区就其物理/化学特性和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。

[0428] 1. 结合测定及其他测定

[0429] 在一个方面,测试本发明的抗体的抗原结合活性,例如,通过已知方法,诸如ELISA、Western印迹等。在一个方面,测试包含本发明的变体Fc区的多肽的抗原结合活性,例如,通过已知方法,诸如ELISA、Western印迹等。

[0430] 在另一方面,竞争测定可用于鉴定与本文所述的任何抗DENV抗体竞争结合DENV和/或DENV E蛋白的抗体。在某些实施方案中,当这种竞争抗体过量存在时,其阻断(例如,降低)参照抗体与DENV和/或DENV E蛋白的结合至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多。在一些情况下,结合被抑制至少

80%、85%、90%、95%或更多。在某些实施方案中,这种竞争性抗体结合与本文所述的抗DENV抗体结合的相同表位(例如,线性或构象表位)。用于绘制抗体结合的表位的详细示例性方法提供在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”in *Methods in Molecular Biology* vol.66 (Humana Press,Totowa,NJ)中。

[0431] 在示例性竞争测定中,将固定的DENV或DENV E蛋白在包含结合DENV和/或DENV E蛋白的第一标记抗体和正在测试其与第一抗体竞争结合DENV或DENV E蛋白的能力的第二未标记抗体的溶液中温育。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的DENV或DENV E蛋白在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与DENV或DENV E蛋白结合的条件下孵育后,除去过量的未结合的抗体,并测量与固定的DENV或DENV E蛋白相关的标记的量。如果相对于对照样品,测试样品中与固定的DENV或DENV E蛋白相关的标记的量实质性减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合DENV或DENV E蛋白。见Harlow和Lane(1988) *Antibodies:A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0432] 用于确定含有变体Fc区的多肽对一个或多个FcR家族成员的结合活性的测定法描述于本文中或另外是在本领域中已知的。这种结合测定包括但不限于BIACORE®测定,其利用表面等离子体共振 (SPR) 现象,放大化学发光亲和均相测定 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) (ALPHA) 筛选,ELISA和荧光激活细胞分选 (FACS) (Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11):4005-4010)。

[0433] 在一个实施方案中,BIACORE®分析可用于评估包含变体Fc区的多肽的结合活性是否相对于特定FcR家族成员增强、或维持或降低。例如,通过观察从传感图分析获得的解离常数(Kd)值是否减少或增加,其中使用已知的方法和试剂,诸如蛋白A、蛋白L、蛋白A/G、蛋白G、抗-λ链抗体、抗κ链抗体、抗原肽、抗原蛋白),使各种FcR作为分析物与固定或捕获到传感器芯片上的包含变体Fc区的多肽相互作用。结合活性的变更还可以通过比较使一种或更多种类型的FcR作为分析物与包含变体Fc区的捕获多肽相互作用之前和之后的传感图上的共振单位(RU)值的变化来确定。备选地,可以将FcR固定或捕获到传感器芯片上,并且将包含变体Fc区的多肽用作分析物。

[0434] 在BIACORE®分析中,相互作用的观察中的物质(配体)之一被固定在传感器芯片上的金薄膜上,并通过从传感器芯片的反面照射光,从而全反射发生在金薄膜和玻璃之间的界面处,部分反射光 (SPR信号) 形成降低的反射强度的部分。当相互作用的观察中的另一种物质(分析物)在传感器芯片表面上流动并且配体与分析物结合时,固定的配体分子的质量增加并且在传感器芯片表面的溶剂的折射率变化。SPR信号的位置由于折射率的这种变化而移动(在另一方面,当该结合解离时,信号位置返回)。BIACORE®系统通过绘制纵坐标上传感器芯片表面的质量变化作为测量数据(传感图)来表示上述偏移量,或更具体地说是质量的时间变量。根据传感图确定与限制在传感器芯片表面上的配体结合的分析物的量。从传感图的曲线确定诸如结合速率常数(ka)和解离速率常数(kd)的动力学参数,并且根据这些常数的比率确定解离常数(Kd)。在BIACORE®方法中,优选使用用于测量抑制的方法。用于测量抑制的方法的实例描述在Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103(11):4005-4010(2006)。

[0435] ALPHA筛选通过ALPHA技术进行,该技术基于以下原理使用两个珠子,供体和受体。仅当与供体珠子结合的分子与结合到受体珠子的分子物理相互作用时才检测到发光信号,并且两个珠子彼此非常接近。供体珠子中的激光激发光敏剂将环境氧转化为激发态单线态氧。单线态氧分散在供体珠子周围,当它到达相邻的受体珠子时,在珠子中诱导化学发光反应,并最终发出光。当与供体珠子结合的分子不与结合受体珠子的分子相互作用时,化学发光反应不会发生,因为供体珠子产生的单线态氧没有到达受体珠子。

[0436] 例如,生物素化的多肽复合物与供体珠子结合,并且用谷胱甘肽S转移酶(GST)标记的Fc受体与受体珠子连接。在不存在包含变体Fc区的竞争性多肽复合物的情况下,包含亲本Fc区的多肽复合物与Fc受体相互作用并产生520-620nm信号。包含未标记的变体Fc区的多肽复合物与包含亲本Fc区的多肽复合物竞争与Fc受体的相互作用。相对结合活性可以通过量化作为竞争结果的观察到的荧光减少来确定。使用碘基-NHS-生物素等多肽复合物(例如抗体)的生物素化是众所周知的。适当地采用在携带融合基因的细胞中表达Fc受体和GST的方法来作为用GST标记Fc受体的方法,其中所述融合基因通过将编码框架中Fc受体的多核苷酸与编码可表达的载体中的GST的多核苷酸融合而产生,并且使用谷胱甘肽柱进行纯化。优选地,例如通过将它们拟合到单点竞争模型来分析所获得的信号,所述单点竞争模型使用诸如GRAPHPAD PRISM(GraphPad, San Diego)之类的软件进行非线性回归分析。

[0437] 具有降低的FcR结合活性的变体Fc区是指当使用基本上相同量的相应亲本Fc区和变体Fc区进行测定时,以比亲本Fc区基本上更弱的结合活性结合至FcR的Fc区。此外,具有提高的FcR结合活性的变体Fc区是指当使用大体相同量的亲本Fc区和变体Fc区进行测定时,以比相应亲本Fc区基本上更强的结合活性结合至FcR的Fc区。具有保持的FcR结合活性的变体Fc区是指当使用大体相同量的相应亲本Fc区和含有变体Fc区的多肽进行测定时,以与亲本Fc区相当或基本上无异的结合活性结合FcR的Fc区。

[0438] 可以根据上述测量方法测定各种FcR与Fc区的结合量的增加或减少来确定Fc区对各种FcR的结合活性是提高还是降低。这里,各种FcR与Fc区的结合量可以评价为通过将作为分析物的各种FcR与Fc区相互作用之前和之后改变的传感图的RU值的差除以在将Fc区捕获到传感器芯片之前和之后改变的传感图的RU值的差得到的值。针对Fc γ R或FcRn的Fc区的结合活性可以通过本文实施例5中描述的方法确定。

[0439] 在本发明中,实质性降低的Fc γ R结合活性优选地意味着,例如,针对Fc γ R的变体Fc区的结合活性作为亲本Fc区的Fc γ R结合活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%、小于0.2%或小于0.1%。其优选地意味着,[在Fc γ R与变体Fc区相互作用之前和之后改变的传感图的RU值的差]/[在将Fc γ R捕获到传感器芯片之前和之后改变的传感图的RU值的差]的比例小于1、小于0.8、小于0.5、小于0.3、小于0.2、小于0.1、小于0.08、小于0.05、小于0.03、小于0.02、小于0.01、小于0.008、小于0.005、小于0.003、小于0.002或小于0.001。

[0440] 在本发明中,不是实质性提高的FcRn结合活性,尤其是在pH7.4时,优选意味着例如与亲本Fc区的FcRn结合活性相比,变体Fc区对FcRn的结合活性,小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于90倍、小于80倍、小于70倍、小于60倍、小于50倍、小于40倍、小于30倍、小于20倍、小于10倍、小于5倍、小于3倍或小于2倍。其优选地意味着,例如,[在FcRn

与变体Fc区相互作用之前和之后改变的传感图的RU值的差]/[在将FcRn捕获到传感器芯片之前和之后改变的传感图的RU值的差]的比例小于0.5、小于0.3、小于0.2、小于0.1、小于0.08、小于0.05、小于0.03、小于0.02、小于0.01、小于0.008、小于0.005、小于0.003、小于0.002或小于0.001。

[0441] 为了确定含有变体Fc区的多肽对C1q的结合活性,可以进行C1q结合ELISA。简而言之,可以在4℃下将测定板与包含变体Fc区的多肽或包含亲本Fc区的多肽(对照)在包被缓冲液中包被过夜。然后可以洗涤和封闭该板。洗涤后,可将人C1q的等分试样加入各孔中,并在室温下温育2小时。在进一步洗涤后,可以向每个孔中加入100μl绵羊抗补体C1q过氧化物酶缀合的抗体,并在室温下温育1小时。可以再次用洗涤缓冲液洗涤该板,并且可以向每个孔中加入100μl含有OPD(邻苯二胺二盐酸盐(Sigma))的底物缓冲液。通过黄色外观观察到的氧化反应可以进行30分钟并通过添加100μl 4.5N H₂SO₄来停止。然后可以在(492-405) nm处读取吸光度。针对C1q的Fc区的结合活性可以通过本文实施例4中描述的方法确定。

[0442] 在一个方面,本发明的变体Fc区和亲本Fc区的C1q结合活性的差异作为亲本Fc区的C1q结合活性的函数小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%或小于5%。

[0443] 2. 活性测定

[0444] 在一个方面,提供测定以鉴别具有生物活性的抗DENV抗体。生物活性可包括例如阻断DENV E蛋白与宿主细胞的结合、抑制DENV进入宿主细胞、抑制和/或预防宿主细胞的DENV感染等。还提供在体内和/或在体外具有这种生物活性的抗体。

[0445] 在某些实施方案中,测试本发明的抗体的这种生物学活性。在某些实施方案中,可利用斑块减少中和测试(PRNT)测定用于测量测试抗体的活性或中和效力。在一些实施方案中,动物宿主可用于测量体内抗DENV活性。

[0446] 在某些实施方案中,针对在DENV和测试抗体之间的结合,可以直接测定细胞。免疫组织化学技术、共聚焦技术和/或评估结合的其他技术是本领域技术人员熟知的。各种细胞系可用于此类筛选测定,包括为此目的特别改造的细胞。用于筛选测定的细胞的实例包括哺乳动物细胞、真菌细胞、细菌细胞或病毒细胞。细胞可以是经刺激的细胞,例如用生长因子刺激的细胞。本领域技术人员将理解,本文公开的发明涵盖用于测量测试抗体结合DENV的能力的多种测定法。

[0447] 在一方面,提供了用于鉴定具有生物活性的抗ZIKV抗体的测定。生物活性可以包括,例如,阻断ZIKV与宿主细胞的结合、抑制ZIKV进入宿主细胞、抑制和/或预防宿主细胞的ZIKV感染等。还提供了在体内和/或体外具有这种生物活性的抗体。

[0448] 在某些实施方案中,测试了本发明的抗体的这种生物活性。在某些实施方案中,斑块减少中和测试(PRNT)测定或病灶减少中和测试(FRNT)测定可用于测量测试抗体的活性或中和效力。在一些实施方案中,动物宿主可用于测量体内抗ZIKV活性。

[0449] 在某些实施方案中,针对在ZIKV和测试抗体之间的结合,可以直接测定细胞。免疫组织化学技术、共聚焦技术和/或其他评估结合的技术是本领域技术人员所熟知的。各种细胞系可用于此类筛选测定,包括为此目的而特别工程改造的细胞。筛选测定中使用的细胞的实例包括哺乳动物细胞、真菌细胞、细菌细胞或病毒细胞。细胞可以是经刺激的细胞,例如用生长因子刺激的细胞。本领域技术人员将理解,本文公开的发明涵盖了用于测量测试

抗体结合ZIKV的能力的多种测定法。

[0450] 根据该测定法,可能需要细胞和/或组织培养。可以使用许多不同的生理学测定中的任何一种来检查细胞。备选地或另外地,可以进行分子分析,包括但不限于蛋白质印迹以监测蛋白质表达和/或测试蛋白质-蛋白质相互作用;质谱法以监测其他化学修饰;等等。

[0451] 在一些实施方案中,此类方法利用动物宿主。例如,适用于本发明的动物宿主可以是任何哺乳动物宿主,包括灵长类动物、雪貂、猫、狗、牛、马和啮齿动物诸如小鼠、仓鼠、兔和大鼠。在一些实施方案中,在施用测试抗体之前或同时,动物宿主接种,感染或以其他方式暴露于病毒。天然的(naive)和/或接种动物可用于任何各种研究。例如,这种动物模型可用于本领域已知的病毒传播研究。可以在病毒传播研究之前、期间或之后将测试抗体施用于合适的动物宿主,以确定测试抗体在阻断动物宿主中的病毒结合和/或感染性方面的功效。

[0452] 在一个方面,提供了用于鉴定具有生物活性的包含变体Fc区的多肽的测定法。生物学活性可包括,例如ADCC活性和CDC活性。还提供了在体内和/或体外具有这种生物学活性的包含变体Fc区的多肽。

[0453] 在某些实施方案中,测试本发明的包含变体Fc区的多肽的这种生物学活性。在某些方面,与包含亲本Fc区的多肽相比,包含本发明的变体Fc区的多肽调节效应子功能。在某个方面,该调节是ADCC和/或CDC的调节。

[0454] 可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体具有Fc γ R结合(因此可能具有ADCC活性),且保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞,NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, *Annu Annu Rev Immunol* (1991) 9, 457-492的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。用于评估感兴趣的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利No. 5,500,362 (见例如Hellstrom等, *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83, 7059-7063) 和Hellstrom等, *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82, 1499-1502; US 5,821,337 (见Bruggemann等, *J Exp Med* (1987) 166, 1351-1361)。备选地,可以采用非放射性测定方法(见,例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI)。对于此类测定有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或者另外地,可以在体内(例如在Clynes等, *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95, 652-656中公开的动物模型中)评估感兴趣的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体是否结合C1q,并且因此具有CDC活性。见例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(见,例如Gazzano-Santoro等, *J Immunol Methods* (1997) 202, 163-171; Cragg等, *Blood* (2003) 101, 1045-1052; 以及Cragg和Glennie, *Blood* (2004) 103, 2738-2743)。还可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(见,例如Petkova等, *Int Immunol* (2006) 18, 1759-1769)。

[0455] D. 免疫缀合物

[0456] 在一些实施方案中,本发明还提供免疫缀合物,其包含与一种或更多种细胞毒性剂(例如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素,或其片段)),或放射性同位素缀合的本文的抗DENV抗体。在一些实施方

案中,本发明还提供免疫缀合物,其包含与一种或更多种细胞毒性剂(例如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素,或其片段)),或放射性同位素缀合的本文的包含变体Fc区的多肽。

[0457] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或更多种药物缀合,所述药物不限于美登木素生物碱(见美国专利No.5,208,020,5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);他汀(auristatin)诸如单甲基奥瑞他汀(monomethylauristatin)药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(见美国专利No.5,635,483和5,780,588和7,498,298);多拉司他汀;加利车霉素或其衍生物(见美国专利No.5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环霉素诸如道诺霉素或阿霉素(见Kratz等,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利No.6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;诸如多西紫杉醇、紫杉醇、拉罗他赛、替司他赛和沃塔紫杉醇等的紫杉烷类;单端孢霉烯;和CC1065。

[0458] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含如本文所述的缀合至酶促活性毒素的抗体或其片段,其包括但不限于白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A、 α -八叠球菌素、油桐蛋白质、香石竹毒蛋白、美洲商陆(Phytolacca americana)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草(saponaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族化合物(tricothecenes)。

[0459] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含如本文所述的缀合至放射性原子以形成放射性缀合物的抗体。多种放射性同位素可用于放射性缀合物的产生。例子包括 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 以及Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可能包含用于核素研究的放射性原子,例如Tc-99m或 ^{123}I ,或用于核磁共振(NMR)成像的自旋标记(也称为磁共振成像,MRI),诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0460] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用各种双功能蛋白偶联剂制备,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如二甲基己二酸盐)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基))己二胺,双重氮二鎗衍生物(如双-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所描述的制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。见,W094/11026。所述接头可以是“可切割的接头”,其促进细胞中细胞毒性药物的释放。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、

二甲基接头或含二硫键的接头 (Chari等, Cancer Res. 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020)。

[0461] 本文中的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用交联剂制备的这种缀合物,包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC、硫代-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄基)苯甲酸酯),其可商业获得(例如,从Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.)。

[0462] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0463] 在某些实施方案中,本文中提供的任何抗DENV抗体都可用于检测生物样品中DENV和/或DENV E蛋白的存在。在某些实施方案中,本文提供的任何抗ZIKV抗体可用于检测生物样品中ZIKV的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织,诸如血清、全血、血浆、活组织检查样品、组织样品、细胞悬液、唾液、痰、口腔液、脑脊液、羊水、腹水、乳(milk)、初乳(colostrum)、乳腺分泌物、淋巴液、尿液、汗液、泪液、胃液、滑液、腹膜液、眼晶状体液或粘液。

[0464] 在一个实施方案中,提供用于诊断和检测方法的抗DENV抗体。在又一方面,提供了检测生物样品中DENV的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在允许抗DENV抗体与DENV结合的条件下使生物样品与本文所述的抗DENV抗体接触,以及检测在抗DENV抗体和DENV之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在又一方面,提供了检测生物样品中DENV E蛋白的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在允许抗DENV抗体与DENV E蛋白结合的条件下使生物样品与本文所述的抗DENV抗体接触,以及检测在抗DENV抗体和DENV E蛋白之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,抗DENV抗体用于选择适合用抗DENV抗体治疗的受试者,例如其中抗DENV抗体或DENV E蛋白是选择患者的生物标志物。

[0465] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性病症包括DENV感染和由DENV感染引起或与之相关的疾病和/或症状,诸如登革热、登革热出血热(DHF)和登革热休克综合征(DSS)。

[0466] 在一个实施方案中,提供了用于诊断或检测方法的抗ZIKV抗体。在进一步的方面,提供了检测生物样品中ZIKV的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物样品与如本文中所述的抗ZIKV抗体在允许抗ZIKV抗体结合ZIKV的条件下接触,并检测抗ZIKV抗体和ZIKV之间是否形成复合物。此种方法可以是体外或体内方法。在进一步的方面,提供了检测生物样品中ZIKV的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物样品与如本文中所述的抗ZIKV抗体在允许抗ZIKV抗体结合ZIKV的条件下接触,并检测抗ZIKV抗体和ZIKV之间是否形成复合物。此种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,将抗ZIKV抗体用于选择适合于利用抗ZIKV抗体治疗的受试者,例如,其中ZIKV是用于选择患者的生物标志物。

[0467] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性病症包括ZIKV感染和由ZIKV感染引起或与之相关的疾病和/或症状,例如发烧、皮疹、头痛、关节痛、红眼和肌肉疼痛。

[0468] 在某些实施方案中,提供了标记的抗DENV抗体。在某些实施方案中,提供了标记的抗ZIKV抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光的、发色的、电子致密的、化学发光的和放射性标记),以及例如,通过酶促反应或分子相互作用间接检测的诸如酶或

配体的部分。示例性标记包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I, 荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物, 罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、荧光素酶(luciferases), 例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利No.4,737,456)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮(dihydrophthalazinediones)、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶的杂环氧化酶)、与使用过氧化氢氧化染料前体(诸如HRP、乳过氧化物酶,或微过氧化物酶、生物素/抗生物素蛋白、自旋标签、噬菌体标签、稳定的自由基等)的酶偶联的那些。

[0469] 在一个实施方案中, 包含本发明的变体Fc区的抗体可以用作亲和纯化剂。在该方法中, 使用本领域熟知的方法将抗体变体固定在诸如Sephadex树脂或滤纸的固相上。使固定化的抗体变体与含有待纯化的抗原的样品接触, 然后用合适的溶剂洗涤支撑物, 所述溶剂会除去除了待纯化的抗原(其与固定化的抗体变体结合)之外基本上所有样本中的物质。最后, 用另一种合适的溶剂(诸如甘氨酸缓冲液, pH 5.0)洗涤支撑物, 所述溶剂会从抗体变体中释放抗原。

[0470] 抗体变体也可用于诊断测定, 例如用于检测特定细胞、组织或血清中感兴趣的抗原的表达。

[0471] 抗体变体可以用于任何已知的测定方法, 例如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, (1987) pp.147-158, CRC Press, Inc.。

[0472] F. 药物制剂

[0473] 通过混合具有期望纯度的此类抗体与一种或更多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980))以冻干制剂或水性溶液形式制备如本文中所述的抗DENV抗体的药物制剂。通过混合具有期望纯度的此类抗体与一种或更多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980))以冻干制剂或水性溶液形式制备如本文所描述的抗-ZIKV抗体的药物制剂。

[0474] 通过混合具有期望纯度的此类抗体与一种或更多种任选的药学上可接受的载体以冻干制剂或水性溶液形式制备如本文中所描述的包含变体Fc区的多肽的药物制剂。

[0475] 一般地, 药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 并且包括但不限于缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六烃季铵; 氯化苄甲烃铵; 苄索氯铵; 酚; 丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(少于约10个残基)多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反离子, 诸如钠; 金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性的药学上可接受的载体进一步包括间质药物分散剂诸如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP), 例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白, 诸如rHuPH20 (HYLENE (注册商

标),Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP及使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公布号2005/0260186和2006/0104968。在一个方面,将sHASEGP与一种或更多种另外的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0476] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利No.6,267,958中。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后面的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0477] 本文的制剂还可含有多于一种的活性成分,这些活性成分对于所治疗的具体适应症是必需的,优选那些具有互补活性但不会相互产生不利影响的活性成分。例如,可能需要进一步提供抗病毒剂(诸如但不限于干扰素(例如,干扰素 α -2b,干扰素- γ 等))、抗DENV单克隆抗体、抗DENV多克隆抗体、RNA聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、免疫调节剂、反义化合物、短干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、RNA适体、核酶及其组合。这种活性成分合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0478] 活性成分可包埋于例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),包埋在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中,或包埋在粗乳剂中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0479] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品形式,例如膜或微胶囊。

[0480] 用于体内施用的制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过透过无菌滤膜过滤。

[0481] G. 治疗方法和组合物

[0482] 本文中提供的任何抗DENV抗体可用于治疗方法中。

[0483] 在一个方面,提供用作药物的抗DENV抗体。在进一步的方面,提供了用于治疗DENV感染的抗DENV抗体。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的抗DENV抗体。在某些实施方案中,本发明提供抗DENV抗体,其用于治疗患有DENV感染的个体的方法中,包括向所述个体施用有效量的抗DENV抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种例如如下所述的另外的治疗剂。在进一步的实施方案中,本发明提供抗DENV抗体,其用于阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。在某些实施方案中,本发明提供抗DENV抗体,其用于在个体中阻断DENV E蛋白结合至和/或DENV进入宿主细胞的方法中,包括向所述个体施用有效的抗DENV抗体以阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。根据以上任何实施方案中所述的“个体”优选是人。

[0484] 在进一步的方面,本发明提供抗DENV抗体在生产或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗DENV感染。在进一步的实施方案中,所述药物用于治疗DENV感染的方法,包括向患有DENV感染的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种例如如下所述的另外的治疗剂。在进一步的实施方案中,所述药物用于阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。在进一步的实施方案中,所述药物用于在个体中阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞的方法,包括向所述个体施用有效量的药物以阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。根据以上任何实施方案中所述的“个体”可以是人。

[0485] 在进一步的方面,本发明提供治疗DENV感染的方法。在一个实施方案中,该方法包

括向患有这种DENV感染的个体施用有效量的抗DENV抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下所述。根据以上任何实施方案中所述的“个体”可以是人。

[0486] 在进一步的方面,本发明提供了用于在个体中阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞的方法。在一个实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的抗DENV抗体以阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0487] 在进一步的方面,该发明提供包含本文提供的任何抗DENV抗体的药物制剂,例如用于以上任何治疗方法。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗DENV抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗DENV抗体和至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。

[0488] 在进一步的方面,该药物制剂用于治疗DENV感染。在进一步的实施方案中,药物制剂用于阻断DENV E蛋白结合至宿主细胞和/或DENV进入宿主细胞。在一个实施方案中,将药物制剂施用至患有DENV感染的个体。根据以上任何实施方案中所述的“个体”优选是人。

[0489] 在某些实施方案中,DENV感染可包括由DENV感染引起或与之相关的疾病和/或症状,诸如登革热、登革热出血热(DHF)和登革热休克综合征(DSS)。

[0490] 在一方面,本发明提供用于治疗或预防寨卡病毒感染的方法,包含施用结合ZIKV的抗体。在一方面,本发明提供用于抑制寨卡病毒由怀孕的母体传播至胎儿的方法。在一方面,本发明提供用于预防先天性寨卡综合征(例如,先天性发育缺陷、小头畸形等)的方法,包含施用结合ZIKV的抗体。在一方面,本发明提供用于抑制降低胎儿重量(例如,整个婴儿、头部等)的方法,包含施用结合ZIKV的抗体。

