



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118955699 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202410516500.4

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2013.10.18

C07K 16/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006.01)

61/715,642 2012.10.18 US

A61K 39/42 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 45/06 (2006.01)

201380064622.4 2013.10.18

A61P 31/18 (2006.01)

(71) 申请人 洛克菲勒大学

地址 美国纽约州

申请人 加州理工学院

(72) 发明人 H·穆奎特 M·努森兹韦格

P·J·比约克曼 L·沙夫

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理人 涂滔

权利要求书1页 说明书52页

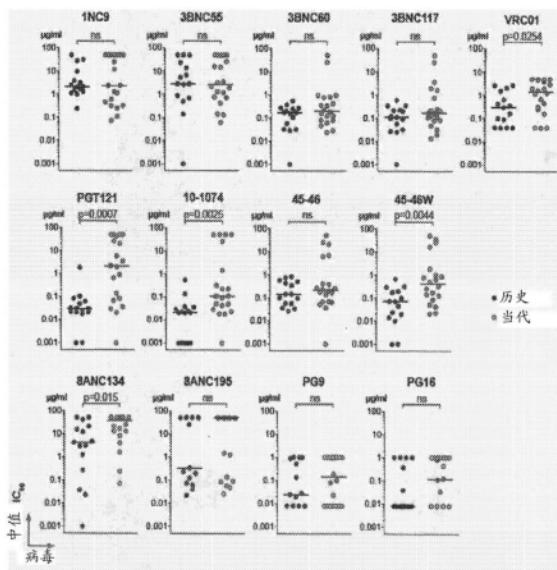
序列表(电子公布) 附图26页

(54) 发明名称

广泛中和性抗HIV抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗HIV抗体。还公开了相关方法和组合物。HIV引起获得性免疫缺陷综合征(AIDS)，即一种以如下的临床特征为特征的人类状况，所述临床特征包括消耗综合征、中枢神经系统变性和导致危及生命的机会性感染和恶性的重度免疫抑制在内的。自其在1981年被发现起，HIV 1型(HIV-1)已经导致全球至少2500万人死亡。



1. 分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含CDRH 1、CDRH 2、CDRH 3、CDRL 1、CDRL 2和CDRL 3,其中所述CDRH 1、CDRH 2、CDRH 3、CDRL 1、CDRL 2和CDRL 3包含选自下组的CDR组的相应序列:SEQ ID NO:39-44、SEQ ID NO:51-56、SEQ ID NO:63-68、SEQ ID NO:75-80、SEQ ID NO:81-86、SEQ ID NO:87-92、SEQ ID NO:93-98、SEQ ID NO:99-104和SEQ ID NO:131-136。

2. 权利要求1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中重链和轻链包含SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:7-8、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:15-16、SEQ ID NO:17-18、SEQ ID NO:19-20、SEQ ID NO:21-22、SEQ ID NO:23-24和SEQ ID NO:129-130的相应序列。

3. 权利要求1-2的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

4. 分离的核酸,其包含编码权利要求1-3中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分的CDR、重链可变区或轻链可变区的序列。

5. 载体,其包含权利要求4的核酸。

6. 培养细胞,其包含权利要求5的载体。

7. 药物组合物,其包含

(i) 至少一种权利要求1-3中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分,和(ii)药学可接受载体。

8. 第一治疗剂在制备用于预防或治疗需要此类预防或治疗的患者的HIV感染或HIV相关疾病的药物组合物中的用途,所述第一治疗剂包含治疗有效量的权利要求1-3中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分。

9. 权利要求8的用途,其中所述药物组合物进一步包括第二治疗剂。

10. 权利要求9的用途,其中所述第二治疗剂是抗病毒剂。

11. 权利要求9的用途,其中所述第二治疗剂是选自下组的治疗剂:非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、进入或融合抑制剂和整合酶抑制剂。

12. 用于生成抗HIV抗体或其抗原结合部分的方法,其包括

获得权利要求6的培养细胞;

在如下条件下在培养基中培养所述细胞,所述条件容许由所述载体编码的多肽的表达并且装配抗体或其抗原结合部分,并

自所述培养细胞或所述细胞的培养基纯化所述抗体或其抗原结合部分。

## 广泛中和性抗HIV抗体

[0001] 本申请是基于申请日为2013年10月18日,优先权日为2012年10月18日,申请号为202110092787.9,发明名称为:“广泛中和性抗HIV抗体”的专利申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年10月18日提交的美国临时申请No. 61/715,642的在35U.S.C. § 119(e) 下的优先权,并且在此完整并入。

[0004] 政府利益

[0005] 本文中公开的发明至少部分在来自国家健康研究所的拨款号P01AI081677下得到政府支持完成。因而,美国政府具有本发明的某些权利。

### 发明领域

[0006] 本发明涉及广泛且有力的针对人免疫缺陷病毒(“HIV”)的抗体。

### 发明背景

[0008] HIV引起获得性免疫缺陷综合征(AIDS),即一种以如下的临床特征为特征的人类状况,所述临床特征包括消耗综合征、中枢神经系统变性和导致危及生命的机会性感染和恶性的重度免疫抑制在内的。自其在1981年被发现起,HIV 1型(HIV-1)已经导致全球至少2500万人死亡。预测2000-6000万人会在接下去的二十年里被感染,即使存在着HIV感染的2.5%每年下降。需要用于治疗或抑制HIV感染的治疗剂和方法。

[0009] 一些HIV感染个体在其血清中显示广泛中和性IgG抗体。然而,尽管其在设计有效疫苗中有潜在意义,关于这些抗体的特异性和活性知之甚少。在动物模型中,中和性抗体的被动转移可以促成免于病毒攻击的保护。中和性抗体应答也可以在HIV感染个体中形成,但是还要完全揭示血液学应答的详细组成。

### 发明概述

[0011] 本发明涉及新的广泛中和性抗HIV抗体种类。抗体的共有重链和轻链氨基酸序列在下文列出,并且在图3a和3b中显示:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>DX<sub>4</sub>YWSWIRQSPGKGLEWIGYVHDGDTNPNPSL  
KSRVX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>SLDTSKNQVSLKLX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>VTAADSA<sub>9</sub>YYCARAX<sub>10</sub>HGX<sub>11</sub>RIYGIVAFGEX<sub>12</sub>FTYFYMDV  
WGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

[0012]

SX<sub>1</sub>VRPQPPSLSVAPGETARIX<sub>2</sub>CGEX<sub>3</sub>SLGSRAVQWYQQRPGQAPSLLIYNNQDRPSGIPERFSG  
SPDX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>FGTTATLTITX<sub>6</sub>VEAGDEADYYCHIWDSRX<sub>7</sub>PTX<sub>8</sub>WVFGGGTTLTVL (SEQ ID NO:  
2)

[0013] 在SEQ ID NO:1或2的序列中,每个“X”可以是任何氨基酸残基或无氨基酸。优选地,每个X可以是如图3a和3b中显示的克隆变体10-259,10-303,10-410,10-847,10-996,10-1074,10-1121,10-1130,10-1146,10-1341,和10-1369,和10-1074抗体的人工修饰形式10-1074GM的相应位置处的残基。

[0014] 因而,本发明的一个方面特征在于分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其具有至少一个具有选自下组的序列的互补决定区(CDR):SEQ ID NO:33-38,条件是抗体不是抗体PGT-121,122,或123。SEQ ID NO:33-38指在Kabat系统下重链CDR(CDRH)1-3和轻链CDR(CDRL)1-3的序列,如图3a和3b中显示的。在一个实施方案中,CDR可以含有选自下组的序列:SEQ ID NO:39-104,即在KABAT系统下的CDR序列,如下文表1中显示的。或者,CDR可以含有选自下组的序列:在IMGT系统下的那些相应的抗体CDR序列,如下文表1中显示的。

[0015] 在一个实施方案中,分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分含有包含CDRH 1,CDRH 2,和CDRH 3的重链可变区,其中CDRH 1,CDRH 2和CDRH 3包含SEQ ID NO:33-35的相应序列。CDRH 1,CDRH 2和CDRH 3也可以包含选自下组的CDRH组的相应序列:SEQ ID NO:39-41,SEQ ID NO:45-47,SEQ ID NO:51-53,SEQ ID NO:57-59,SEQ ID NO:63-65,SEQ ID NO:69-71,SEQ ID NO:75-77,SEQ ID NO:81-83,SEQ ID NO:87-89,SEQ ID NO:93-95,SEQ ID NO:99-101,和SEQ ID NO:131-133。或者,CDRH可以含有选自如下文表1中显示的在IMGT系统下的那些相应的抗体CDR序列的相应序列。

[0016] 在另一个实施方案中,分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分含有包含CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3的轻链可变区,其中CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3包含SEQ ID NO:36-38的相应序列。例如,CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3可以包含选自下组的CDRL组的相应序列:SEQ ID NO:42-44,SEQ ID NO:48-50,SEQ ID NO:54-56,SEQ ID NO:60-62,SEQ ID NO:66-68,SEQ ID NO:72-74,SEQ ID NO:78-80,SEQ ID NO:84-86,SEQ ID NO:90-92,SEQ ID NO:96-98,SEQ ID NO:102-104,和SEQ ID NO:134-136。或者,CDRL可以含有选自如下文表1中显示的在IMGT系统下的那些相应的抗体CDR序列的相应序列。

[0017] 在又一个实施方案中,上文提及的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,其包含CDRH 1,CDRH 2,和CDRH 3,和(ii)轻链可变区,其包含CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3.CDRH 1,CDRH 2,CDRH 3,CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3可以包含选自下组的CDR组的相应序列:SEQ ID NO:39-44,SEQ ID NO:45-50,SEQ ID NO:51-56,SEQ ID NO:57-62,SEQ ID NO:63-68,SEQ ID NO:69-74,SEQ ID NO:75-79,SEQ ID NO:81-86,SEQ ID NO:87-92,SEQ ID NO:93-98,SEQ ID NO:99-104,和SEQ ID NO:131-136。或者,CDRH和CDRL可以含有选自如下文表1中显示的在IMGT系统下的那些相应的抗体CDR序列的相应序列。

[0018] 在一个进一步的实施方案中,分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分包含下列一项或两项:(i)具有SEQ ID NO:1的共有氨基酸序列的重链和(ii)具有SEQ ID NO:2的共有氨基酸序列的轻链。重链可以含有选自下组的序列:SEQ ID NO:3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,和129,且轻链可以含有选自下组的序列:SEQ ID NO:4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,和130。例如,重链和轻链可以包含SEQ ID NO:3-4,SEQ ID NO:5-6,SEQ ID NO:7-8,SEQ ID NO:9-10,SEQ ID NO:11-12,SEQ ID NO:13-14,SEQ ID NO:15-16,SEQ ID NO:17-18,SEQ ID NO:19-20,SEQ ID NO:21-22,SEQ ID NO:23-24,和129-130的相应序列。

[0019] 在一个优选的实施方案中,分离的抗HIV抗体是选自下组的抗体:10-259,10-303,10-410,10-847,10-996,10-1074,10-1074GM,10-1121,10-1130,10-1146,10-1341,和10-1369。图3a和3b中显示了其相应的重链可变区、轻链可变区、CDRH 1-3和CDRL 1-3。在一个更优选的实施方案中,分离的抗HIV抗体是10-1074样抗体,即再选自下组的抗体:10-847,10-996,10-1074,10-1074GM,10-1146,和10-1341。此组的抗体比PGT121在中和当代病毒上

更有力。上文讨论的抗体可以是人抗体、人源化抗体、或嵌合抗体。

[0020] 在第二个方面,本发明提供了一种分离的核酸,其具有编码上文讨论的抗HIV抗体或其抗原结合部分的CDR、重链可变区、或轻链可变区的序列。特征还在于具有核酸的载体和具有载体的培养细胞。

[0021] 可以在用于生成抗HIV抗体或其片段的方法中使用核酸、载体和培养细胞。方法特别包括以下步骤:获得上文提及的培养细胞;在如下条件下在培养基中培养所述细胞,所述条件容许由所述载体编码的多肽的表达并且装配抗体或其片段,并自所述培养细胞或所述细胞的培养基纯化所述抗体或片段。

[0022] 在第三个方面,本发明特征在于药物组合物,其含有(i) 上文提及的至少一种抗HIV抗体,或其抗原结合部分,和(ii) 药学可接受载体。

[0023] 在第四个方面,本发明提供了一种预防或治疗HIV感染或HIV相关疾病的方法。方法包括特别包括以下步骤:鉴定需要此类预防或治疗的患者,并对所述患者施用第一治疗剂,其包含治疗有效量的至少一种上文提及的抗HIV抗体或其抗原结合片段。所述方法可以进一步包括施用第二治疗剂,诸如抗病毒剂。

[0024] 在第五个方面,本发明提供了一种试剂盒,其具有药学可接受剂量单位的药学有效量的至少一种上文提及的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,和药学可接受剂量单位的药学有效量的抗HIV剂。两种药学可接受剂量单位可以任选采用单一药学可接受剂量单位的形式。例示性抗HIV剂可以是选自下组的:非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、进入或融合抑制剂、和整合酶抑制剂。

[0025] 在第六个方面,本发明提供了一种用于受试者中HIV感染的诊断、预后或治疗监测的试剂盒。试剂盒含有一种或多种特异性结合来自受试者的生物学样品中的抗HIV中和性抗体的检测试剂。试剂盒可以进一步包含用于实施PCR或质谱术的试剂。

[0026] 下文描述中列出了本发明的一个或多个实施方案的详情。本发明的其它特征、目的和优点从描述和权利要求书看会是显而易见的。

[0027] 本公开包括以下实施方案:

[0028] 实施方案1.一种分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含至少一个具有选自下组的序列的互补决定区(CDR):SEQ ID NO:33-38。

[0029] 实施方案2.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述CDR包含选自下组的序列:SEQ ID NO:39-104。

[0030] 实施方案3.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含含有CDRH 1, CDRH 2, 和CDRH 3的重链可变区,其中所述CDRH 1, CDRH 2和CDRH 3包含SEQ ID NO:33-35的相应序列。

[0031] 实施方案4.实施方案3的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述CDRH 1, CDRH 2和CDRH 3包含选自下组的CDRH组的相应序列:SEQ ID NO:39-41, SEQ ID NO:45-47, SEQ ID NO:51-53, SEQ ID NO:57-59, SEQ ID NO:63-65, SEQ ID NO:69-71, SEQ ID NO:75-77, SEQ ID NO:81-83, SEQ ID NO:87-89, SEQ ID NO:93-95, SEQ ID NO:99-101, 和SEQ ID NO:131-133。

[0032] 实施方案5.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含含有CDRL 1, CDRL 2和CDRL 3的轻链可变区,其中所述CDRL 1, CDRL 2和CDRL 3包含SEQ ID NO:36-38

的相应序列。

[0033] 实施方案6.实施方案5的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述CDRL 1, CDRL 2和CDRL 3包含选自下组的CDRL组的相应序列:SEQ ID NO:42-44,SEQ ID NO:48-50, SEQ ID NO:54-56,SEQ ID NO:60-62,SEQ ID NO:66-68,SEQ ID NO:72-74,SEQ ID NO:78-80,SEQ ID NO:84-86,SEQ ID NO:90-92,SEQ ID NO:96-98,SEQ ID NO:102-104,和SEQ ID NO:134-136。

[0034] 实施方案7.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含包含CDRH 1,CDRH 2,和CDRH 3的重链可变区,和

[0035] 包含CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3的轻链可变区。

[0036] 实施方案8.实施方案7的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述CDRH 1, CDRH 2,CDRH 3,CDRL 1,CDRL 2和CDRL 3包含选自下组的CDR组的相应序列:SEQ ID NO: 39-44,SEQ ID NO:45-50,SEQ ID NO:51-56,SEQ ID NO:57-62,SEQ ID NO:63-68,SEQ ID NO:69-74,SEQ ID NO:75-79,SEQ ID NO:81-86,SEQ ID NO:87-92,SEQ ID NO:93-98,SEQ ID NO:99-104,和SEQ ID NO:131-136。

[0037] 实施方案9.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含下列一项或两项: (i) 包含SEQ ID NO:1的共有氨基酸序列的重链和(ii) 包含SEQ ID NO:2的共有氨基酸序列的轻链。

[0038] 实施方案10.实施方案9的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述重链包含选自下组的序列:SEQ ID NO:3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,和129,且所述轻链包含选自下组的序列:SEQ ID NO:4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,和130。

[0039] 实施方案11.实施方案9的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述重链和所述轻链包含SEQ ID NO:3-4,SEQ ID NO:5-6,SEQ ID NO:7-8,SEQ ID NO:9-10,SEQ ID NO:11-12,SEQ ID NO:13-14,SEQ ID NO:15-16,SEQ ID NO:17-18,SEQ ID NO:19-20,SEQ ID NO:21-22,SEQ ID NO:23-24,和129-130的相应序列。

[0040] 实施方案12.实施方案1的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是选自下组的抗体:10-259,10-303,10-410,10-847,10-996,10-1074,10-1121,10-1130,10-1146,10-1341,10-1369,和10-1074GM。

[0041] 实施方案13.实施方案1-12中任一项的分离的抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体。

[0042] 实施方案14.一种分离的核酸,其包含编码实施方案1-13中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合片段的CDR,重链可变区,或轻链可变区的序列。

[0043] 实施方案15.一种载体,其包含实施方案14的核酸。

[0044] 实施方案16.一种培养细胞,其包含实施方案15的载体。

[0045] 实施方案17.一种药物组合物,其包含(i) 至少一种实施方案1-13中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合片段,和(ii) 药学可接受载体。

[0046] 实施方案18.一种预防或治疗HIV感染或HIV相关疾病的方法,其包括下列步骤:

[0047] 鉴定需要此类预防或治疗的患者,并

[0048] 对所述患者施用第一治疗剂,其包含治疗有效量的至少一种实施方案1-13中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合片段。

- [0049] 实施方案19.实施方案18的方法,其进一步包括施用第二治疗剂。
- [0050] 实施方案20.实施方案19的方法,其中所述第二治疗剂是抗病毒剂。
- [0051] 实施方案21.一种用于生成抗HIV抗体或其片段的方法,其包括
- [0052] 获得实施方案16的培养细胞;
- [0053] 在如下条件下在培养基中培养所述细胞,所述条件容许由所述载体编码的多肽的表达并且装配抗体或其片段,并
- [0054] 自所述培养细胞或所述细胞的培养基纯化所述抗体或片段。
- [0055] 实施方案22.一种试剂盒,其包含:
- [0056] 药学可接受剂量单位的药学有效量的至少一种实施方案1-13中任一项的分离的抗HIV抗体,和
- [0057] 药学可接受剂量单位的药学有效量的抗HIV剂,
- [0058] 其中两种药学可接受剂量单位可以任选采用单一药学可接受剂量单位的形式。
- [0059] 实施方案23.实施方案22的试剂盒,其中所述抗HIV剂是选自下组的抗HIV剂:非核昔逆转录酶抑制剂,蛋白酶抑制剂,进入或融合抑制剂,和整合酶抑制剂。
- [0060] 实施方案24.一种用于受试者中HIV感染的诊断、预后或治疗监测的试剂盒,其包含一种或多种特异性结合来自受试者的生物学样品中的抗HIV中和性抗体的检测试剂。
- [0061] 实施方案25.实施方案24的试剂盒,其进一步包含用于实施PCR的试剂。
- [0062] 实施方案26.实施方案25的试剂盒,其进一步包含用于实施质谱术的试剂。
- [0063] 本公开进一步包括以下实施方案:实施方案1.一种分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含第一抗原结合臂和第二抗原结合臂,
- [0064] 其中所述第一抗原结合臂和所述第二抗原结合臂特异地结合不同表位或分子,
- [0065] 其中所述第一抗原结合臂包含CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2, 和CDRL 3, 其中所述CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2和CDRL 3包含选自下组的CDR组的相应序列:SEQ ID NO:69-74、SEQ ID NO:57-62、SEQ ID NO:63-68、SEQ ID NO:87-92和SEQ ID NO:93-98。
- [0066] 实施方案2.实施方案1的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含具有SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:19-20或SEQ ID NO:21-22所示的相应序列的重链可变区和轻链可变区。
- [0067] 实施方案3.实施方案1或2的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含具有SEQ ID NO:13-14、SEQ ID NO:9-10、SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:19-20或SEQ ID NO:21-22所示的相应序列的重链和轻链。
- [0068] 实施方案4.实施方案1的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2和CDRL 3包含SEQ ID NO:69-74的相应序列。
- [0069] 实施方案5.实施方案1的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含具有SEQ ID NO:13-14的相应序列的重链可变区和轻链可变区。
- [0070] 实施方案6.实施方案5的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其包含具有SEQ ID NO:13-14的相应序列的重链和轻链。
- [0071] 实施方案7.实施方案1-6中任一项的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述第二抗原结合臂结合白细胞上的触发分子。