[0491] 在一个实例中,术语“先天性寨卡综合征”是指出生缺陷的独特模式,这种模式对于出生前被寨卡病毒感染的胎儿和婴儿是独特的。如本领域技术人员将理解的,患有先天性寨卡综合征的受试者可能表现出以下症状,例如但不限于先天性发育缺陷、小头畸形、头骨已部分塌陷的严重小头畸形、具有特定脑损伤模式的脑组织减少(包括皮质下钙化)、对眼后的损伤(包括黄斑瘢痕和局灶性色素性视网膜斑驳)、先天性挛缩(如畸形足或关节挛缩)、出生后很快限制身体运动的张力过强等。相信本文所述抗体的施用将预防先天性寨卡综合征的至少一种(或至少两种或至少三种或至少四种或全部)症状。例如,本文所述的抗体可防止胎儿或婴儿在出生前感染寨卡病毒,从而抑制胎儿重量(例如整个婴儿、头部等)的减轻。

[0492] 本文所提供的任何抗ZIKV抗体可用于治疗方法。

[0493] 在一方面,提供了用作药物的抗ZIKV抗体。在进一步的方面中,提供了用于治疗ZIKV感染的抗ZIKV抗体。在某些实施方案中,提供了用于治疗方法的抗ZIKV抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗患有ZIKV感染的个体的方法中的抗ZIKV抗体,该方法包含向该个体施用有效量的抗ZIKV抗体。在一个这种实施方案中,该方法进一步包含向该个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下文所描述。在进一步的实施方案中,本发明提供了用于阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞的抗ZIKV抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用于在个体中阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞的方法中的抗ZIKV抗体,该方法包含向该个体施用有效的抗ZIKV抗体以阻断ZIKV结合宿主细

胞和/或ZIKV进入宿主细胞。根据上述实施方案中任一个的“个体”优选为人。

[0494] 在进一步的方面中,本发明提供抗ZIKV抗体在药物的制造或制备中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗ZIKV感染。在进一步的实施方案中,该药物用于治疗ZIKV感染的方法,该方法包含对患有ZIKV感染的个体施用有效量的药物。在一个这种实施方案中,该方法进一步包含向该个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下文所描述。在进一步的实施方案中,该药物用于阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞。在进一步的实施方案中,该药物用于在个体中阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞的方法,该方法包含向该个体施用有效量的药物以阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞。根据上述实施方案中任一个的“个体”优选为人。

[0495] 在进一步的方面中,本发明提供用于治疗ZIKV感染的方法。在一个实施方案中,该方法包含向患有ZIKV感染的个体施用有效量的抗ZIKV抗体。在一个这种实施方案中,该方法进一步包含向该个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下文描述。根据上述实施方案中任一个的“个体”优选为人。

[0496] 在进一步的方面中,本发明提供用于在个体中阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞的方法。在一个实施方案中,该方法包含向该个体施用有效量的抗ZIKV抗体以阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞。在一个实施方案中,“个体”为人。

[0497] 在进一步的方面中,本发明提供包含本文所提供的任何抗ZIKV抗体的药物制剂,例如,用于任何上述治疗方法。在一个实施方案中,药物制剂包含本文所提供的任何抗ZIKV抗体及药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文所提供的任何抗ZIKV抗体及至少一种另外的治疗剂,例如,如下文描述。

[0498] 在进一步的方面中,药物制剂用于治疗ZIKV感染。在进一步的实施方案中,药物制剂用于阻断ZIKV结合宿主细胞和/或ZIKV进入宿主细胞。在一个实施方案中,药物制剂施用于患有ZIKV感染的个体。根据上述实施方案中任一个的“个体”优选为人。

[0499] 在某些实施方案中,ZIKV感染可包括由ZIKV感染所引起或与之相关的疾病和/或症状,如发烧、皮疹、头痛、关节痛、红眼和肌肉疼痛。

[0500] 本文中提供的任何包含变体Fc区的多肽均可用于治疗方法中。

[0501] 在一个方面,提供了用作药物的包含变体Fc区的多肽。在某些实施方案中,提供了用于治疗方法的包含变体Fc区的多肽。在某些实施方案中,本发明提供包含变体Fc区的多肽,其用于治疗患有病症的个体的方法中,包括向所述个体施用有效量的包含变体Fc区的多肽。在一个这样的实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在一个实施方案中,所述病症是病毒感染。在一个实施方案中,所述“个体”是人。

[0502] 在进一步的方面,本发明提供包含变体Fc区的多肽在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗病症。在一些方面,所述多肽是抗体。在一些方面,所述多肽是Fc融合蛋白。在进一步的实施方案中,所述药物用于治疗病症的方法,包括向患有待治疗病症的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在一个实施方案中,所述病症是病毒感染。在一个实施方案中,所述“个体”是人。

[0503] 在进一步的方面,本发明提供了治疗病症的方法。在一个实施方案中,该方法包括

向患有这种病症的个体施用有效量的包含变体Fc区的多肽。在一个这样的实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在一个实施方案中,所述病症是病毒感染。在一个实施方案中,所述“个体”是人。

[0504] 在进一步的方面中,本发明提供包含本文提供的包含变体Fc区的多肽的药物制剂,其用于治疗方法,诸如本文所述的任何治疗方法。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的包含变体Fc区的多肽和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的包含变体Fc区的多肽和至少一种另外的治疗剂。

[0505] 在进一步的方面中,所述药物制剂用于治疗病症。在一个实施方案中,将所述药物制剂施用至患有病症的个体。在一个实施方案中,所述病症是病毒感染。在一个实施方案中,所述“个体”是人。

[0506] 包含本发明的变体Fc区的抗病毒抗体可以抑制用常规抗病毒抗体观察到的抗体依赖性增强(ADE)。ADE是通过激活Fc γ R使与抗体结合的病毒被吞噬,从而增强了病毒对细胞的感染的现象。减少与激活Fc γ R的相互作用的Fc修饰可以减轻ADE的风险。在位置234和235处的从亮氨酸到丙氨酸以形成LALA突变体的突变已经显示出在体内降低登革热感染的ADE的风险(Cell Host Microbe (2010) 8, 271-283)。然而,这些修饰降低了由抗体介导的其他效应免疫功能,例如ADCC和CDC。尤其是,可以预期CDC在抑制ADE中起重要作用,因此不应降低Fc区的补体成分C1q结合用于治疗功效。此外,通过改造改变对其补救受体FcRn的结合亲和力的Fc区,可以延长抗体半衰期,这可能导致预防性使用抗体来保护病毒感染。

[0507] 该病毒优选选自腺病毒、星状病毒、嗜肝DNA病毒、疱疹病毒、乳多空病毒、痘病毒、沙粒病毒、布尼亚病毒、钙病毒、冠状病毒、丝状病毒、黄病毒、正粘液病毒、副粘病毒、小核糖核酸病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、弹状病毒或披膜病毒。

[0508] 在优选的实施方案中,腺病毒包括但不限于人腺病毒。在优选的实施方案中,星状病毒包括但不限于哺乳动物星状病毒。在优选的实施方案中,嗜肝DNA病毒包括但不限于乙型肝炎病毒。在优选的实施方案中,疱疹病毒包括但不限于I型单纯疱疹病毒、2型单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒、Epstein-Barr病毒、水痘带状疱疹病毒、玫瑰病毒和卡波西肉瘤相关的疱疹病毒。在优选的实施方案中,乳多空病毒包括但不限于人乳头瘤病毒和人多瘤病毒。在优选的实施方案中,痘病毒包括但不限于类天花病毒、痘苗病毒、牛痘病毒、猴痘病毒、天花病毒、假痘病毒、丘疹性口炎病毒、特纳河痘病毒(tanapox virus)、雅巴猴肿瘤病毒和传染性软疣病毒。在优选的实施方案中,沙粒病毒包括但不限于淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、拉沙病毒、马丘波病毒和胡宁病毒。在优选的实施方案中,布尼亚病毒包括但不限于汉坦病毒、内罗病毒、正布尼亚病毒和白蛉病毒。在优选的实施方案中,钙蛋白病毒包括但不限于vesivirus,诺如病毒,诸如诺瓦克病毒和沙波病毒。在优选的实施方案中,冠状病毒包括但不限于人冠状病毒(严重急性呼吸综合征(SARS)的病原体)。在优选的实施方案中,丝状病毒包括但不限于埃博拉病毒和马尔堡病毒。在优选的实施方案中,黄病毒包括但不限于黄热病病毒、西尼罗河病毒、登革热病毒(DENV-1,DENV-2,DENV-3和DENV-4)、丙型肝炎病毒、流行性乙型脑炎(tick borne encephalitis)病毒、日本脑炎病毒、墨莱溪谷脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒、俄罗斯春夏脑炎病毒、鄂木斯克出血热病毒、牛病毒性腹泻病毒、Kyasanus森林病病毒和波瓦桑脑炎病毒。在优选的实施方案中,正粘液病毒包括但不限于A型流感病毒,B型流感病毒和C型流感病毒。在优选的实施方案中,副粘病毒包括但不限于副

流感病毒、腮腺炎病毒(rubula virus)(流行性腮腺炎)、麻疹病毒(麻疹)、肺病毒(诸如人呼吸道合胞病毒)和亚急性硬化性全脑炎病毒。在优选的实施方案中,小RNA病毒包括但不限于脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒A、柯萨奇病毒B、甲型肝炎病毒、埃可病毒和肠道病毒(eneterovirus)。在优选的实施方案中,呼肠孤病毒包括但不限于科罗拉多蜱热病毒和轮状病毒。在优选的实施方案中,逆转录病毒包括但不限于慢病毒,例如人免疫缺陷病毒和人T淋巴细胞病毒(HTLV)。在优选的实施方案中,弹状病毒包括但不限于狂犬病病毒(lyssavirus)(诸如狂犬病毒(rabies virus))、水泡性口炎病毒和感染性造血坏死病毒。在优选的实施方案中,披膜病毒包括但不限于甲病毒,诸如罗斯河病毒、O'nyong'nyong病毒、辛德毕斯病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒和西部马脑炎病毒和风疹病毒。

[0509] 在进一步的方面中,本发明提供用于制备药物和药物制剂的方法,包含将本文提供的任何抗DENV抗体与药学上可接受的载体混合,例如用于以上任何治疗方法。在一个实施方案中,制备药物或药物制剂的方法还包括向药物或药物制剂中添加至少一种另外的治疗剂。

[0510] 在进一步的方面中,本发明提供用于制备药物和药物制剂的方法,包含将本文提供的任何抗ZIKV抗体与药学上可接受的载体混合,例如用于以上任何治疗方法。在一个实施方案中,制备药物或药物制剂的方法还包括向药物或药物制剂中添加至少一种另外的治疗剂。

[0511] 本发明的抗体可在治疗中单独使用或与其他药剂组合使用。例如,本发明的抗体可与至少一种另外的治疗剂共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂为抗病毒剂(诸如但不限于干扰素(例如,干扰素 α -2b,干扰素- γ 等))、抗DENV单克隆抗体、抗DENV多克隆抗体、RNA聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、免疫调节剂、反义化合物、短干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、RNA适体、核酶及其组合。

[0512] 在进一步的方面,本发明提供用于制备药物和药物制剂的方法,包含将本文提供的任何包含变体Fc区的多肽与药学上可接受的载体混合,例如用于以上任何治疗方法。在一个实施方案中,制备药物或药物制剂的方法还包括向药物或药物制剂中添加至少一种另外的治疗剂。

[0513] 本发明的包含变体Fc区的多肽可在治疗中单独使用或与其他药剂组合使用。例如,本发明的包含变体Fc区的多肽可与至少一种另外的治疗剂共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂为抗病毒剂(诸如但不限于干扰素(例如,干扰素 α -2b,干扰素- γ 等))、抗病毒单克隆抗体、抗病毒多克隆抗体、RNA聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、免疫调节剂、反义化合物、短干扰RNA、短发夹RNA、微小RNA、RNA适体、核酶及其组合。

[0514] 上文提到的这种组合疗法包括联合施用(其中两种或更多种治疗剂包括在相同或分开的制剂中)和单独施用,在这种情况下,本发明的包含变体Fc区的抗体或多肽的施用可以在施用所述另外的治疗剂或药剂之前、同时和/或之后进行。在一个实施方案中,所述抗DENV抗体的施用和另外的治疗剂的施用彼此在约一个月内,或在约一、二或三周内,或在约一、二、三、四、五或六天内进行。在另一个实施方案中,所述包含变体Fc区的多肽的施用和另外的治疗剂的施用彼此在约一个月内,或在约一、二或三周内,或在约一、二、三、四、五或六天内进行。

[0515] 包含本发明的变体Fc区的抗体或多肽(和任何另外的治疗剂)可通过任何适合的

手段施用,包括胃肠外、肺内、和鼻内,及若期望用于局部治疗的话,通过病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,给药可以通过任何合适的路径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射进行。本文中考虑各种给药日程表,包括但不限于单次施用或在多个时间点里的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0516] 包含本发明的变体Fc区的抗体或多肽可以以一种符合良好的医学实践的方式配制、确定剂量及施用。在此背景中考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状态、病症原因、药剂递送部位、施用方法、施用日程以及其它为从业医生所知的因素。所述药剂无需但可任选地与一种或更多种目前用于预防或治疗所述问题病症的药剂一起配制。这类其它药剂的有效量取决于制剂中所存在的药剂的量、病症或治疗的类型、以及其它上述讨论的因素。这些制剂通常以与本文所描述的相同的剂量和施用途径使用,或者以本文所描述的剂量的约1%至99%使用,或通过任何剂量和凭经验/临床确定为合适的任何途径使用。

[0517] 为了预防或治疗疾病,包含本发明的变体Fc区的抗体或多肽(当单独或与一种或更多种其它另外的治疗剂联合使用时)的合适剂量将取决于所要治疗的疾病的类型、抗体的类型、包含所述变体Fc区的多肽的类型、疾病的严重性和病程、是否施用包含所述变体Fc区的抗体或多肽用于预防或治疗目的、之前的治疗、患者的临床史和对包含所述变体Fc区的抗体或多肽的响应、以及主治医师的自由裁量权。包含变体Fc区的抗体或多肽在一次或一系列的治疗中适合地施用至患者。根据疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的包含Fc变体的抗体或多肽可作为初始候选剂量用于向患者施用,不论,例如,通过一种或更多种单独施用,或通过连续输注。根据上述因素,一种典型的日剂量可能范围为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于在数天或更长时间内的重复施用,根据状况,治疗一般将持续直至发生对疾病症状的期望的抑制。所述包含Fc变体的抗体或多肽的一种示例性剂量可为在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg的一种或更多种剂量(或其任何组合)可被施用至患者。这种剂量可间歇施用,例如每周或每三周施用(例如使得患者接受约2-约20剂,或例如约6剂的所述包含Fc变体的抗体或多肽)。可施用初始较高的负荷剂量,接着施用一种或更多种较低的剂量。通过常规技术和测定法易于监测该治疗的进展。

[0518] 应当理解,可使用本发明的免疫缀合物代替抗DENV抗体或抗ZIKV抗体,或者除抗DENV抗体或抗ZIKV抗体外,可使用本发明的免疫缀合物进行任何上述制剂或治疗方法。同样应理解,可使用本发明的免疫缀合物代替包含本文提供的变体Fc区的多肽,或者除了包含本文提供的变体Fc区的多肽之外可使用本发明的免疫缀合物进行任何上述制剂或治疗方法。

[0519] H. 制品

[0520] 在本发明的另一方面,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上文所描述的病症的材料。制品包含容器和容器上的标签或与容器联合的包装说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。所述容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器容纳单独的或与另一种组合物组合的有效治疗、预防和/或诊断病况的组合物,并且可以具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可穿过的塞子的静脉内溶液

袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性成分是包含本发明的Fc变体的抗体或多肽。标签或包装说明书指示组合物用于治疗选择的病况。此外,制品可以包含(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的Fc变体的抗体或多肽;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含另外的细胞毒性或其他的治疗剂。在本发明的此实施方案中的制品可以进一步包含包装说明书,其指示组合物可用于治疗特定的病况。备选地,或此外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer's)溶液和葡聚糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0521] 应当理解,任何上述制品可包括本发明的免疫缀合物代替抗DENV抗体或抗ZIKV抗体,或者除了抗DENV抗体或抗ZIKV抗体之外,任何上述制品可包括本发明的免疫缀合物。可以理解,任何上述制品可以包括本发明的免疫缀合物代替包含变体Fc区的多肽,或者除了包含变体Fc区的多肽之外,任何上述制品可以包括本发明的免疫缀合物。

实施例

[0522] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应理解,在给出上文提供的一般描述的情况下,可以实施各种其他实施方案。

[0523] 实施例1:抗原和抗体的制备

[0524] DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4重组可溶性E蛋白的表达和纯化

[0525] 使用FreeStyle293-F细胞系或Expi293细胞系(Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA)瞬时表达来自DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4的具有羧基末端8x组氨酸标签的重组可溶性E蛋白(0.8E-His)(分别为SEQ ID NO:65-68)。通过从DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4中表达prM0.8E-His(分别为SEQ ID NO:61-64),prM0.8E-His在细胞中表达为单一多肽。然后对其进行细胞内加工以在prM和0.8E-His之间切割。结果,0.8E-His被分泌到细胞培养基中。将含有0.8E-His的条件培养基应用于填充有装有镍或钴的固定化金属亲和色谱(IMAC)树脂的柱,然后用咪唑洗脱。合并含有0.8E-His的级份并将其应用于Superdex 200凝胶过滤柱(GE healthcare, Uppsala, Sweden)。合并含有0.8E-His的级份并储存在-80℃。

[0526] 重组人Fc γ Rs的表达和纯化

[0527] 通过以下方法制备人Fc γ R的细胞外结构域。首先,通过本领域技术人员熟知的方法合成Fc γ R的细胞外结构域的基因。那时,每个Fc γ R的序列是根据NCBI登记的信息产生的。具体而言,Fc γ RIa基于NCBI登录No.NM_000566(版本No.NM_000566.3)的序列产生,Fc γ RIIa基于NCBI登录No.NM_001136219(版本No.NM_001136219.1)的序列产生,Fc γ RIIb基于NCBI登录No.NM_004001(版本No.NM_004001.3)的序列产生,Fc γ RIIIa基于NCBI登录No.NM_001127593(版本No.NM_001127593.1)的序列产生,且Fc γ RIIIb基于NCBI登录No.NM_000570(版本No.NM_000570.3)的序列产生,并且His标签附着于每个Fc γ R构建体的C末端。此外,对于Fc γ RIIa,Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb,多态性的存在是已知的,并且对于Fc γ RIIa通过参考Warmerdam等人(J Exp Med(1990)172,19-25);对于Fc γ RIIIa通过参考Wu等人(J Clin Invest(1997)100,1059-1070);和对于Fc γ RIIIb通过参考Ory等人(J Clin Invest(1989)84,1688-1691)产生多态性位点。

[0528] 通过将获得的基因片段插入动物细胞表达载体中构建表达载体。将构建的表达载体瞬时导入人胚胎肾细胞来源的FreeStyle293细胞 (Invitrogen) 中以表达感兴趣的蛋白质。通过0.22- μ m过滤器过滤从上述经历瞬时引入的细胞的培养基中获得的培养上清液而制备的液体,原则上通过以下四个步骤纯化:(i) 阳离子交换柱色谱(SP Sepharose FF); (ii) 针对His标签的亲合柱层析(HisTrap HP); (iii) 凝胶过滤柱色谱(Superdex200); (iv) 无菌过滤。为了纯化Fc γ RI,用Q琼脂糖凝胶FF的阴离子交换柱层析用于步骤(i)。使用分光光度计在280nm下测量纯化蛋白质的吸光度。基于测量值,使用通过诸如PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423) 的方法测定的消光系数计算纯化蛋白质的浓度。

[0529] 重组小鼠Fc γ Rs的表达和纯化

[0530] 通过以下方法制备小鼠Fc γ R (mFc γ R) 的细胞外结构域:首先,通过本领域技术人员公知的方法合成Fc γ R细胞外结构域的基因。对于这种合成,每个Fc γ R的序列是基于NCBI中登记的信息制备的。具体地,mFc γ RI基于NCBI参考序列:NP_034316.1的序列制备;mFc γ RIIb基于NCBI参考序列:NP_034317.1的序列制备;mFc γ RIII基于NCBI参考序列:NP_034318.2的序列制备;并且mFc γ RIV基于NCBI参考序列:NP_653142.2的序列制备。这些序列中的每一个都用His标签进行C末端标记。

[0531] 将每个获得的基因片段插入用于在动物细胞中表达的载体中以制备表达载体。将制备的表达载体瞬时转移至人胚胎肾细胞衍生的FreeStyle293细胞 (Invitrogen) 以表达感兴趣的蛋白质。回收得到的培养上清液,使其通过0.22- μ m的过滤器,以得到培养上清液。照例,通过以下四个步骤纯化获得的培养上清液:(i) 离子交换柱层析, (ii) 针对His标签的亲合柱层析(His Trap HP), (iii) 凝胶过滤柱层析(Superdex 200), 和(iv) 无菌过滤。步骤(i) 的离子交换柱色谱使用用于mFc γ RI的Q Sepharose HP、用于mFc γ RIIb和mFc γ RIV的SP Sepharose FF和用于mFc γ RIII的SP Sepharose HP进行。D-PBS(-) 在步骤(iii) 中或之后用作溶剂,而含有0.1M精氨酸的D-PBS(-) 用于mFc-RIII。使用分光光度计在280nm处测量每种纯化蛋白质的吸光度,并通过使用通过诸如PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423) 的方法获得的值计算的消光系数计算纯化蛋白质的浓度。

[0532] 重组人FcRn的表达和纯化

[0533] FcRn是FcRn α 链和 β 2-微球蛋白的异二聚体。基于公开的人FcRn基因序列(J Exp Med (1994) 180, 2377-2381) 制备寡DNA引物。编码完整基因的DNA片段是使用人cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 作为模板和制备的引物通过PCR制备的。使用获得的DNA片段作为模板,通过PCR扩增编码含有信号区(Met1-Leu290) 的细胞外结构域的DNA片段,并将其插入哺乳动物细胞表达载体中。同样地,基于公开的人 β 2-微球蛋白基因序列(Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99, 16899-16903) 制备寡DNA引物。编码完整基因的DNA片段是使用人cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 作为模板和制备的引物通过PCR制备的。使用获得的DNA片段作为模板,通过PCR扩增编码含有信号区(Met1-Met119) 的全蛋白的DNA片段,并将其插入哺乳动物细胞表达载体中。

[0534] 可溶性人FcRn通过以下步骤表达。用PEI (Polyscience) 通过脂质转染法将构建用于表达人FcRn α 链 (SEQ ID NO:81) 和 β 2-微球蛋白 (SEQ ID NO:82) 的质粒导入人胚胎肾癌来源的细胞系HEK293H (Invitrogen) 的细胞中。收集所得培养物上清液,并使用IgG Sepharose 6Fast Flow (Amersham Biosciences) 纯化FcRn,然后使用HiTrap Q HP (GE

Healthcare) (J Immunol (2002) 169,5171-5180) 进一步纯化。

[0535] 重组抗体的表达和纯化

[0536] 使用FreeStyle293-F细胞系或Expi293细胞系(Thermo Fisher,Carlsbad,CA,USA)瞬时表达重组抗体。使用蛋白A,用常规方法完成从表达抗体的条件培养基中的纯化。如果需要,进一步进行凝胶过滤。

[0537] 重组可溶性人CD154的表达和纯化

[0538] 基于公开的蛋白质序列(NP_000065.1)合成人CD154基因。使用合成的DNA作为模板,通过PCR制备编码具有FLAG标签的可溶形式的人CD154(shCD154)的DNA片段,并将得到的DNA片段插入哺乳动物细胞表达载体中,从而产生FLAG-shCD154(SEQ ID NO:106)表达载体。通过本领域技术人员已知的常规方法确定获得的表达载体的核苷酸序列。如制造商提供的方案所述,使用FreeStyle 293细胞系(Invitrogen)表达FLAG-shCD154。转染后,使细胞生长适当的时间,然后收获条件培养基。使用25mM MES(pH6.0)对条件培养基进行阳离子交换层析,并用连续梯度25mM MES,1M NaCl(pH6.0)洗脱FLAG-shCD154。合并峰值级份,使用AmiconUltra Ultracel浓缩,并使用磷酸盐缓冲盐水(Wako)进行凝胶过滤层析。再次合并峰值级份并使用AmiconUltra Ultracel浓缩,然后通过用0.22微米PVDF膜过滤器过滤灭菌。为了确定纯化的FLAG-shCD154的浓度,使用分光光度计在280nm处测量吸光度。使用通过Protein Science 1995,4:2411-2423中描述的方法计算的消光系数,从确定的值计算蛋白质浓度。

[0539] 实施例2:生成对DENV E蛋白具有改善的亲活力的抗体变体

[0540] 合成编码抗DENV E蛋白抗体的VH(3CH,SEQ ID NO:1)和VL(3CL,SEQ ID NO:7)的基因,并使之分别与人IgG1 CH(SG182,SEQ ID NO:46)和人CL(SK1,SEQ ID NO:60)组合,且将两种构建体克隆到单一表达载体中。抗体在本文中称为DG_3CH-SG182/3CL-SK1,或称为3C。

[0541] 检查了许多突变及其组合以鉴定改善3C结合特性的突变和组合。然后将多个突变引入可变区以增强对E蛋白的结合亲和力。因此生成优化的VH变体,3CH912(SEQ ID NO:2)、3CH953(SEQ ID NO:3)、3CH954(SEQ ID NO:4)、3CH955(SEQ ID NO:5)、3CH1047(SEQ ID NO:6)、3CH987(SEQ ID NO:90)、3CH989(SEQ ID NO:91)、3CH992(SEQ ID NO:92)、3CH1000(SEQ ID NO:93)、3CH1046(SEQ ID NO:94)、3CH1049(SEQ ID NO:95),和优化的VL变体,3CL499(SEQ ID NO:8)、3CL563(SEQ ID NO:9)、3CL658(SEQ ID NO:10)、3CL012(SEQ ID NO:96)、3CL119(SEQ ID NO:97)、3CL633(SEQ ID NO:98)、3CL666(SEQ ID NO:99)、3CL668(SEQ ID NO:100)。将编码VH的基因与人IgG1 CH(SG182,SEQ ID NO:46;SG1095,SEQ ID NO:54;或SG1106,SEQ ID NO:59中任何一个)组合,并将编码VL的基因与人CL(SK1,SEQ ID NO:60)组合。将它们中的每一个克隆到表达载体中。表2总结了抗体变体的氨基酸序列。该变体之一DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1在本文中也称为3Cam,另一种变体DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1在本文中称为3Cam2。

[0542] 抗体在用重链和轻链表达载体的混合物共转染的HEK293细胞中表达,并通过蛋白A纯化。

[0543] 表2

[0544] 3C和3C变体的氨基酸序列

[0545]

抗体	SEQ ID NO:									
	VH	VL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3	CH	CL
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	1	7	11	13	16	21	24	27	46	60
DG_3CH912-SG182/3CL-SK1	2	7	11	14	17	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH954-SG182/3CL-SK1	4	7	11	15	18	21	24	27	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL-SK1	5	7	11	15	19	21	24	27	46	60
DG_3CH-SG182/3CL499-SK1	1	8	11	13	16	21	25	28	46	60
DG_3CH-SG182/3CL563-SK1	1	9	11	13	16	22	25	29	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL499-SK1	3	8	11	15	17	21	25	28	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL563-SK1	3	9	11	15	17	22	25	29	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL499-SK1	5	8	11	15	19	21	25	28	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL563-SK1	5	9	11	15	19	22	25	29	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1	6	10	12	15	20	23	26	30	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG1095/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	59	60
DG_3CH953-SG1095/3CL012-SK1	3	96	11	15	17	21	24	30	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL012-SK1	93	96	12	15	17	21	24	30	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL012-SK1	6	96	12	15	20	21	24	30	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL012-SK1	3	96	11	15	17	21	24	30	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL012-SK1	93	96	12	15	17	21	24	30	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL012-SK1	6	96	12	15	20	21	24	30	59	60
DG_3CH953-SG1095/3CL119-SK1	3	97	11	15	17	23	24	27	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL119-SK1	93	97	12	15	17	23	24	27	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL119-SK1	6	97	12	15	20	23	24	27	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL119-SK1	3	97	11	15	17	23	24	27	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL119-SK1	93	97	12	15	17	23	24	27	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL119-SK1	6	97	12	15	20	23	24	27	59	60
DG_3CH1049-SG182/3CL-SK1	95	7	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL-SK1	94	7	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL-SK1	91	7	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL-SK1	92	7	101	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL-SK1	90	7	101	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL012-SK1	95	96	12	15	20	21	24	30	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL012-SK1	94	96	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL012-SK1	91	96	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL012-SK1	92	96	101	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL012-SK1	90	96	101	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL119-SK1	95	97	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL119-SK1	94	97	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL119-SK1	91	97	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL119-SK1	92	97	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL119-SK1	90	97	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL668-SK1	95	100	12	15	20	21	24	30	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL668-SK1	94	100	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL668-SK1	91	100	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL666-SK1	95	99	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL666-SK1	94	99	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL666-SK1	91	99	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL633-SK1	95	98	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL633-SK1	94	98	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL633-SK1	91	98	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL668-SK1	3	100	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL668-SK1	93	100	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL666-SK1	3	99	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL666-SK1	93	99	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL633-SK1	3	98	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL633-SK1	93	98	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL666-SK1	6	99	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL666-SK1	92	99	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL633-SK1	6	98	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL633-SK1	92	98	101	15	17	21	24	27	46	60

[0546] 使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 在25℃下确定抗DENV E蛋白抗体结合DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4的E蛋白的亲和力。使用胺偶联试剂盒 (GE Healthcare) 将抗组氨酸抗体 (GE Healthcare) 固定在CM4传感器芯片的所有流动池上。所有抗体和分析物均在pH 7.4, 含有20mM磷酸钠, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20和0.005% NaN₃的PBS中制备。将具有C末端His标签的DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4的E蛋白捕获到流动池2或3上, 流动池1作为参照流动池。E蛋白的捕获水平针对200个共振单位 (RU)。在整个传感器表面上以250nM注射抗DENV E蛋白抗体180秒, 然后进行300秒的解离。使用10mM Gly-HCl pH1.5在每个循环后再生传感器表面。通过使用Biacore T200评估软件2.0版 (GE Healthcare) 处理并

拟合数据至1:1结合模型来确定结合亲和力。

[0547] 表3a和3b显示抗DENV E蛋白抗体与DENV-1 (在表中描述为DV1)、DENV-2 (在表中描述为DV2)、DENV-3 (在表中描述为DV3) 和DENV-4 (在表中描述为DV4) 的E蛋白结合的亲和力 (K_d)。与亲本3C相比,每种3C变体显示出对所有四种DENV血清型的提高的结合亲和力。作为实例,亲本抗体3C (DG_3CH-SG182/3CL-SK1) 和变体抗体3Cam (DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1) 之一的传感图显示在图1中。另外,亲本抗体3C (DG_3CH-SG182/3CL-SK1) 和变体抗体3Cam2 (DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1) 之一的传感图显示在图12中。

[0548] 表3a

[0549] 针对四种DENV血清型的3C和3C变体的Kd值

Fv变体	KD (M)			
	DV1	DV2	DV3	DV4
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	3.21E-08	1.40E-08	6.07E-09	1.69E-08
DG_3CH912-SG182/3CL-SK1	1.85E-09	8.11E-10	2.44E-10	8.78E-09
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	1.41E-09	7.76E-10	1.36E-10	6.20E-09
DG_3CH954-SG182/3CL-SK1	8.87E-10	1.22E-10	1.24E-10	4.35E-09
DG_3CH955-SG182/3CL-SK1	1.13E-09	7.94E-10	2.05E-10	7.80E-09
[0550] DG_3CH-SG182/3CL499-SK1	1.11E-08	4.73E-09	4.03E-09	8.35E-09
DG_3CH-SG182/3CL563-SK1	1.34E-08	4.43E-09	3.52E-09	1.18E-08
DG_3CH953-SG182/3CL499-SK1	1.46E-09	9.05E-10	2.11E-10	5.99E-09
DG_3CH953-SG182/3CL563-SK1	1.88E-09	9.22E-10	2.64E-10	8.21E-09
DG_3CH955-SG182/3CL499-SK1	1.26E-09	1.03E-09	3.31E-10	8.26E-09
DG_3CH955-SG182/3CL563-SK1	1.91E-09	1.04E-09	2.90E-10	1.22E-08
DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1	3.51E-09	7.65E-10	3.82E-12*	9.11E-09
DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1	2.14E-09	8.43E-10	2.31E-13*	5.61E-09

[0551] 注:*强结合,放慢速率<1E-05,KD不能唯一确定。

[0552] 表3b

[0553] 针对DENV1和DENV3血清型的3C和3C变体的Kd值

[0554]

Fv变体	KD (M)	
	DV1	DV3
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	2.25E-08	6.35E-09
DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1	2.98E-09	5.01E-12 *
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	1.80E-09	9.85E-13 *
DG_3CH1000-SG182/3CL-SK1	1.79E-09	3.49E-12 *
DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1	2.06E-09	7.22E-11 *
DG_3CH953-SG1095/3CL-SK1	1.79E-09	7.03E-12 *
DG_3CH1000-SG1095/3CL-SK1	1.80E-09	1.68E-11 *
DG_3CH1047-SG1095/3CL-SK1	2.09E-09	2.93E-12 *
DG_3CH953-SG1106/3CL-SK1	1.85E-09	7.08E-12 *
DG_3CH1000-SG1106/3CL-SK1	1.84E-09	2.99E-13 *
DG_3CH1047-SG1106/3CL-SK1	2.12E-09	4.71E-12 *
DG_3CH953-SG1095/3CL012-SK1	1.86E-09	5.53E-12 *
DG_3CH1000-SG1095/3CL012-SK1	1.83E-09	9.59E-13 *
DG_3CH1047-SG1095/3CL012-SK1	2.21E-09	3.17E-12 *
DG_3CH953-SG1106/3CL012-SK1	1.89E-09	1.06E-11 *
DG_3CH1000-SG1106/3CL012-SK1	1.91E-09	1.01E-13 *
DG_3CH1047-SG1106/3CL012-SK1	2.18E-09	2.36E-12 *
DG_3CH953-SG1095/3CL119-SK1	1.99E-09	7.18E-12 *
DG_3CH1000-SG1095/3CL119-SK1	1.92E-09	4.28E-14 *
DG_3CH1047-SG1095/3CL119-SK1	2.23E-09	3.79E-12 *
DG_3CH953-SG1106/3CL119-SK1	1.96E-09	2.17E-12 *
DG_3CH1000-SG1106/3CL119-SK1	1.91E-09	1.82E-12 *
DG_3CH1047-SG1106/3CL119-SK1	2.29E-09	4.36E-12 *
DG_3CH1049-SG182/3CL-SK1	2.14E-09	2.39E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL-SK1	1.91E-09	2.13E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL-SK1	1.84E-09	4.48E-13 *
DG_3CH992-SG182/3CL-SK1	2.02E-09	4.03E-12 *
DG_3CH987-SG182/3CL-SK1	1.82E-09	9.86E-13 *
DG_3CH1049-SG182/3CL012-SK1	2.26E-09	1.05E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL012-SK1	1.92E-09	1.45E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL012-SK1	1.52E-09	9.67E-14 *
DG_3CH992-SG182/3CL012-SK1	1.72E-09	1.07E-12 *
DG_3CH987-SG182/3CL012-SK1	1.42E-09	2.67E-12 *
DG_3CH1049-SG182/3CL119-SK1	1.72E-09	5.09E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL119-SK1	1.53E-09	2.73E-12 *
DG_3CH989-SG182/3CL119-SK1	1.53E-09	6.83E-12 *
DG_3CH992-SG182/3CL119-SK1	1.87E-09	5.15E-13 *
DG_3CH987-SG182/3CL119-SK1	1.53E-09	7.15E-13 *
DG_3CH1049-SG182/3CL668-SK1	1.70E-09	1.55E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL668-SK1	1.56E-09	5.59E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL668-SK1	1.50E-09	3.03E-12 *
DG_3CH1049-SG182/3CL666-SK1	1.72E-09	2.95E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL666-SK1	1.52E-09	4.70E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL666-SK1	1.50E-09	1.96E-12 *
DG_3CH1049-SG182/3CL633-SK1	1.73E-09	4.10E-12 *
DG_3CH1046-SG182/3CL633-SK1	1.64E-09	2.01E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL633-SK1	1.54E-09	2.37E-12 *
DG_3CH953-SG182/3CL668-SK1	1.68E-09	2.36E-12 *
DG_3CH1000-SG182/3CL668-SK1	1.68E-09	8.00E-13 *
DG_3CH953-SG182/3CL666-SK1	1.69E-09	5.48E-12 *
DG_3CH1000-SG182/3CL666-SK1	1.66E-09	2.50E-12 *
DG_3CH953-SG182/3CL633-SK1	1.65E-09	4.96E-12 *
DG_3CH1000-SG182/3CL633-SK1	1.77E-09	4.25E-12 *
DG_3CH1047-SG182/3CL666-SK1	9.82E-10	4.20E-11 *
DG_3CH992-SG182/3CL666-SK1	1.39E-09	8.02E-13 *
DG_3CH1047-SG182/3CL633-SK1	9.56E-10	4.37E-13 *
DG_3CH992-SG182/3CL633-SK1	1.27E-09	2.95E-12 *

[0555] 注:*强结合,放慢速率<1E-05,KD不能唯一确定。

[0556] 实施例3:用于改善性质的抗体CH变体的生成

[0557] 将多个突变引入人IgG1重链恒定区CH(SG182,SEQ ID NO:46),并且因此,生成人IgG1 CH变体,SG192(SEQ ID NO:47)、SG1085(SEQ ID NO:48)、SG1086(SEQ ID NO:49)、SG1087(SEQ ID NO:50)、SG1088(SEQ ID NO:51)、SG1089(SEQ ID NO:52)、SG1090(SEQ ID NO:53)、SG1095(SEQ ID NO:54)、SG1096(SEQ ID NO:55)、SG1097(SEQ ID NO:56)、SG1098(SEQ ID NO:57)、SG1105(SEQ ID NO:58)、SG1106(SEQ ID NO:59)、SG1109(SEQ ID NO:107)、SG1044(SEQ ID NO:108)和SG1045(SEQ ID NO:109)。将编码CH变体的基因与3C的VH(3CH,SEQ ID NO:1),3C变体之一(3CH1047,SEQ ID NO:6)或抗CD154抗体(SLAPH0336a,SEQ ID NO:88)组合。将抗CD154抗体的VL基因(SLAPL0336a,SEQ ID NO:89)与人CL(SK1,SEQ ID NO:60)组合。将它们中的每一个克隆到表达载体中。表4总结了CH变体的细节。使用可在三聚体抗原CD154的存在下形成大免疫复合物的抗CD154抗体SLAPH0336a/SLAPL0336a的可变区,以评价CH变体与每种Fc受体的亲合力结合。

[0558] 抗体在用重链和轻链表达载体的混合物共转染的HEK293细胞中表达,并通过蛋白A纯化。

[0559] 表4

[0560] 变体Fc区的氨基酸序列

变体名称	ID	突变	SEQ ID NO:
WT	SG182	-	46
LALA	SG192	L234A,L235A	47
KWES	SG1085	K326W,E333S	48
EFT+AE	SG1086	G236A,S267E,H268F,S324T,I332E	49
EFT	SG1087	S267E,H268F,S324T	50
LALA+KWES	SG1088	L234A,L235A,K326W,E333S	51
LALA+EFT+AE	SG1089	L234A,L235A,G236A,S267E,H268F,S324T,I332E	52
LALA+EFT	SG1090	L234A,L235A,S267E,H268F,S324T	53
LALA+KAES	SG1095	L234A,L235A,K326A,E333S	54
LALA+KDES	SG1096	L234A,L235A,K326D,E333S	55
LALA+KEES	SG1097	L234A,L235A,K326E,E333S	56
LALA+KMES	SG1098	L234A,L235A,K326M,E333S	57
LALA+ACT3+KAES	SG1105	L234A,L235A,K326A,E333S,M428L,N434A,Y436T,Q438R,S440E	58
LALA+ACT5+KAES	SG1106	L234A,L235A,K326A,E333S,M428L,N434A,Q438R,S440E	59
KAES	SG1109	K326A,E333S	107
LALA+ACT3	SG1044	L234A,L235A,M428L,N434A,Y436T,Q438R,S440E	108
LALA+ACT5	SG1045	L234A,L235A,M428L,N434A,Q438R,S440E	109

[0562] 实施例4:具有Fc变体的抗体与补体C1q的结合亲和力

[0563] 人C1q结合试验

[0564] 将具有Fc变体的抗CD154抗体(内部抗体(in-house antibodies),其使用实施例3中描述的方法生成)分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp(Nalge Nunc International)上,并使其在4℃下放置过夜。用PBST洗涤后,用含有0.5%BSA和1×Block Ace:Blocking Reagent(DS Pharma)的TBST在室温下封闭板2小时。洗涤板后,将人C1q(Calbiochem)分配到板中,并在室温下静置1小时。洗涤板,加入HRP标记的抗人C1q抗体(Bio Rad),在室温下反应1小时,并进行洗涤。随后,添加TMB底物(Invitrogen)。通过读板器在450nm(测试波长)和570nm(参照波长)的波长下测量信号。通过将LALA突变引入Fc区,减弱了具有野生型Fc区

(WT)的抗体与人C1q的结合亲和力,并且减弱的与人C1q的结合亲和力通过除LALA突变外进一步引入KWES、EFT或EFT+AE来恢复(图2)。LALA+KMES突变略微增加结合亲和力,而LALA+KWES、LALA+KAES和LALA+KEES突变体以与WT相当的亲和力与C1q结合(图3)。上述LALA或LALA+KAES突变体的结合特性不受进一步引入ACT3或ACT5突变的影响(图4)。

[0565] 小鼠C1q结合试验

[0566] 将具有Fc变体的抗CD154抗体(内部抗体(in-house antibodies),其使用实施例3中描述的方法生成)分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp(Nalge Nunc International)上,并使其在4℃下放置过夜。用PBST洗涤后,用含有0.5%BSA和1×Block Ace:Blocking Reagent(DS Pharma)的TBST在4℃下封闭板7小时。洗涤平板后,将10%小鼠血浆(Innovative Research)分配到平板中,并在4℃下放置过夜。洗涤板,加入生物素化的抗小鼠C1q抗体(Hycult Biotech),在室温下反应1小时,并进行洗涤。加入链霉抗生物素蛋白-HRP(Pierce)在室温下反应1小时,并进行洗涤。随后,添加ABTS ELISA HRP底物(KPL)。通过读板器在405nm的波长下测量信号。通过将LALA突变引入Fc区,减弱了具有野生型Fc区(WT)的抗体与小鼠C1q的结合亲和力,并且减弱的与小鼠C1q的结合亲和力通过除LALA突变外进一步引入KAES来恢复。上述LALA或LALA+KAES突变体的结合特性不受进一步引入ACT3或ACT5突变的影响(图5)。

[0567] 实施例5:Fc变体与FcγR和FcRn结合的Biacore分析

[0568] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在25℃下测定Fc变体在pH 7.4下对人或小鼠FcγR和人FcRn的结合。所有抗体和FcγR或FcRn均在含有50mM磷酸钠,150mM NaCl,0.05%吐温20,0.005%NaN₃的PBS-PH 7.4中制备。对于FcγR结合测定,使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)将抗组氨酸抗体(GE Healthcare)固定在CM4传感器芯片的所有流动池上。通过抗组氨酸抗体在流动池2、3或4上捕获每种FcγR,流动池1作为参照流动池。FcγR捕获水平针对400共振单位(RU)。在所有流动池上以100nM注射所有抗体。通过混合1:1摩尔比的抗体和三聚体CD154制备免疫复合物,并在室温下温育1小时。使用10mM甘氨酸-HCl,pH 1.5,在每个循环后再生传感器表面。

[0569] 对于FcRn结合测定,使用生物素CAPture试剂盒(GE Healthcare)将生物素CAPture Reagent(GE Healthcare)固定在CAP传感器芯片的两种流动池1和2上。将生物素化的FcRn捕获到流动池2上,流动池1作为参照流动池。FcRn捕获水平针对400RU。在流动池1和2上以100nM注射所有抗体。通过混合1:1摩尔比的抗体和三聚体CD154制备免疫复合物,并在室温下温育1小时。每个循环后使用8M盐酸胍,1M NaOH(3:1体积/体积)再生传感器表面。

[0570] 将结合水平标准化为相应FcγR或FcRn的捕获水平。基于结合反应监测单独的抗体或免疫复合物(抗体和三聚体CD154抗原)对人或小鼠FcγR和人FcRn的结合。免疫复合物用于评价通过亲合力效应增强的对FcγR或FcRn的结合。人FcγR1a、FcγR2a 167H和167R、FcγR2b、FcγR3a 158F和158V、FcγR3b NA1和NA2的结果显示在图6(a)-(h)中。小鼠FcγR1、FcγR2b、FcγR3、FcγR4的结果显示在图7(a)-(d)中。对于每种测试的FcγR,通过将LALA、LALA+KAES或LALA+KWES突变引入Fc区,实质性降低野生型Fc区(描述为WT IgG)的结合。使用单独的抗体(描述为仅Ab)和免疫复合物(描述为CD154IC)的测定之间的趋势大致相同。对于大多数测试的FcγR,与WT IgG相比,KAES或KWES突变体的结合没有大大降低。人

FcRn的结果如图8所示。即使在将LALA或LALA+KAES突变引入Fc区之后,野生型Fc区(描述为hIgG1)与人FcRn的结合似乎也未受影响。通过进一步引入ACT3或ACT5突变,所述结合略微增强,但仍然保持相对低(图8)。

[0571] 实施例6:抗DENV抗体对DENV感染的体内功效

[0572] 用 10^6 噬斑形成单位(pfu) DENV-2株D2Y98P腹膜内感染6-8周龄的AG129小鼠。48小时后,小鼠用P1缓冲液中的1-30 μ g抗体处理。抗体通过眼眶后路径静脉内注射。24小时后,也就是最初感染后72小时,收集血液。在先前的研究中(Zust等人,J Virol (2014) 88,7276-7285;Tan等人,PLoS Negl Trop Dis (2010) 4,e672),已经确定在用D2Y98P感染后的峰值病毒血症在感染后3-4天内达到。从每只小鼠的血浆中提取病毒RNA,进行定量PCR,并与噬斑测定中具有已知感染性的DENV-2标准品进行比较。与该小鼠模型中的PBS对照相比,3C和3Cam抗体均大大降低了病毒血症,并且两种抗体的功效相当。与仅具有LALA突变的抗体相比,在Fc区中具有LALA+KAES突变的抗体显示出更强的功效。这是3C和3Cam抗体的情况(图9)。该结果表明通过向LALA突变添加KAES突变来恢复C1q结合活性有助于抗体的抗病毒功效。

[0573] 用 10^6 - 10^7 噬斑形成单位(pfu) DENV病毒(DENV-1株08K3126,DENV-2株D2Y98P,DENV-3株VN32/96,DENV-4株TVP360)腹膜内感染6-8周龄的AG129小鼠。48小时后,小鼠用P1缓冲液中的1-30 μ g抗体处理。抗体通过眼眶后路径静脉内注射。24小时后,也就是最初感染后72小时,收集血液。在先前的研究中(Zust等人,J Virol (2014) 88,7276-7285;Tan等人,PLoS Negl Trop Dis (2010) 4,e672),已经确定在用D2Y98P感染后的峰值病毒血症在感染后3-4天内达到。从每只小鼠的血浆中提取病毒RNA,进行定量PCR,并与病灶形成测定中具有已知感染性的DENV-2标准品进行比较。在此小鼠模型中,与P1缓冲液对照相比,具有相同Fc变体(LALA+KAES)的3C和3Cam2抗体大大降低了病毒血症,与3C抗体相比,3Cam2抗体降低了病毒血症(图10)。

[0574] 与具有增加的施用抗体剂量的仅具有LALA突变的抗体相比,在Fc区中具有LALA+KAES突变的3Cam2显示出更强的功效(图11)。该结果表明通过向LALA突变添加KAES突变来恢复C1q结合活性有助于抗体的抗病毒功效。

[0575] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实施例详细地描述了前述发明,但是描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地通过引用将其整体并入。

[0576] 实施例7:登革热特异性抗体3C和3Cam2对寨卡病毒交叉反应的体外测试

[0577] 7.1.FRNT测定

[0578] 为了测试DG_3CH1047-SG1106/3CL_SK1(或3Cam2-LALA+KAES+ACT5)对Zika的中和能力,进行了病灶减少中和(FRNT)测定。结果表明,与DG_3CH-SG1106/3CL_SK1(或3C-LALA+KAES+ACT5)相比,3Cam2-LALA+KAES+ACT5对Zika的中和能力更高(图13)。表5提供了对寨卡病毒的平均中和能力或EC50。

[0579] 测试的抗体的序列如下:

[0580] • 3Cam2:

[0581] DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG182 (SEQ ID NO:46) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0582] • 3Cam2-LALA+KAES:

[0583] DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG1095 (SEQ ID NO:54) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0584] • 3Cam2-LALA+KAES+ACT5:

[0585] DG_3CH1047 (SEQ ID NO:6) -SG1106 (SEQ ID NO:59) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0586] • 3C:

[0587] DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG182 (SEQ ID NO:46) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0588] • 3C-LALA:

[0589] DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG192 (SEQ ID NO:47) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0590] • 3C-LALA+KAES+ACT5:

[0591] DG_3CH (SEQ ID NO:1) -SG1106 (SEQ ID NO:59) /3CL (SEQ ID NO:7) _SK1 (SEQ ID NO:60)

[0592] 表5

[0593] 抗体3Cam2-LALA+KAES+ACT5及3C-LALA+KAES+ACT5对寨卡的中和能力

[0594] EC50 (μg/mL)	3Cam2-LALA+KAES+ACT5	3C-LALA+KAES+ACT5
实验1	0.33	5.33
实验2	0.93	1.12
平均值	0.63	3.225