- [0072] 实实施方案8.实施方案1-7中任一项的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述第二抗原结合臂结合T细胞受体分子。
- [0073] 实实施方案9.实施方案1-8中任一项的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述第二抗原结合臂结合CD3。
- [0074] 实实施方案10.实施方案1-9中任一项的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体。
- [0075] 实实施方案11.实施方案1-2、4-5和7-9中任一项的分离的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分,其中所述第一抗原结合臂选自Fab、F(ab')<sup>2</sup>、Fv和scFv。
- [0076] 实实施方案12.一种分离的核酸,其包含编码实施方案1-11中任一项的双特异性抗HIV抗体或其抗原结合部分的序列。
- [0077] 实实施方案13.一种载体,其包含实施方案12的核酸。
- [0078] 实实施方案14.一种培养细胞,其包含实施方案12的核酸或实施方案13的载体。
- [0079] 实实施方案15.一种药物组合物,其包含
- [0080] (i) 至少一种实施方案1-11中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分、或实施方案12的核酸、或实施方案13的载体、或实施方案14的培养细胞,和
- [0081] (ii) 药学可接受载体。
- [0082] 实实施方案16.实施方案15的药物组合物,其还包含第二治疗剂。
- [0083] 实实施方案17.实施方案16的药物组合物,其中所述第二治疗剂包含抗病毒剂或第二抗HIV抗体或其抗原结合部分。
- [0084] 实实施方案18.一种预防或治疗患者的HIV感染或HIV相关疾病的方法,其包括对所述患者施用包含治疗有效量的实施方案1-11中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分的治疗剂。
- [0085] 实实施方案19.实施方案18的方法,其还包括施用第二治疗剂。
- [0086] 实实施方案20.实施方案19的方法,其还包括施用抗病毒剂。
- [0087] 实实施方案21.至少一种实施方案1-11中任一项的抗HIV抗体或其抗原结合部分、或实施方案12的核酸、或实施方案13的载体、或实施方案14的培养细胞用于预防或治疗HIV感染的用途。
- [0088] 实实施方案22.一种用于生成抗HIV抗体或其片段的方法,其包括
- [0089] 获得实施方案14的培养细胞;
- [0090] 在如下条件下在培养基中培养所述细胞,所述条件容许由所述载体编码的多肽的表达并且装配抗体或其片段,并
- [0091] 自所述培养细胞或所述细胞的培养基纯化所述抗体或片段。
- [0092] 实实施方案23.一种试剂盒,其包含:
- [0093] 药学可接受剂量单位的药学有效量的至少一种实施方案1-11中任一项的分离的抗HIV抗体、或实施方案12的核酸、或实施方案13的载体、或实施方案14的培养细胞。
- [0094] 实实施方案24.实施方案23的试剂盒,其还包含药学可接受剂量单位的药学有效量的抗HIV剂,其中两种药学可接受剂量单位可以任选采用单一药学可接受剂量单位的形式。

## 附图简述

[0096] 图1显示了：PGT121样和10-1074样变体的中和活性。(A) 在TZM-b1测定法中比较PGT121样和10-1074样抗体的中和效力的热图。较暗的颜色=更有力的中和；白色=无中和。(B) 针对9种病毒的均值 $IC_{50}$ (y轴)和结合gp120和gp140的表观 $K_D$ 值(x轴)之间的关联。(C) 在针对扩充的一组119种病毒的TZM-b1测定法中比较PGT121, 10-996和10-1074抗体的中和宽度和效力的图。y轴显示了直至x轴上显示的浓度为止的 $IC_{50}$ 值的累积频率。蜘蛛图(左上角)显示了根据HIV-1进化枝的中和病毒的频率分布。(D) 显示摩尔中和比率(MNR; Fab 和 IgG  $IC_{50}$ 浓度的比率)的点图。水平棒代表所有病毒的均值 $IC_{50}$ 。(E) 比较针对自历史(Hist.)和当代(Cont.)血清转化者分离的病毒的PGT121(暗灰色)和10-1074(亮灰色)的中和效力的柱状图。ns, 不显著; \*\*, p<0.005。标示了PGT121和10-1074对当代病毒中和的中值 $IC_{50}$ 间的倍数差异。

[0097] 图2显示了：PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>突变体抗体的结合和中和活性。(A) 比较10-1074, PGT121, PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>抗体结合gp120和gp140的表观 $K_D$ 值的柱形图。误差棒表示自三个独立实验获得的 $K_D$ 值的SEM。标示了“野生型”对“糖突变体(glycomutant)”抗体的 $K_D$ 值间的倍数差异。(B) 与突变体抗体(PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>)比较PGT121和10-1074对聚糖(图7A)结合的柱形图。以每个点5fmol排列的探针的荧光强度(在一式两份的点上的均值)测量结合的数值得分。(C) 在针对一组40种病毒的TZM-b1测定法中比较PGT121、PGT121<sub>GM</sub>、10-1074和10-1074<sub>GM</sub>抗体的中和宽度和效力的覆盖图。

[0098] 图3描绘了：PGT121和10-1074克隆变体的序列比对。(A) PGT121样和10-1074样抗体的重链(IgH), 和所有克隆变体的可能的种系(GL) VH的氨基酸比对。标示了基于晶体结构、框架(FWR)和互补决定区(CDR)的氨基酸编号方式, 如由Kabat(.J Exp Med 132 (2): 211-250)和IMGT(Nucleic Acids Res 37(Database issue): D1006-1012)限定的。颜色阴影显示了酸性(红色)、碱性(蓝色)、酪氨酸(绿色)氨基酸。(B) 与A相同, 只是对于轻链(IgL)而言。

[0099] 图4显示了：PGT121和10-1074克隆变体的结合亲和力。(A) PGT121 IgG抗体变体与YU-2gp140和gp120配体的相互作用的结合亲和力, 如通过表面等离振子共振(SPR)测量的。M, mol/l; s, 秒; RU, 响应单位;/, 检测不到结合。 $\chi^2$ 值( $\chi^2$ )<10标示用于拟合曲线的1:1结合模型充分描述实验数据。认为显示的平衡和动力学常数是“表观”常数以说明源自IgG二价结合的亲和力效应。(B) 点图, 其显示PGT121样(蓝色阴影)和10-1074样(绿色阴影)的结合( $k_a$ )和解离( $k_d$ )速率常数。(C) 线性回归图, 其比较IgG抗体在其结合gp120和gp140方面的 $k_a$ 和 $k_d$ 值(x轴)对其针对表4中显示的9种病毒的中和效力(均值 $IC_{50}$ 值)(y轴)。

[0100] 图5描绘了：PGT121变体对gp120“核心”蛋白、gp120<sup>GD324-5AA</sup>突变体和线性gp120<sup>V3</sup>肽的结合。(A) 与完整YU-2gp120相比基于ELISA的PGT121样和10-1074样抗体对HXB2 gp120<sup>核心</sup>和2CC-核心蛋白的结合分析。x轴显示了获得y轴上标示的ELISA值(OD<sub>405nm</sub>)需要的抗体浓度(M)。使用抗CD4bs抗体VRC01(Science 329 (5993): 856-861)、抗V3 loop抗体10-188(PLoS One 6 (9): e24078)、和非HIV反应性抗体mG053(Science 301 (5638): 1374-1377)作为对照。(B) 与(A)相同, 只是对于结合gp120<sup>GD324-5AA</sup>突变体蛋白质而言。(c) 比较PGT121和10-1074样抗体和针对gp120<sup>V3-C3</sup>重叠肽的对照抗体(阳性对照10-188、1-79、2-59和2-1261(Nature 458 (7238): 636-640)), 和阴性对照mG053)的ELISA反应性的柱形图。y轴标示通过测试2 $\mu$ g/

m1的IgG抗体获得的ELISA值( $OD_{405nm}$ )。右下方显示了各个肽的氨基酸序列。至少一式两份实施所有实验。显示了代表性数据。

[0101] 图6描绘了:PGT121对gp120糖基化突变体和脱糖基化gp120的结合。(A)基于ELISA的PGT121和10-1074抗体变体对gp120、 $gp120^{NNT301-303AAA}$ 、 $gp120^{N332A}$ 和 $gp120^{N332A/NNT301-303AAA}$ 的结合分析。x轴显示了获得y轴上标示的ELISA值( $OD_{405nm}$ )需要的抗体浓度(M)。黑色虚线和连续线显示阳性(10-188)和阴性(mG053)抗体对照针对四种抗原的平均反应性。(B)比较未处理的gp120(WT,野生型)、经PNG酶F和EndoH消化的gp120s的银染色的SDS-PAGE凝胶。L,蛋白质梯。(C),与(A)相同,只是比较未处理的和经PNG酶F处理的gp120。(D)与(A)相同,只是比较未处理的和经EndoH处理的gp120。至少一式两份实施所有实验。

[0102] 图7描绘了:PGT121和10-1074克隆变体对聚糖的结合。(A)一组15种N-聚糖探针的单糖序列,所述N-聚糖探针用于聚糖微阵列分析以对PGT121样和10-1074样抗体检查对N-聚糖的直接结合。DH指通过还原性胺化与N-聚糖缀合的脂质标签1,2-双十六烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DHPE)。记录的关键特征是(i) PGT121组抗体结合具有通过1-3连接与核心甘露糖连接的以半乳糖终止的触角的单触角N-聚糖探针10(N2),而具有与核心甘露糖以1-6连接的触角的非异构体N-聚糖探针11(称作N4);(ii)此种以半乳糖终止的1-6连接的触角的存在(就像在双触角探针13(NA2)中那样)容许结合, $\alpha$ 2-6连接的(而非 $\alpha$ 2-3连接的)唾液酸的存在亦然;(iii)缺乏半乳糖且以N-乙酰基葡萄糖胺终止的双触角探针12(NGA2)不被结合。(B)比较PGT121样、10-1074样、和种系形式(GL)抗体的聚糖结合的柱形图。使用10-188(一种抗V3环抗体)作为阴性对照。以每个点2fmol(白色)和5fmol(灰色)排列的探针的荧光强度(在一式两份的点上的均值)测量结合的数值得分。

[0103] 图8描绘了:针对仅高甘露糖gp120和病毒的抗体结合和中和活性。(A)比较用几夫碱(kifunensine)( $gp120_{kif}$ )处理的细胞中生成的YU-2gp120和未处理的细胞(WT,野生型)中生成的gp120的银染色的SDS-PAGE凝胶。L,蛋白质梯。(B)PGT121样(蓝色标记物)和10-1074样(绿色标记物)抗体对YU-2gp120( $gp120_{WT}$ )和 $gp120_{kif}$ 的结合的ELISA比较。x轴显示了获得y轴上标示的ELISA值( $OD_{405nm}$ )需要的抗体浓度(M)。(C)针对在存在(病毒 $_{kif}$ )或缺乏(Virus $_{WT}$ )几夫碱的情况下生成的选择PGT121敏感性/10-1074抗性假病毒评估的PGT121的中和曲线。水平点线标示50%中和,其中 $IC_{50}$ 值可以自x轴上的抗体浓度得到。一式三份实施实验。误差棒标示一式三份测量的SD。(D)比较针对在HEK 293S GnT<sup>-/-</sup>细胞(病毒 $GnT^{-/-}$ )中或在野生型细胞(病毒 $_{WT}$ )中生成的YU-2和PV0.4假病毒的选择抗体的中和活性的柱形图。y轴显示了x轴上显示的病毒中和的均值 $IC_{50}$ 值( $\mu g/ml$ )。误差棒标示自两个独立实验获得的 $IC_{50}$ 值的SEM。

[0104] 图9显示了:PGT121、10-996和10-1074的中和活性。(A)比较针对指定HIV-1进化枝的病毒的PGT121、10-996和10-74的中和效力的图(使用TZM-b1测定法和一组119种假病毒测定)。x轴显示了实现50%中和需要的抗体浓度( $\mu g/ml$ )( $IC_{50}$ )。y轴显示了直至x轴上显示的浓度为止的 $IC_{50}$ 值的累积频率。(B)比较针对扩充的一组119种病毒的PGT121、10-996和10-1074抗体的中和宽度和效力的图,如通过TZM-b1中和测定法测定的。y轴显示了直至x轴上显示的浓度为止的 $IC_{80}$ 值的累积频率。(C)图显示了PGT121和10-1074对选定病毒的中和曲线。水平点线标示50%中和,其中 $IC_{50}$ 值可以自x轴上的抗体浓度得到。一式三份实施实验。误差棒标示一式三份测量的SD。

[0105] 图10描绘了：针对历史对当代进化枝B病毒的中和活性。比较选定bNAb的针对自历史(Hist.)和当代(Cont.)血清转化者分离的进化枝B病毒的中和效力的点图。水平棒代表每名患者的所有病毒的中值IC<sub>50</sub>。使用Mann-Whitney检验评估组间的差异。ns，不显著。

[0106] 图11描绘了：用一组11种广泛作用性抗HIV-1单抗中和两种R5热带SHIV。用于中和SHIVAD8E0(A)和SHIVDH12-V3AD8(B)的计算IC50值。

[0107] 图12描绘了：被动施用的中和性单抗的血浆浓度与用两种不同R5 SHIV攻击猕猴后的病毒获得的关系。实心圆图标示受保护的(无获得)猴；空心圆图标示受感染的动物。

[0108] 图13描绘了：bNAb的血浆浓度。通过测量血浆样品中的中和活性测定单抗的浓度。(A) 针对对一种但非另一种bNAb敏感的HIV-1株(即HIV-1株X2088\_9(10-1074敏感)；HIV-1株Q769\_d22(3BNC117敏感))的10-1074和3BNC117的TZM.b1中和测定法中测量的ID50值。(B) 抗体施用前(preP)，但是掺有0.01, 0.1, 1, 10, 和100μg/ml抗体10-1074(蓝色)或3BNC117(绿色)的血浆的中和活性。基于(A)中的测量ID50值，以血浆<sub>ID50</sub>滴度(左栏)报告并且转化成抗体浓度(右栏)的中和活性。(C) bNAb施用之前(出血前)和之后(天)的指定猕猴血浆样品中测量的<sub>ID50</sub>滴度(左栏)和bNAb浓度(右栏)。

## 发明详述

[0110] 本发明至少部分基于一种针对HIV的广泛中和性抗体(bNAb)新种类的意料不到的发现，所述广泛中和性抗体能识别gp120上的碳水化合物依赖性表位，包括复合型N-聚糖。

[0111] 抗体对于大多数疫苗的成功是必需的，并且针对HIV的抗体似乎是最近RV144抗HIV疫苗试验中保护的唯一关联物。一些HIV-1感染患者在感染后2-4年形成针对gp160病毒刺突(spike)的广泛中和性血清学活性，但是由于自体病毒经由突变逃脱，这些抗体一般不保护受感染的人。不过，广泛中和性活性对病毒施加选择压力，并且广泛中和性抗体(bNAb)对猕猴的被动转移针对SHIV感染提供保护。因此，已经提出了引发此类抗体的疫苗在人中针对HIV感染可以是保护性的。

[0112] 单细胞抗体克隆技术的开发揭示了bNAb靶向HIV-1gp160刺突上的几种不同表位。最有效力的HIV-1bNAb识别CD4结合位点(CD4b)(Science 333 (6049) :1633-1637; Nature 477 (7365) :466-470; Science 334 (6060) :1289-1293)和与可变环(Nature 477 (7365) :466-470; Science 326 (5950) :285-289; Science 334 (6059) :1097-1103; Nature 480 (7377) :336-343)，包括V1/V2(PG9/PG16)(Science 326 (5950) :285-289)和V3环(PGT)(Nature 477 (7365) :466-470)有关的碳水化合物依赖性表位。由于至今研究的抗体是小克隆家族的独特例子或成员，关于碳水化合物依赖性表位知之甚少。

[0113] 为了更好地了解中和性抗体对HIV-1和被PGT抗体靶向的表位的应答，我们分离出控制来自生成PGT121的进化枝A感染患者的gp160特异性IgG记忆应答的大克隆家族的成员。如本文中公开的，根据序列、结合亲和力、碳水化合物和V3环的中和活性和识别，PGT121抗体分成两组，即PGT121样和10-1074样组。10-1074及相关家族成员展现出罕见的有力中和，包括针对新传播病毒的广泛反应性。与先前表征的碳水化合物依赖性bNAb不一样，PGT121结合聚糖微阵列实验中的复合型，而非高甘露糖N-聚糖。PGT121和10-1074与其种系前体的结构和与复合型N-聚糖结合的PGT121结构相比的晶体结构是其独特特性合理化。

[0114] 在一个例子中，实施测定法以分离编码PGT121的B细胞克隆，所述PGT121在聚糖依

赖性bNAb间在识别复合型,而非高甘露糖N-聚糖上是独特的。PGT121克隆分成通过序列、结合亲和力、碳水化合物识别和中和活性区别的PGT121和10-1074样组。10-1074组展现出明显的效力和宽度,尽管可检不到对无蛋白质聚糖的结合。无配体PGT121、10-1074、及其种系前体的晶体结构揭示了差异的碳水化合物识别定位到CDRH2和CDRH3之间的裂缝,其被分开的PGT121结构中的复合型N-聚糖占据。PGT121和10-1074之间的交换聚糖接触残基确认这些残基在中和活性中的意义。HIV包膜展现出高甘露糖和复合型N聚糖的可变比例,如此这些结果(包括抗HIV bNAb的复合型N-聚糖识别的第一结构表征)对于了解抗体及最终疫苗如何能实现广泛中和性活性是至关重要的。

[0115] 如本文中使用的,术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体和多反应性抗体)、和抗体片段。如此,如在本说明书内的任何背景中使用的,术语“抗体”意图包括但不限于任何特定的结合成员,免疫球蛋白类和/或同种型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE和IgM);及其生物学相关片段或特异性结合成员,包括但不限于Fab、F(ab')2、Fv、和scFv(单链或相关实体)。本领域中应当理解,抗体是一种至少具有通过二硫键互相连接的两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1、CH2和CH3)组成。轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。重链和轻链两者的可变区包含框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。4个FWR区是相对保守的,而CDR区(CDR1、CDR2和CDR3)代表高变区,并且如下从NH<sub>2</sub>端至COOH端排列:FWR1、CDR1、FWR2、CDR2、FWR3、CDR3、和FWR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域,而根据同种型,恒定区可以介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合。

[0116] 如本文中使用的,“抗体”的定义中还包括嵌合抗体、人源化抗体、和重组抗体、转基因非人动物生成的人抗体、及使用技术人员可用的富集技术自文库选择的抗体。

[0117] 术语“可变的”指如下的实情,即可变(V)域的某些区段在抗体间在序列上广泛不同。V域介导抗原结合,并且限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性在可变区的110个氨基酸的跨距间不是均匀分布的。取而代之,V区由以各长9-12个氨基酸的称作“高变区”的极端变异性的较短区域分开的15-30个氨基酸的称作框架区(FR)的相对不变区段组成。天然重链和轻链的可变区各自包含由3个高变区(其形成环连接,且在一些情况中形成beta折叠结构的一部分)连接的4个FR(主要采用beta折叠构造)。每条链中的高变区通过FR极端紧密保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(见例如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0118] 如本文中使用的,术语“高变区”指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区一般包含来自“互补决定区”(“CDR”)的氨基酸残基。

[0119] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”指自基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可以以少量存在的可能的天然存在的突变外,构成群体的各种抗体是相同的。术语“多克隆抗体”指包含针对决定簇(“表位”的不同抗体的制备物。

[0120] 本文中的单克隆抗体包括“嵌合”抗体(其中重链和/或轻链的一部分与自特定物种衍生的或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列是相同的或同源的,而各链的剩余部分与自另一种物种衍生的或属于另一种抗体类或亚类的抗体中的相应序列是相同的或同源的)及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(见例如美国专利No.4,

816,567;及Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。描述的发明提供了自人抗体衍生的可变区抗原结合序列。因而,本文中主要感兴趣的嵌合抗体包括具有一个或多个个人抗原结合序列(例如CDR)并且含有一个或多个自非人抗体衍生的序列(例如FR或C区序列)的抗体。另外,本文中包括的嵌合抗体是那些包含一种抗体类或亚类的人可变区抗原结合序列和自另一种抗体类或亚类衍生的另一种序列(例如FR或C区序列)的。

[0121] 一般认为“人源化抗体”是一种具有对其引入来自非人来源的一种或多种氨基酸残基的人抗体。这些非人氨基酸残基经常称为“输入”残基,其通常自“输入”可变区取得。可以遵循Winter及合作者的方法(见例如Jones等,Nature,321:522-525(1986);Reichmann等,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science,239:1534-1536(1988))实施人源化,其通过用输入可变区序列替代人抗体的相应序列进行。因而,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(见例如美国专利No.4,816,567),其中已经用来自非人物种的相应序列替换基本上小于整个的人可变区。

[0122] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,诸如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sup>2</sup>、和Fv片段;双抗体;线性抗体(见例如美国专利No.5,641,870;Zapata等,Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0123] “Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小限度抗体片段。此片段含有紧密非共价联合的一个重链可变区域和一个轻链可变区域的二聚体。从这两个域的折叠得出6个高变环(各自来自H和L链的3个环),其为抗原结合贡献氨基酸残基,并且对抗体赋予抗原结合特异性。然而,甚至单一可变区(或仅包含对抗原特异性的3个CDR的Fv的一半)具有识别和结合抗原的能力,尽管以比完整结合位点更低的亲和力。

[0124] “单链Fv”(“sFv”或“scFv”)是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体域的抗体片段。sFv多肽可以进一步包含VH和VL域之间使sFv能够形成抗原结合的期望结构的多肽接头。对于sFv的综述,参见例如Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994);Borrebaeck 1995,见下文。

[0125] 术语“双抗体”指通过构建sFv制备的小抗体片段,所述sFv在VH和VL域之间具有短接头(约5-10个残基),从而实现V域的链间而非链内配对,生成二价片段(即具有两个抗原结合位点的片段)。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两个抗体的VH和VL域存在于不同多肽链上。双抗体更完整记载于例如EP 404,097;WO 93/11161;及Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)。

[0126] 域抗体(dAb)(其可以以完全人形式生成)是抗体的最小已知抗原结合片段,范围为约11kDa至约15kDa。dAb是免疫球蛋白的重链和轻链(分别为VH和VL)的稳健可变区。它们在微生物细胞培养物中高度表达,显示有利的生物物理特性,包括例如但不限于溶解度和温度稳定性,并且完全适合于通过体外选择系统诸如例如噬菌体展示进行选择和亲和力成熟。dAb作为单体是生物活性的,并且由于其较小的尺寸和内在稳定性,可以安排成较大的分子以创建具有延长的血清半衰期或其它药理学活性的药物。此技术的例子已经记载于例如W09425591(关于源自骆驼科(Camelidae)重链Ig的抗体)及US20030130496(其描述了自噬菌体文库分离单域完全人抗体)。

[0127] Fv和sFv是具有缺乏恒定区的完整组合位点的唯一种类。如此,它们适合于体内使用期间降低的非特异性结合。sFv融合蛋白可以构建为产生在sFv的氨基或羧基端的效应蛋白的融合物。参见例如Antibody Engineering, Borrebaeck编, 见上文。抗体片段也可以是“线性抗体”, 例如如记载于例如美国专利No.5,641,870的。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0128] 在某些实施方案中, 描述的发明的抗体是双特异性的或多特异性的。双特异性抗体是对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性双特异性抗体可以结合单一抗原的两种不同表位。其它此类抗体可以组合第一抗原结合位点与第二抗原的结合位点。或者, 可以组合抗HIV臂与如下的臂, 该臂结合靶细胞上的触发分子, 诸如T细胞受体分子(例如CD3), 或IgG的Fc受体(Fc $\gamma$  R), 诸如Fc $\gamma$  RI(CD64)、Fc $\gamma$  RII(CD32)和Fc $\gamma$  RIII(CD16), 从而将细胞防御机制聚焦并局部化到受感染的细胞。也可以使用双特异性抗体来将细胞毒剂局部化至受感染的细胞。可以以全长抗体或抗体片段(例如F(ab')2双特异性抗体)制备双特异性抗体。例如, WO 96/16673描述了一种双特异性抗ErbB2/抗Fc $\gamma$  RIII抗体, 并且美国专利No.5,837,234公开了一种双特异性抗ErbB2/抗Fc $\gamma$  RI抗体。例如, WO98/02463中报告了一种双特异性抗ErbB2/Fc $\alpha$ 抗体; 美国专利No.5,821,337教导了一种双特异性抗ErbB2/抗CD3抗体。还可参见例如Mouquet等, Polyreactivity Increases The Apparent Affinity Of Anti-HIV Antibodies By Heteroligation. Nature. 467, 591-5 (2010), 及Mouquet等, Enhanced HIV-1neutralization by antibody heteroligation" Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 17; 109 (3) :875-80。

[0129] 用于生成双特异性抗体的方法是本领域中已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中两条链具有不同特异性(参见例如Millstein等, Nature, 305:537-539 (1983))。类似的规程披露于例如WO 93/08829, Traunecker等, EMBO J., 10:3655-3659 (1991), 并且还可参见Mouquet等, Enhanced HIV-1neutralization by antibody heteroligation" Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 17; 109 (3) :875-80。

[0130] 或者, 可以将具有期望结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原组合位点)与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合物具有Ig重链恒定域, 其包含铰链的至少一部分、CH2、和CH3区。依照一些实施方案, 含有对于轻链键合必需的位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一种融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和(若想要的话)免疫球蛋白轻链的DNA插入不同的表达载体中, 并且共转染到合适的宿主细胞中。这在构建中使用的三条多肽链的不同比率提供期望的双特异性抗体的最佳产量时在实施方案中在调节三个多肽片段的相互比例上提供更大的灵活性。然而, 有可能在相等比率的至少两条多肽链的表达导致高产量时或者在比率对期望的链组合的产量没有显著影响时将两条或所有三条多肽链的编码序列插入单一表达载体中。

[0131] 用于自抗体片段生成双特异性抗体的技术也已经记载于文献中。例如, 可以使用化学连接制备双特异性抗体。例如, Brennan等, Science, 229:81 (1985)描述了一种规程, 其中蛋白水解切割完整的抗体以生成F(ab')2片段。在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原这些片段以稳定化邻近的二硫醇并阻止分子间二硫化物形成。然后, 将生成的Fab'片段转化成硫代硝基苯甲酸盐(thionitrobenzoate, TNB)衍生物。然后, 通过用巯基乙胺还原

将Fab' -TNB衍生物中的一种再转化成Fab' -硫醇，并与等摩尔量的另一个Fab' -TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。可以使用生成的双特异性抗体作为用于选择性固定化酶的药剂。

[0132] 本文中涵盖抗体的其它修饰。例如，可以将抗体与多种非蛋白质性聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物)之一连接。抗体也可包载于例如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)，在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)，或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Oslo,A.编,(1980)。

[0133] 通常，使用本领域中可用的载体和方法重组生成描述的发明的抗体。也可以通过体外活化的B细胞生成人抗体(参见例如美国专利No.5,567,610和5,229,275)。可用于本发明的分子遗传学和遗传工程的通用方法记载于Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook,等,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),Gene Expression Technology(Methods in Enzymology,Vol.185,D.Goeddel编,1991.Academic Press, San Diego,CA),“Guide to Protein Purification”in Methods in Enzymology (M.P.Deutshcer编, (1990) Academic Press, Inc.);PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications (Innis等1990.Academic Press, San Diego,CA),Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,第2版(R.I.Freshney.1987.Liss, Inc.New York, NY),及Gene Transfer and Expression Protocols,第109-128页,E.J.Murray编,The Humana Press Inc.,Clifton,N.J.)的当前版本。用于遗传操作的试剂、克隆载体、和试剂盒可购自商业厂家，诸如BioRad,Stratagene,Invitrogen,ClonTech和Sigma-Aldrich Co.。

[0134] 也可以在能够在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下生成人抗体的完整全集的转基因动物(例如小鼠)中生成人抗体。例如，已经描述了嵌合且种系的突变体小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因列转移入此类种系突变体小鼠中导致抗体攻击后人抗体的生成。参见例如Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551 (1993) ;Jakobovits等,Nature,362:255-258 (1993) ; Bruggemann等,Year in Immuno.,7:33 (1993) ;美国专利No.5,545,806,5,569,825,5,591, 669(均属于GenPharm)；美国专利No.5,545,807;和W0 97/17852。此类动物可以遗传工程化改造为生成包含描述发明的多肽的人抗体。

[0135] 已经开发出用于生成抗体片段的多种技术。在传统上，这些片段经由对完整抗体的蛋白水解消化衍生(参见例如Morimoto等,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) ;及Brennan等,Science,229:81 (1985))。然而，现在可以通过重组宿主细胞直接生成这些片段。Fab、Fv和ScFv抗体片段均可以在大肠杆菌(E.coli)中表达并自大肠杆菌分泌，如此容许大量这些片段的容易生成。可以自大肠杆菌直接回收Fab' -SH片段，并且将其化学偶联以形成F(ab')2片段(参见例如Carter等,Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。根据另一种方法，可以自重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')2片段。包含救援受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')2片段记载于美国专利No.5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员而言会是显而易见的。

[0136] 可以利用本领域中已知用于使用富集技术自文库选择抗体片段的其它技术作为先前讨论的技术的备选来选择单链抗体,所述技术包括但不限于噬菌体展示、核糖体展示(Hanes和Pluckthun,1997,Proc.Nat.Acad.Sci.94:4937-4942)、细菌展示(Georgiou等,1997,Nature Biotechnology 15:29-34)和/或酵母展示(Kieke,等,1997,Protein Engineering 10:1303-1310)。自利用丝状噬菌体技术直接生成的单链抗体文库选择单链抗体。噬菌体展示技术是本领域中已知的(例如参见来自Cambridge Antibody Technology (CAT) 的技术),如披露于美国专利No.5,565,332;5,733,743;5,871,907;5,872,215;5,885,793;5,962,255;6,140,471;6,225,447;6,291650;6,492,160;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081,以及依赖于1992年5月24日提交的优先权提交GB 9206318的其它美国家族成员,或申请;还可见Vaughn,等1996,Nature Biotechnology 14: 309-314)。也可以使用可用的重组DNA技术,诸如DNA扩增方法(例如PCR),或可能通过使用相应的杂交瘤cDNA作为模板设计和构建单链抗体。

[0137] 变体抗体也包括在本发明的范围内。如此,本申请中所述的序列的变体也包括在本发明的范围内。可以使用本领域中已知的方法获得具有改善的亲合力的抗体序列的其它变体,并且包括在本发明的范围内。例如,可以使用氨基酸取代来获得具有进一步改善的亲和力的抗体。或者,可以使用核苷酸序列的密码子优化来改善表达系统中的翻译效率以生成抗体。

[0138] 此类变体抗体序列会与本申请中所述的序列共享70%或更多(即80%,85%,90%,95%,97%,98%,99%或更大)序列同一性。相对于参照序列(即本申请中所述的序列)的全长计算此类序列同一性。如本文中提及的,百分比同一性如使用NCBI(国立生物技术信息中心;www.ncbi.nlm.nih.gov/)规定的缺省参数[Blosum 62矩阵;缺口打开罚分=11和缺口延伸罚分=1]使用BLAST第2.1.3版测定的。例如,本发明提供了肽序列,其包含一种或多种本文中公开的序列的至少约5、10、15、20、30、40、50、75、100、150、或更多个连续肽以及其间的所有中间长度。如本文中使用的,术语“中间长度”意图描述引用数值之间的任何长度,诸如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、等;21、22、23、等;30、31、32、等;50、51、52、53、等;100、101、102、103、等;150、151、152、153、等。

[0139] 本发明提供了单独或与在血清中具有广泛中和活性的其它抗体(诸如但不限于VRC01、抗V3环、CD4bs、和CD4i抗体及PG9/PG16样抗体)组合的抗体。

[0140] 根据另一个实施方案,本发明提供了用于制备和施用HIV抗体组合物的方法,所述HIV抗体组合物适合于以如下的量并且依照如下的日程表对具有HIV感染,或有HIV感染风险的人或非人灵长类患者施用,所述量和日程表足以诱导人中针对HIV的保护性免疫应答,或HIV病毒的减少。

[0141] 根据另一个实施方案,本发明提供了包含至少一种本发明的抗体和药学可接受载体的疫苗。根据一个实施方案,疫苗是包含至少一种本文中描述的抗体和药学可接受载体的疫苗。疫苗可以包含任何组合的多种具有本文中描述的特征的抗体,并且可以进一步包含对于HIV而言中和性的抗体,其是本领域中已知的。

[0142] 应当理解,组合物可以是本文中公开的单一抗体或抗体组合(其可以是相同或不同的),以在疫苗接种后预防或治疗性处理HIV感染的各种亚型的进展。可以根据期望的免疫力选择此类组合。在对动物或人施用抗体时,它可以与一种或多种本领域普通技术人员

已知的药学可接受载体、赋形剂或佐剂组合。组合物可以进一步包含本领域中已知的广泛中和性抗体，包括但不限于VRC01、b12、抗V3环、CD4bs、和CD4i抗体及PG9/PG16样抗体。

[0143] 此外，就测定患者中的有效水平以治疗HIV而言，特别地，合适的动物模型是可用的，并且已经广泛实施以评估针对各种基因疗法方案的针对HIV的体内效力(Sarver等(1993b)，见上文)。这些模型包括小鼠、猴和猫。即使这些动物对HIV疾病不是天然易感的，可以用慢病毒载体或HIV感染用人外周血单核细胞(PBMC)、淋巴结、胎肝/胸腺或其它组织重建的嵌合小鼠模型(例如SCID、bg/nu/xid、NOD/SCID、SCID-hu、有免疫能力的SCID-hu、经骨髓消融的BALB/c)，并且用作HIV发病机制的模型。类似地，可以采用猿免疫缺陷病毒(SIV)/猴模型，也可以采用猫免疫缺陷病毒(FIV)/猫模型。在用于治疗性处理AIDS时，药物组合物可以含有与依照本发明的载体结合的其它药物。这些其它药物可以以其传统方式(例如作为治疗HIV感染的药剂)使用。

[0144] 根据另一个实施方案，本发明提供了基于抗体的药物组合物，其包含有效量的分离的HIV抗体，或亲和力成熟形式，其提供预防性或治疗性处理选择以降低HIV病毒的感染。可以通过多种本领域中已知的策略(例如参见McGoff和Scher, 2000, Solution Formulation of Proteins/Peptides: In McNally, E.J.编Protein Formulation and Delivery. New York, NY: Marcel Dekker; 第139-158页；Akers和Defilippis, 2000, Peptides and Proteins as Parenteral Solutions.于: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Philadelphia, PA: Talyor and Francis; 第145-177页；Akers, 等, 2002, Pharm. Biotechnol. 14: 47-127)配制本发明的基于抗体的药物组合物。适合于患者施用的药学可接受组合物会含有配制剂中有有效量的抗体，所述配制剂不仅保留生物学活性，同时还促进在可接受温度范围内贮存期间的最大稳定性。根据期望的配制剂，药物组合物还可以包含药学可接受稀释剂、药学可接受载体和/或药学可接受赋形剂，或通常用于配制药物组合物以进行动物或人施用的任何此类媒介物。稀释剂选择为使得不影响组合的生物学活性。此类稀释剂的例子是蒸馏水、生理学磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、和汉克氏溶液。可用于本发明的药物组合物或配制剂的赋形剂的量是用来使抗体在组合物间均一分布，从而在要将其对有此需要的受试者投递时可以将其均一分散的量。它可以用来将抗体稀释至一定的浓度，该浓度提供期望的有益减轻或治愈结果，同时使可由于过高浓度而发生的任何不利副作用最小化。它也可以具有保存效果。如此，对于具有高生理学活性的抗体，会采用更多的赋形剂。另一方面，对于展现出较低的生理学活性的任何活性成分，会采用较小量的赋形剂。

[0145] 可以施用上文描述的抗体和抗体组合物或疫苗组合物(其包含至少一种本文中描述的抗体或该抗体的组合)以预防性和治疗性处理HIV病毒感染。

[0146] 本发明还涉及分离的多肽，其包含新的轻链和重链氨基酸序列，及SEQ ID NO:1和2的重链和轻链的共有序列，如图3中所列的。

[0147] 在其它相关实施方案中，本发明提供了多肽变体，其编码图3中所列的HIV抗体的氨基酸序列；SEQ ID NO:1和2的重链和轻链的共有序列。这些多肽变体与本发明的多肽序列相比具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%、或更大的序列同一性，如使用本文中描述的方法(例如使用标准参数的BLAST分析)测定的。本领域技术人员会认可可以通过考虑氨基酸相似性等适当调整这些数值以测定编码的蛋白质的相应

同一性。

[0148] 术语“多肽”以其常规意义使用，即作为氨基酸的序列。多肽不限于特定长度的产物。肽、寡肽、和蛋白质包括在多肽的定义内，并且此类术语在本文中可互换使用，除非另有明确指示。此术语还包括多肽的表达后修饰，例如糖基化、乙酰化、磷酸化等，及本领域中已知的其它修饰(天然存在的和非天然存在的两者)。多肽可以是整个蛋白质，或其亚序列。本发明的背景中感兴趣的特定多肽是能够结合抗原或HIV感染细胞的包含CDR、VH和VL的氨基酸亚序列。

[0149] 多肽“变体”在该术语在本文中使用时指通常与本文中明确公开的多肽相差一处或多处取代、缺失、添加和/或插入的多肽。此类变体可以是天然存在的或者可以是如下合成生成的，例如通过如本文中描述的那样和/或使用本领域中公知的多种技术之任一种修饰一种或多种本发明的上述多肽序列，并且评估多肽的一种或多种生物学活性。

[0150] 例如，可以用某些氨基酸取代蛋白质结构中的其它氨基酸而没有其结合其它多肽(例如抗原)或细胞的能力的可察觉丧失。由于限定蛋白质的生物学功能活性的正是所述蛋白质的结合能力和性质，可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列且因此其根本的DNA编码序列的取代，由此获得具有类似特性的蛋白质。如此，涵盖的是，可以在公开的组合物的肽序列，或编码所述肽的相应DNA序列中进行各种变化而没有其生物学效用或活性的可察觉丧失。

[0151] 在许多情况中，多肽变体会含有一处或多处保守取代。“保守取代”指用氨基酸取代具有相似特性的另一种氨基酸，使得肽化学领域的技术人员会预多肽的二级结构和亲水特性基本上不变的取代。

[0152] 氨基酸取代一般基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。可以考虑各种前述特征的例示性取代是本领域技术人员公知的，并且包括：精氨酸和赖氨酸；谷氨酸和天冬氨酸；丝氨酸和苏氨酸；谷氨酰胺和天冬酰胺；和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0153] “同源性”或“序列同一性”指多核苷酸或多肽序列变体中在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比同源性后与非变体序列相同的残基的百分比。在具体的实施方案中，多核苷酸和多肽变体与本文中描述的多核苷酸或多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%多核苷酸或多肽同源性。

[0154] 此类变体多肽序列会与本申请中所述的序列共享70%或更多(即80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多)序列同一性。在别的实施方案中，描述的发明提供了包含本文中公开的氨基酸序列的各种长度的连续区段的多肽片段。例如，本发明提供了肽序列，其包含一种或多种本文中公开的序列的至少约5、10、15、20、30、40、50、75、100、150、或更多个连续肽及其间的所有中间长度。

[0155] 本发明还包括编码描述的发明性抗体及其片段的部分或整个轻链和重链的核酸序列。由于遗传密码的冗余性，会存在编码相同氨基酸序列的这些序列的变体。

[0156] 本发明还包括分离的核酸序列，其编码图3中所列的HIV抗体的重链和轻链的多肽和SEQ ID NO:1和2的重链和轻链的共有序列。

[0157] 在其它相关实施方案中，描述的发明提供了多核苷酸变体，其编码图3中所列的HIV抗体的重链和轻链的肽序列；SEQ ID NO:1和2的重链和轻链的共有序列。这些多核苷酸

变体与本发明的多核苷酸序列相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%、或更大的序列同一性，如使用本文中描述的方法(例如使用标准参数的BLAST分析)测定的。本领域技术人员会认可这些数值可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框布置等适当调整以测定由两种核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。