[0595] 7.2. 利用寨卡病毒的ADE测试

[0596] 为了测试与抗体的野生型Fc版本相比3Cam2-LALA+KAES+ACT5是否不仅消除了DENV感染的增强,而且还消除了Zika病毒感染的增强,我们使用K562细胞进行了ADE测试(图14)。该方法与用于DENV的方法相同。对于DG_3CH1047-SG182/3CL_SK1(或3Cam2)的野生型Fc版本,观察到增强,但对于其Fc变体DG_3CH1047-SG1095/3CL_SK1(或3Cam2-LALA+KAES)和3Cam2-LALA+KAES+ACT5没有观察到增强(图14A)。用新一批的3Cam2Ab重复该实验,确认Fc变体抗体可消除增强作用。

[0597] 总体而言,数据表明,LALA突变消除了DENV和Zika病毒感染的增强,另外的KAES和ACT5突变并未逆转LALA的作用。

[0598] 7.3. 体外方法

[0599] 7.3.1. 病毒

[0600] Zika病毒(亚洲毒株,登录号为KF993678)是从新加坡环境卫生研究所(Environmental Health Institute,Singapore)获得的。该病毒在C6/36细胞(ATCC)中生长,并使用病灶形成测定法进行如下定量:感染前20-24小时,将每孔 1×10^5 个BHK-21细胞接种到24孔板中,并在37℃,5%CO₂下温育过夜。将含有病毒的上清液以1:100到1:100,000连续稀释,并在37℃,5%CO₂下在细胞单层中以500μL的体积温育2-3小时。温育结束时,将每个孔用0.5mL RPMI中的0.8%甲基纤维素覆盖。将板在37℃,5%CO₂下温育4.5天。

[0601] 为了染色感染的细胞,除去具有甲基纤维素的细胞培养基,并用3.7%甲醛固定细

胞30分钟。除去甲醛后,用自来水洗涤板,并用1XPBS中的1%Triton X-100透化处理细胞。在另一个洗涤步骤之后,将在1%FBS/1XPBS中稀释的抗体4G2用于染色受感染的细胞,然后与在1%FBS/PBS中以1:2,000稀释的多克隆山羊抗小鼠-HRP一起温育。Trueblue过氧化物酶底物(KPL)用于显色反应。手动计数每个孔的病灶,并基于所有可计数孔的计数平均值计算初始浓度。

[0602] 7.3.2.FRNT测定

[0603] 感染前20-24小时,将每孔 1×10^5 BHK-21细胞接种到24孔板中,并在 37°C ,5% CO_2 下温育过夜。在RPMI培养基中的96个U形底无菌板中制备抗体稀释液,并添加恒定量的病毒。将该混合物在 37°C ,5% CO_2 下温育30分钟,然后添加到细胞中。用新鲜的450 μL 5%FBS/RPMI代替来自24孔板的过夜培养基,并将50 μL 病毒/抗体混合物添加到孔中,并在 37°C ,5% CO_2 下温育2-3小时。

[0604] 温育结束时,将每个孔用0.5mL RPMI中的0.8%甲基纤维素覆盖。将板在 37°C ,5% CO_2 下温育4.5天。

[0605] 为了染色感染的细胞,除去具有甲基纤维素的细胞培养基,并用3.7%甲醛固定细胞30分钟。除去甲醛后,用自来水洗涤板,并用1%PBS中的1%Triton X-100透化处理细胞。在另一个洗涤步骤之后,将在1%FBS/1XPBS中稀释的抗体4G2用于染色受感染的细胞,然后与在1%FBS/PBS中以1:2,000稀释的多克隆山羊抗小鼠-HRP一起温育。Trueblue过氧化物酶底物(KPL)用于显色反应。手动计数每个孔的病灶,并使用Prism软件(三参数曲线拟合)计算EC50值。

[0606] 7.3.3.K562 ADE测定

[0607] 将在RPMI/10%FCS培养基中的 6×10^4 K562细胞/孔接种到96孔圆底组织培养板中,并培养过夜。在分开的圆底板中制备抗体的系列稀释液,并加入恒定量的病毒。将混合物在 37°C 下温育30分钟,然后向K562细胞中添加50 μL 。MOI为1。在添加抗体/病毒混合物之前,除去过夜的培养基。在 37°C 温育90分钟后,添加RPMI,10%FCS进行2.5天的进一步温育。然后将细胞用Cytofix/Cytoperm溶液(Becton Dickinson)固定,然后用抗E抗体4G2-Alexa647和抗NS1-Alexa488染色。在具有96孔HTS单元(BD)的FACS Verse流式细胞仪上分析样品。

[0608] 实施例8:登革热特异性抗体3C和3Cam2对寨卡病毒感染的保护能力的体内测试

[0609] 8.1.治疗性抗体治疗的功效

[0610] 由于AG129小鼠对寨卡病毒高度敏感,甚至比DENV感染后更早死于感染,因此对于寨卡我们选择IFNAR模型。

[0611] IFNAR小鼠缺乏I型IFN受体(IFNAR),但通常表达II型或IFN γ 受体(IFNGR)。

[0612] 根据以前的出版物[Cell Host Microbe.2016;19(5):720-30.doi:10.1016/j.chom.2016.03.010.]选择了104pfu/小鼠的病毒剂量。使用的寨卡病毒株是在加拿大从泰国归来的旅行者中分离出来的。毒株来自亚洲种系。用100 μg 抗体的剂量处理小鼠。

[0613] 与用P1缓冲液处理的对照小鼠相比,寨卡病毒感染后两天用3Cam2-LALA+KAES+ACT5处理的小鼠在感染后第3天和第5天的病毒血症明显降低。3Cam2-LALA+KAES+ACT5比3C-LALA+KAES+ACT5更有效地降低了病毒血症(图15)。在存活分析中,与感染后第15天全部死亡的P1处理小鼠相反,两个抗体处理组均存活到至少第50天(实验结束)(图16)。

[0614] 8.2.体内法

[0615] 8.2.1.用于体内处理的抗体制剂

[0616] 将抗体以若干毫克/毫升的浓度在P1缓冲液(20mM His,150mM Arg-Asp,pH6.0)中浓缩,并在体内处理前不久在P1缓冲液中稀释至所需浓度。

[0617] 8.2.2.小鼠

[0618] 将AG129小鼠或IFNAR小鼠按照指示用于体内实验。AG129小鼠购自英国的B&K Universal。IFNAR小鼠(B6.129S2-Ifnar1tm1Agt/Mmjax)购自The Jackson Laboratory (US)。

[0619] 8.2.3.治疗性处理

[0620] 以104pfu/小鼠腹膜内(i.p.)感染小鼠。感染后48小时,用异氟烷(iosflurane)麻醉小鼠以静脉内(i.v.)注射抗体。将抗体稀释在P1缓冲液中,并以100μL的体积进行眼眶后注射。

[0621] 实施例9:3Cam2-LALA+KAES+ACT5对寨卡病毒的体外功效

[0622] 9.1.结合

[0623] 测量了DG_3CH-SG182/3CL_SK1(或3C),DG_3CH-SG192/3CL_SK1(或3C-LALA)和3Cam2-LALA+KAES+ACT5人抗体与寨卡病毒(ZIKV)的结合。

[0624] 简而言之,将单克隆抗体稀释,然后在纯化的ZIKV包被的ELISA板上在37℃温育1小时。HRP缀合的第二抗人IgG抗体用于检测3C、3C-LALA和3Cam2-LALA+KAES+ACT5与ZIKV病毒体的结合。使用TMB底物进行显示。反应停止后,测量吸光度,一式两份地进行读数。

[0625] 3Cam2-LALA+KAES+ACT5与3C和3C-LALA抗体相似地结合ZIKV(图17)。

[0626] 9.2中和

[0627] 还测定了抗体抑制ZIKV感染细胞的能力。将ZIKV在MOI 10下与稀释的人单克隆抗体混合,并在37℃温和搅拌下温育2小时。然后将病毒/单克隆抗体混合物添加到接种在96孔板中的HEK 293T细胞中。在37℃下培养2天后,通过使用流式细胞术检测ZIKV特异性抗原来测量细胞感染。所有读数均一式三份,计算在不存在抗体的情况下针对感染ZIKV的细胞的中和能力。

[0628] 所有抗体3Cam2-LALA+KAES+ACT5、3C和3C-LALA均展示了类似的中和ZIKV对HEK细胞感染的能力(图18)。

[0629] 实施例10:3Cam2-LALA+KAES+ACT5对寨卡病毒的体内功效:母婴传播

[0630] 然后在体内测试抗体,以研究其抑制病毒从母体向后代传播的能力。

[0631] 交配后10.5天,用ZIKV接种怀孕的IFNAR敲除小鼠。在感染后第-1、0和3天施用抗体。交配后第16.5天,将怀孕的小鼠宰杀并收获胎儿。记录胎儿的重量,包括全身和头部。在羊水、胎盘、胎儿脑和肝脏中测量病毒载量。

[0632] 与未经处理的老鼠的胎儿相比,来自经过处理的母体的胎儿重量明显更高,这表明对在未经处理的ZIKV感染的动物中发现的先天性发育缺陷的预防(图19)。抗体显著抑制了病毒从怀孕的母体到胎儿的传播(图20)。

序列表

<110> 中外制药株式会社
 新加坡科技研究局
 <120> 对寨卡病毒具有交叉反应性的抗登革热病毒抗体及使用方法
 <130> 34246SG6/MBR(JKN)/ndh
 <160> 109
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Thr Ala Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 2
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 3
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 3
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0001]

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
      20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
      100      105      110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
      115      120      125
Thr Val Ser Ser
      130
<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> VH
<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
      20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
      100      105      110
Asp Asp Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
      115      120      125
Thr Val Ser Ser
      130
<210> 5
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> VH
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
      20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
      100      105      110
Asp Leu Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
      115      120      125
Thr Val Ser Ser

```

130
 <210> 6
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 7
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 8
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ala Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys

100 105
 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 9
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Gln Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Ala Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 10
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Glu Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 11
 Ser Asn Tyr Ile His
 1 5
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-H1
 <400> 12
 Ser Tyr Tyr Met His
 1 5
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 13
 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Thr Ala Ser Ala Gln Lys Phe Gln

	1	5	10	15
	Gly			
	<210>	14		
	<211>	17		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	HVR-H2		
	<400>	14		
	Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ser Ala Gln Lys Phe Gln			
	1	5	10	15
	Gly			
	<210>	15		
	<211>	17		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	HVR-H2		
	<400>	15		
	Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe Gln			
	1	5	10	15
	Gly			
	<210>	16		
	<211>	23		
	<212>	PRT		
	<213>	智人 (Homo sapiens)		
	<400>	16		
	Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Gly			
	1	5	10	15
[0005]	Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro			
		20		
	<210>	17		
	<211>	23		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	HVR-H3		
	<400>	17		
	Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe Asp Gly			
	1	5	10	15
	Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro			
		20		
	<210>	18		
	<211>	23		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	HVR-H3		
	<400>	18		
	Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Asp			
	1	5	10	15
	Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro			
		20		
	<210>	19		
	<211>	23		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	HVR-H3		
	<400>	19		
	Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Leu			
	1	5	10	15

Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
 20
 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-H3
 <400> 20
 Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe Asp Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
 20
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 21
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L1
 <400> 22
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Gln Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 [0006] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L1
 <400> 23
 Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 24
 Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L2
 <400> 25
 Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe
 1 5
 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L2
 <400> 26
 Asp Ala Ser Glu Leu Lys Thr
 1 5
 <210> 27
 <211> 9

<212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 27
 Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L3
 <400> 28
 Gln Gln Phe Asp Ala Leu Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L3
 <400> 29
 Gln Gln Phe Ser Ala Leu Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L3
 <400> 30
 Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile Thr
 1 5
 [0007] <210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 32
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 33
 Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 34
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> FR-H3
 <400> 34
 Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 35
 Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 36
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys
 20
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 37
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 38
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 39
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-H1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是Asn或Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa是Ile或Met
 <400> 40
 Ser Xaa Tyr Xaa His
 1 5
 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-H2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa是Thr或 Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa是Ala或Arg
 <400> 41
 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Xaa Xaa Ser Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 42
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-H3
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是Arg或Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa是Arg或Phe
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa是Gly, Asp或Leu
 <400> 42
 [0009] Gly Gly Xaa Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Xaa Asp Xaa
 1 5 10 15
 Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
 20
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是Asp或Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa是Lys或Gln
 <400> 43
 Gln Ala Ser Gln Xaa Ile Arg Xaa Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa是Asn或Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)
 <223> Xaa是Thr或Phe
 <400> 44
 Asp Ala Ser Xaa Leu Lys Xaa
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HVR-L3
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa是Asp, Ser或Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是Asp或Ala
 <400> 45
 Gln Gln Phe Xaa Xaa Leu Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 46
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CH
 <400> 46
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

[0010]

	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290						295					300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	305					310					315					320
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
					325											
	<210>	47														
	<211>	328														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	CH														
	<400>	47														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75				80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[0011]	145					150					155				160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235				240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290					295					300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	305					310					315					320
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
					325											
	<210>	48														
	<211>	328														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	CH														
	<400>	48														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr

				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70					75				80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				115				120					125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				130			135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150					155				160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				195				200					205			
	Trp	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				210			215					220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225						230					235				240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				275				280					285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				290			295					300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305						310					315				320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
				325												
<210>	49															
<211>	328															
<212>	PRT															
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
<220>																
<223>	CH															
<400>	49															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5						10					15	
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				35				40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				50			55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70					75				80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				115				120					125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				130			135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	Phe	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp

	145				150				155					160		
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165					170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Thr	Asn
			195					200					205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235				240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250					255	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290				295						300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	305					310					315					320
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
					325											
	<210>	50														
	<211>	328														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	CH														
	<400>	50														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
[0013]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70				75					80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	Phe	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	145					150				155					160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Thr	Asn
			195					200					205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235				240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250				255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe

92

[0015]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50				55					60						
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90						95		
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			115					120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135					140					
	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	Phe	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150					155					160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170						175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185						190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Thr	Asn	
			195					200					205				
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
		210					215				220						
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225					230					235					240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250					255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
			275					280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290					295					300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310					315					320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro									
					325												
	<210>		53														
	<211>		328														
	<212>		PRT														
	<213>		人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>																
	<223>		CH														
	<400>		53														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50				55					60						
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90						95		
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			115					120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135					140					

Val Val Val Asp Val Glu Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 54

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CH

<400> 54

[0016]

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

[0017]

```

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      325
<210> 55
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CH
<400> 55
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100      105      110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120      125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Asp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
      225      230      235      240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      325
<210> 56
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CH
<400> 56
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

```

[0018]

```

1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                100      105      110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                115      120      125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                195      200      205
Glu Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225      230      235      240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325

```

<210> 57

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CH

<400> 57

```

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

```

```

      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Met Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225      230      235      240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      325

```

```

<210> 58
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CH
<400> 58

```

[0019]

```

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

```

				260					265					270			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
			275					280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290					295					300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Thr	Thr	
	305					310					315					320	
	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro									
					325												
	<210>	59															
	<211>	328															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
	<220>																
	<223>	CH															
	<400>	59															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1			5					10					15			
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20					25					30				
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40					45					
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50				55					60						
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70				75						80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90						95		
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100						105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115					120						125				
[0020]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130				135						140					
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150				155					160		
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
			165						170						175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180						185					190			
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195						200					205				
	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210				215					220						
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225					230					235				240		
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245							250					255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270				
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275						280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290				295						300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr	
	305					310					315					320	
	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro									
					325												
	<210>	60															
	<211>	107															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
	<220>																
	<223>	CL															
	<400>	60															

[0021]

```

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

<210> 61
<211> 585
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> DENV
<400> 61
Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1      5      10      15
Phe His Leu Thr Thr Arg Gly Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Lys
20      25      30
Gln Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ser Ala Gly Val Asn
35      40      45
Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr
50      55      60
Met Thr Tyr Lys Cys Pro Arg Ile Thr Glu Ala Glu Pro Asp Asp Val
65      70      75      80
Asp Cys Trp Cys Asn Ala Thr Asp Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys
85      90      95
Ser Gln Thr Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala Leu Ala
100      105      110
Pro His Val Gly Leu Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser
115      120      125
Ser Glu Gly Ala Trp Lys Gln Ile Gln Lys Val Glu Thr Trp Ala Leu
130      135      140
Arg His Pro Gly Phe Thr Val Ile Ala Leu Phe Leu Ala His Ala Ile
145      150      155      160
Gly Thr Ser Ile Thr Gln Lys Gly Ile Ile Phe Ile Leu Leu Met Leu
165      170      175
Val Thr Pro Ser Met Ala Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp
180      185      190
Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu
195      200      205
His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp
210      215      220
Ile Glu Leu Leu Lys Thr Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys
225      230      235      240
Leu Cys Ile Glu Ala Lys Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys
245      250      255
Pro Thr Gln Gly Glu Ala Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe
260      265      270
Val Cys Arg Arg Thr Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
275      280      285
Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Leu Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val
290      295      300
Thr Lys Leu Glu Gly Lys Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser
305      310      315      320
Val Ile Val Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu
325      330      335
Thr Thr Glu His Gly Thr Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr
340      345      350

```

Ser Glu Ile Gln Leu Thr Asp Tyr Gly Thr Leu Thr Leu Asp Cys Ser
 355 360 365
 Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys
 370 375 380
 Glu Lys Ser Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
 385 390 395 400
 Pro Trp Thr Ser Gly Ala Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln
 405 410 415
 Asp Leu Leu Val Thr Phe Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val
 420 425 430
 Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His
 450 455 460
 Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser
 465 470 475 480
 Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu
 485 490 495
 Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp
 500 505 510
 Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr
 515 520 525
 Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu
 530 535 540
 Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile
 545 550 555 560
 Ile Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys
 565 570 575
 Gly His His His His His His His His
 580 585

[0022]

<210> 62
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> DENV
 <400> 62
 Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
 1 5 10 15
 Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg
 20 25 30
 Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn
 35 40 45
 Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr
 50 55 60
 Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Phe Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Gly Glu His Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val
 100 105 110
 Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser
 115 120 125
 Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Ala Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu
 130 135 140
 Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile
 145 150 155 160
 Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala
 165 170 175
 Val Ala Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp
 180 185 190
 Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu
 195 200 205
 His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp
 210 215 220

[0023]

Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys
 245 250 255
 Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe
 260 265 270
 Val Cys Lys His Ser Met Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
 275 280 285
 Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr Cys Lys
 290 295 300
 Lys Asn Met Lys Gly Lys Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr
 305 310 315 320
 Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp
 325 330 335
 Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile
 340 345 350
 Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser
 355 360 365
 Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu
 370 375 380
 Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
 385 390 395 400
 Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys
 405 410 415
 Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val
 420 425 430
 Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His
 450 455 460
 Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser
 465 470 475 480
 Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu
 485 490 495
 Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly
 500 505 510
 Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His
 515 520 525
 Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp
 530 535 540
 Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
 545 550 555 560
 Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys
 565 570 575
 Gly His His His His His His His His
 580 585
 <210> 63
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> DENV
 <400> 63
 Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
 1 5 10 15
 Phe His Leu Thr Ser Arg Asp Gly Glu Pro Arg Met Ile Val Gly Lys
 20 25 30
 Asn Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ala Ser Gly Ile Asn
 35 40 45
 Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Met Cys Asp Asp Thr
 50 55 60
 Val Thr Tyr Lys Cys Pro His Ile Thr Glu Val Glu Pro Glu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asp Cys Trp Cys Asn Leu Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys
 85 90 95

[0024]

Asn Gln Ala Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala Leu Ala
 100 105 110
 Pro His Val Gly Met Gly Leu Asp Thr Arg Thr Gln Thr Trp Met Ser
 115 120 125
 Ala Glu Gly Ala Trp Arg Gln Val Glu Lys Val Glu Thr Trp Ala Leu
 130 135 140
 Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Leu Ala Leu Phe Leu Ala His Tyr Ile
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Leu Thr Gln Lys Val Val Ile Phe Ile Leu Leu Met Leu
 165 170 175
 Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp
 180 185 190
 Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu
 195 200 205
 His Gly Gly Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp
 210 215 220
 Ile Glu Leu Gln Lys Thr Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys
 225 230 235 240
 Leu Cys Ile Glu Gly Lys Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys
 245 250 255
 Pro Thr Gln Gly Glu Ala Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr
 260 265 270
 Val Cys Lys His Thr Tyr Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
 275 280 285
 Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ile Glu Gly Lys Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys Tyr Thr
 305 310 315 320
 Val Ile Ile Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu
 325 330 335
 Thr Gln Gly Val Thr Ala Glu Ile Thr Ser Gln Ala Ser Thr Ala Glu
 340 345 350
 Ala Ile Leu Pro Glu Tyr Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg
 355 360 365
 Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys
 370 375 380
 Ala Trp Met Val His Arg Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Gly Ala Thr Thr Lys Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu
 405 410 415
 Leu Val Thr Phe Lys Asn Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr
 435 440 445
 Glu Ile Gln Thr Ser Gly Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys
 450 455 460
 Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala
 465 470 475 480
 Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln
 485 490 495
 His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro
 500 505 510
 Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn
 515 520 525
 Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro
 530 535 540
 Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile
 545 550 555 560
 Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly His
 565 570 575
 His His His His His His
 580

<210> 64

<211> 585

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> DENV
 <400> 64
 Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
 1 5 10 15
 Phe Ser Leu Ser Thr Arg Asp Gly Glu Pro Leu Met Ile Val Ala Lys
 20 25 30
 His Glu Arg Gly Arg Pro Leu Leu Phe Lys Thr Thr Glu Gly Ile Asn
 35 40 45
 Lys Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Met Cys Glu Asp Thr
 50 55 60
 Val Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu Val Asn Thr Glu Pro Glu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asp Cys Trp Cys Asn Leu Thr Ser Thr Trp Val Met Tyr Gly Thr Cys
 85 90 95
 Thr Gln Ser Gly Glu Arg Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Thr
 100 105 110
 Pro His Ser Gly Met Gly Leu Glu Thr Arg Ala Glu Thr Trp Met Ser
 115 120 125
 Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Ala Gln Arg Val Glu Ser Trp Ile Leu
 130 135 140
 Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Leu Ala Gly Phe Met Ala Tyr Met Ile
 145 150 155 160
 Gly Gln Thr Gly Ile Gln Arg Thr Val Phe Phe Val Leu Met Met Leu
 165 170 175
 Val Ala Pro Ser Tyr Gly Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp
 180 185 190
 Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu
 195 200 205
 His Gly Gly Cys Val Thr Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp
 210 215 220
 [0025] Phe Glu Leu Thr Lys Thr Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ile Glu Ala Ser Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys
 245 250 255
 Pro Thr Gln Gly Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr
 260 265 270
 Ile Cys Arg Arg Asp Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
 275 280 285
 Leu Phe Gly Lys Gly Gly Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser
 290 295 300
 Gly Lys Ile Thr Gly Asn Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr
 305 310 315 320
 Val Val Val Thr Val His Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp
 325 330 335
 Thr Ser Asn His Gly Val Thr Ala Met Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser
 340 345 350
 Val Glu Val Lys Leu Pro Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu
 355 360 365
 Pro Arg Ser Gly Ile Asp Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys
 370 375 380
 Lys Lys Thr Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
 385 390 395 400
 Pro Trp Thr Ala Gly Ala Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Glu Arg Met Val Thr Phe Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val
 420 425 430
 Thr Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Ala Gly
 435 440 445
 Ala Thr Glu Val Asp Ser Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His
 450 455 460
 Leu Lys Cys Lys Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser
 465 470 475 480
 Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu

				485					490					495
	Thr	Gln	His	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Val	Lys	Tyr	Glu	Gly
				500					505					510
	Ala	Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ile	Glu	Ile	Arg	Asp	Val	Asn	Lys
			515					520					525	
	Val	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Ser	Ser	Thr	Pro	Leu	Ala	Glu	Asn
		530					535				540			
	Ser	Val	Thr	Asn	Ile	Glu	Leu	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser
	545				550						555			
	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Leu	His	Trp	Phe
				565						570				575
	Gly	His	His	His	His	His	His	His	His					
			580						585					
	<210>	65												
	<211>	403												
	<212>	PRT												
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)												
	<220>													
	<223>	DENV												
	<400>	65												
	Met	Arg	Cys	Val	Gly	Ile	Gly	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Gly
	1			5					10					15
	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Asp	Val	Val	Leu	Glu	His	Gly	Ser	Cys
			20					25					30	
	Thr	Met	Ala	Lys	Asn	Lys	Pro	Thr	Leu	Asp	Ile	Glu	Leu	Lys
			35					40					45	
	Glu	Val	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Leu	Arg	Lys	Leu	Cys	Ile	Glu
		50					55					60		
	Ile	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly
	65					70				75				80
	Thr	Leu	Val	Glu	Glu	Gln	Asp	Ala	Asn	Phe	Val	Cys	Arg	Arg
				85					90					95
[0026]	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys
			100					105					110	
	Leu	Leu	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Lys	Cys	Val	Thr	Lys	Leu	Glu
			115					120					125	
	Ile	Val	Gln	Tyr	Glu	Asn	Leu	Lys	Tyr	Ser	Val	Ile	Val	Thr
		130					135					140		
	Thr	Gly	Asp	Gln	His	Gln	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Thr	Glu	His
	145					150				155				160
	Ile	Ala	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Ile	Gln
				165						170				175
	Asp	Tyr	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Cys	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly
			180						185				190	
	Phe	Asn	Glu	Met	Val	Leu	Leu	Thr	Met	Lys	Glu	Lys	Ser	Trp
			195					200					205	
	His	Lys	Gln	Trp	Phe	Leu	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Trp	Thr	Ser
		210					215					220		
	Ser	Thr	Ser	Gln	Glu	Thr	Trp	Asn	Arg	Gln	Asp	Leu	Leu	Val
	225					230				235				240
	Lys	Thr	Ala	His	Ala	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Val	Val	Leu	Gly
				245						250				255
	Glu	Gly	Ala	Met	His	Thr	Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Thr	Glu	Ile
			260						265					270
	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Phe	Ala	Gly	His	Leu	Lys	Cys	Arg
			275					280					285	
	Met	Asp	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Val	Met	Cys
		290					295					300		
	Ser	Phe	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Gln	His	Gly
	305					310					315			320
	Leu	Val	Gln	Val	Lys	Tyr	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	Pro	Cys	Lys
				325						330				335
	Phe	Ser	Thr	Gln	Asp	Glu	Lys	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg
				340					345					350
	Thr	Ala	Asn	Pro	Ile	Val	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys	Pro	Val	Asn
														Ile
														Glu

105

<210> 67
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> DENV
 <400> 67
 Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr
 20 25 30
 Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Gln Lys Thr
 35 40 45
 Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Gly Lys
 50 55 60
 Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala
 65 70 75 80
 Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr Val Cys Lys His Thr Tyr
 85 90 95
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu Glu Ser Ile Glu Gly Lys
 115 120 125
 Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys Tyr Thr Val Ile Ile Thr Val His
 130 135 140
 Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala
 145 150 155 160
 Glu Ile Thr Ser Gln Ala Ser Thr Ala Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr
 165 170 175
 Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 180 185 190
 Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg
 195 200 205
 Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Thr Thr
 210 215 220
 Lys Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn
 225 230 235 240
 Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 245 250 255
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly
 260 265 270
 Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp
 275 280 285
 Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe
 290 295 300
 Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
 325 330 335
 Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala
 340 345 350
 Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 355 360 365
 Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala
 370 375 380
 Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly His His His His His His
 385 390 395 400
 His

 <210> 68
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>

<223> DENV
 <400> 68
 Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr
 20 25 30
 Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Thr Lys Thr
 35 40 45
 Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser
 50 55 60
 Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val
 85 90 95
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 100 105 110
 Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn
 115 120 125
 Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His
 130 135 140
 Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Thr Ser Asn His Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Ala Met Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro
 165 170 175
 Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp
 180 185 190
 Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val
 195 200 205
 His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Gly Ala
 210 215 220
 Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe
 225 230 235 240
 [0029] Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255
 Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Ala Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
 260 265 270
 Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg
 275 280 285
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
 290 295 300
 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro
 325 330 335
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
 340 345 350
 Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
 355 360 365
 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn
 370 375 380
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly His His His His His
 385 390 395 400
 His His His

 <210> 69
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 69
 Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
 20 25 30
 Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
 35 40 45

[0030]

Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
 50 55 60
 Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
 65 70 75 80
 Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
 85 90 95
 Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Gln Val Ser Arg
 100 105 110
 Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
 115 120 125
 Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
 130 135 140
 Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
 145 150 155 160
 Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
 165 170 175
 Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
 180 185 190
 Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
 195 200 205
 Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
 225 230 235 240
 Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
 245 250 255
 Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
 260 265 270
 Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
 275 280 285
 Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
 290 295 300
 Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
 305 310 315 320
 Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
 325 330 335
 Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 340 345 350
 Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
 355 360 365
 Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 370
 <210> 70
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 70
 Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
 20 25 30
 Ser Gln Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
 35 40 45
 Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
 50 55 60
 Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
 100 105 110
 Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
 115 120 125
 His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
 130 135 140

	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
	145					150					155					160
	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	His	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
				165						170					175	
	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr
				180					185					190		
	Thr	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro	Ser
			195					200					205			
	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Val	Ile	Val	Ala	Val	Val	Ile	Ala
	210						215					220				
	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr	Cys
	225					230					235				240	
	Arg	Lys	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Ala	Ala
				245						250					255	
	Gln	Phe	Glu	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Met	Ile	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg	Gln
				260					265					270		
	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asp	Tyr	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Met
			275					280					285			
	Thr	Leu	Asn	Pro	Arg	Ala	Pro	Thr	Asp	Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu
	290						295					300				
	Thr	Leu	Pro	Pro	Asn	Asp	His	Val	Asn	Ser	Asn	Asn				
	305					310					315					
	<210>	71														
	<211>	316														
	<212>	PRT														
	<213>	智人 (Homo sapiens)														
	<400>	71														
	Met	Thr	Met	Glu	Thr	Gln	Met	Ser	Gln	Asn	Val	Cys	Pro	Arg	Asn	Leu
	1			5					10						15	
	Trp	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Asp	
				20					25					30		
[0031]	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Trp
			35				40						45			
	Ile	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gln	Gly	Ala
	50					55					60					
	Arg	Ser	Pro	Glu	Ser	Asp	Ser	Ile	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn	Leu
	65					70					75				80	
	Ile	Pro	Thr	His	Thr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn	Asn
				85						90					95	
	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Thr	Gly	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp
			100						105					110		
	Pro	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Pro
			115						120					125		
	His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Arg	Cys	His	Ser
	130						135					140				
	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
	145					150					155					160
	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	Arg	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
				165						170					175	
	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr
				180					185					190		
	Thr	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro	Ser
			195					200					205			
	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Val	Ile	Val	Ala	Val	Val	Ile	Ala
	210						215					220				
	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Ile	Tyr	Cys
	225					230					235				240	
	Arg	Lys	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Asp	Pro	Val	Lys	Ala	Ala
				245						250					255	
	Gln	Phe	Glu	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Met	Ile	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg	Gln
				260					265					270		
	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asp	Tyr	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Met
			275					280					285			
	Thr	Leu	Asn	Pro	Arg	Ala	Pro	Thr	Asp	Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu
	290						295					300				

110

111

[0034]

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Asn Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Val Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230
 <210> 76
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 76
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230
 <210> 77
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 77
 Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu

[0035]