[0158] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用，指单链或双链RNA、DNA、或混合聚合物。多核苷酸可以包含基因组序列、基因组外序列和质粒序列、和表达多肽或可以改编为表达多肽的较小的工程化基因区段。

[0159] “分离的核酸”指与自然伴随天然序列的其它基因组DNA序列及蛋白质或复合物诸如核糖体和聚合酶基本上分开的核酸。该术语涵盖已经自其天然存在的环境取出的核酸序列，并且包括重组或克隆DNA分离物和化学合成类似物或通过异源系统生物合成的类似物。基本上纯的核酸包括核酸的分离形式。因而，这指如最初分离的核酸，并且不排除后来手动添加到分离的核酸的基因或序列。

[0160] 多核苷酸“变体”在该术语在本文中使用时指通常与本文中明确公开的多核苷酸相差一处或多处取代、缺失、添加和/或插入的多核苷酸。此类变体可以是天然存在的或者可以是如下合成生成的，例如通过如本文中描述的那样和/或使用本领域中公知的多种技术之任一种修饰一种或多种本发明的多核苷酸序列，并且评估编码多肽的一种或多种生物学活性。

[0161] 可以在描述发明的多核苷酸的结构中进行修饰，并且仍然获得编码具有期望特征的变体或衍生物多肽的功能分子。在期望改变多肽的氨基酸序列以创建本发明多肽的等同物，或甚至改善的变体或部分时，本领域技术人员会改变编码DNA序列的一种或多种密码子。

[0162] 通常，多核苷酸变体含有一处或多处取代、添加、缺失和/或插入，使得由变体多核苷酸编码的多肽的免疫原性结合特性相对于由本文中明确列出的多核苷酸序列编码的多肽基本上不是降低的。

[0163] 在别的实施方案中，描述的发明提供了多核苷酸片段，其包含与一种或多种本文中公开的序列相同或互补的序列的各种长度的连续区段。例如，本发明提供了多核苷酸，其包含一种或多种本文中公开的序列的至少约10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500或1000或更多个连续核苷酸及其间的所有中间长度，并且涵盖引用数值间的任何长度，诸如16、17、18、19、等；21、22、23、等；30、31、32、等；50、51、52、53、等；100、101、102、103、等；150、151、152、153、等；并且包括200-500；500-1,000的所有整数。

[0164] 在本发明的另一个实施方案中，提供了多核苷酸组合物，其能够在中等至高严格性条件下与本文中提供的多核苷酸序列或其片段或其互补序列杂交。杂交技术是分子生物学领域中公知的。为了例示，适合于测试本发明的多核苷酸与其它多核苷酸杂交的中等严格条件包括在5x SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA (pH 8.0) 的溶液中预清洗；于50-60°C., 5x SSC清洗过夜；接着于65°C清洗两次达20分钟，每次用2x、0.5x、和0.2x含有0.1% SDS的SSC。本领域技术人员会理解可以容易地操作杂交严格性，诸如通过改变杂交溶液的盐含量和/或实施杂交的温度。例如，在另一个实施方案中，合适的高度严格杂交条件包括上文描述的那些，只是提高杂交温度，例如至60-65°C或65-70°C。

[0165] 在一些实施方案中,由多核苷酸变体或片段编码的多肽与由天然多核苷酸编码的多肽具有相同的结合特异性(即特异性或优先结合相同的表位或HIV株)。在一些实施方案中,描述的多核苷酸、多核苷酸变体、片段和杂交序列编码如下的多肽,该多肽具有本文中明确列出的多肽序列的结合活性的至少约50%,至少约70%,和至少约90%的结合活性水平。

[0166] 可以组合描述发明的多核苷酸或其片段(不管编码序列自身如何)与其它DNA序列,诸如启动子、多聚腺苷酸化信号、别的限制性酶位点、多克隆位点、其它编码区段、等,从而其总体长度可以相当大地变化。采用几乎任何长度的核酸片段。例如,本发明的许多实施方案中包括具有长度约10000、约5000、约3000、约2000、约1000、约500、约200、约100、约50个碱基对等(包括所有中间长度)的总体长度的例示性多核苷酸区段。

[0167] 本发明的范围内进一步包括包含根据本发明的核酸序列的载体诸如表达载体。用此类载体转化的细胞也包括在本发明的范围内。

[0168] 本发明还提供了包含本发明核酸的载体和宿主细胞,及用于生成本发明多肽的重组技术。本发明的载体包括那些能够在任何类型的细胞或生物体中复制的,包括例如质粒、噬菌体、粘粒、和微型染色体。在一些实施方案中,包含描述发明的多核苷酸的载体是适合于多核苷酸的增殖或复制的载体,或适合于表达描述发明的多肽的载体。此类载体是本领域中已知的,且是商品化的。

[0169] “载体”包括穿梭和表达载体。通常,质粒构建体还会包含复制起点(例如ColE1复制起点)和选择标志物(例如氨苄青霉素或四环素抗性),其分别用于质粒在细菌中的复制和选择。“表达载体”指含有对于在细菌或真核细胞中表达抗体(包括本发明的抗体片段)必需的控制序列或调节元件的载体。

[0170] 如本文中使用的,术语“细胞”可以是任何细胞,包括但不限于真核多细胞物种的细胞(例如与单细胞酵母细胞形成对比),诸如但不限于哺乳动物细胞或人细胞。细胞可以以单一实体存在,或者可以是较大的细胞集合的一部分。此类“较大的细胞集合”可以包括例如细胞培养物(混合的或纯的)、组织(例如内皮、表皮、粘膜或其它组织)、器官(例如肺、肝、肌肉和其它器官)、器官系统(例如循环系统、呼吸系统、胃肠系统、泌尿系统、神经系统、外皮系统或其它器官系统)、或生物体(例如鸟、哺乳动物、等)。

[0171] 本发明的多核苷酸可以完整或按部分合成,然后将其组合,并使用常规分子和细胞生物学技术(包括例如使用合适的限制性位点和限制酶将多核苷酸亚克隆入线性化载体中)插入载体中。使用与多核苷酸的每条链互补的寡核苷酸引物通过聚合酶链式反应扩增描述发明的多核苷酸。这些引物还包括限制酶切割位点以促进亚克隆入载体中。可复制载体组分一般包括但不限于下列一种或多种:信号序列、复制起点、和一种或多种标志物或选择基因。

[0172] 为了表达本发明的多肽,可以将编码多肽或功能等同物的核苷酸序列插入合适的表达载体(即含有对于插入编码序列的转录和翻译必需的元件的载体)中。可以使用本领域技术人员公知的方法来构建含有编码感兴趣多肽的序列和合适的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术、和体内遗传重组。此类技术记载于例如Sambrook,J.,等(1989)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Plainview,N.Y.及Ausubel,F.M.等(1989)Current Protocols in

Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York.N.Y..

[0173] 本发明还提供了可用于使用本发明的抗体、多肽和核酸实施诊断和预后测定法的试剂盒。本发明的试剂盒包含合适的容器,该容器包含标记或未标记形式的本发明的HIV抗体、多肽或核酸。另外,在以适合于间接结合测定法的标记形式供应抗体、多肽或核酸时,试剂盒进一步包含用于实施合适的间接测定法的试剂。例如,试剂盒可以包含一个或多个合适的容器,根据标记物的性质,所述容器包含酶底物或衍生化剂。还可以包含对照样品和/或用法说明。本发明还提供了用于通过PCR或质谱术检测生物学样品中本发明的HIV抗体或HIV抗体的核苷酸序列的存在的试剂盒。

[0174] 如本文中使用的,“标记物”指与抗体直接或间接缀合,从而生成“经标记的”抗体的可检测化合物或组合物。也可以将标记物与本文中公开的多肽和/或核酸序列缀合。标记物可以自身可检测(例如放射性同位素标记物或荧光标记物)或在酶促标记物的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。也可以修饰描述发明的抗体和多肽以包含表位标签或标记物,例如以用于纯化或诊断应用。合适的检测手段包括使用标记物,诸如但不限于放射核苷酸、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、色原体、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基复合物、自由基、颗粒、染料、等。

[0175] 根据另一个实施方案,本发明提供了诊断方法。诊断方法一般牵涉使从患者获得的生物样品(诸如例如血液、血清、唾液、尿液、痰液、细胞拭样品、或组织活组织检查)与HIV抗体接触,并测定与对照样品或预先确定的截留数值相比抗体是否优先结合样品,由此指示HIV病毒的存在。

[0176] 根据另一个实施方案,本发明提供了检测来自患者的生物学样品中本发明HIV抗体的存在的方法。检测方法一般牵涉从患者获得生物学样品,诸如例如血液、血清、唾液、尿液、痰液、细胞拭样品、或组织活组织检查,并分离HIV抗体或其片段,或编码HIV抗体的核酸,并测定生物学样品中HIV抗体的存在。还有,本发明提供了检测细胞中HIV抗体的核苷酸序列的方法。也可以使用本文中公开的引物检测HIV抗体的核苷酸序列。可以利用已知的重组技术和/或质谱仪的使用测定来自患者的生物学样品中HIV抗体的存在。

[0177] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于检测生物学样品中的HIV抗体的方法,所述HIV抗体包含包含高度保守共有序列的重链和包含高度保守共有序列的轻链,所述方法包括从哺乳动物受试者获得含有免疫球蛋白的生物学样品,从所述样品分离HIV抗体,并鉴定重链和轻链的高度保守共有序列。生物学样品可以是血液、血清、唾液、尿液、痰液、细胞拭样品、或组织活组织检查。可以通过本领域中已知的方法(包括例如PCR和质谱术)测定氨基酸序列。

[0178] 术语“评估”包括任何形式的测量,并且包括测定元件存在与否。术语“测定”、“测量”、“估测”、“评估”和“测试”可互换使用,并且包括定量和定性测定。评估可以是相对的或决定的。“评估存在”包括测定存在的某物的量,和/或测定其存在还是缺乏。如本文中使用的,术语“测定”、“测量”、和“评估”及“测试”可互换使用,并且包括定量和定性测定两者。

[0179] II.降低病毒复制的方法

[0180] 进一步提供了用于降低HIV病毒滴度、病毒复制、病毒增殖或HIV病毒蛋白量增加的方法。根据另一个方面,方法包括对受试者施用足以降低受试者中一种或多种HIV株或隔离群的HIV滴度、病毒复制或HIV蛋白量增加的HIV抗体量。

[0181] 根据另一个实施方案,本发明提供了降低病毒复制或HIV感染传播至别的宿主细胞或组织的方法,其包括使哺乳动物细胞与结合gp120上的抗原性表位的抗体或其部分接触。

[0182] III.治疗方法

[0183] 根据另一个实施方案,本发明提供了用于治疗受病毒感染(诸如例如HIV)感染的哺乳动物的方法,其包括对所述哺乳动物施用包含本文中公开的HIV抗体的药物组合物。根据一个实施方案,用于治疗受HIV感染的哺乳动物的方法包括对所述哺乳动物施用包含本发明抗体或其片段的药物组合物。本发明的组合物可以包含超过一种具有公开的特征的抗体(例如多种抗体或抗体合并物)。它还可以包括如本领域中已知的其它HIV中和性抗体,例如但不限于VRC01、PG9和b12。

[0184] 被动免疫已经证明为一种用于预防和治疗病毒性疾病的有效且安全策略。(参见例如Keller等,Clin.Microbiol.Rev.13:602-14(2000);Casadevall,Nat.Biotechnol.20:114(2002);Shibata等,Nat.Med.5:204-10(1999);及Igarashi等,Nat.Med.5:211-16(1999)。使用人单克隆抗体的被动免疫提供了用于HIV的紧急预防和治疗的立即处理策略。

[0185] 有HIV相关疾病或病症风险的受试者包括已经与感染个体接触或者已经以某些其它方式暴露于HIV的患者。预防剂的施用可以在HIV相关疾病或病症的特征性症状表现前出现,从而疾病或病症得到预防或备选地在其进展上得到延迟。

[0186] 对于体内治疗人和非人患者,对患者施用或提供包含本发明HIV抗体的药学制剂。在用于体内治疗时,以治疗有效量(即消除或降低患者的病毒负荷的量)对患者施用本发明的抗体。依照已知方法(诸如静脉内施用,例如以推注或者通过在一段时间里连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面、或吸入路径对人患者施用抗体。可以在胃肠外,(在有可能时)在靶细胞部位处,或静脉内施用抗体。在一些实施方案中,通过静脉内或皮下施用来施用抗体。可以系统性、胃肠外或局部对患者或受试者施用本发明的治疗性组合物。用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数是通过内科医生熟悉的常规规程容易地可测量的。

[0187] 对于胃肠外施用,可以结合药学可接受胃肠外媒介物将抗体配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳剂)。此类媒介物的例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、和5%人血清清蛋白。非水性媒介物包括但不限于不挥发性油和油酸乙酯。可以使用脂质体作为载体。媒介物可以含有少量添加剂诸如增强张力和化学稳定性的物质,诸如例如缓冲剂和防腐剂。可以以约1mg/ml至10mg/ml的浓度在此类媒介物中配制抗体。

[0188] 剂量和剂量方案取决于内科医生容易确定的多种因素,诸如感染的性质,例如其治疗指数、患者、和患者史。一般而言,对患者施用治疗有效量的抗体。在一些实施方案中,施用的抗体量在约0.1mg/kg至约50mg/kg患者体重的范围内。根据感染的类型和严重性,约0.1mg/kg至约50mg/kg体重(例如约0.1-15mg/kg/剂量)的抗体是对患者施用(无论例如通过一种或多种不同施用或者通过连续输注)的最初候选剂量。通过常规方法和测定法以及基于内科医生或本领域的其它技术人员已知的标准容易监测此疗法的进展。通过内科医生熟悉的常规规程容易可测量用于评估成功治疗和疾病改善的上述参数。

[0189] 可以组合其它治疗方案与本发明HIV抗体的施用。组合施用包括使用不同制剂或单一药物制剂的共施用,和任意次序的连续施用,其中优选地,存在有两种(或所有)活

性药剂同时施加其生理学活性的时间段。此类联合疗法可以导致协同治疗效果。通过内科医生熟悉的常规规程容易可测量用于评估成功治疗和疾病改善的上述参数。

[0190] 术语“治疗”或“处理”或“减轻”可互换使用，并且指治疗性处理和防范性或预防性措施两者；其中目的是预防或减缓（减轻）靶向的病理状况或病症。需要治疗的对象包括那些已经具有病症的对象以及那些易于具有病症的对象或那些要预防病症的对象。若在接受治疗量的依照本发明方法的抗体后，患者显示下列一项或多项的可观察到的和/或可测量的降低或缺乏，则受试者或哺乳动物是成功“治疗”感染的：受感染细胞的数目减少或受感染细胞的缺乏；被感染的总细胞的百分比降低；和/或以一定程度减轻一种或多种与特定感染有关的症状；降低的发病率和死亡率，和生活质量问题的改善。通过内科医生熟悉的常规规程容易可测量用于评估成功治疗和疾病改善的上述参数。

[0191] 术语“治疗有效量”指有效治疗受试者或哺乳动物中的疾病或病症的抗体或药物量。

[0192] 与一种或多种其它治疗剂“组合”施用包括以任何次序的同时（并发）和连续施用。

[0193] 如本文中使用的，“载体”包括药学可接受载体、赋形剂或稳定剂，其在采用的剂量和浓度时对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒。经常，生理学可接受载体是水性pH缓冲溶液。生理学可接受载体的例子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，包括但不限于抗坏血酸；低分子量（小于约10个残基）多肽；蛋白质，诸如但不限于血清清蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如但不限于聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸诸如但不限于甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖，和其它碳水化合物，包括但不限于葡萄糖，甘露糖，或糊精；螯合剂，诸如但不限于EDTA；糖醇，诸如但不限于甘露醇或山梨糖醇；盐形成反荷离子，诸如但不限于钠；和/或非离子型表面活性剂，诸如但不限于TWEEN.；聚乙二醇(PEG)，和PLURONICS。

[0194] 在提供范围数值的情况下，应当理解本发明内涵盖所述范围的上限和下限之间的每个居间数值（至下限单位的十分之一，除非上下文另有明确说明）和所述规定范围中的任何其它规定或居间数值。本发明内还涵盖可以独立包括在较小范围中的这些较小范围的上限和下限，其服从规定范围中的任何明确排除的限度。在规定范围包括一个或两个限度的情况下，本发明中还包括排除那些包括限度中任两个的范围。

[0195] 实施例1

[0196] 本实施例描述了下述实施例2-5中使用的材料和方法。

[0197] 遵循gp140特异性单B细胞捕捉克隆并生成HIV抗体，如先前描述的(Mouquet,H.等PLoS One 6,e24078(2011);Tiller,T.等J Immunol Methods329,112-24(2008);及Scheid,J.F.等Nature 458,636-40(2009))。通过将HC位置32、53、54、58、97、1001处的10-1074残基取代入PGT121中生成PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>“糖突变体”抗体，且反之亦然。通过ELISA、SPR和聚糖微阵列测定法测定抗gp140抗体对HIV Env蛋白的结合特性，如先前描述的(Scheid,J.F.等Science 333,1633-7(2011);Walker,L.M.等Nature 477,466-70(2011);及Mouquet,H.等PLoS One 6,e24078(2011))。使用(i)TZM.b1细胞中的基于萤光素酶的测定法，和(ii)如先前描述的那样使用主要HIV-1变体感染的基于PBMC的测定法(Li,M.等J Virol 79,10108-25(2005);Euler,Z.等Journal of virology 85,7236-45(2011);及Bunnik,E.M.等Nature medicine 16,995-7(2010))评估中和。通过分子置换分别将

PGT121 (“无配体”和“有配体”)、10-1074 和 GL Fab 片段的结构解析到 2.8 Å、2.3 Å、1.8 Å 和 2.4 Å 分辨率。

[0198] 单B细胞RT-PCR和Ig基因分析

[0199] 自患者10(pt10;在Nature 477(7365):466-470.中称作患者17)PBMC单细胞分选 gp140<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>B细胞、cDNA合成和巢式PCR扩增Ig基因是在先前的研究(PLoS One 6(9):e24078)中实施的。使用前导序列中进一步上游的正向引物(L-V $\lambda$ 3-21\*02:5' CTGGACCGTTCTCCTCCTCG 3')来PCR扩增由PGT121克隆变体表达的Ig $\lambda$ 基因以避免潜在突变的区域(31)。对所有PCR产物测序,并且分析Ig基因选择(gene usage)、CDR3分析和VH/V $\kappa$ 体细胞超突变数目(IgBLAST;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>和IMGT®;<http://www.imgt.org>)。使用具有ClustalW分析功能(缺省参数)的MacVector程序(v.12.5.0)实施多个序列比对,并且用于通过邻接法(Neighbor Joining method)(具有最佳树模式(Best tree mode)和外围生根法(outgroup rooting))来产生系统树图。或者,使用UPGMA法(具有最佳树模式)产生系统树图。

[0200] 使用IgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)和IMGT®/V-QUEST([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/share/textes/](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/))将PGT121样和10-1074样抗体的种系(GL)前体基因区段鉴定为V<sub>H</sub>4-59\*01、J<sub>H</sub>6\*03、V<sub>L</sub>3-21\*02和J<sub>L</sub>3\*02。(这些基因区段是人抗体全集中最常使用的(PLoS One 6(8):e22365; Immunogenetics 64(5):337-350)。为了建立代表性GL祖先序列,我们使用IgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)比对10-996(含有最少的体细胞超突变的抗体)的IgH和IgL序列与GL序列。通过将成熟的V<sub>H</sub>和J<sub>H</sub>基因区段替换为其GL对应物,并且使用牵涉N区核苷酸的CDRH3区的10-996序列和D<sub>H</sub>基因区段来构建GL IgH序列。自V<sub>L</sub>3-21\*02和J<sub>L</sub>3\*02基因区段序列装配GL IgL序列。

[0201] 抗体的克隆和生成

[0202] 将纯化的经消化的PCR产物克隆入人Ig $\gamma_1$ -或Ig $\lambda$ 表达载体(J Immunol Methods 329(1-2):112-124)中。然后,将含有IgH和Ig $\lambda$ 基因的载体测序,并与初始PCR产物序列比较。PGT121和10-303共享相同的Ig $\lambda$ 基因,并且在IgH基因的位置2中具有一处氨基酸差异(图4);因此,为了生成PGT121 IgG,我们使用10-303Ig $\lambda$ 基因和PGT121IgH基因,其通过定点诱变(QuikChange定点诱变试剂盒;Stratagene)将单一取代(V2M)引入10-303IgH基因中生成。为了生成有His标签的Fab,将PGT121和10-1074V<sub>H</sub>基因亚克隆入通过修饰我们的标准Ig $\gamma_1$ 载体(Science 301(5638):1374-1377)以编码后面有6x-His标签的IgG1 C<sub>H</sub>1域生成的6xHis-IgC $\gamma_1$ 表达载体中。将编码PGT121<sub>GM</sub>(S32Y、K53D、S54R、N58T、H97R、T1001Y)和10-1074<sub>GM</sub>(Y32S、D53K、R54S、T58N、R97H、Y1001T)突变体抗体的IgH DNA片段以合成小基因(IDT)获得,并亚克隆入Ig $\gamma_1$ 表达载体中。

[0203] 下文列出10-1074<sub>GM</sub>的重链序列,其中突变是加下划线的。10-1074<sub>GM</sub>的轻链序列与10-1074的轻链序列相同。

[0204] QVQLQESGPGLVKPSETLSVTCSVGD~~SMNN~~SYWTWIRQSPGKGLEWIGYISKS  
ESANYNPSLNSRVVISRDTSKNQLSLKLNSVTPADTAVYYCATARHGQRIYGVV

[0205] SFGEFFTYYSMDVGKGTTVTVSS

[0206] 通过使用聚乙烯亚胺(PEI)沉淀法(PLoS One 6(9):e24078)将IgH和IgL表达质粒

瞬时转染入指数生长的HEK 293T细胞(ATCC,CRL-11268)中来生成抗体和Fab片段。使用蛋白G Sepharose珠(GE Healthcare)依照制造商的用法说明亲和纯化IgG抗体。使用HisPur™钴树脂(Cobalt Resin)(Thermo scientific)亲和纯化Fab片段,如下文描述的。

[0207] HIV-1Env蛋白

[0208] 使用QuikChange定点诱变试剂盒(Stratagene)依照制造商的用法说明将丙氨酸突变在位置301至303(Asn-Asn-Thr)、324至325(Gly-Asp)、和332(Asn)(HXBc2氨基酸编号方式)处引入pYU-2gp120载体(J.Sodroski,Harvard Medical School的赠品)中。使用相同的规程通过在位于Asn<sub>262</sub><sub>gp120</sub>和Asn<sub>406</sub><sub>gp120</sub>之间的每个PNGS处将单丙氨酸突变引入pYU-2gp120<sup>N332A</sup>载体来生成“双重聚糖”突变体。通过DNA测序确认定点突变。

[0209] 使用编码YU-2gp140(Journal of virology 74(12):5716-5725)、YU-2gp120、HXB2c gp120<sup>core</sup>(Nature 393(6686):648-659)、HXB2c 2CCcore(PLoS Pathog 5(5):e1000445)蛋白、和YU-2gp120突变体蛋白的表达载体来转染HEK 293T细胞。为了生成仅高甘露糖YU-2gp120蛋白(gp120<sub>kif</sub>)，在转染时添加25μM几夫碱(Enzo Life Sciences)。将培养物上清液收获，并使用基于离心的过滤装置(Vivacell 100,Sartorius Stedim Biotech GmbH)浓缩，该装置容许样品对10mM咪唑、50mM磷酸钠、300mM氯化钠(pH 7.4)的缓冲液更换。通过使用HisPur™钴树脂(Thermo scientific)依照制造商的用法说明进行亲和层析纯化蛋白质。

[0210] 对于脱糖基化反应，将PBS中的50μg HEK 293T细胞生成的YU-2gp120用在其不含变性剂的相应反应缓冲液中的200U PNG酶F(New England Biolabs)或10,000U Endo H<sub>f</sub>(New England Biolabs)于37°C消化过夜。在施用离心滤器(Amicon®Ultra,Millipore)对PBS进行缓冲液更换后，通过使用4-12%NuPAGE凝胶(Invitrogen)的SDS-PAGE，接着通过银染色(Pierce银染色试剂盒,Thermo Scientific)检查经糖苷酶处理的gp120s(200ng)。

[0211] ELISA

[0212] 用PBS中的100ng/孔纯化的gp120包被高结合96孔ELISA板(Costar)过夜。在清洗后，将板用2%BSA、1μM EDTA、0.05%Tween-PBS(封闭缓冲液)封闭2小时，然后与26.7nM浓度的IgG(或对于使用YU-2gp120双重聚糖突变体的ELISA为427.2nM)和PBS中的7个连续1:4稀释物一起温育2小时。在清洗后，通过与缀合有HRP的山羊抗人IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)(在封闭缓冲液中为0.8μg/ml)一起温育1小鼠，并通过添加HRP生色底物(ABTS溶液,Invitrogen)显现板(PLoS One 6(9):e24078)。使用先前描述的肽-ELISA法测试抗体对选择的gp120<sup>V3</sup>重叠肽的结合。

[0213] 对于竞争ELISA,经gp120包被的板用封闭缓冲液封闭2小时，然后与PBS中抗体竞争物的1:2连续稀释溶液(5.2至667nM的IgG浓度范围)中的生物素化的抗体(对于PGT121浓度为26.6nM,对于10-1074为0.21nM,对于10-996为0.43nM以及对于10-1369为1.67nM)一起温育2小时。使用缀合有HRP的链霉亲合素(Jackson ImmunoResearch)(以封闭缓冲液中的0.8μg/ml)显现板,如上文描述的。至少一式两份实施所有实验。

[0214] 聚糖微阵列分析

[0215] 通过在两个水平上(2和5fmol/点)一式两份将与脂质连接的聚糖探针(拟糖脂(neoglycolipid))机器打印到硝酸纤维素包被的玻璃载玻片上(Methods Mol Biol 808:117-136)来产生微阵列。用含有15种源自高甘露糖和复合型的N-聚糖的拟糖脂的微阵列实

施结合测定法。图7A中显示了探针的序列。简言之,以50 $\mu$ g/ml测试抗体,并且用生物素化的抗人IgG(Vector),接着用经AlexaFluor 647标记的链霉亲合素(Molecular Probes)检测结合。

[0216] 表面等离振子共振

[0217] 使用Biacore T100(Biacore, Inc)实施实验(Nature 467 (7315) :591-595)。简言之,将YU-2gp140和gp120蛋白在CM5芯片(Biacore, Inc.)上以300RU的偶联密度用伯胺偶联。分别以1 $\mu$ M和10 $\mu$ M,以35 $\mu$ l/min的流速以3分钟结合和5分钟解离相在流动池上注射抗gp120 IgG和种系前体(GL)。通过以50 $\mu$ l/min的流速30秒注射10mM甘氨酸-HCl pH 2.5再生传感器表面。在不进行体积反射指数(bulk reflective index, RI)校正的情况下使用1:1结合模型(Biacore T100评估软件)在扣除背景后自动力学分析计算解离( $k_d$ ( $s^{-1}$ ))、结合( $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )和结合常数( $K_D$ (M)或 $K_A$ (M $^{-1}$ ))。使用1:1结合模型计算的二价IgG的结合常数在教科书中称为“表观”亲和力以强调 $K_D$ 值包括潜在的亲合力效应。

[0218] 中和测定法

[0219] 使用TZM.b1细胞中基于萤光素酶的测定法评估病毒中和(J Virol 79 (16) :10108-10125)。测试的HIV-1假病毒主要含有tier-2和tier-3病毒(Journal of virology 84 (3) :1439-1452)(表4和5)。在用25 $\mu$ M几夫碱(Enzo Life Sciences)处理的野生型细胞中(图8C)或在HEK 293S GnTI $^{+/-}$ 细胞(图8D)中生成仅高甘露糖的假病毒。使用非线性回归分析来计算观察到半最大抑制的浓度( $IC_{50}$ 值)。还使用主要HIV-1变体(n=95)感染用先前表征的基于PBMC的测定法评估中和活性,所述主要HIV-1变体从具有1985和1989年之间(“历史血清转化者”,n=14)或2003和2006年之间(“当代血清转化者”,n=21)(Journal of virology 85 (14) :7236-7245; Nat Med 16 (9) :995-997)的已知血清转化数据的进化枝B感染供体分离。使用GraphPad Prism软件(v5.0b)以最佳拟合曲线下的面积计算每种抗体的中和活性,所述最佳拟合曲线拟合相对于范围为0.001至50 $\mu$ g/ml的 $IC_{50}$ 值标准化的病毒比例。通过相对于最高值(用10-1074获得)标准化所有AUC值得到曲线下的相对面积(RAUC)值。

[0220] 统计学分析

[0221] 用GraphPad Prism软件(v5.0b)实施统计学分析。使用Spearman相关检验分析针对gp120和gp140的抗体在针对选择的一组9种病毒株的TZM-b1测定法中的中和效力对表观结合亲和力。使用Mann Whitney检验来比较:(i)属于PGT121或10-1074组的抗体对gp120/gp140的亲和力,和(ii)针对从历史和当代血清转化者分离的病毒的中和活性。

[0222] 晶化和结构确定

[0223] 表达有6x-His标签的PGT121、10-1074和10-996GL Fab以进行晶化。通过序贯的Ni $^{2+}$ -NTA亲和力(Qiagen)和Superdex20010/300(GE Healthcare)大小排阻层析从经瞬时转染的HEK 293-6E细胞的上清液纯化Fab。对于无配体PGT121 Fab的晶体,通过蛋白A亲和层析(Pierce)从经瞬时转染的HEK 293-6E细胞的上清液分离PGT121 IgG,并且通过木瓜蛋白酶切割IgG以及使用Superdex20010/300(GE Healthcare)大小排阻层析的进一步纯化获得Fab片段。

[0224] 将纯化的Fab浓缩至PBS缓冲液中的8-20mg/ml(“无配体”PGT121,8mg/ml;10-1074和GL,20mg/ml)。从蛋白质样品(终浓度:15mg/ml)制备“有配体”PGT121 Fab晶体,所述蛋白质样品与3倍摩尔过量的NA2聚糖混合,并且于20℃温育2小时。使用1:1蛋白质与储器比率

在400nL液滴中使用Mosquito®晶化自动仪器(TTP labs)于20℃筛选晶化条件。在24%PEG 4,000,0.1M Tris-HCl pH 8.5,10mM CuCl<sub>2</sub>中获得“无配体”PGT121 Fab的晶体(P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>;a=56.8,b=74.7,c=114.9 Å),并且“有配体”PGT121 Fab的晶体(P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>;a=67.8,b=67.8,c=94.1 Å)在17%PEG 10,000,0.1M Bis-Tris pH5.5,0.1M CH<sub>3</sub>-COcHNH<sub>4</sub>中生长。在25%PEG 3,350,0.1M Bis-Tris pH 5.5,0.2M NaCl中获得10-1074Fab的晶体(P2<sub>1</sub>;a=61.4,b=40.3,c=84.5 Å;β=95.39°),并且GL Fab的晶体(P2<sub>1</sub>;a=54.9,b=344.7,c=55.2 Å;β=91.95°)在20%PEG 3,350,0.24M丙二酸钠pH 7.0,10mM MnCl<sub>2</sub>中生长。通过在含有20%甘油(“无配体”和“有配体”PGT121 Fab)或20%乙二醇(10-1074Fab和GL Fab)的母液中浸透冷冻保护晶体,随后在液氮中快速冷冻。

[0225] 在6M像素检测仪(Dectris)上在斯坦福同步辐射光源(Stanford Synchrotron Radiation Lightsource,SSRL)以光束线12-2(波长=1.029 Å)收集衍射数据。使用XDS将数据索引化(index),合并并换算(scale)。使用从“无配体”PGT121 Fab晶体获得的数据,我们使用Phenix在省略CDRH3和CDRL3环中的残基后使用两种搜索模型PGT128 Fab(PDB代码3PV3)的C<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>域和2F5(PDB代码3IDJ)的V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>域来寻找每个不对称单位的一个Fab的分子替换办法(对于重链和轻链分别为链H和L)。随后,我们使用“无配体”PGT121结构作为搜索模型来寻找“有配体”PGT121 Fab(每个不对称单位的一个Fab)、10-1074Fab(每个不对称单位的一个Fab)和GL(每个不对称单位的四个Fab)的分子替换办法。

[0226] 使用Phenix并且使用Coot将模型手动拟合到电子密度图中来实施迭代细化(包括GL的非结晶学对称限制)。将原子模型细化至3.0 Å分辨率(对于PGT121 Fab)(R<sub>工作</sub>=21.6%;R<sub>游离</sub>=26.4%),1.9 Å分辨率(对于10-1074Fab)(R<sub>工作</sub>=18.7%;R<sub>游离</sub>=22.3%),2.4 Å分辨率(对于4个GL Fab分子)(R<sub>工作</sub>=19.4%;R<sub>游离</sub>=23.7%),和2.4 Å分辨率(对于“有配体”PGT121 Fab)(R<sub>工作</sub>=20.1%;R<sub>游离</sub>=24.9%)。PGT121 Fab的原子模型在拉马钱德兰(Ramachandran)图的有利(favored)、容许(allowed)和不许(disallowed)区中分别含有95.2%、4.9%和0.0%残基(10-1074Fab:98.8%,0.9%,0.2%;GL Fab:96.0%,3.8%,0.23%;“有配体”PGT121 Fab:96.7%,3.1%,0.2%)。使用PyMOL进行分子显现,并且产生Fab结构的图。使用1.4 Å探针用Areaimol(CCP4 Suite)实施掩埋表面积计算。

[0227] 使用PyMOL中的Super脚本比对Fab结构。使用PDBeFold实施成对Ca比对。

[0228] 实施例2:PGT121克隆型的优势和多样性

[0229] 使用YU-2gp140三聚物作为“诱饵”从进化枝A感染非洲裔供体分离gp140特异性IgG记忆B细胞。鉴定出与23种独特的克隆家族对应的87种匹配的免疫球蛋白重(IgH)和轻(IgL)链基因。IgH抗gp140全集以占所有扩充B细胞克隆的约28%的1个克隆家族占优势。此B细胞家族对应于与PGT121-123(Nature 477 (7365):466-470)相同的克隆,并且含有38个成员,其中29个在核苷酸水平上是独特的变体(表3)。基于其IgH核苷酸序列,PGT121家族分成两组:含有PGT121-123和9种紧密相关变体的PGT121样组,和含有20个成员的第二组10-1074样。虽然我们的传统引物(J Immunol Methods 329 (1-2):112-124;Science 301 (5638):1374-1377)由于编码框架区1的区域中的核苷酸缺失而没有扩增出由PGT121B细胞克隆表达的IgL基因,使用设计为扩增重度体细胞突变基因的新Igλ特异性引物获得38种Igλ基因中的24种(表3)。与IgH基因中的高水平超突变(平均为18.2%的Vλ基因)一致,扩增的Igλ基因是高度突变的(平均为18.2%的Vλ基因),并且携带框架区1(FWR1)中的核苷酸缺失

(12至21个核苷酸)和框架区3(FWR3)中的9核苷酸插入(图3B和表3)。

[0230] 图3(a)和3(b)中显示了3种PGT抗体(PGT-121,-122,和-123),7种PGT121和10-1074克隆变体(10-259,10-303,10-410,10-847,10-996,10-1074,10-1121,10-1130,10-1146,10-1341,10-1369,和10-1074GM),可能地种系(GL),和共有序列的序列比对。下文表1中列出了IMGT和KABT系统两者下相应重链可变区、轻链可变区、重链CDR、和轻链CDR的序列。下文表2中列出了KABT系统下序列的分配的序列标识号:

表1

IgH <sup>+</sup> 列		FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
IMGT								
10-1369	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GAFIADHY	WVHLRPLGKG PEWIGY	VHDSDGI	NYNPSLKNRVLHSIDKSTNQVSLKL AVTAGSALAYYC	ATTKHGRRIYGVVAFGE WFTYFMDV	WGKGTTVTVSS
10-259	VS	QVHLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GTLYRDNY	WVWIRQPLGKQ PEWIGY	VHDSDGT	NYNPSLKSRSVHLISLDSNNLVSLRLT AVTAADSATYVC	ATTKHGRRIYGVVAFNE WFTYFMDV	WGKGTTVTVSS
10-303	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GASISDSY	WVSHTRSPGKG LEWIGY	VHKSGDT	NYNPSLKSRSVNLISLDSKQNQVSLSLV AATAADSQKYIC	ARTLHGRRIYGVVAFNE WFTYFMDV	WGNGTQVTVSS
10-410	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GASINDAY	WVWIRQSPGKR PEWIGY	VHHSGDT	NYNPSLKLRRVTFSLDPAKNEYSLKL ALTAADSAVFC	ARALHGRRIYGVVALGE LFTYFMDV	WGKGTTVTVSS
10-1130	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GASINDAY	WVWIRQSPGKR PEWIGY	VHHSGDT	NYNPSLKLRRVTFSLDPAKNEYSLKL DLTAADSAVFC	ARALHGRRIYGVVALGE LFTYFMDV	WGKGTTVTVSS
10-1121	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GASINDAY	WVWIRQSPGKR PEWIGY	VHHSGDT	NYNPSLKLRRVTFSLDPAKNEYSLKL DLTAADSAVFC	ARALHGRRIYGVVALGE LFTYFMDV	WGKGTTVTVSS
10-1146	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	NGSVSGRF	WVWIRQSPRG LEWIGY	FSDTDRS	EYSPSLRSRLLTSLDASNQNSLKL SYTAADSATYVC	ARTQOQKRIYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
10-996	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	NGSVSGRF	WVWIRQSPRG LEWIGY	FSDETEK	NYNPSLRSRLLTSLDASKNQNSLKL SYTAADSATYVC	ARTQOQKRIYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
GL		QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GGSISSYY	WVWIRQPPGKG LEWIGY	IYYSGST	NYNPSLKSRSVITISVDTSKNQNSLKL SYTAADPAVFC	ARTQOQKRIYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
10-1341	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GDSMNNYY	WVWIRQSPKG LEWIGY	ISDRESA	TYNPSLNSRVVITSRDTSTNQNSLKL SYTPADTAVYC	ATARRGQRIVYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
10-847	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GDSMNNYY	WVWIRQSPKG LEWIGY	ISDRESA	TYNPSLNSRVVITSRDTSKNQNSLKL SYTPADTAVYC	ATARRGQRIVYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
10-1074	VS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GDSMNNYY	WVWIRQSPKG LEWIGY	ISDRESA	TYNPSLNSRVVITSRDTSKNQNSLKL SYTPADTAVYC	ATARRGQRIVYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
10-1074	GM	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GDSMNNYY	WVWIRQSPKG LEWIGY	ISKSESA	NYNPSLNSRVVITSRDTSKNQNSLKL SYTPADTAVYC	ATARRGQRIVYGVVSFGE FFYYIYMDA	WGKGTTAVTVSS
KABT								
10-1369	VSGAFIA	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DHYNW	WIRLPLGKPE WIG	YVHDSGDINY	RVHLSLDKSTNQVSLKLMATAGDSA LYYCAT	TKHGRRIYGVVAFGENF TYFYMDV	WGKGTTAVTVSS
10-259	VSGTLVR	QVHLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DNWNW	WMMQPLGKPE WIG	YVHDSGDNTNY	RVHLSLDKSNNLVSLRUTAATPAADSA TYYCAT	TKHGRRIYGVVAFNEWF TYFYMDV	WGKGTTAVTVSS
10-303	VSGASIS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DSWMS	WIRRSPGKGLE WIG	YVHKSGDTNY	RVNLSLDTSKQNQVSLVAAATPAAADSG SPSLKS WIG	TIHGRRIYGVVAFNEWF TYFYMDV	WGNGTQVTVSS
10-410	VSGASVN	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DAYWS	WIRQSPGKPE WVG	YVHHSGDTNY	RVTFSLDPAKNEYSLKLVALTAADSA NPSLKR WVG	ALHGRRIYGVVALGEFL TYFYMDV	WGKGTTAVTVSS
10-1130	VSGASIN	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DAYWS	WIRQSPGKPE WVG	YVHHSGDTNY	RVTFSLDPAKNEYSLKLVIDTAADSA NPSLKR WVG	ALHGRRIYGVVALGEFL TYFYMDV	WGKGTTAVTVSS
10-1121	VSGASIN	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	DAYWS	WIRQSPGKPE WVG	YVHHSGDTNY	RVTFSLDPAKNEYSLKLVIDTAADSA NPSLKR WVG	ALHGRRIYGVVALGEFL TYFYMDV	WGKGTTAVTVSS
10-1146	VSGNSVVS	QVQLQESGPGLVKPPLTSLTCN	GRFWWS	YFQSPGKPE WIG	YFSDTURSEY SEBSIRS	RLTLSIDASRNQNSLKLKVTAADSA YYIYMDA	AQQGRRIYGVVSGEFFF YYIYMDA	WGKGTTAVTVSS