```

1      5      10      15
Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala
20      25      30
Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn
35      40      45
Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr
50      55      60
Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr
65      70      75      80
Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln
85      90      95
Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn
100     105     110
Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu
115     120     125
Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn
130     135     140
Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser
145     150     155     160
Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His
165     170     175
Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile
180     185     190
Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser
195     200     205
Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn
210     215     220
Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val
225     230     235     240
Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile
245     250     255
Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala
260     265     270
Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln
275     280     285
Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Val Trp Phe His Ile Leu Phe
290     295     300
Tyr Leu Ser Val Gly Ile Met Phe Ser Leu Asn Thr Val Leu Tyr Val
305     310     315     320
Lys Ile His Arg Leu Gln Arg Glu Lys Lys Tyr Asn Leu Glu Val Pro
325     330     335
Leu Val Ser Glu Gln Gly Lys Lys Ala Asn Ser Phe Gln Gln Val Arg
340     345     350
Ser Asp Gly Val Tyr Glu Glu Val Thr Ala Thr Ala Ser Gln Thr Thr
355     360     365
Pro Lys Glu Ala Pro Asp Gly Pro Arg Ser Ser Val Gly Asp Cys Gly
370     375     380
Pro Glu Gln Pro Glu Pro Leu Pro Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ala Gln
385     390     395     400
Thr Ser Gln Ser

```

<210> 78

<211> 293

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 78

```

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

```

65	Phe	His	Asn	Gly	Arg	Ser	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Gln	Ala	Ser	Tyr	Thr	80
					85					90						95	
	Phe	Lys	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Met	Glu	
			100						105					110			
	Gln	Thr	Arg	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Asp	Trp	
			115						120					125			
	Leu	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Gln	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	
		130					135					140					
	Thr	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	Arg	Asn	Lys	Leu	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	
	145					150					155					160	
	Phe	Phe	His	Asn	Glu	Lys	Ser	Val	Arg	Tyr	His	His	Tyr	Ser	Ser	Asn	
				165						170						175	
	Phe	Ser	Ile	Pro	Lys	Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
				180					185					190			
	Lys	Gly	Ser	Leu	Gly	Arg	Thr	Leu	His	Gln	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	
			195					200					205				
	Thr	Val	Gln	Gly	Pro	Lys	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Ile		
		210					215				220						
	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Ile	Ile	Leu	
	225					230				235						240	
	Val	Ser	Leu	Val	Tyr	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Val	Pro	Asp	Asn	Pro	Pro	
				245						250					255		
	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Asn	Thr	Ile	Thr	Tyr	
			260						265					270			
	Ser	Leu	Leu	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	His	Asp	
			275					280					285				
	Tyr	Gln	Asn	His	Ile												
		290															
	<210>	79															
	<211>	267															
	<212>	PRT															
	<213>	小家鼠 (Mus musculus)															
	<400>	79															
	Met	Thr	Leu	Asp	Thr	Gln	Met	Phe	Gln	Asn	Ala	His	Ser	Gly	Ser	Gln	
	1				5				10					15			
	Trp	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Phe	Ala	Asp		
			20						25				30				
	Arg	Gln	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Asp	Pro	Pro	
			35					40					45				
	Trp	Ile	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Asp	Met	Val	Thr	Leu	Met	Cys	Glu	Gly	
		50				55					60						
	Thr	His	Asn	Pro	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Trp	Ser	
	65				70					75				80			
	Ser	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Gln	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Lys	Ala	Thr	Val	
				85						90				95			
	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Met	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Ser	
			100						105					110			
	Asp	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Asp	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	Thr	
			115					120					125				
	Pro	Gln	Arg	Val	Phe	Leu	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Thr	Leu	Arg	Cys	His	
		130					135					140					
	Ser	Trp	Arg	Asn	Lys	Leu	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	Phe	Phe	His	Asn	Glu	
	145					150					155				160		
	Lys	Ser	Val	Arg	Tyr	His	His	Tyr	Lys	Ser	Asn	Phe	Ser	Ile	Pro	Lys	
				165						170					175		
	Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Gly	Ser	Leu	Gly	
			180					185						190			
	Ser	Thr	Gln	His	Gln	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Asp	Pro	
			195					200					205				
	Ala	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Val	Trp	Tyr	His	Thr	Ala	Phe	Ser	
		210					215					220					
	Leu	Val	Met	Cys	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Tyr	
	225					230				235					240		
	Val	Arg	Arg	Asn	Leu	Gln	Thr	Pro	Arg	Asp	Tyr	Trp	Arg	Lys	Ser	Leu	

115

[0038]

```

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
      165      170      175
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
      180      185      190
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
      195      200      205
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
      210      215      220
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
      225      230      235      240
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
      245      250      255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
      260      265      270
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
      275      280      285
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
      290      295      300
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
      305      310      315      320
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
      325      330      335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
      340      345      350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
      355      360      365
<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 82
Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1      5      10      15
Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
      20      25      30
His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
      35      40      45
Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
      50      55      60
Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
      65      70      75      80
Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
      85      90      95
Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
      100      105      110
Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
      115
<210> 83
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 83
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

```

			100					105					110				
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			115					120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135					140					
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145						150					155				160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165						170					175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185						190			
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
			195					200					205				
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
	225					230					235				240		
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250				255			
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270				
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275					280						285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290				295					300						
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310					315					320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325						330							
<210>	84																
<211>	326																
<212>	PRT																
<213>	智人 (Homo sapiens)																
<400>	84																
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg		
1			5					10					15				
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
			20					25				30					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
		35					40				45						
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
	50					55				60							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr		
65					70				75					80			
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85					90					95				
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
			100					105					110				
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
		115					120					125					
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
		130				135					140						
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
145					150					155					160		
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn		
			165						170					175			
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp		
			180					185					190				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro		
		195				200					205						
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu		
		210				215					220						
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn		
225					230					235				240			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile		

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 245 250 255
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 260 265 270
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 275 280 285
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 290 295 300
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 85
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 85
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 [0040] Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 86

<211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 86
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 [0041] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325
 <210> 87
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CH
 <400> 87
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

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

<210> 88
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 88

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

<210> 89
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 89

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

						35																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												</
--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

<400> 92
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 93
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 93
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 94
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110

Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 95
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH
 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 96
 <211> 107
 <212> PRT
 [0045] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 96
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105
 <210> 97
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 97
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105

<210> 98
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL
 <400> 98

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

<210> 99
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0046]

<220>
 <223> VL
 <400> 99
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
 100 105

<210> 100
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> VL
 <400> 100
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

	65					70				75						80
	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Glu	Asp	Leu	Pro	Ile
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Gln	Ile	Lys					
				100					105							
	<210>	101														
	<211>	5														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	HVR-H1														
	<400>	101														
	Ser	Tyr	Tyr	Ile	His											
	1				5											
	<210>	102														
	<211>	30														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	FR-H1														
	<400>	102														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr		
				20					25					30		
	<210>	103														
	<211>	32														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	FR-H3														
	<400>	103														
[0047]	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu
	1				5				10						15	
	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
				20					25					30		
	<210>	104														
	<211>	23														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	FR-L1														
	<400>	104														
	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5				10						15	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys									
				20												
	<210>	105														
	<211>	32														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	FR-L3														
	<400>	105														
	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
	1				5				10						15	
	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30		
	<210>	106														
	<211>	157														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
	<220>															
	<223>	CD154														
	<400>	106														

[0048]

```

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
1      5      10      15
Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser
20      25      30
Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu
35      40      45
Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu
50      55      60
Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser
65      70      75      80
Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg
85      90      95
Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys
100     105     110
Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln
115     120     125
Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser
130     135     140
His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
145     150     155
<210> 107
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> CH
<400> 107
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100     105     110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115     120     125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130     135     140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145     150     155     160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165     170     175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180     185     190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195     200     205
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210     215     220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225     230     235     240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245     250     255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260     265     270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275     280     285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290     295     300