[0232]

<b>10-996</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSLTC	GRFW	WIROSPGKIE WIG	YFSDETEKSNY NPRLRS	RLTISVDASKNQLSIKLNSVTAADSA	TQGKRIYGVVSFGEFF HYYMDA	WGKGTPAVTVSS
<b>GL</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSLTC	SYYWS	WIROPPGKIE WIG	YIYSGSTINY NPRLRS	RVTISVDTSKNQFSIKLNSVTAAADTA	TQGKRIYGVVSFGDYY YYYYMDV	WGKGTPAVTVSS
<b>10-1341</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSVTC	NYWT	WIROSPGKIE WIG	YISDRESATY NPRLRS	RVVISRDTSTNQLSIKLNSVTADTA	ARIGQRTIYGVVSFGEFF YYYSMDV	WGKGTPAVTVSS
<b>10-847</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSVTC	NYWT	WIROSPGKIE WIG	YISDRESATY NPRLRS	RVVISRDTSKNQFSIKLNSVTADTA	ARIGQRTIYGVVSFGEFF YYYSMDV	WGKGTPAVTVSS
<b>10-1074</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSVTC	NYWT	WIROSPGKIE WIG	YISDRESATY NPRLRS	RVVISRDTSKNQFSIKLNSVTADTA	ARRGCRIVGVVSFGEFF YYYSMDV	WGKGTPAVTVSS
<b>10-1074</b>	QVQLQESSPGLVKPSETLSVTC	NYWT	WIROSPGKIE WIG	YISKSESANY NPRLRS	RVVISRDTSKNQFSIKLNSVTADTA	ARRGCRIVGVVSFGEFF YYYSMDV	WGKGTPAVTVSS
<b>GM</b>	VSGDSMN			YYCAT			

<b>IgL序号</b>	<b>IMGT</b>	<b>FWR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FWR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FWR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FWR4</b>
<b>GL</b>	SVITQPSVSPGQTARIITCG	NIGSKS	VHVVQQKPGQA PVLLVY	DJS	DRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRV EADYYC	QWMDSSDHWW	FGGGTKLTLVIL	
<b>10-1369</b>	SSMSVSPGETAKITCGEK	SIGSRA	VQWYQKPGQP PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPDIEFGTTATLTI	HIDARREPTNWV	FDRGATLTLVIL	
<b>10-259</b>	SSMSVSPGETAKISCGKE	SIGSRA	VQWYQKSGQP PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSATPDGFAGTTATLTI	HIDARGGTNWV	FDRGATLTLVIL	
<b>10-303</b>	SD1SVAPPGETARIISCGEK	SIGSRA	VQWYQHAGO PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPDSPFGTTATLTI	H1WDSRVPKTWV	FGGGTTLTVIL	
<b>10-1121</b>	SFVSVAPPQPARTICGEE	SLGSRS	V1WYQQRPGQA PSLLIY	NNH	DRPSGIPERFSGSPGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRPTNWV	FGEGTTLTVIL	
<b>10-410</b>	SFVSVAPPQPARTICGEE	SIGSRS	V1WYQQRPGQA PSLLIY	NNN	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRPTNWV	FGEGTTLTVIL	
<b>10-1130</b>	SFVSVAPPQPARTICGEE	SIGSRS	V1WYQQRPGQA PSLLIY	NNN	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRPTNWV	FGEGTTLTVIL	
<b>10-847</b>	SYVRPLSVALGETASISCGRQ	ALGSRA	VQWYQHAGO PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRSGFSWS	FGGGATRLTLVIL	
<b>10-1074</b>	SYVRPLSVALGETPARISCGRQ	ALGSRA	VQWYQHAGO PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRSGFSWS	FGGAATRLTVIL	
<b>10-1341</b>	SYVRPLSVALGETPARISCGRQ	ALGSRA	VQWYQHAGO PSLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRSGFSWS	FGGAATRLTVIL	
<b>10-996</b>	SSLPLSVAPPAGATAKIAAGEK	SFASRA	VQWYQKPGQA PVLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRSGFSWS	FGGGTQLTVIL	
<b>10-1146</b>	SSLPLSLAPGATAKIPCGEK	SIGSRA	VQWYQKPGQA PVLLIY	NNQ	DRPSGIPERFSGSPGSTMFGTTATLTI	H1WDSRSGFSWS	FGGGTQLTVIL	
<b>KABAT</b>		<b>FWR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FWR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FWR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FWR4</b>
<b>GL</b>	SVITQPSVSPGQTARIITC	GNNNIGSKSVH	WYQQKPGQQAPV LVVY	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGD EADYYC	QWMDSSDHWW	FGGGTKLTLVIL	
<b>10-1369</b>	SSMSVSPGETAKITC	GEKSIGSRAVQ	WYQKPGQPBS LILY	NNQDRPS	GVPERFSASDIEFGTTATLTINVE AGDEAAYC	HIDARREPTNWV	FDRGATLTLVIL	
<b>10-259</b>	SSMSVSPGETAKISC	GEKSIGSRAVQ	WYQOKSGQPPS	NNQDRPS	GVPERFSATPDGFAGTTATLTINVE	HIDARGGTNWV	FDRGATLTLVIL	

[0233]

		LITY	ADDEADYYC
10-303	SDISVAPGETARISC	GEKSLGSRAVQ LITY	NNQDRPS GIPERFSGSPDSPFGTTATLTITSVE AGDEADYYC
10-1121	SFVSVAPGQTARITC	GEESLGSRSVI LITY	NNHDRPS GIPERFSGSPGSTFGTTATLTITSVE AGDEADYYC
10-410	SFVSVAPGQTARITC	GEESLGSRSVI LITY	NNNDRPS GIPERFSGSPGSTFGTTATLTITSVE AGDEADYYC
10-1130	SFVSVAPGQTARITC	GEESLGSRSVI LITY	NNNDRPS GIPERFSGSPGSTFGTTATLTITSVE AGDEADYYC
10-847	SYVRPLSVALGETASISC	GRQALGSRAVQ LITY	NNQDRPS GIPERFSGSPDINFGTRATLTISGVE AGDEADYYC
10-1074	SYVRPLSVALGETARISC	GRQALGSRAVQ LITY	NNQDRPS GIPERFSGSPDINFGTRATLTISGVE AGDEADYYC
10-1341	SYVRPLSVALGETARISC	GRQALGSRAVQ LITY	NNQDRPS GIPERFSGSPDINFGTRATLTISGVE AGDEADYYC
10-996	SSLPLSVAPGATAKIAIC	GEKSFASRAVQ LITY	NNQDRPA GVSERFSGTPDVFGSTATLTISRVE AGDEADYYC
10-1146	SSLPLSVAPGATAKIC	GEKSRGSRAVQ LITY	NNQDRPA GVSERYSGNPDAIGVATLTISRVE AGDEAEEYC

[0234] 表2

名称	SEQ ID NOs			
	可变区		CDR 1-3	
	重链(H)	轻链(L)	H	L
共有序列	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NOs: 33-35	SEQ ID NOs: 36-38
10-259	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NOs: 39-41	SEQ ID NOs: 42-44
10-303	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NOs: 45-47	SEQ ID NOs: 48-50
10-410	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NOs: 51-53	SEQ ID NOs: 54-56
10-847	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NOs: 57-59	SEQ ID NOs: 60-62
10-996	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NOs: 63-65	SEQ ID NOs: 66-68
10-1074	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NOs: 69-71	SEQ ID NOs: 72-74
10-1121	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NOs: 75-77	SEQ ID NOs: 78-80
10-1130	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NOs: 81-83	SEQ ID NOs: 84-86
10-1146	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NOs: 87-89	SEQ ID NOs: 90-92
10-1341	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NOs: 93-95	SEQ ID NOs: 96-98
10-1369	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NOs: 99-101	SEQ ID NOs: 102-104
PGT-121	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NOs: 105-107	SEQ ID NOs: 108-110
PGT-122	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NOs: 111-113	SEQ ID NOs: 114-116
PGT-123	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NOs: 117-119	SEQ ID NOs: 120-122
GL	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NOs: 123-125	SEQ ID NOs: 126-128
10-1074GM	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NOs: 131-133	SEQ ID NOs: 134-136

[0236] 11种新的独特变体是表达的(表3),并且通过ELISA和表面等离振子共振(SPR)证明对YU-2gp120和gp140的结合。除非另有记录,在哺乳动物细胞中表达用于这些和其它实验的gp120和gp140蛋白,所述哺乳动物细胞能将复合型或高甘露糖N-聚糖附着到PNGS。与gp120的反应性水平在属于PGT121和10-1074组的抗体间有所不同,后者展现出更高的表现亲和力(图3A),这主要是由于10-1074相关抗体自gp120/gp140解离更慢(图4B)。

[0237] 实施例3:PGT121和10-1074表位

[0238] V3环茎附近的Asn<sub>332</sub><sub>gp120</sub>报告为对于PGT121的结合和病毒中和是至关重要的(Nature 477 (7365) :466-470),如此我们检查V3在PGT121样和10-1074样抗体的抗原识别中的作用。使用缺乏V1-V3环(gp120<sup>核心</sup>)或保留V3的一部分(2CC-核心)的HXB2 gp120“核心”蛋白,并且使用在V3茎中携带双重丙氨酸取代的YU-2gp120突变体蛋白质(gp120<sup>GD324-5AA</sup>)实施ELISA。测试的抗体显示在与完整YU-2gp120相比时降低的针对缺乏V3环的变体和gp120<sup>GD324-5AA</sup>的反应性,其中10-1074组抗体的结合是最受影响的(图5A和B)。这些结果提示了这两个抗体组的识别牵涉V3环附近的蛋白质决定簇。抗体无一结合跨越V3的重叠肽,这提示了靶定表位是不连续的和/或需要通过分离的肽没有实现的特定构象(图5C)。

[0239] Asn<sub>332</sub><sub>gp120</sub>(以早期编号方式为Asn<sub>337</sub><sub>gp120</sub>(J Proteome Res 7 (4) :1660-1674))是定义为序列Asn-X-Ser/Thr的潜在N-糖基化位点(PNGS)的N端残基。为了测定Asn<sub>332</sub><sub>gp120</sub>和/或其N-连接的聚糖是否是新的PGT121-和10-1074-组抗体的gp120反应性需要的,我们通过ELISA测试其对YU-2gp120<sup>N332A</sup>的结合。N332A取代降低PGT121和所有新抗体变体的结合,而其针对缺乏邻近糖基化位点的突变体gp120(gp120<sup>NNT301-3AAA</sup>突变体)的反应性是未变的。为了测定在Asn<sub>332</sub><sub>gp120</sub> PNGS外的PNGS是否影响新抗体的识别,我们构建一系列的11种双重聚糖突变体,其中YU-2gp120中的N332A突变是与位于Asn<sub>262</sub><sub>gp120</sub>和Asn<sub>406</sub><sub>gp120</sub>之间的PNGS突变组合的。所有PGT121样和10-1074样抗体以与对gp120<sup>N332A</sup>的亲和力相当的亲和力结合到每种双重聚糖突变体。

[0240] 为了比较PGT121-和10-1074-样抗体的总体聚糖识别,我们检查其对用PNG酶F处

理的YU-2gp120的结合,所述PNG酶F切割复合型和高甘露糖N-聚糖两者。由于gp120不能被完全酶促脱糖基化(除非它被变性),PNG酶F处理导致天然折叠的gp120的部分脱糖基化(图6)。不过,两组抗体的反应性的差异在于PNG酶F对gp120的部分脱糖基化降低所有PGT121样抗体但是无—10-1074样抗体的结合反应性(图6C)。用经Endo H(其切割高的甘露糖,而非复合型N-聚糖)处理的YU-2gp120进行的类似实验影响10-1074样抗体超过PGT121样抗体的结合(图6D)。

[0241] N-聚糖微阵列揭示了7种测试的PGT121样抗体中的6种显示对以半乳糖或 $\alpha$ 2-6-连接的唾液酸为末端的复合型单或双触角N-聚糖的可检测结合,但是对高甘露糖型聚糖的结合检测不到,这确证并扩充没有PGT121-123对高甘露糖N-聚糖的结合和Man<sub>4</sub>和Man<sub>9</sub>枝状体(dendron)不竞争gp120结合的先前报告(图7)。比较而言,10-1074样抗体对无蛋白质聚糖没有可检测的结合(图7)。虽然PGT121样抗体结合无蛋白质复合型而非高甘露糖N-聚糖,但是PGT121样抗体仍然结合用几夫碱(gp120<sub>kif</sub>) (一种甘露糖苷酶抑制剂,其导致高甘露糖聚糖专门附着至PNGS)处理的细胞中生成的YU-2gp120(图8B)。大多数PGT121样抗体展现出小的,但可再现的结合gp120<sub>kif</sub>的降低。相反,10-1074样抗体仍然完全结合gp120<sub>kif</sub>(图8B)。这些结果与如下的假设一致:高甘露糖及复合型N-聚糖可以参与PGT121样抗体的表位。

[0242] 通过竞争ELISA用每组的两种代表性成员(对于PGT121样组为PGT121和10-1369;对于10-1074样组为10-1074和10-996)实施表位定位实验。所有4种抗体显示交叉竞争,但是PGT121抑制10-996和10-1074对gp120的结合比10-996和10-1074抑制PGT121对gp120的结合更适度。为了进一步定位靶定表位,我们使用抗gp120抗体,其识别V3环的冠(图5),CD4bs,共受体结合位点(CD4诱导的;CD4i),一群高甘露糖N-聚糖(2G12)(Journal of virology 76(14):7293-7305; Proc Natl Acad Sci USA 102(38):13372-13377),或V3环和位置301和332处的N-连接的聚糖(PGT128)。抗V3冠抗体抑制PGT121和10-1369的结合,但是不干扰10-996和10-1074的结合。PGT128和(在更小的程度上)2G12,而非CD4bs和CD4i抗体降低所有4种抗体对gp120的结合。

[0243] 总之,这些数据提示了PGT121克隆成员识别牵涉V3环和Asn332<sub>gp120</sub>相关聚糖附近的蛋白质决定簇的位点。然而,克隆分成两个家族,即PGT121样和10-1074样组,其差异在于它们对gp120的亲和力及聚糖在表位形成中的作用。

[0244] 实施例4:广泛且有力的HIV中和

[0245] 为了评估新PGT121变体的中和活性,我们使用10种病毒株(包括R1166.c1,其缺乏gp120位置332处的PNGS)来测量其抑制TZM-b1细胞的HIV感染的能力。所有PGT121变体(包括10-1074样抗体)中和9种假病毒,并且无一中和R1166.c1对照(图1A和表4)。中和活性与对HIV刺突的亲和力相关联,其中10-1074组比PGT121组显示略大的效力(图1B和图4C)。PGT121/10-1074抗体克隆型的一种代表性种系型式(GL)不能结合gp120/gp140或中和该组中的任何病毒,这暗示体细胞突变是结合和中和需要的。将GL轻链与突变10-1074-或10-996-组重链配对不能挽救结合或中和,这提示了这两条突变链促成抗体互补位的正确装配。

[0246] 实施接着的测定法以比较PGT121和两种10-1074样抗体(10-996和10-1074)针对扩充的一组119种难以中和的假病毒(分类为tier-2和tier-3)的中和活性(表4和5)。10-996和10-1074显示与PGT121相似的中和效力和宽度(图1C,图9,和表5和6)。如预期的,大多

数携带gp120位置332和/或334(跨越Asn332-X-Ser334/Thr334 PNGS)处的氨基酸变化的病毒对中和有抗性(83.8%对PGT121有抗性,100%对10-1074和10-996有抗性)。此PNGS处的突变占大多数对中和有抗性的病毒(对于10-996为68.5%,对于10-1074为72.5%及对于PGT121为60.8%) (表7)。对PGT121和10-1074的IgG和Fab形式观察到相当的中和活性,这提示了二价性对于其活性不是至关重要的(图1D)。

[0247] 为了评估HIV包膜上的复合型N-聚糖在PGT121和10-1074中和中的潜在作用,我们以两种不同方式生成仅高甘露糖病毒体:通过在用几夫碱处理的细胞中装配假病毒(这生成 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  N-连接的聚糖),或者通过在HEK 293S  $\text{GnTI}^{-/-}$ 细胞中装配(这生成 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  N-连接的聚糖)。我们发现了PGT121中和3种经几夫碱衍生的PGT121敏感性/10-1074抗性株中的2种,这与其在野生型细胞中生成的对应物等同(图8C)。 $\text{GnTI}^{-/-}$ 细胞中生成的两种PGT121敏感性/10-1074敏感性病毒株与其在野生型细胞中生成的对应物同等的对PGT121和10-1074敏感。与复合型N-聚糖部分保护CD4结合位点免于抗体结合的先前报告一致, $\text{GnTI}^{-/-}$ 细胞中生成的病毒对CD4结合位点抗体(NIH45-46<sup>G54W</sup>和3BNC60)更敏感(图8D)。

#### [0248] 实施例5:新型传播的HIV-1

[0249] 接着,我们检查PGT121和10-1074针对传播建立者病毒的活性,其通过使用在1985和1989年之间(历史血清转化者,n=14)或2003和2006年之间(当代血清转化者,n=25)血清转化的个体分组分离的95种进化枝B病毒(51,52)在基于外周血单核细胞(PBMC)的测定法中评估中和进行。我们比较PGT121和10-1074与抗CD4bs bNAb和其它bNAb,包括VRC01, PG9/PG16,b12,2G12,4E10和2F5。中和活性的聚簇分析显示了分成两个组;PGT121/10-1074组合有最有活性的HIV中和物,包括抗CD4bs和PG9抗体(表8)。显著地,10-1074对此进化枝B病毒组显示优越的中和效力,在测试的所有bNAb中在在0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 展现出最大的宽度(95种进化枝B病毒的67%) (表8)。虽然10-1074比PGT121显示更高的对当代进化枝B病毒的效力(约20倍差异),但是这两种抗体针对历史病毒比针对当代病毒更有效(图1E和图10)。

#### [0250] 实施例6:PGT121、10-1074和GL的晶体结构

[0251] 为了调查PGT121样和1074样抗体之间的差异的结构决定簇,我们分别以3.0 Å, 1.9 Å和2.4 Å分辨率解析PGT121、10-1074和一种代表性种系前体(GL)的Fab片段的晶体结构(表9)。三种Fab间重链和轻链可变域( $V_{\text{H}}$ 和 $V_{\text{L}}$ )的叠覆显示了主链结构的保守,其中差异限于相对于GL,亲和力成熟的Fab的CDRH3和CDRL3环的小置换(表10)。

[0252] 由抗体共享的罕见特征是其长(25个残基)CDRH3环,其形成双链反向平行 $\beta$ -片层,其延伸 $V_{\text{H}}$ 域F和G链。在每个Fab中,延伸的CDRH3环的尖端主要含有非极性残基。对PGT145(一种碳水化合物敏感性抗体,其表位牵涉gp120 V1V2环)的CDRH3观察到类似的结构特征。然而,PGT145的CDRH3延伸的双链 $\beta$ -片层主要含有带负电荷的残基,包括在尖端处的两个硫酸盐化酪氨酸。比对PGT121和PGT145的 $V_{\text{H}}-V_{\text{L}}$ (表10)显示了CDRH3<sub>PGT145</sub>延伸过CDRH3<sub>PGT121</sub>,并且其尖端和 $V_{\text{H}}$ 域是对齐的,而PGT121,10-1074和GL的CDRH3向 $V_{\text{L}}$ 倾斜。CDRH3<sub>PGT121</sub>/CDRH3<sub>10-1074</sub>/CDRH3<sub>GL</sub>向 $V_{\text{L}}$ 的倾斜开放CDRH2和CDRH3之间的裂缝,即一种没有由相关抗体共享的特征。