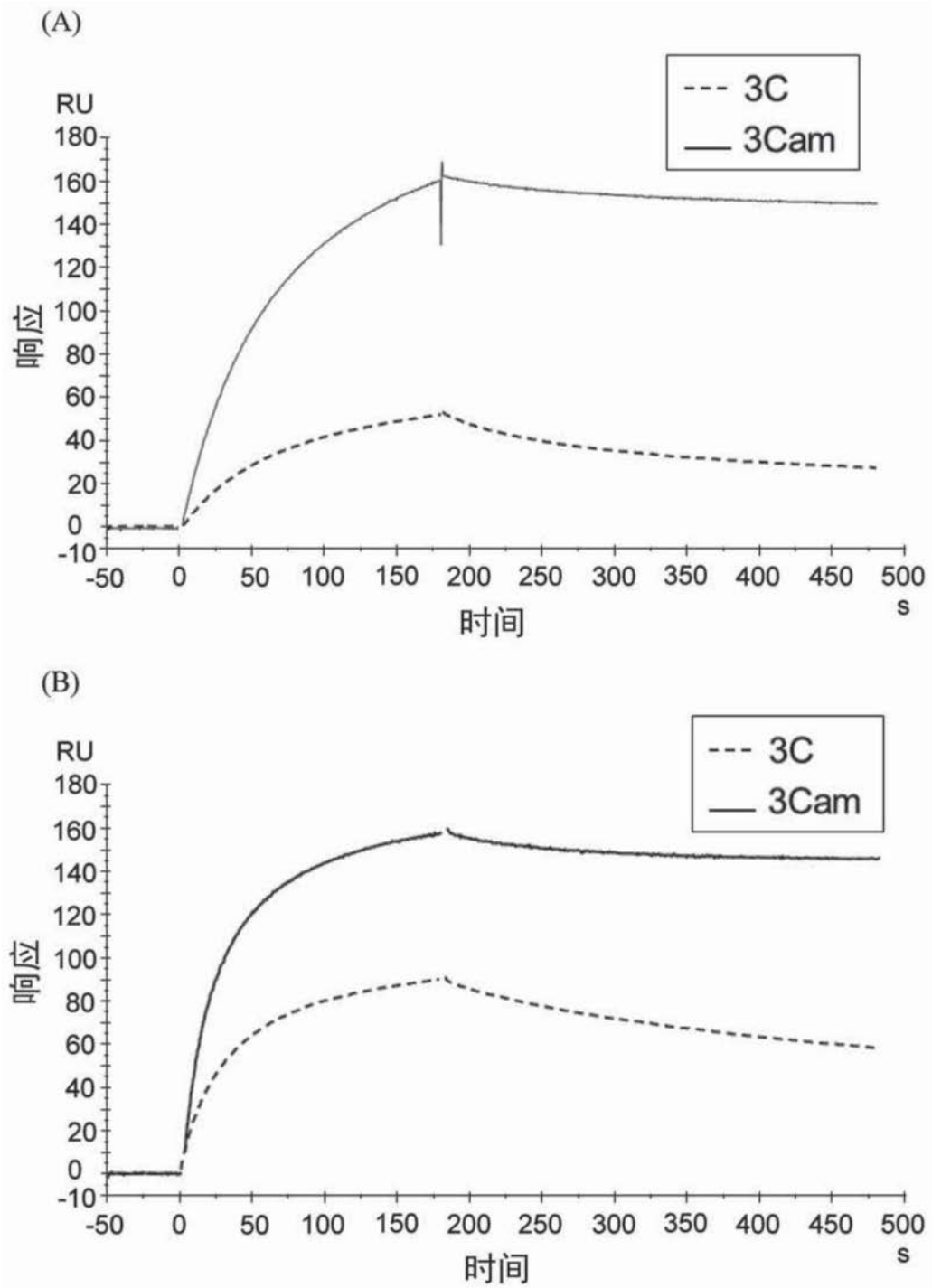
```

[0049]

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325
 <210> 108
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CH
 <400> 108
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr
 305 310 315 320
 Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
 325
 <210> 109
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CH
 <400> 109
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

					</											

[0050]



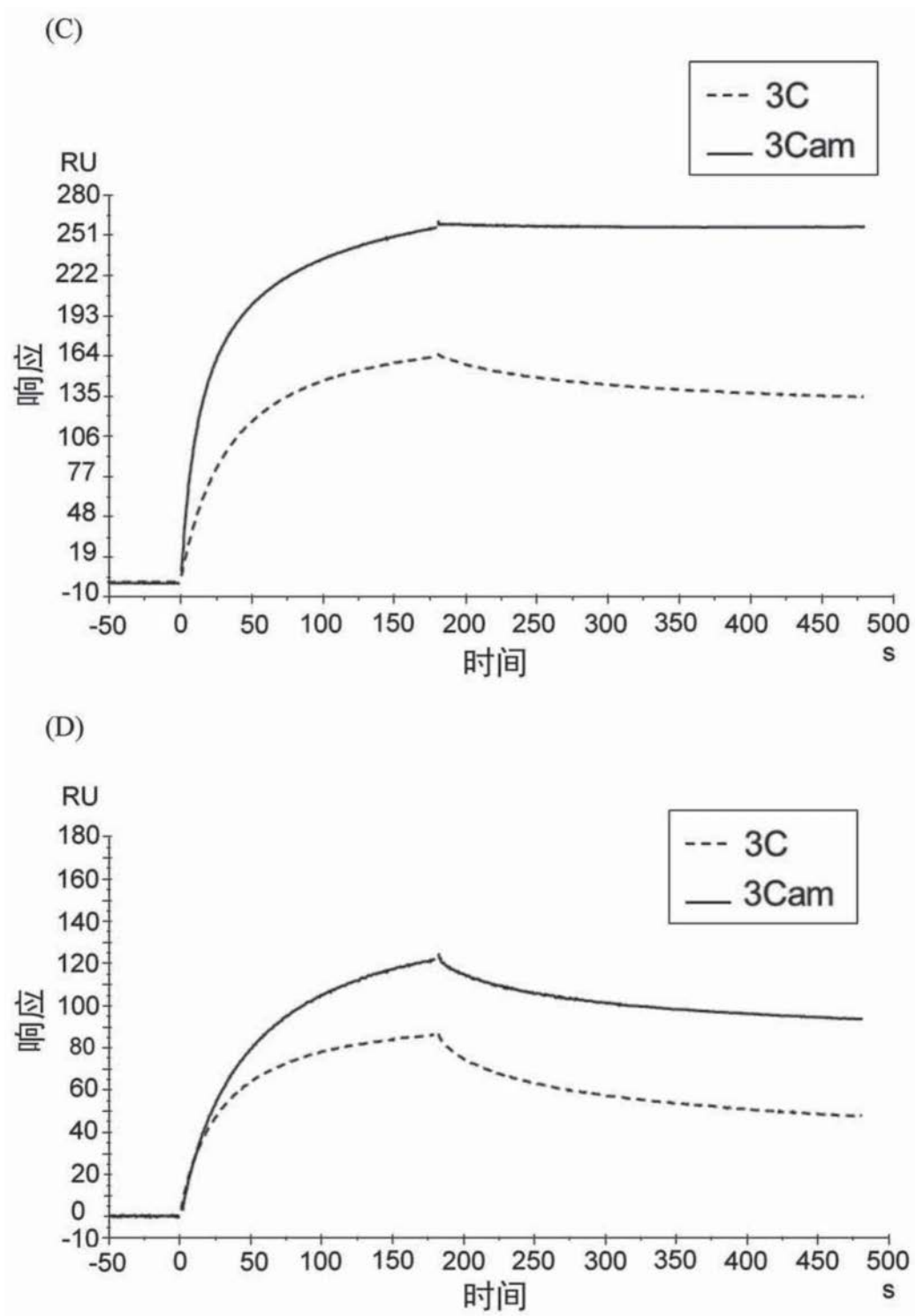


图1

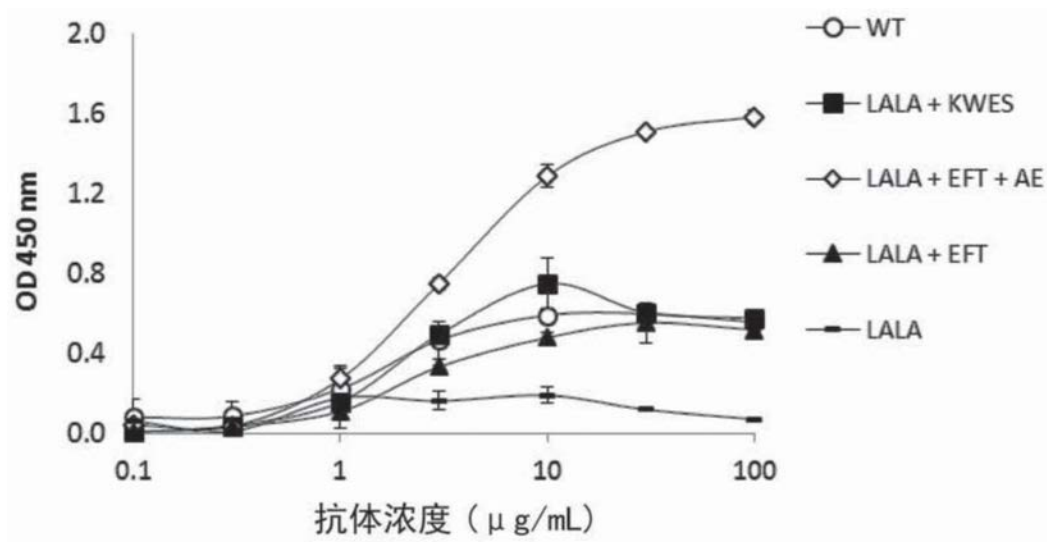


图2

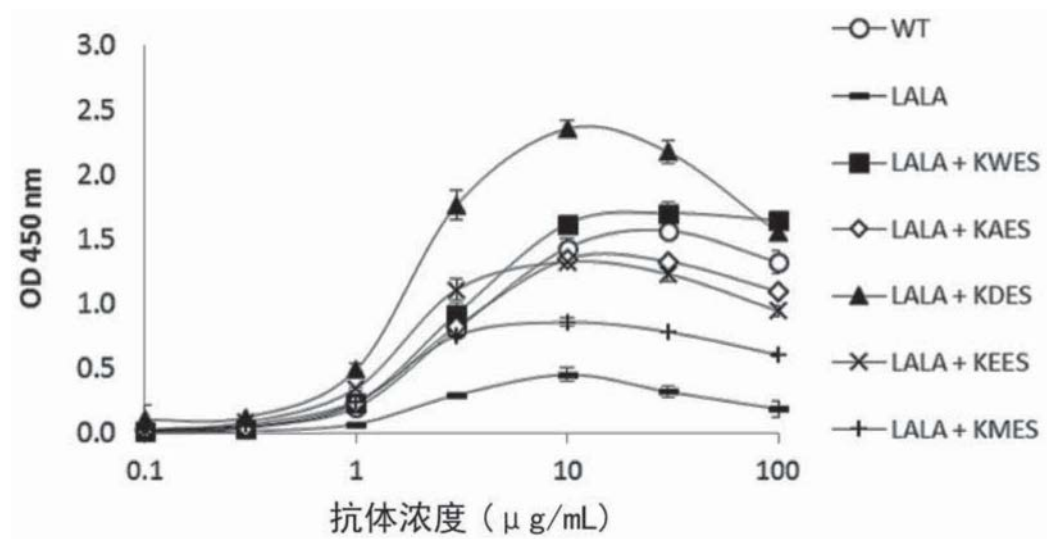


图3

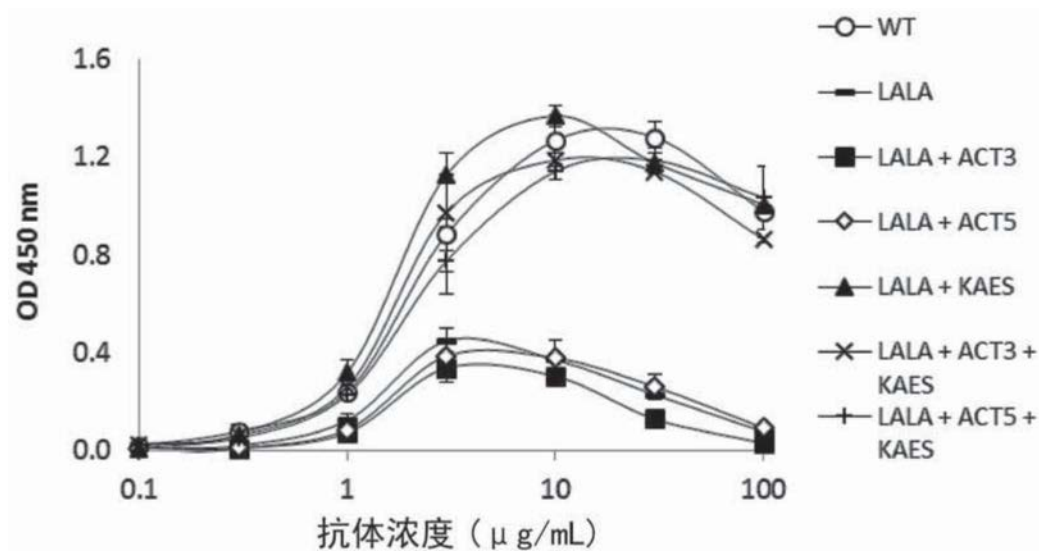


图4

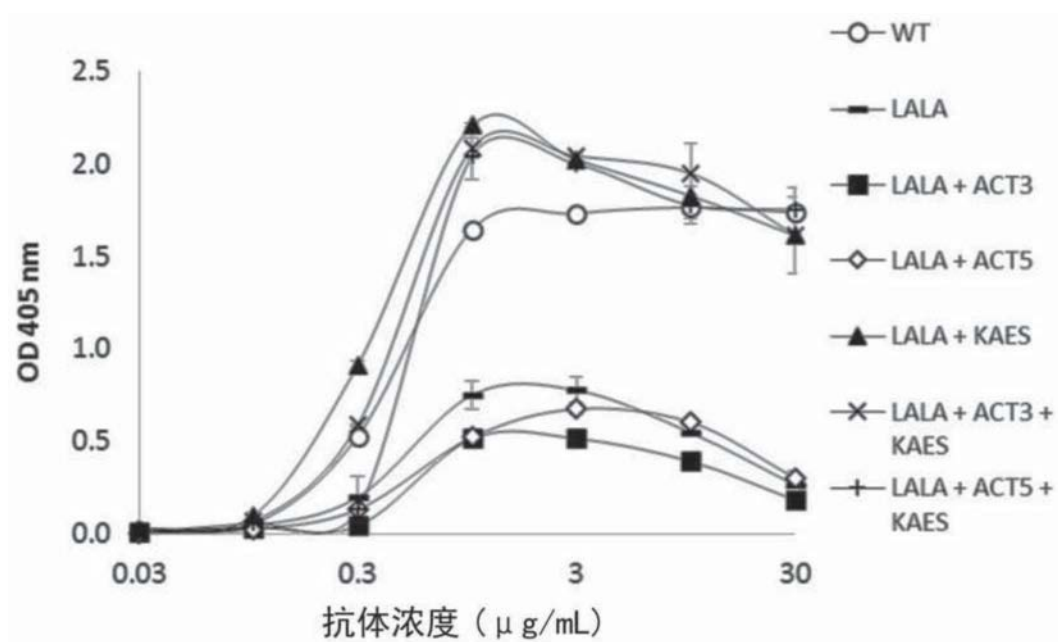


图5

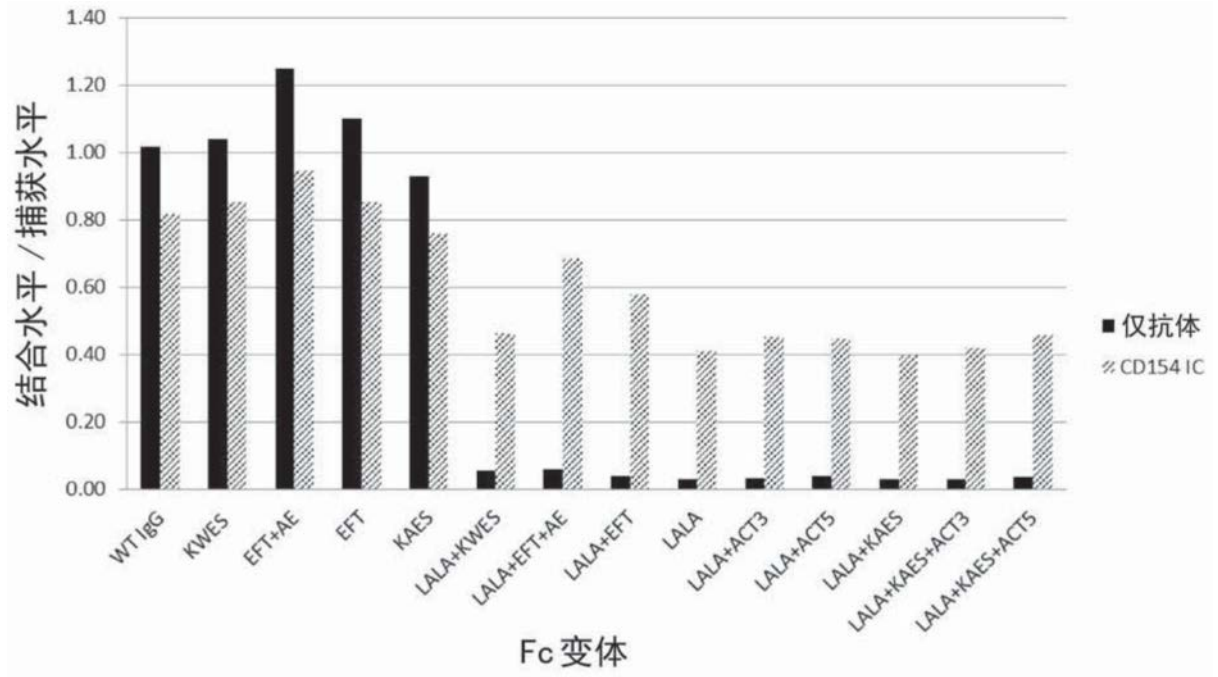


图6 (a)

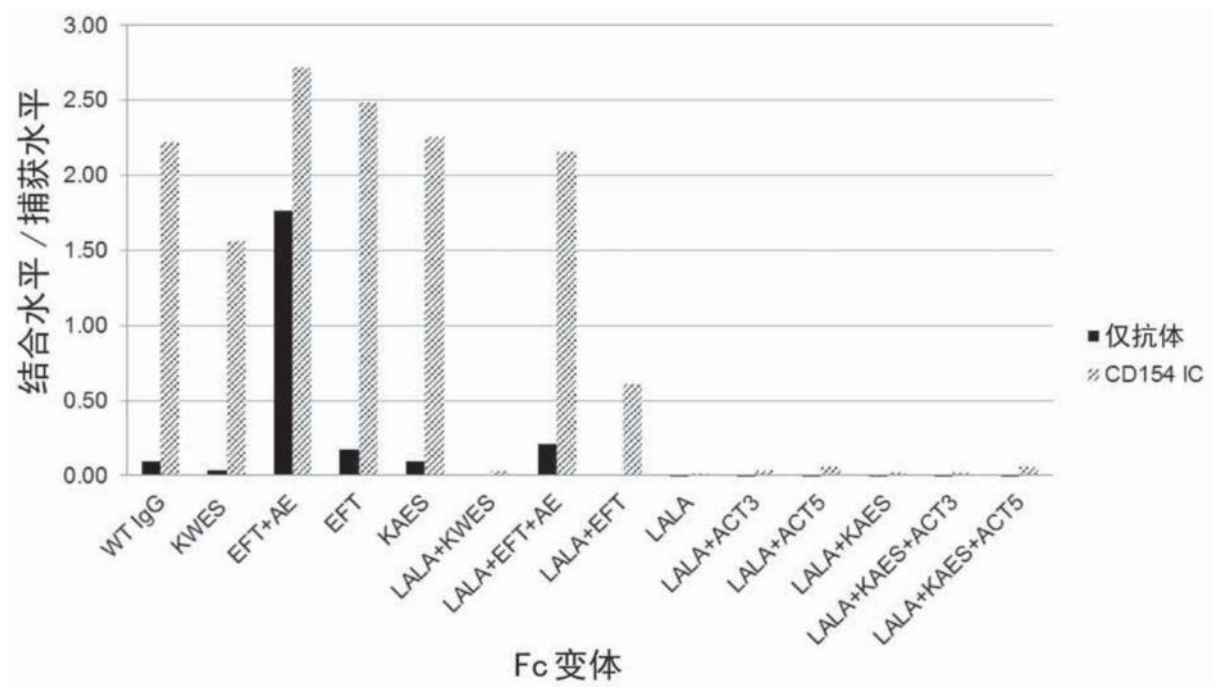


图6 (b)

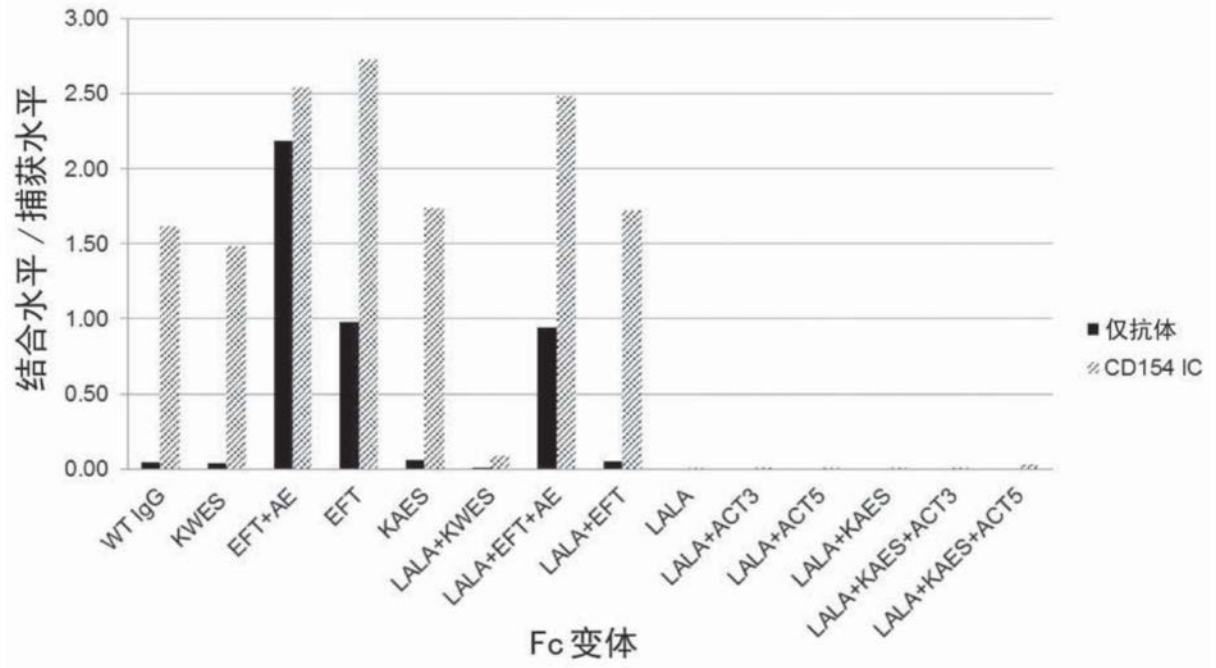


图6(c)

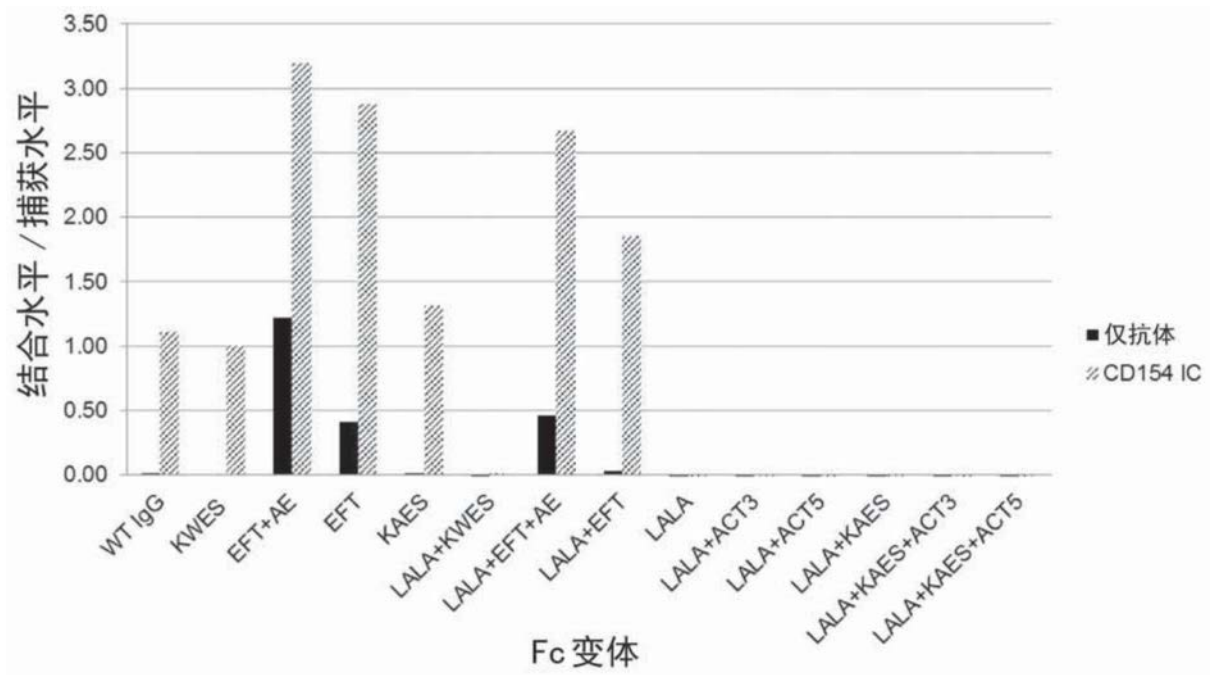


图6(d)

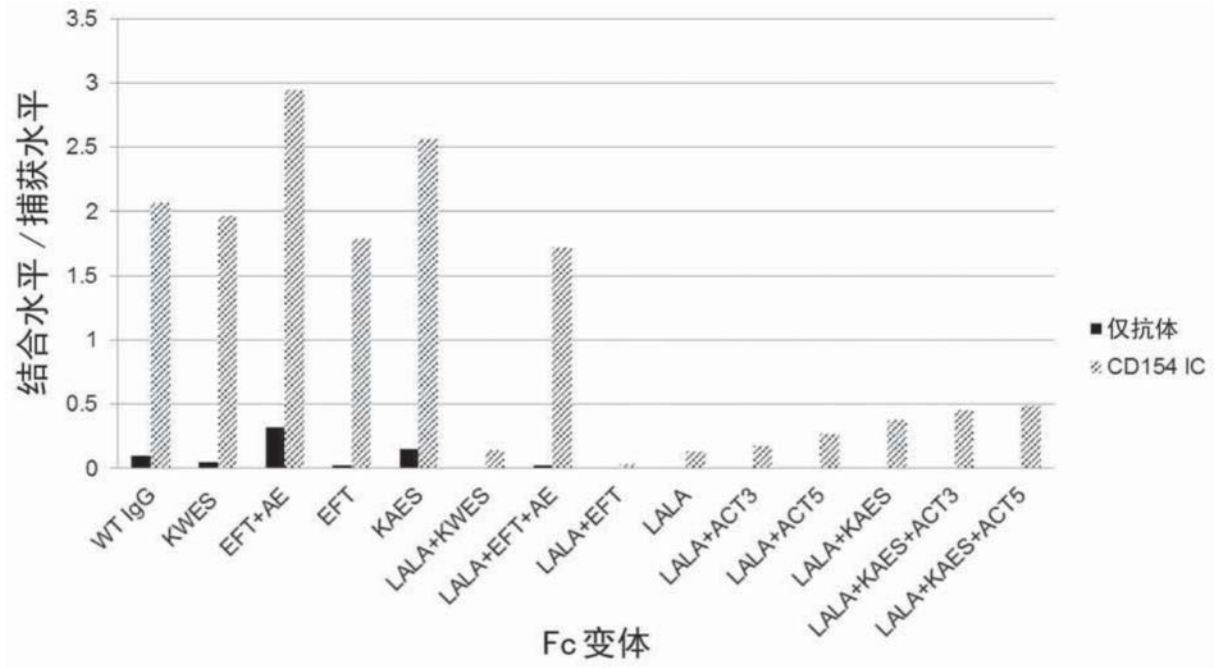


图6 (e)

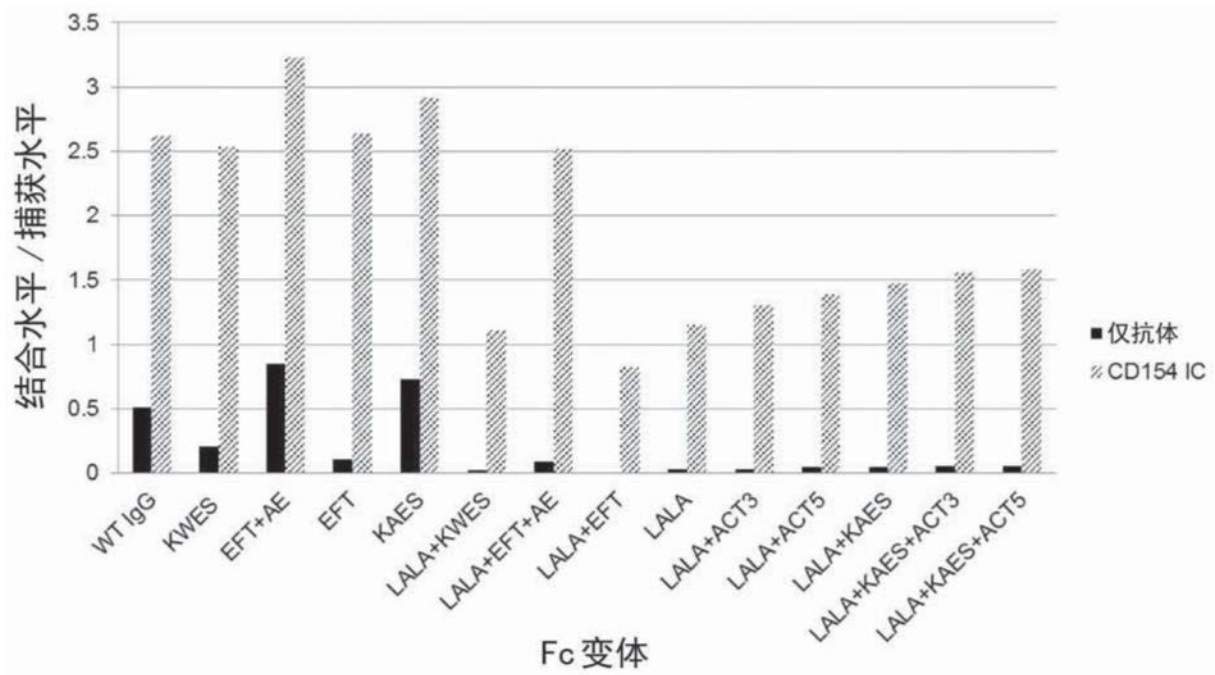


图6 (f)

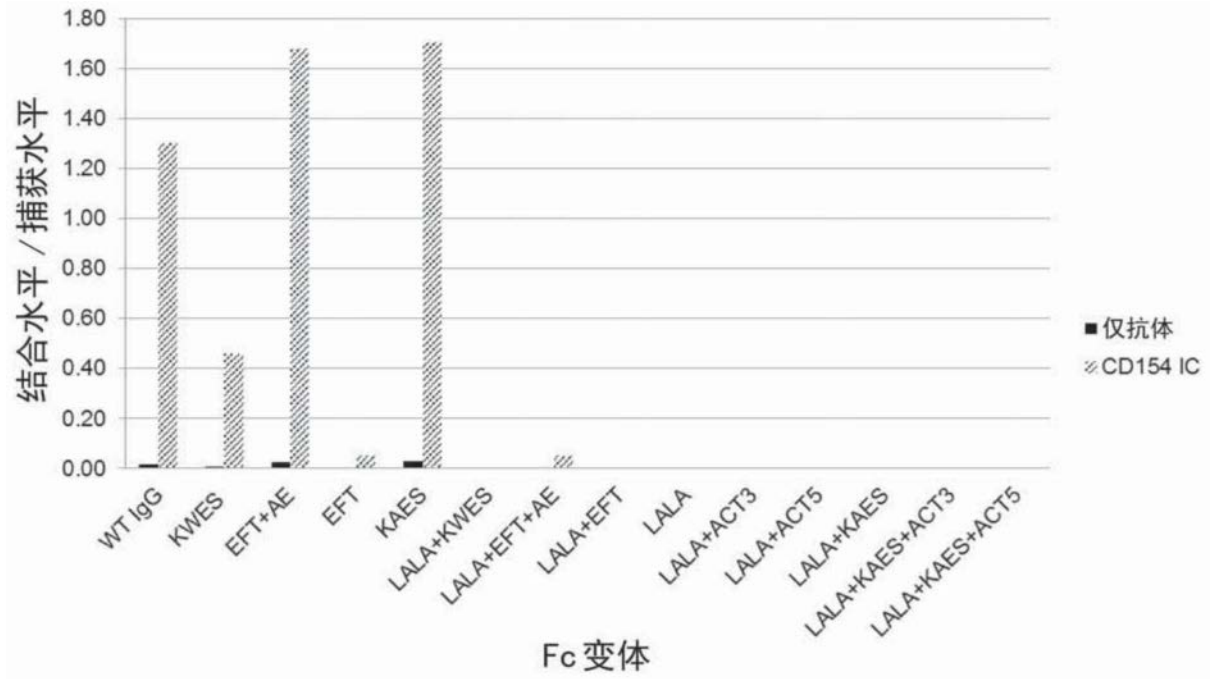


图6 (g)

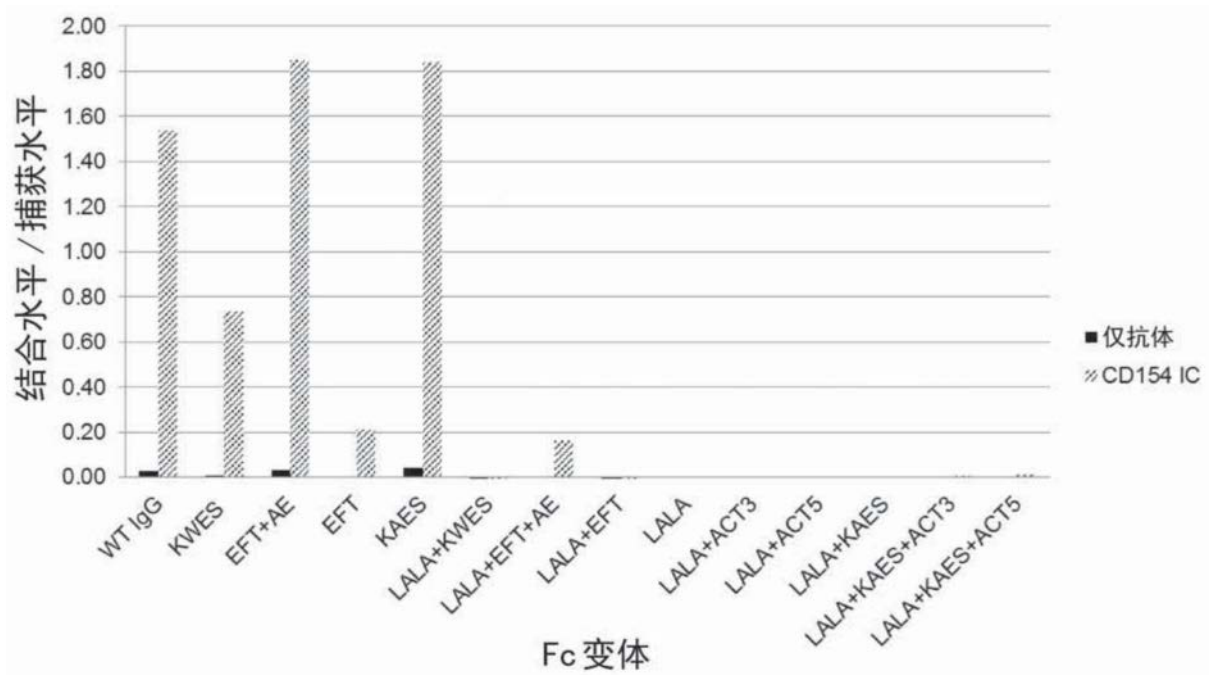


图6 (h)

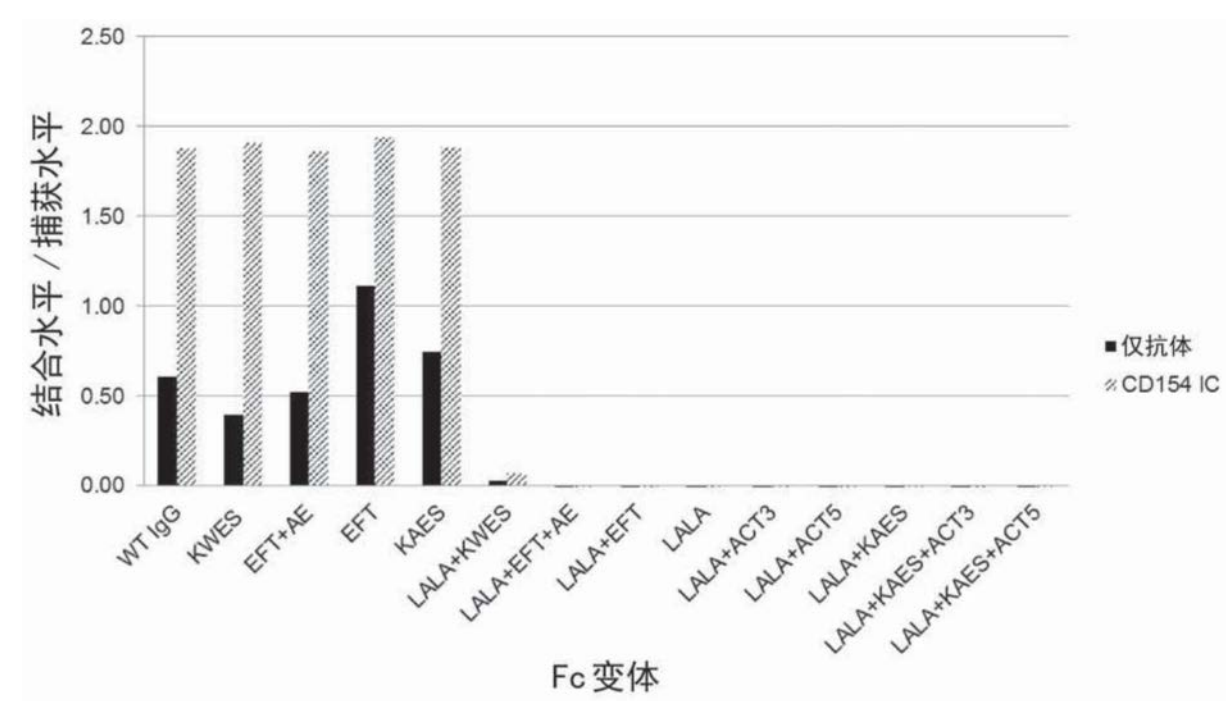


图7 (a)

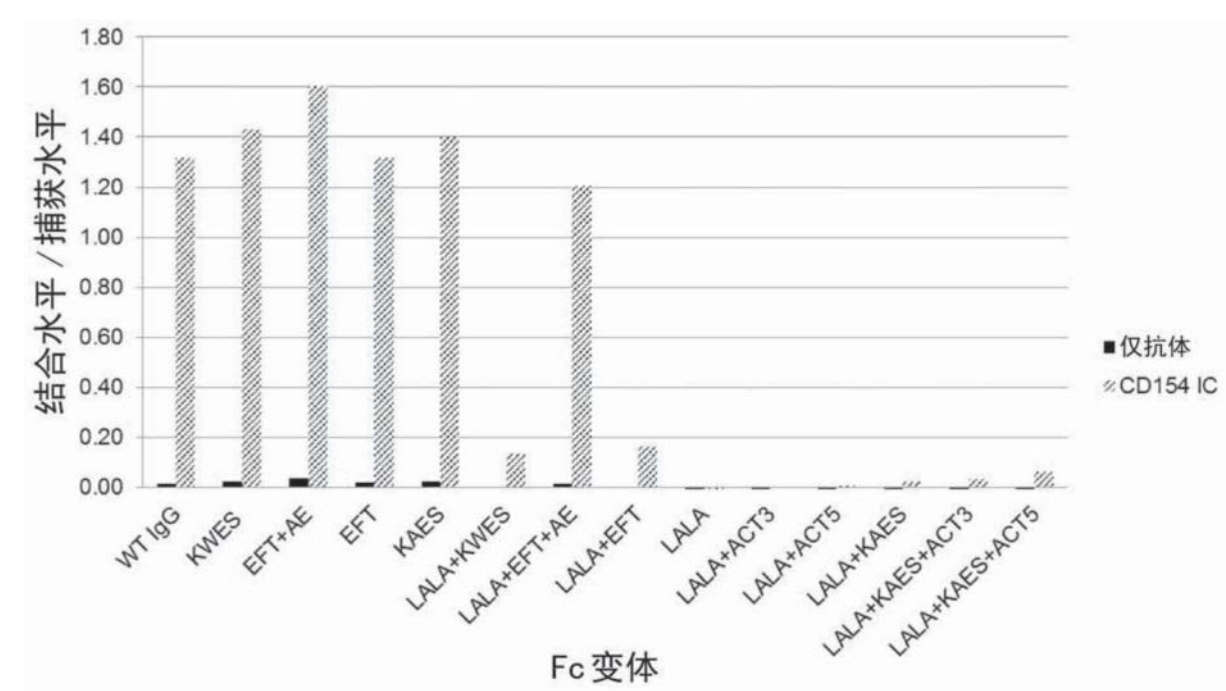


图7 (b)

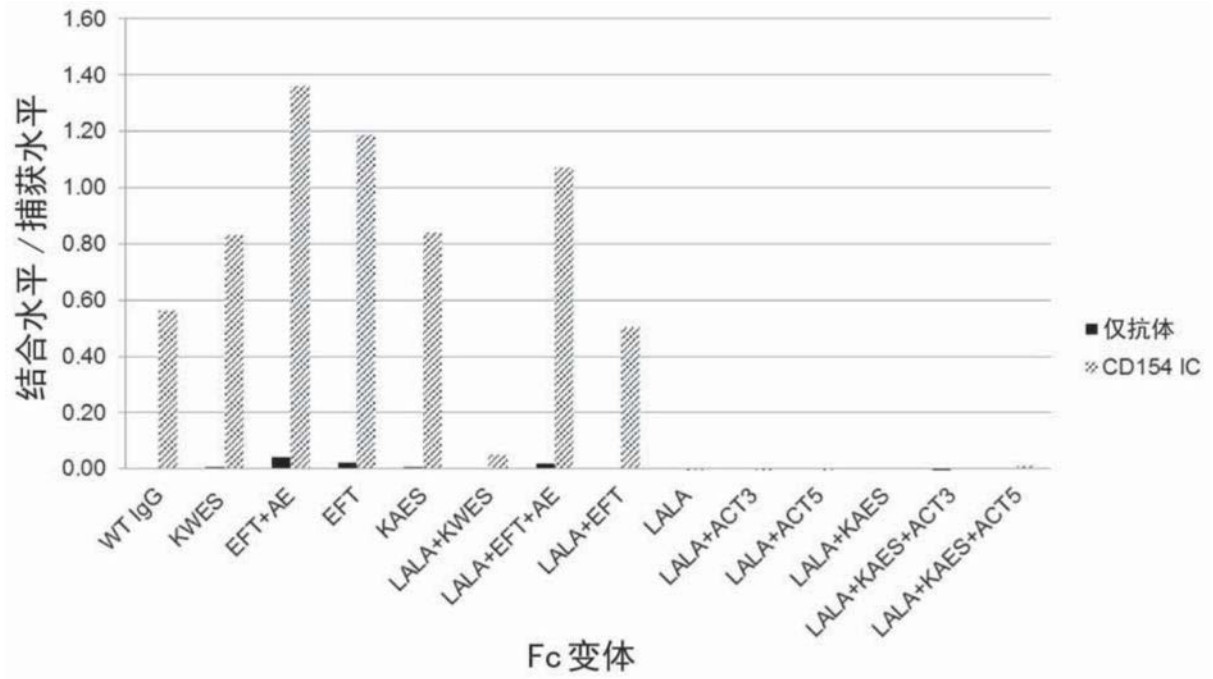


图7 (c)

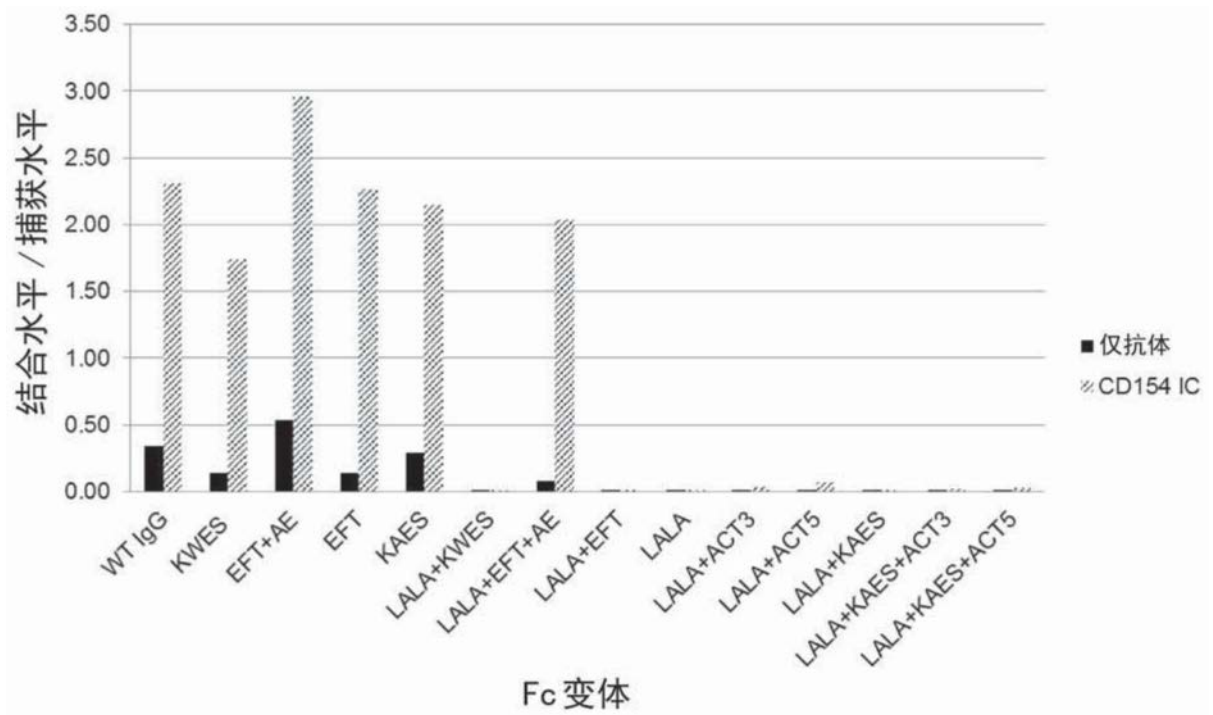


图7 (d)

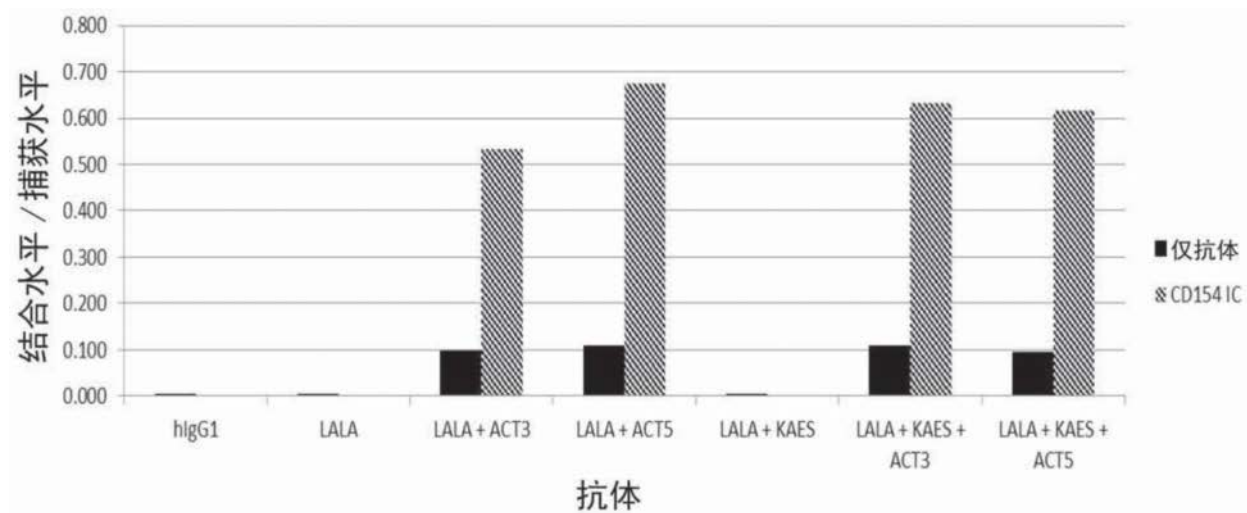