[0253] PGT121和10-1074相对于GL及彼此而言是高度趋异的(在132个残基中,PGT121<sub>VH</sub>与10-1074<sub>VH</sub>和GL<sub>VH</sub>分别相差36和45个残基,而10-1074<sub>VH</sub>和GL<sub>VH</sub>差异29个)。大多数PGT121/10-

1074差异位于CDR<sub>VH</sub>环和CDRL3中。令人感兴趣的是,CDRH3中的6处取代(残基100d,100f,100h,100j,100l,100n)交替,使得每第二个残基被取代,这引起源自CDRH3向V<sub>L</sub>倾斜的CDRH2和CDRH3之间的裂缝的表面重修(resurfacing)。此区域可能促成PGT121和10-1074的不同细微特异性。重链框架区3(FWR3<sub>HC</sub>)中的5处其它溶剂暴露的取代(残基64,78,80-82;链D和E)是潜在的抗原接触位点,这是考虑到HIV抗体中的框架区能接触gp120。可以促成细微特异性差异的其它差异包括不存在于10-1074或GL中的Asp56<sub>HC</sub>(10-1074和GL中的Ser56<sub>HC</sub>)附近的PGT121上的负片(patch)和GL的类似表面上找不到的CDRL1和CDRL3表面上的正片。

[0254] 对PGT121和10-1074共同的体细胞突变可以参与其表位的共享特征。PGT121和10-1074的重链仅共享三处共同突变(在36处PGT121-GL和29处10-1074-GL差异中)。比较而言,PGT121和10-1074共享18处共同的轻链突变(在37处PGT121-GL和3610-1074-GL差异中),包括轻链FWR3中的插入(其引入连接链D和E的环的凸出),和PGT121和10-1074两者中CDRL2<sub>CL</sub>中Asp50<sub>LC</sub>-Asp51<sub>LC</sub>至Asn50<sub>LC</sub>-Asn51<sub>LC</sub>的取代(导致更少的带负电荷的表面)。引入LC<sub>PGT121</sub>和LC<sub>10-1074</sub>中的大量共同取代(约50%的LC取代)指向CDRL1、CDRL2和FWR2<sub>LC</sub>为由PGT121和10-1074共享的表位的潜在接触区。

[0255] 接着,与PGT128的结构进行比较,所述PGT128识别Asn332<sub>gp120</sub>-和Asn301<sub>gp120</sub>-连接的聚糖和V3,并且以与不能生成复合型N-聚糖修饰的蛋白质的细胞中表达的外部域/微型V3环gp120的复合物解析。与PGT121和10-1074的CDRH3环不同,PGT128<sub>CDRH3</sub>没有向PGT128<sub>VL</sub>倾斜,并且CDRH3<sub>PGT128</sub>不包括双链β-片层。另外,CDRH3<sub>PGT128</sub>(18个残基)短于PGT121和10-1074的CDRH3(24个残基),而CDRH2<sub>PGT128</sub>含有PGT121或10-1074中找不到的6残基插入。由于这些差异,CDRH2是PGT128中的最显著特征,而CDRH3是PGT121和10-1074中最显著的。CDRH2<sub>PGT128</sub>和CDRL3<sub>PGT128</sub>共同识别附着于Asn332<sub>gp120</sub>的Man<sub>8/9</sub>,并且CDRH3<sub>PGT128</sub>接触V3环碱基。此gp120识别模型对于PGT121和10-1074是不可能的,因为其CDRH2和CDRH3环的结构特征与PGT128的CDRH2和CDRH3环的结构特征显著不同,这与PGT128而非PGT121和10-1074(图7)识别无蛋白质的高甘露糖聚糖的能力一致。

[0256] 实施例7:PGT121-聚糖复合物的晶体结构

[0257] 使用在包含NA2(一种复合型无唾液酰(asialyl)双触角聚糖)的条件下获得的晶体(图7)解析与复合型唾液酸化的双触角聚糖结合的PGT121的2.4 Å分辨率结构(表9)。令人惊讶地,在我们的晶体结构中与PGT121结合的聚糖不是NA2,而是来自晶格中邻近PGT121 Fab的复合型N-聚糖;具体的是附着于Asn105<sub>HC</sub>的N-聚糖。聚糖身份是明显的,因为存在有与Asn105<sub>HC</sub>的糖苷连接和Manα1-3Man触角上的末端唾液酸的电子密度(Manα1-6Man触角的半乳糖和唾液酸模块是未解析的)。结合的聚糖的组成对应于α2-6-唾液酸化A2(2-6)聚糖中在微阵列实验(图7)中被PGT121结合的部分以及对应于附着于HEK293T细胞中表达的蛋白质上的PNGS的复合型N-聚糖上预期的唾液酰连接。虽然此结构(“有配体”PGT121)的V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>域以无显著差异重叠到没有结合的N-聚糖的PGT121结构(“无配体”PGT121)的V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>域上(表10),但是肘弯曲角度(elbow bend angle)(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>和C<sub>H</sub>1-C<sub>L</sub>假二分体(pseudo-dyads)之间的角度)在结构间存在不同。此差异可能反映柔性(flexibility),其容许Fab根据晶格力采用可变的肘弯曲角度。

[0258] 鉴于我们观察到一种晶体结构(“有配体”PGT121结构)中而非另一种结构(“无配体”PGT121结构)中的复合型N-聚糖的结合,我们评估PGT121对不附着于gp120的复合型N-

聚糖的亲和力在晶体中PGT121的浓度范围(约10mM)中。若我们假设结合分离的聚糖的 $K_D$ 在1-10mM的范围内,其与PG9结合 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ 得到的1.6mM  $K_D$ 相当,则PGT121结合分离的聚糖的 $K_D$ 仅代表对PGT121对gp120的亲和力(其在nM范围内)的较小贡献(图4A)。

[0259] “有配体”PGT121结构中的聚糖专门与V<sub>H</sub>域相互作用,并且与所有3个CDR中的残基产生广泛的接触(**PGT121<sub>HC</sub>上的掩埋表面积= 600 Å<sup>2</sup>**)。接触包括与锚定与分支点甘露糖连接的N-乙酰氨基葡萄糖模块和1-3-触角上的末端唾液酸之间的聚糖的9个氨基酸的10个直接的和18个水介导的氢键(表11)。通过此唾液酸产生与PGT121的几个接触,在水介导的与Asp31<sub>HC</sub>的氢键外还包括与PGT121残基Asp31<sub>HC</sub>和His97<sub>HC</sub>的3个直接氢键。唾液酸还促成水介导的聚糖内氢键网络。与唾液酸的直接接触可以解释在我们的聚糖微阵列分析中PGT121对唾液酸化的A2(2-6)聚糖比对无唾液酸化的NA2聚糖的结合更强(图7)。通过1-3-触角的N-乙酰氨基葡萄糖和半乳糖模块建立的水介导的广泛蛋白质接触可以解释观察到的无唾液酸化单和双触角聚糖对PGT121的结合(图7)。

[0260] 将直接或可能氨基酸侧链接触贡献给聚糖的6个残基(Ser32<sub>HC-CDRH1</sub>, Lys53<sub>HC-CDRH2</sub>, Ser54<sub>HC-CDRH2</sub>, Asn58<sub>HC-CDRH2</sub>, His97<sub>HC-CDRH3</sub>, Thr1001<sub>HC-CDRH3</sub>)与10-1074上的那些残基(Tyr32<sub>HC-CDRH1</sub>, Asp53<sub>HC-CDRH2</sub>, Arg54<sub>HC-CDRH2</sub>, Thr58<sub>HC-CDRH2</sub>, Arg97<sub>HC-CDRH3</sub>, Tyr1001<sub>HC-CDRH3</sub>)不同,并且在PGT121样而非10-1074样抗体间高度保守。10-1074残基缺乏相应的官能团以产生观察到的聚糖接触或具有会引起空间碰撞的大体积侧链。这些残基中的4个与GL上的那些残基(Tyr32<sub>HC-CDRH1</sub>, Tyr53<sub>HC-CDRH2</sub>, Gln97<sub>HC-CDRH3</sub>, Tyr1001<sub>HC-CDRH3</sub>)也存在不同,这提示了我们的聚糖微阵列中10-1074样抗体和GL对无蛋白质复合型聚糖的结合缺乏源自缺少的氢键和/或空间碰撞(例如His97<sub>PGT121</sub>对Arg97<sub>10-1074</sub>; Thr1001<sub>PGT121</sub>对Tyr1001<sub>10-1074</sub>)。由于PGT121和10-1074之间的大多数序列差异在CDRH环中聚簇,特别是聚簇到CDRH2和CDRH3之间的裂缝表面,在那里我们观察到结合的复合型N-聚糖, gp120上复合型聚糖的差异识别可以造成观察到的其细微特异性的一些或所有差异。

[0261] 实施例8:聚糖接触抗体残基的取代影响中和

[0262] 为了评估自“有配体”PGT121结构鉴定的复合型N-聚糖接触残基的贡献,我们生成设计为交换PGT121和10-1074之间的复合型聚糖接触残基的两种突变体抗体:具有PGT121残基(IgH中的6处取代Y32S, D53K, R54S, T58N, R97H, Y1001T)的10-1074IgG和具有相应取代的PGT121 IgG。“糖突变体”抗体(10-1074<sub>GM</sub>和PGT121<sub>GM</sub>)展现出对YU-2gp120/gp140的近野生型表现亲和力,如通过SPR测量的(图2A),这证明了取代没有破坏对由PGT121和10-1074两者中和的病毒株衍生得到包膜突触的结合(图1A)。PGT121复合型N-聚糖接触残基可以在10-1074背景内容纳而不破坏对由这两种野生型抗体结合的gp120/gp140的结合的实情暗示抗原结合的总体相似性,尽管还有细微的特异性差异。

[0263] 与野生型PGT121不同,PGT121<sub>GM</sub>在微阵列实验中没有显示聚糖结合,这确认取代位置处的10-1074残基与无蛋白质聚糖结合不相容(图2B),并且支持如下的提示,即“有配体”PGT121结构中接触聚糖的残基参与识别微阵列中的复合型聚糖。10-1074<sub>GM</sub>也没有显示对无蛋白质聚糖的结合(图2B),这指示了牵涉创建无蛋白质复合型N-聚糖的结合位点中取代的那些残基外的残基。

[0264] 接着,使用基于TZM-b1的测定法来比较野生型和“糖突变体”抗体的中和。我们测试了40种病毒株,包括对PGT121或10-1074有差异抗性的毒株和对这两种野生型抗体敏感

的毒株(图2C和表12)。与PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>对纯化的YU-2包膜蛋白的结合一致,这两种突变体中和YU-2病毒;然而,64%的PGT121敏感性毒株对PGT121<sub>GM</sub>有抗性(图2C,和表12),这提示了“有配体”PGT121结构中鉴定的聚糖接触残基与PGT121的中和活性相关。相反,10-1074<sub>GM</sub>展现出针对10-1074敏感性毒株比野生型10-1074更高的平均效力(图2C和表12),包括针对4种10-1074敏感性毒株(WIT04160.33,ZM214M.PL15,Ce1172\_H1,和3817.v2.c59)的大于3倍的效力增加。一般地,对10-1074的PGT121取代没有对PGT121-敏感性/10-1074-抗性毒株赋予对10-1074<sub>GM</sub>的敏感性,然而这些毒株中的两种(CNE19和62357\_14\_D3\_4589)变得对10-1074<sub>GM</sub>敏感( $IC_{50}$ 分别=0.19 $\mu$ g/ml和40.8 $\mu$ g/ml)。令人感兴趣地,这些是仅PGT121敏感性/10-1074抗性毒株,其包含完整的Asn332<sub>gp120</sub>连接的PNGS。其它PGT121敏感性/10-1074抗性毒株缺乏Asn332<sub>gp120</sub>-连接的聚糖,并且对PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>有抗性,这暗示其对野生型PGT121的敏感性牵涉附近的N-聚糖和/或表位的蛋白质部分的补偿。虽然仅对针对1种毒株(CNE19)的10-1074<sub>GM</sub>观察到显著的功能获得,但是与对针对10-1074敏感性毒株的10-1074<sub>GM</sub>观察到的普遍改进(图2C)一起的此结果与如下的解读一致,即结晶学鉴定的聚糖接触残基在一些背景中可以将PGT121样识别特性转移至10-1074和/或影响其在其它抗体中的效力。另外,PGT121<sub>GM</sub>针对PGT121-敏感性株的中和活性丧失证明PGT121的中和活性牵涉鉴定为“有配体”PGT121结构中接触复合型N-聚糖的残基。

#### [0265] 结果

[0266] PGT121是一种聚糖依赖性bNAb,其最初在仅产生两种克隆相关成员的功能筛选中的进化枝A感染供体的血清中鉴定。使用gp140三聚体作为“诱饵”以进行单分子分选,从而分离29种新的克隆变体。PGT121克隆家族包括不同组的紧密相关抗体;PGT121和10-1074组。结果提示了这两组的表位牵涉在Asn332<sub>gp120</sub>处的PNGS和V3环基部。PGT121样和10-1074样抗体组在氨基酸序列、gp120/gp140结合亲和力、和中和活性上不同,其中10-1074样抗体在中和方面完全依赖于Asn332<sub>gp120</sub>处的完整PNGS,而PGT121样抗体能够中和一些缺乏Asn332<sub>gp120</sub> PNGS的病毒株。

[0267] 两个抗体组间的显著差异在于PGT121样抗体结合碳水化合物阵列中的复合型N-聚糖,而10-1074样抗体没有显示对测试的任何无蛋白质N-聚糖的可检测结合(图7)。抗HIV抗体的无蛋白质聚糖结合不总是可检测的;例如,虽然PG9识别gp120结合的高甘露糖聚糖,但是在微阵列中没有检出对无蛋白质聚糖的结合。如此,虽然聚糖微阵列中的阳性结果暗示特定聚糖掺入抗体表位,但是阴性结果没有排除聚糖识别。例如,虽然在聚糖微阵列实验中检测不到,但是高甘露糖聚糖可以参与PGT121表位,这与仅高甘露糖形式的gp120蛋白和病毒体的结合和中和一致(图8)。

[0268] PGT121、10-1074和其GL祖先之间的差异的分子基础部分由其晶体结构揭示。PGT121和10-1074之间共享大多数轻链体细胞突变,而重链中的突变不同的发现提示了轻链接触共享gp120表位的部分,并且重链识别独特的特征。所有3种抗体展现出具有非极性尖端的延伸CDRH3,所述非极性尖端可以容许接近隐藏表位。两种成熟Fab的抗原结合位点中的差异主要定位于CDRH2和延伸的CDRH3之间的裂缝。令人感兴趣地,在PGT121和10-1074的代表性种系祖先中也发现了CDRH2和CDRH3之间推定的抗原结合裂缝。

[0269] 从晶体结构获得关于PGT121样抗体的聚糖识别的结构信息,其中附着于V<sub>H</sub>域残基的复合型唾液酸化N-聚糖与邻近的PGT121 Fab的组合位点相互作用。“有配体”PGT121结构

的几个特征提示了它对于了解PGT121样抗体识别gp120上的复合型N-聚糖是相关的。第一,结构中的聚糖对应于微阵列中PGT121结合的 $\alpha$ 2-6唾液酸化聚糖A2(2-6) (图7)。第二,聚糖使用通过结构分析提示为牵涉表位识别的CDRH3和CDRH2之间的裂缝与PGT121相互作用,这潜在解释CDRH3向PGT121和10-1074结构中的V<sub>L</sub>的罕见倾斜。第三,鉴定为与聚糖相互作用的大多数V<sub>H</sub>残基在PGT121和10-1074之间所有不同,这合理化聚糖微阵列中的不同结合概况(profile),并且潜在解释了蛋白质结合实验中揭示的不同细微特异性。第四,PGT121和10-1074之间的交换结晶学鉴定的聚糖接触残基部分转移其特性:PGT121<sub>GM</sub>与10-1074一样不结合无蛋白质聚糖,但是PGT121<sub>GM</sub>和10-1074<sub>GM</sub>二者保留对纯化的YU-2gp120/gp140的近野生型结合。虽然PGT121<sub>GM</sub>保留中和被野生型PGT121和10-1074中和的一些病毒株的能力,但是它不能中和PGT121敏感性/10-1074抗性的毒株,这证明了聚糖结合基序对于PGT121针对10-1074抗性毒株的中和活性是必需的。对于相互交换,10-1074<sub>GM</sub>的中和效力相对于10-1074是升高或不受影响的,并且在一种情况下,10-1074<sub>GM</sub>有力中和PGT121敏感性/10-1074抗性毒株,这与晶体学鉴定的聚糖基序的转移以及PGT121和10-1074样抗体的表位相关的假设一致。在来自可得到PGT121中和数据的毒株的gp120序列的分析中,除了与对PGT121样和10-1074样抗体敏感的病毒的Asn332gp120处的PNGS的关联外,不同种类的病毒株(PGT121敏感性/10-1074敏感性,PGT121敏感性/10-1074抗性,PGT121抗性/10-1074敏感性)没有出现清楚的PNGS选择方式,只是10-1074抗性菌株一般缺乏Asn332gp120关联的PNGS。

[0270] 实施例9:抗HIV-1中和性mAb的体内被动转移

[0271] 对猕猴施用5种分离的有力且广泛作用性抗HIV中和性单克隆抗体,并在24小时后用两种不同SHIV中的任一种在直肠内攻击它们。通过组合自60只经攻击动物获得的结果,阻止50%暴露猴中的病毒获得的血浆中保护性中和滴度是约1:100。

[0272] 动物实验

[0273] 本研究中使用的猕猴在MHC I类Mamu-A\*01等位基因方面呈阴性。

[0274] R5-热带SHIVDH12-V3AD8的构建

[0275] 使用Platinum PF DNA聚合酶(Invitrogen),采用PCR诱变(用与SHIVAD8E0(PNAS109, 19769-19774(2012))gp120 V3编码区的5' 和3' 半部对应的引物(正向引物:AGA GCATTTATAACACAGGAGACATAATGGAGATATAAGACAAGCACATTGCAA CATTAGTAAAGTAAAATGGC和反向引物:TCCTGGTCCTATATGTATACTTTCCCTGTATTGTTGGGTCTTGTACAATTAAATTCTACAGTTCATTC)将这些V3序列引入pSHIVDH12-CL7分子克隆的遗传背景(J.of Virology 78, 5513-5519(2004))中。在凝胶纯化后,用T4多核苷酸激酶(GibcoBRL)处理PCR产物,并将其平端连接以创建pSHIVDH12-V3AD8,其用于转化感受态细胞。

[0276] 病毒

[0277] 如下制备病毒储液,即首先使用Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)用SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8分子克隆转染293T细胞。48小时后收集培养上清液,并且于-80℃贮存等分试样,直至使用。通过旋转温育(spinoculation)(J.of Virology 74, 10074-10080(2000))1小时用经转染细胞上清液感染经伴刀豆球蛋白A刺激的猕猴PBMC(500 $\mu$ l中的2x10<sup>6</sup>个细胞),将其与相同数目/体积的活化PBMC混合,并且在每天更换培养基的情况下将培养物维持至少12天。在峰值RT生成的时间左右合并上清液培养基的样品以制

备单独的病毒储液。

[0278] 抗体

[0279] 分离并生成11种单克隆抗体(VRC01, NIH45-46, 45-46G54W, 45-46m2, 3BNC117, 12A12, 1NC9, 和8ANC195, 10-1074, PGT121, 和PGT126)。在此研究中使用DEN3(一种登革病毒NS1特异性人IgG1单克隆抗体)(PNAS109, 18921-18925 (2012))或对照人IgG(NIH Nonhuman Primate Reagent Resource <http://www.nhpreagents.org>)作为阴性对照抗体。在病毒攻击前24小时在静脉内施用选择用于暴露前被动转移的单克隆抗体。

[0280] 质粒病毒RNA水平的定量。

[0281] 通过实时逆转录-PCR(ABI Prism 7900HT序列检测系统; Applied Biosystems)测定血浆中的病毒RNA水平。

[0282] 血浆中的抗体浓度。

[0283] 使用重组HIV-1JRFL gp120(Progenics Pharmaceuticals)或HIVIIIB(Advanced Biotechnology inc)通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定猴血浆中施用的单克隆抗体的浓度(J.of Virology 75, 8340-8347 (2001))。简言之,用HIV-1gp120(2 $\mu$ g/ml)包被微量滴定板,并将其于4℃温育过夜。将板用PBS/0.05% Tween-20清洗,并用1% (vol/vol) BSA封闭。在封闭后,将抗体或血浆样品的连续稀释物添加至板,并于室温温育1小时。用与碱性磷酸酶偶联的山羊抗人IgG F(ab)2片段(Pierce)检测结合,并用SIGMAFAST OPD(Sigma-Aldrich)显现。抗体施用后第5天或第7天开始,通过基于血浆浓度的单指数衰减公式计算中和性单克隆抗体的衰减半衰期(J.of Virology 84, 1302-1313 (2010))。