图8

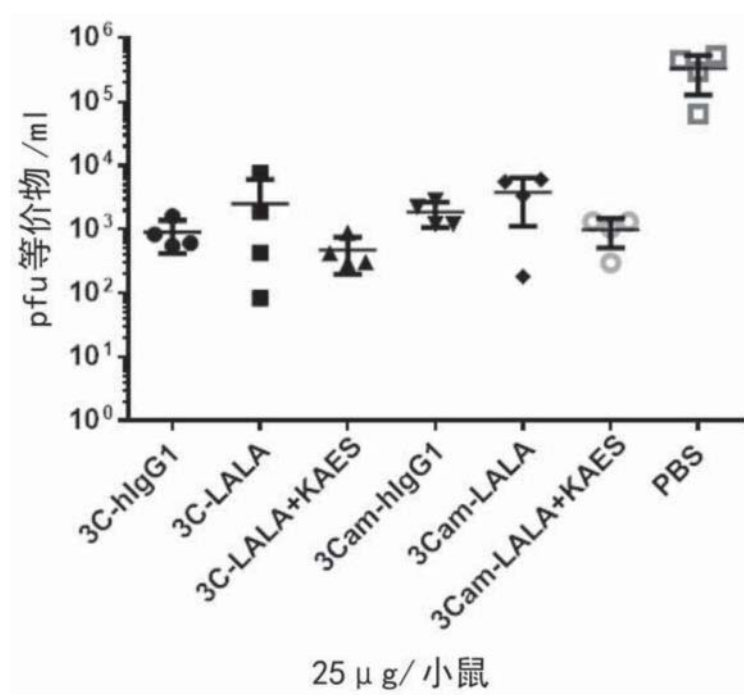


图9

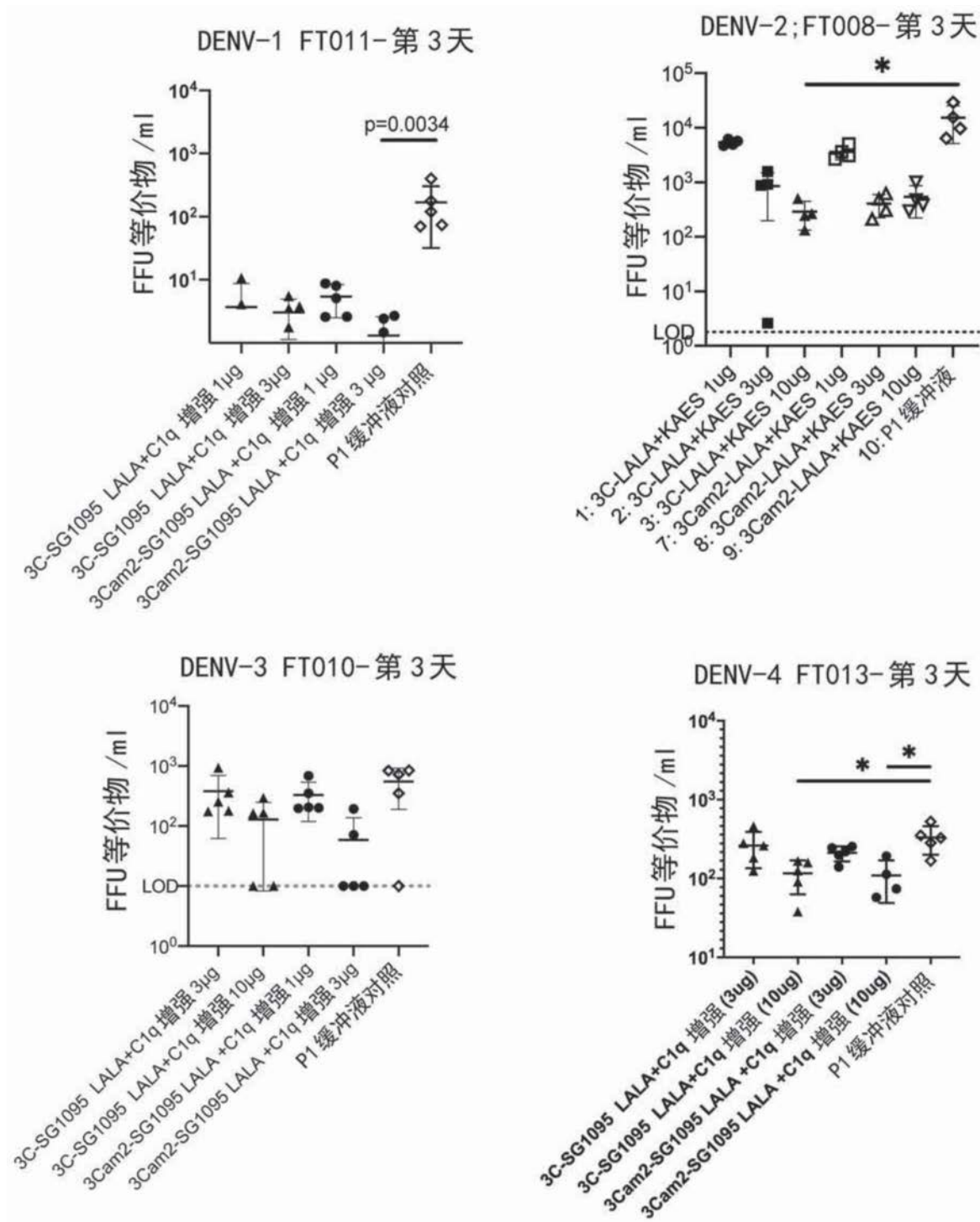


图10

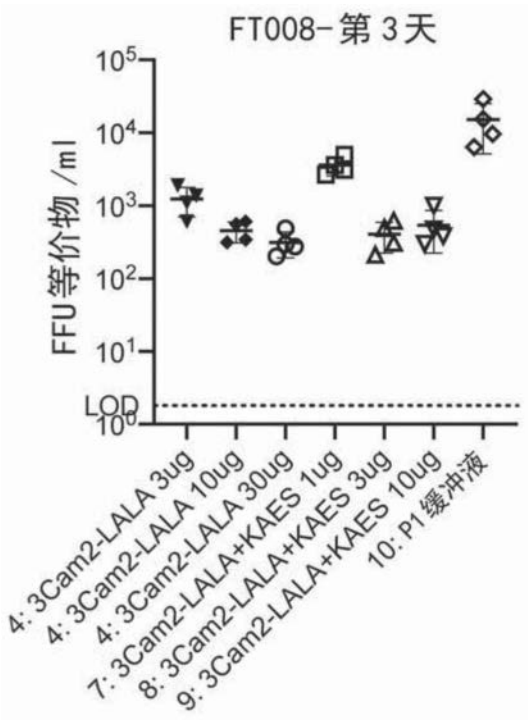
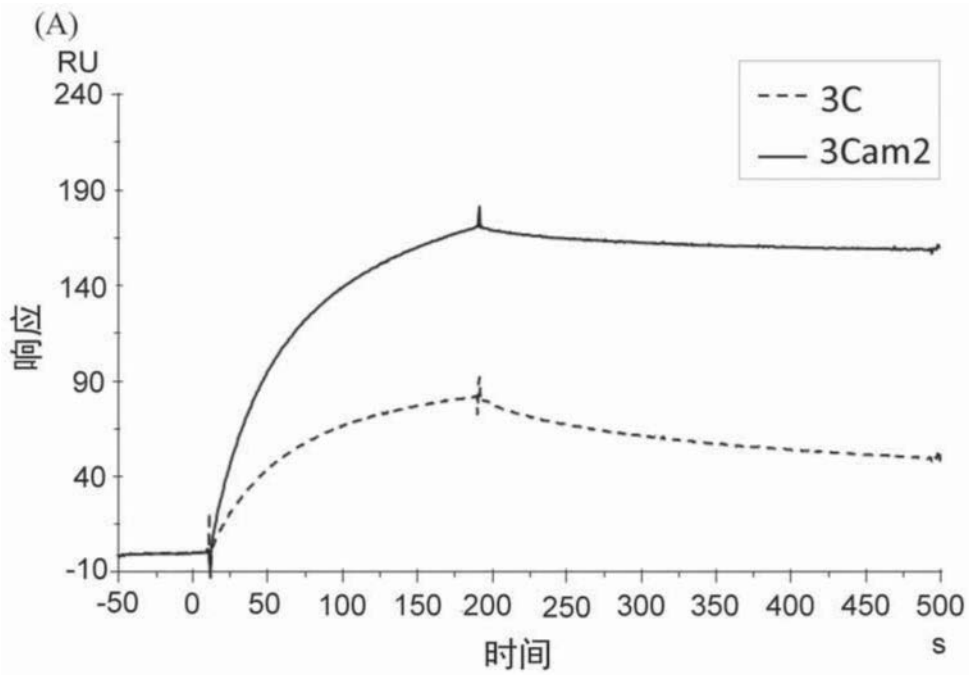
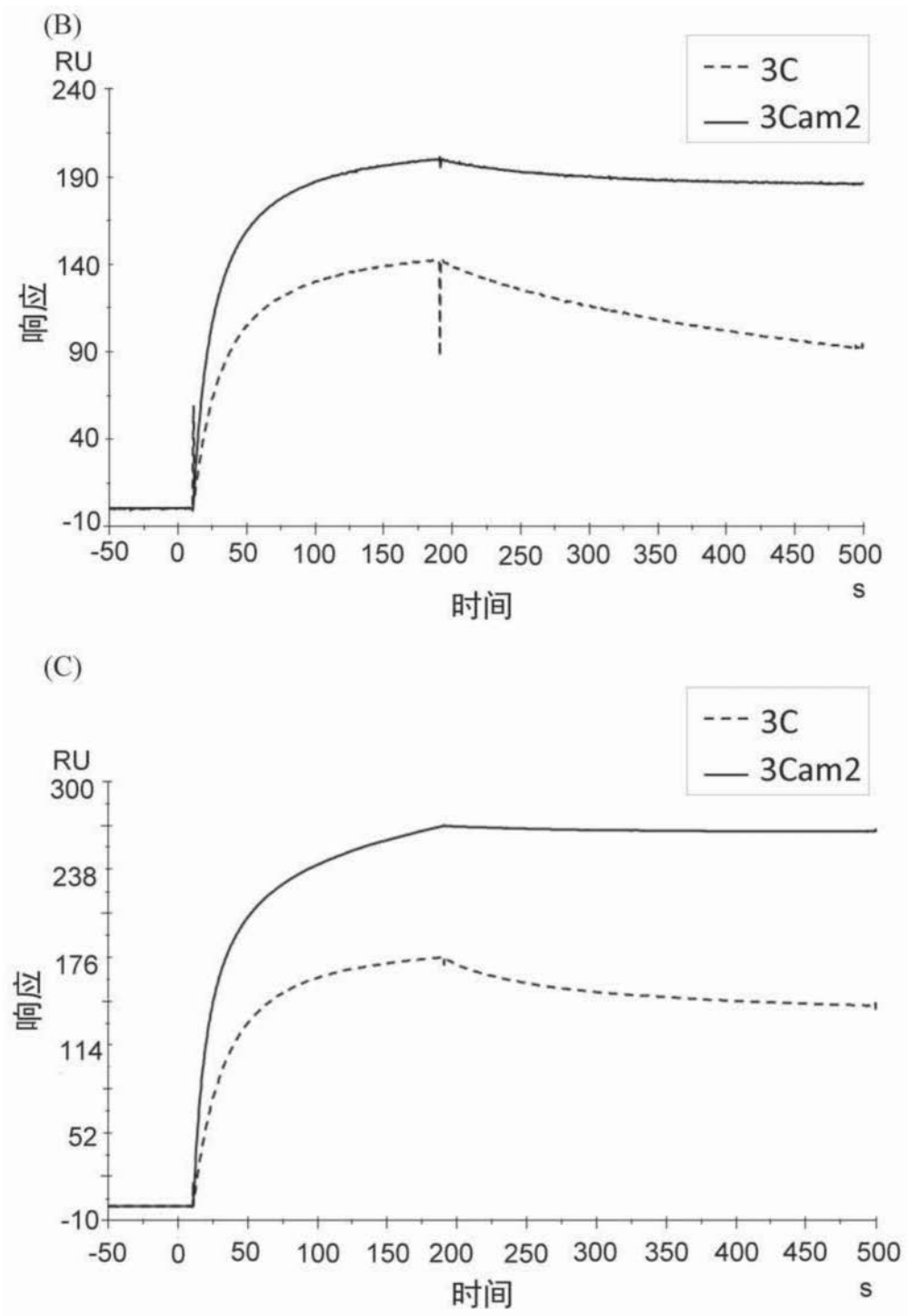


图11





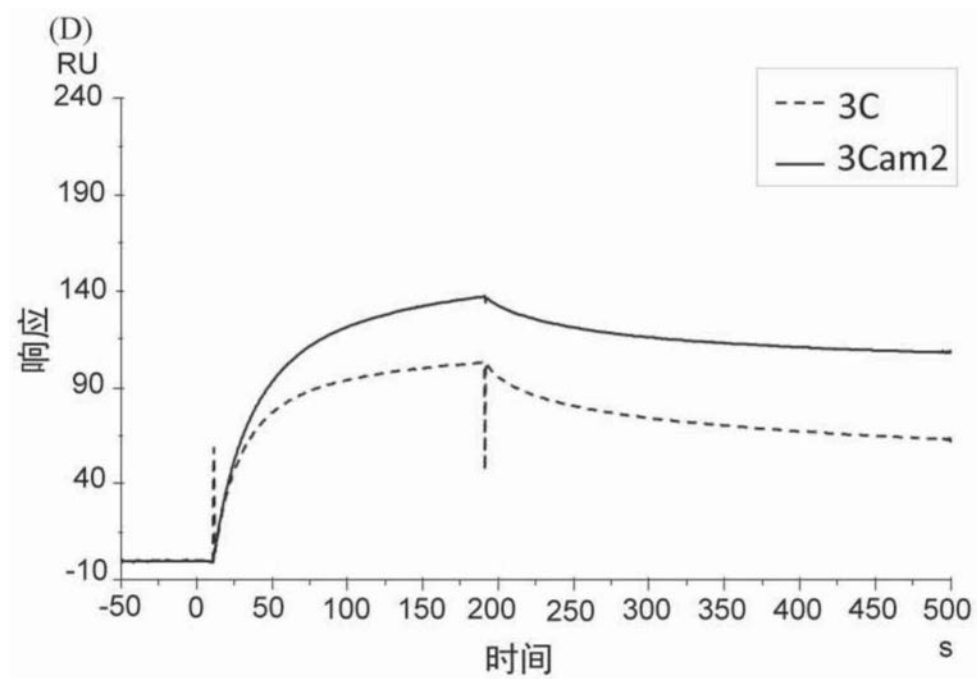


图12

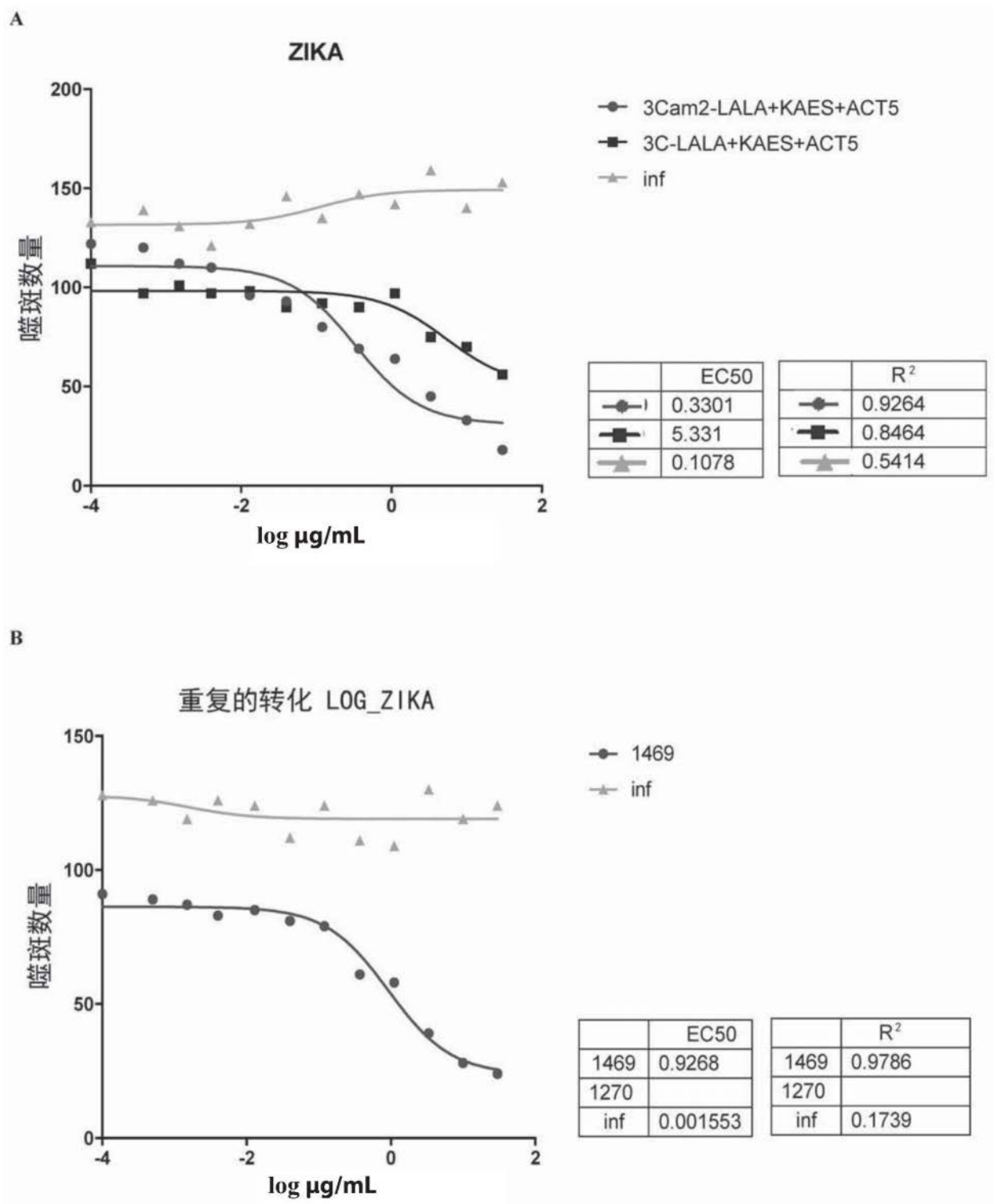


图13

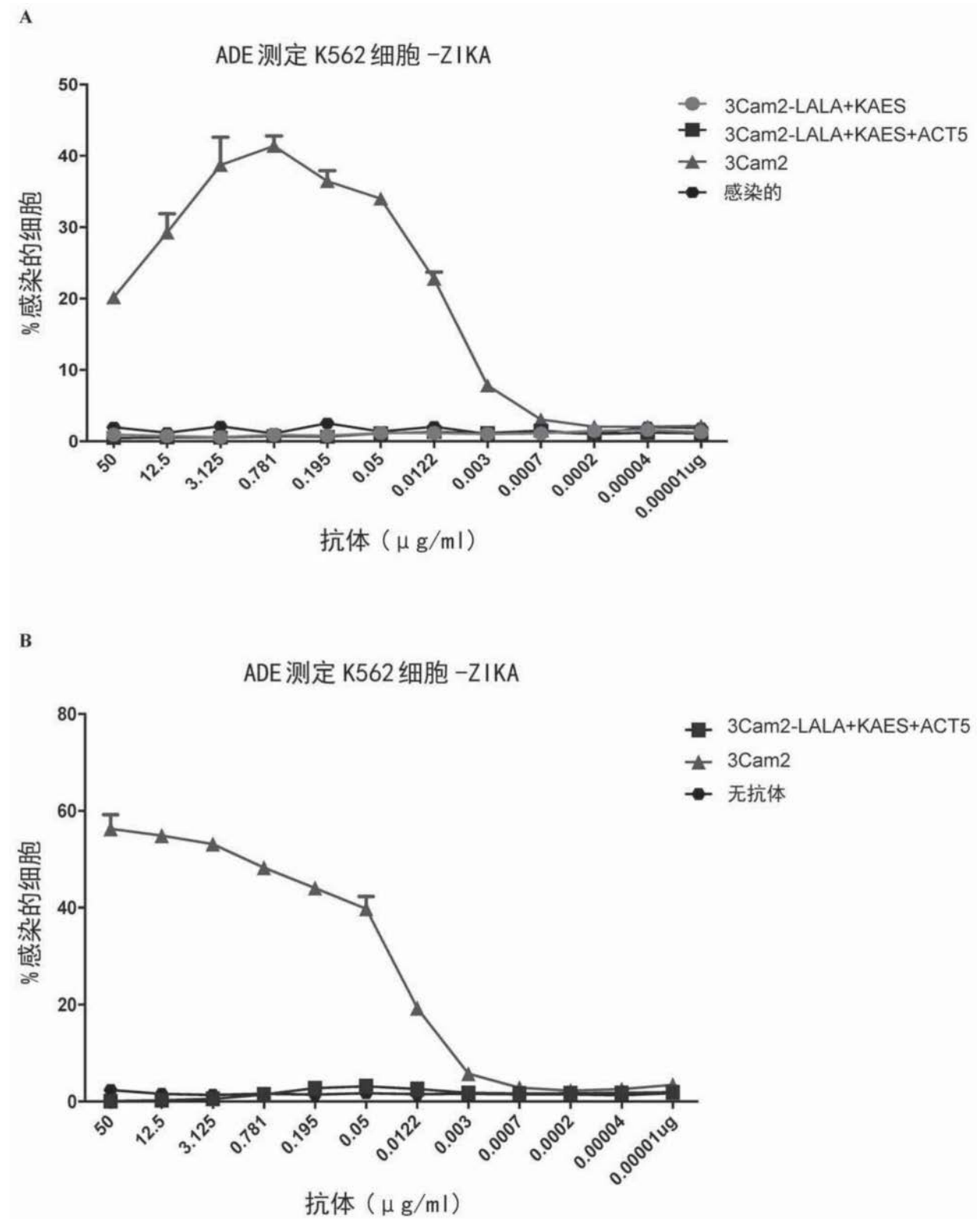


图14

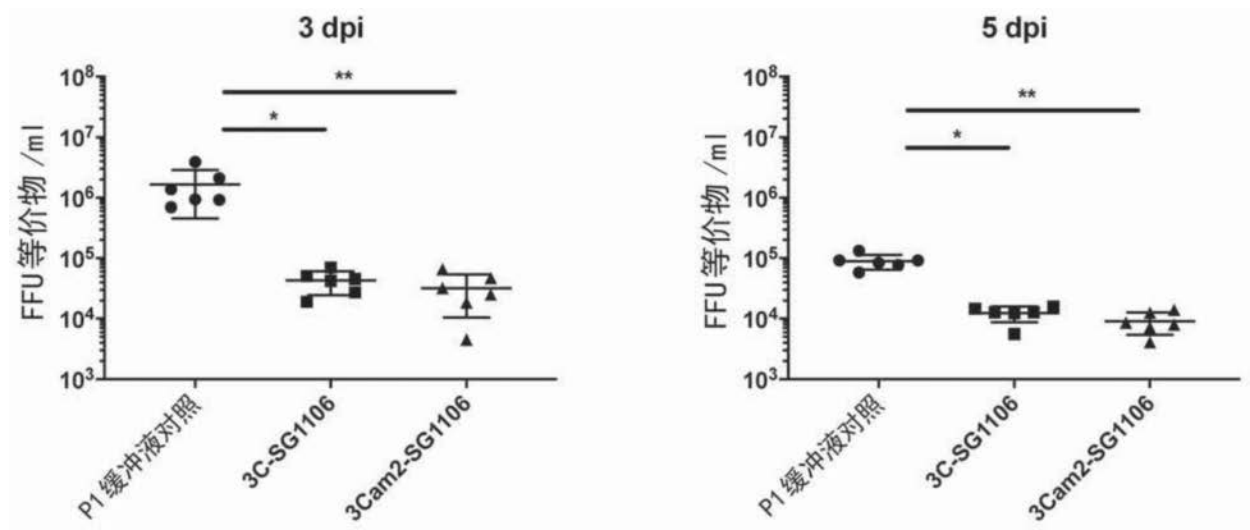


图15

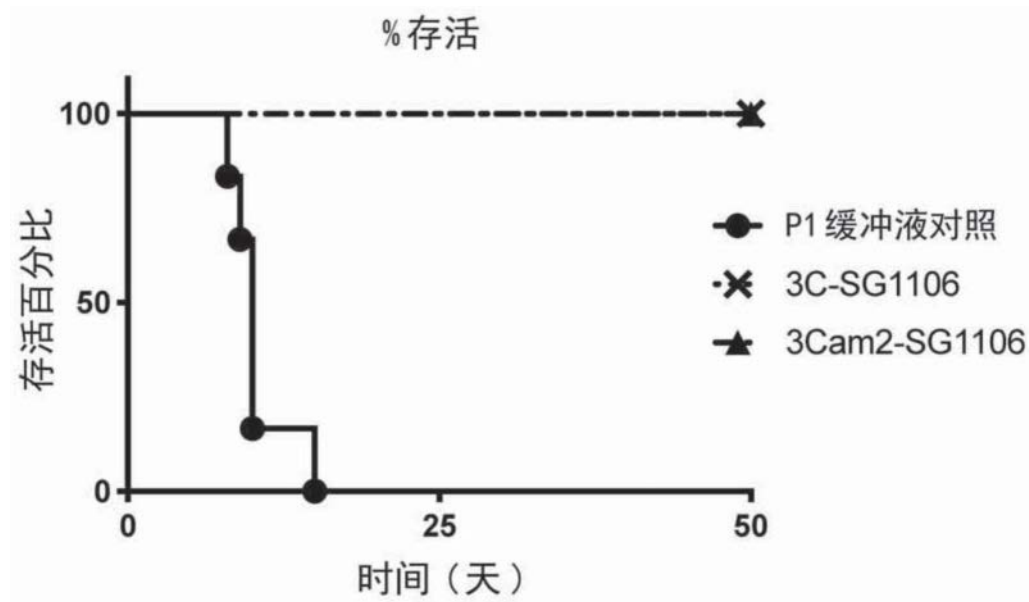


图16

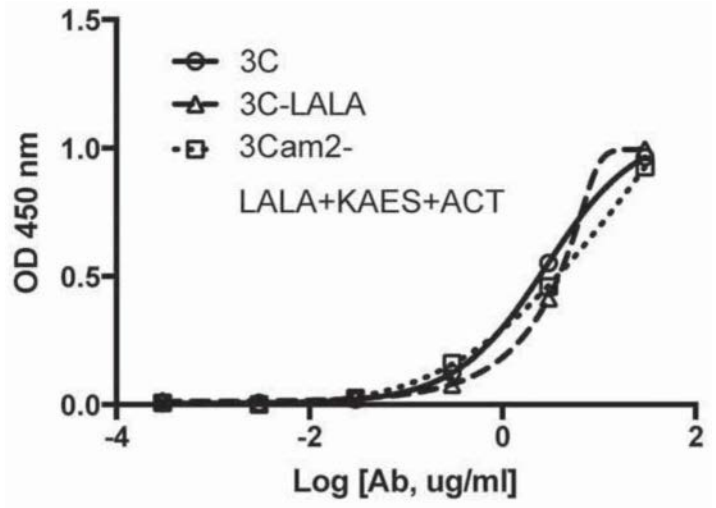


图17

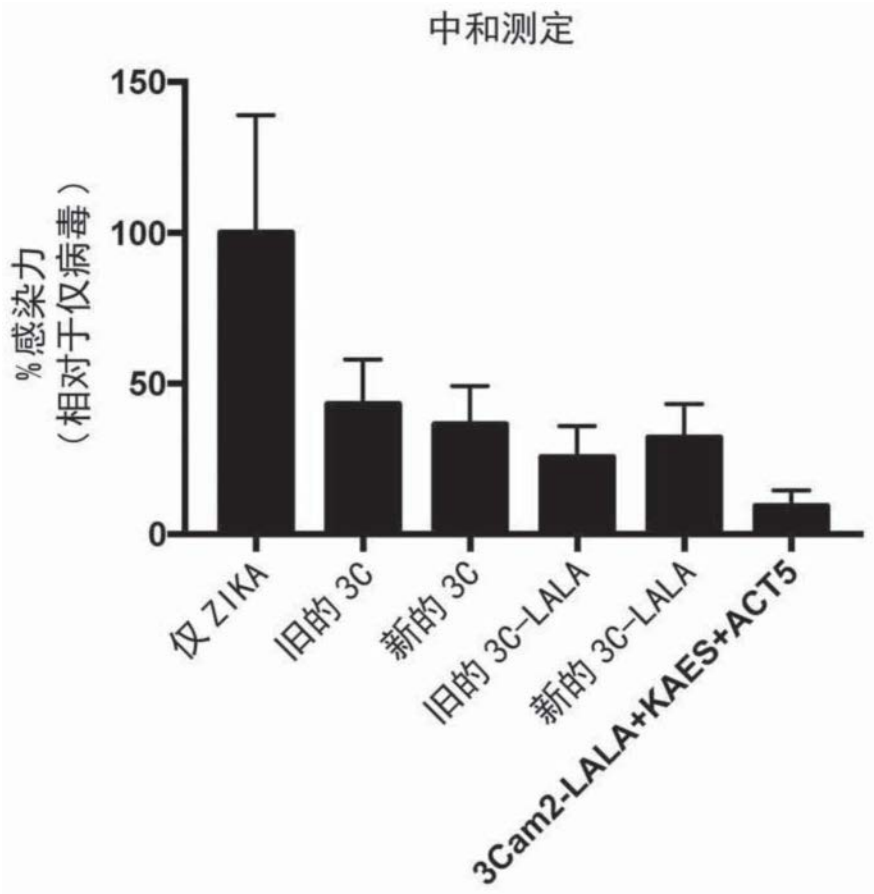


图18

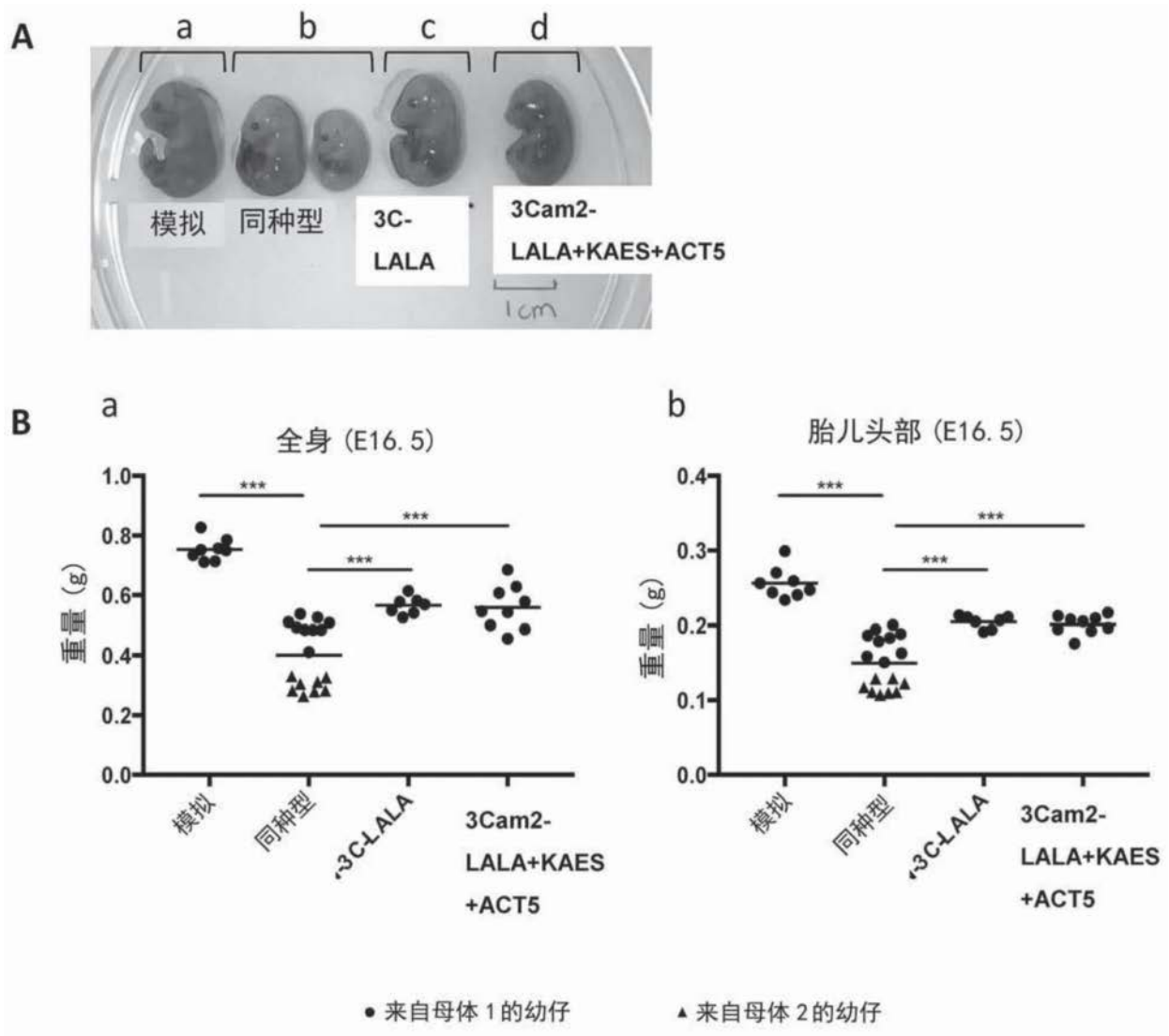


图19

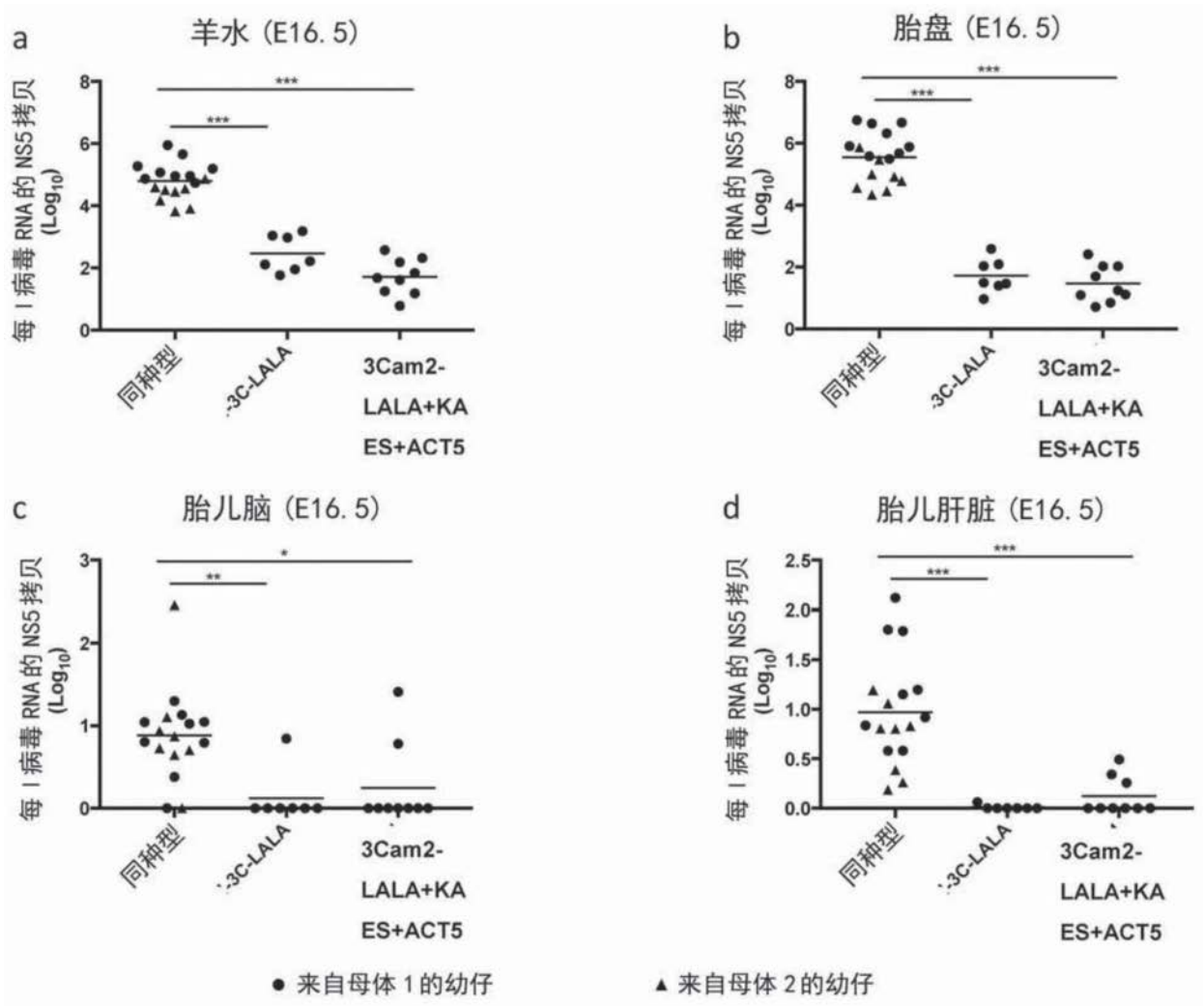


图20