[0284] 中和测定法。

[0285] 通过两类中和测定法评估自猕猴收集的血浆样品中存在的每种单抗的体外效力和中和活性;1)用假型(pseudotyped)攻击病毒的TZM-b1进入测定法(AIDS Res Hum Retroviruses 26, 89-98 (2010))或2)用有复制能力的病毒进行的14天PBMC复制测定法(J.of virology 76, 2123-2130 (2002))。对于TZM-b1测定法,将连续稀释的单抗或血浆样品与假型病毒一起温育,所述假型病毒表达源自SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8的env基因,并且通过用表达相应包膜蛋白的pNLenv1和pCMV载体共转染293T细胞来制备(J.of Virology 84, 4769-4781 (2010))。50%中和抑制剂量(IC50)滴度以在扣除细胞对照RLU后与病毒对照孔中的水平相比引起相对发光单位(RLU)的50%降低的稀释度计算(J.of Virology 84, 1439-1452 (2010))。使用来自分组研究的血浆样品(其展现出针对亚型B HIV-1隔离群的宽中和活性范围)通过TZM-b1细胞测定法测定SHIVDH12;V3AD8分子克隆的中和表型(层水平(tier levels))(J.of General Virology 91, 2794-2803 (2010))。

[0286] 动物保护性滴度的测定和统计学分析。

[0287] 使用Reed和Muench的方法(Am J Hyg 27, 493-497 (1938))实施计算针对每种R5 SHIV的血浆中的中和滴度,该中和滴度导致阻止50或80%经病毒攻击的动物的病毒获得。自计算省略1只显著离群值动物(DEW7)。使用所有60只被动免疫猴,使用Probit(概率单位)回归对赋予体内消除性免疫(sterilizing immunity)需要的血浆中的层之间的关系建模(Cambridge University Press, Cambridge, England, 第3版, 2007),来自此模型的p-值基于似然比率检验(Likelihood ratio Test)。从Probit模型估值测定体内保护的不同水平(33%, 50%, 80%, 90%, 和95%)需要的血浆滴度,并且使用自举法(bootstrapping)构建

90%置信区间。

[0288] 结果：

[0289] SHIVDH12-V3AD8与SHIVAD8E0一样拥有2层抗HIV-1中和敏感性特性(表13)。静脉内或直肠内接种有SHIVDH12-V3AD8的猕猴在感染后(PI)2至3周时展现出范围为105至107个病毒RNA拷贝/ml血浆的峰值病毒血。在大多数SHIVDH12-V3AD8感染动物中,血浆病毒负荷在感染后第8周至第20周之间下降至背景水平。

[0290] 最初在TZM-b1测定系统中测定SHIVAD8E0对11种最近报告的广泛作用性抗HIV-1单抗的中和敏感性(图11A和B)。这些抗体中的8种,即VRC01, NIH45-46(23), 45-46G54W, 45-46m2, 3BNC117, 12A12, 1NC9, 和8ANC195靶向gp120 CD4 bs (Science 333, 1633-1637 (2011)), 并且3种,即10-1074, PGT121, 和PGT126(Nature 477, 466-470 (2011))依赖于HIV-1gp120 N332聚糖的存在。在针对SHIVAD8E0测试时,所有3种聚糖依赖性单抗比CD4 bs单抗展现出更高的效力(图11A)。靶向gp120 N332聚糖的3种单抗的IC50值范围为0.09至0.15 $\mu$ g/ml。CD4 bs单抗展现出宽得多的IC50中和活性范围(0.14至6.34 $\mu$ g/ml), 其中3BNC117是最有力的。用SHIVDH12-V3AD8也观察到中和性单抗效力的类似层级(聚糖依赖性>CD4 bs依赖性), 但是与对SHIVAD8E0观察的IC50值相比, 中和活性在宽得多(>100倍)的范围间分布(图11B)。SHIVDH12-V3AD8比SHIVAD8E0对聚糖靶向性单抗略敏感并且对CD4 bs中和性单抗更敏感。

[0291] 基于图11中显示的结果,选择5种中和性单抗以进行暴露前被动转移研究:VRC01, 因为它是要表征的新分离的广泛作用性Nab的第一种CD4bs Nab; CD4 bs单抗45-46m2和3BNC117, 它们两者都展现出针对SHIVAD8E0和SHIVDH12-V3AD8的强中和活性; 和gp120 N332聚糖依赖性单抗PGT121和10-1074。

[0292] 用于被动转移实验的方案是静脉内施用降低量的中和性单抗,并且在24小时后直肠内攻击动物。加上如下的认识,目的是阻断病毒获得:对个体猕猴重复施用人源化抗HIV单抗可以降低其效力和/或可能诱导过敏性应答,选择足以在单次接种后建立体内感染的大小的SHIV攻击剂量。在这点上,我们先前已经在猕猴中进行SHIVAD8的直肠内滴定,并且报告了1x10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>(其通过在猕猴PBMC中的终点稀释测定)的接种等同于施用约3个动物感染剂量50(AID50) (J. of virology 86, 8516-8526 (2012))。实际上,3个AID50的单一直肠内接种已经导致10只猕猴中10只被SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8感染的成功建立。

[0293] 作为第一次被动转移实验的对照,对动物静脉内施用抗登革病毒NS1 IgG1单抗,在24小时后用SHIVAD8E0攻击所述动物。这两只猴(ML1和MAA)快速被感染,在感染后2周时产生血浆病毒血的峰值水平。VRC01是测试针对病毒获得提供保护的第一种抗HIV-1中和性单抗,并且以50mg/kg的剂量对两只猕猴施用。2只接种猕猴中的1只(DEGF)完全受到保护免于SHIVAD8E0攻击,在45周观察期里没有血浆病毒血或细胞关联病毒DNA的证据。50mg/kg VRC01的另一只接受体(DEH3)被感染,但是峰值血浆病毒血被延迟到感染后第5周。施用更低量(20mg/kg)的VRC01的两只另外的猕猴没有受到保护免于SHIVAD8E0攻击。表13中汇总了这些结果。

[0294] 接着检查PGT121针对SHIVAD8E0攻击的保护性特性。PGT121是TZM-b1测定法中测量的最有力的聚糖靶向性中和性单抗之一(图11)。基于用VRC01获得的结果,选择以20mg/kg的体内PGT121单抗滴定开始。两只经攻击的猴(KNX和MK4)抵抗SHIVAD8E0攻击。在施用更

低量(即5mg/kg, 1mg/kg, 或0.2mg/kg)PGT121时, 2只中的1只, 2只中的2只, 和2只动物中的0只分别受到保护(表13)。

[0295] 类似地评估VRC01和PGT121单抗阻断SHIVDH12-V3AD8获得的能力(表13)。用VRC01获得的结果与用SHIVAD8E0攻击观察到的结果相当:30mg/kg的2只接受体中的1只受到保护免于建立SHIVDH12-V3AD8感染。PGT121单抗在阻止SHIVDH12-V3AD8获得上比VRC01有力得相当多:0.2mg/kg PGT121的2只接受体中的2只抵抗感染。PGT121还表现出在阻止SHIVDH12-V3AD8对SHIVAD8E0体内感染上略为有效(表13)。此结果与体外测定法中PGT121中和两种SHIV的IC50值的8倍差异一致(图11)。

[0296] 表13中汇总了将10-1074, 3BNC117, 或45-46m2中和性单抗被动转移至猕猴, 接着用SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8攻击的结果。10-1074单抗有力阻断这两种SHIV的体内获得。选择CD4bs 3BNC117和45-46m2单抗以被动转移至猕猴, 这基于其在图11中显示的体外中和实验中针对这两种SHIV的IC50值。3BNC117在5mg/kg时在2只猴中的2只中成功阻断SHIVAD8E0感染, 但是在给予1mg/kg剂量的另2只动物中没有阻断(表13)。这与在对用SHIVDH12-V3AD8攻击的猕猴施用相同量的3BNC117时观察到的结果相似:2只中的1只在5mg/kg时被感染;2只中的1只在1mg/kg时被感染。

[0297] 通过HIV-1gp120 ELISA分析在多个时间时自被动转移的猕猴收集的血浆样品以测定中和性单抗浓度。一般地, 攻击时(抗体施用后24小时)每种单抗的血浆浓度与施用的抗体剂量相关联(表13)。

[0298] 图12中显示了血浆单抗浓度与体内保护的关系。在评估的5种中和性单抗中, PGT121针对这两种病毒明显是最有效的, 其中SHIVDH12-V3AD8展现出对此单抗的略大的敏感性(2只猴中的2只在0.2 $\mu$ g/ml的血浆浓度时受到保护)。比较而言, 几乎400 $\mu$ g/ml VRC01的血浆浓度是保护2只动物中的1只免于相同SHIVDH12-V3AD8攻击病毒需要的(表13)。在此研究中对猕猴施用的最有力的CD4 bs单抗3BNC117在阻止任一种SHIV的获得上比VRC01更有效约6至10倍(图12, 表13)。

[0299] PGT121, 10-1074, 3BNC117, 和VRC01单抗的计算半衰期是相当类似的:分别为3.5天, 3.5天, 3.3天, 和3.1天。比较而言, 45-46m2的半衰期极短, 并且不能测得。基于施用20mg/kg人源化中和性单抗(即约250 $\mu$ g/ml[表13])后24小时几只猕猴中的血浆单抗浓度, 两只接受20mg/kg 45-46m2的猴具有仅15.0和17.6 $\mu$ g/ml的血浆单抗浓度, 在24小时中相对于其它中和性单抗衰减超过95%。

[0300] 在用SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8攻击猕猴时对单抗施用后24小时收集的血浆样品测量中和滴度。如表13中显示的, 在抗病毒血浆中和滴度与针对SHIV感染提供的保护之间观察到良好的关联。施用两种聚糖依赖性单抗(PGT121和10-1074)在病毒攻击时明显导致最高的抗HIV-1中和活性滴度。45-46m2单抗的接受体中测量的滴度在检测限处或由于其在体内极短的半衰期而检测不到。

[0301] 使用由Reed和Muench描述的方法(Am J Hyg 27, 493-497 (1938))来计算阻止50%经攻击的猴中的病毒获得需要的、在血浆中测量的中和滴度。分别推出用SHIVAD8E0攻击的28只猴, 或用SHIVDH12-V3AD8攻击的32只猴的这些保护性滴度(表15和16)。保护50%经SHIVAD8E0或SHIVDH12-V3AD8攻击的动物需要的血浆中和滴度分别计算为1:115和1:96。因为在以下情况后获得这些类似的滴度:1) 通过相同的途径和接种物大小的SHIV攻击和2) 施

用相同的中和性单抗集,所以将来自所有60只动物的中和数据组合并进行Probit回归以检查血浆中和滴度和体内保护之间的关系。作为进一步的检查,当在所有60只猕猴上在Probit回归模型中包括SHIV病毒的一个项时,没有两种SHIV病毒之间差异的证据( $p=0.16$ )。当应用于60只猕猴的全组时,Probit回归估计1:104的血浆中和滴度会阻止50%动物中的病毒获得。数据的Probit分析还估计1:57或1:329的50%血浆中和滴度分别保护33%或80%的暴露动物。

[0302] 实施例10:对慢性感染HIV体内模型施用中和性单抗

[0303] 方法汇总:最初,在针对SHIVAD8E0的TZM-b1细胞系统中测定广泛作用性3BNC11724和10-107423中和性单抗针对SHIVAD8E0的中和活性。通过监测血浆病毒负荷和细胞关联病毒核酸评估用R5-热带SHIVAD8E0攻击的慢性感染动物中其阻断病毒获得或控制血浆病毒血的能力;通过流式细胞术测量CD4+T细胞子集的水平。用SGA分析循环病毒变体并测定血浆中的抗体水平。通过针对仅易感10-1074或3BNC117的HIV-1假病毒制备物的中和活性测定NAab的血浆水平。

[0304] 结果:

[0305] 评估两组慢性感染猕猴。第一组由两只临床无症状动物(DBZ3和DC99A)组成,所述动物已经被感染159周,并且具有循环CD4+T细胞的持续的类似且显著的下降(表17)。用于治疗进行中的SHIV感染的方案是以10mg/kg的剂量共施用10-1074和3BNC117。在单抗施用是,猕猴DBZ3和DC99A中的血浆病毒负荷分别是 $1.08 \times 10^4$ 和 $7.6 \times 10^3$ 个RNA拷贝/ml。这两只猴响应组合抗HIV-1单抗治疗,血浆病毒血在7至10天内立即且快速降低至检测不到的水平。在单次施用两种单抗后猕猴DBZ3和DC99A的血浆中可测量的SHIVAD8E0的抑制分别持续27和41天。在每种情况中,血浆病毒血反弹至处理前水平。

[0306] 用两种中和性抗体处理第二组的三只动物(DBX3、DCF1、和DCM8)(它们每只也被SHIVAD8E0感染超过3年,并且临床症状为间歇性腹泻或食欲减退)(表17)。在单抗施用时,猕猴DCM8中循环CD4+T细胞的水平仅是43个细胞/ $\mu$ l并且在动物DCF1(105个细胞/ $\mu$ l)和DBXE(158个细胞/ $\mu$ l)中略高。血浆病毒负荷在动物DBXE和DCF1中超过105个RNA拷贝/ml,并且在猴DCM8中显著更低( $1.59 \times 10^3$ 个RNA拷贝/ml)。对猴DBXE施用两种单抗导致病毒血从第0天 $2.0 \times 10^5$ 个RNA拷贝至第20天在血浆中检测不到的水平的双相降低。这在几天内继之以DBXE中高水平循环病毒的复苏。具有更适度的血浆病毒负荷和非常低的循环CD4+T细胞数目的猕猴DCM8在启动单抗处理后在第6天和第20天之间经历病毒血快速下降到检测不到的水平。最后,动物DCF1(先前报告为已经生成了广泛反应性抗HIV-1NAb)响应组合单抗疗法到第6天展现出血浆病毒血的瞬时且比较适度的27倍降低,之后病毒负荷回到高处理前水平。

[0307] 还在抗体施用之前和之后测定PBMC关联的病毒RNA和DNA水平(表18)。对于每只动物,单抗处理导致细胞关联病毒RNA的降低水平,这与血浆病毒负荷测量充分关联起来。由于抗体处理没有对细胞关联病毒DNA水平观察到一致的样式。对慢性SHIVAD8E0感染猴施用中和性单抗对循环CD4+T细胞水平(特别在具有非常高病毒负荷的动物中)也具有有益的影响。猕猴DBXE和DCF1中的CD4+T细胞数目在单抗介导的病毒抑制期期间增加2至3倍,但是逐渐下降至处理前水平,因为病毒血再次变得可检出。

[0308] 通过测量针对对一种或另一种而非对两种抗体敏感的选定HIV-1假病毒株的血浆

中和活性测定每种单抗的血浆浓度(图13A)。在每只处理动物中,SHIVAD8E0病毒血的抑制是维持的,直到达到约1至3 $\mu$ g/ml的阈值血浆单抗浓度(图13B和13C)。甚至对于猕猴DCF1也是如此,对所述猕猴DCF1观察到血浆病毒RNA水平的适度且瞬时的降低。令人感兴趣地,对有临床症状的猕猴DCM8和DCF1施用的单抗具有缩短的半衰期或者是检测不到的。如较早记录的,猕猴DCM8具有极低的CD4+T细胞水平(43个细胞/ $\mu$ l血浆),并且猕猴DCF1由于其恶化的临床状况而必须在处理启动后第56天实施安乐死。DCF1的尸体检查揭示了重度肠病,其特征在于播散性胃肠隐孢子虫病(cryptosporidiosis)、胰腺炎、和胆管炎。

[0309] 使用SGA分析来测定氨基酸取代是否已经在先前显示影响对10-1074或3BNC117单抗的敏感性的gp120区中产生。在每种情况中,免疫疗法后血浆中存在的反弹病毒是不变的。为了进一步测试再次出现的病毒的敏感性,对两只无临床症状猴(DBZ3和DC99A)再次施用10-1074及3BNC117联合疗法(各10mg/kg)。每只动物中的病毒负荷再次快速下降,在第二次免疫疗法周期的第7天时变得检测不到。病毒血在猕猴DBZ3中被抑制7天并且在猴DC99A中被抑制超过21天。总之,这些结果提示了这两只动物中第一次治疗周期后的病毒再次出现代表不足的体内单抗水平,而不是抗体选择的病毒抗性。

[0310] 表3

[0311] PGT121和10-1074克隆变体的全集

	pt10 mAb#	VH	DH	JH	CDRS <sup>a</sup>	VHmut	长度 <sup>b</sup>	(-)	(+)	Y	Lo	VL	JL	CDRS <sup>c</sup>	Vλmut	FRW1_del	FRW3_Ins	长度 <sup>d</sup>	(-)	(+)	Y	
[0312]	10-160	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	10-186	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	52	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	47	12	3	12	1	2	0	
[0313]	10-248	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8SGEFFFFYYYSMDV	46	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	10-259*	4-59	/	6	TIHGRRRIYGVAPNEWFTYFYMDV	63	24	2	4	3	λ	3-21	3	HYDAR0GTNWW	58	21	3	12	1	2	1	
[0314]	10-288	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
	10-267	4-59	/	6	AQQGKRIYGVNSGELFYYYYYMDA	58	24	2	2	5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0315]	10-303*	4-59	3-3/9	6	TLHGRRRIYGVAPNEWFTYFYMDV	54	24	2	3	3	λ	3-21	3	HMWD8RPTKWW	50	21	3	12	1	3	0	
	10-354	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	48	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0316]	10-410*	4-59	3-10/3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	63	24	2	3	3	λ	3-21	3	HIND8RPTNW	44	21	3	12	1	3	0	
	10-416	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	45	12	3	12	1	2	0	
[0317]	10-488	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
	10-543	4-59	3-10/3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	60	24	2	3	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0318]	10-570	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	42	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	10-621	4-59	3-3/9	6	TLHGRRRIYGVAPNEWFTYFYMDV	54	24	2	3	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0319]	10-664	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	10-720	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0320]	10-730	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	48	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	10-814	4-59	3-10	6	TQQGKRIYGVSGEFFFFYYYSMDA	43	24	2	3	4	λ	3-21	3	HKWD8RSPLSWV	52	15	3	12	1	3	0	
[0321]	10-847*	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
	10-948	4-59	3-3/9	6	TLHGRRRIYGVAPNEWFTYFYMDV	55	24	2	3	3	λ	3-21	3	HMWD8RPTKWW	46	21	3	12	1	3	0	
[0322]	10-996	4-59	3-3/10	6	TQQGKRIYGVV8FGEFFYYYSMDA	41	24	2	3	4	λ	3-21	3	HKWD8RSPLSWV	50	15	3	12	1	3	0	
	10-1022	4-59	3-3	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	51	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0323]	10-1059	4-59	3-3/16	6	TKHGRRRIYGVVAFGEWFTYFYMDV	59	24	2	4	3	λ	3-21	3	HYDARPTNW	46	21	3	12	1	3	1	
	10-1074*	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	45	12	3	12	1	2	0	
[0324]	10-1121*	4-59	3-10/3-3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	63	24	2	3	3	λ	3-21	3	HIND8RPTNW	44	21	3	12	1	3	0	
	10-1180*	4-59	3-10/3-3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	60	24	2	3	3	λ	3-21	3	HIND8RPTNW	42	21	3	12	1	3	0	
[0325]	10-1141*	4-59	3-10/3-3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	63	24	2	3	3	λ	3-21	3	HIND8RPTNW	45	21	3	12	1	3	0	
	10-1146*	4-59	3-10	6	AQQGKRIYGVSGEFFFFYYYSMDA	58	24	2	2	5	λ	3-21	3	HYWD8RSPISWV	61	15	3	12	1	2	1	
[0326]	10-1161	4-59	3-3	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	48	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
	10-1167	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	/	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0327]	10-1223	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	10-1232	4-59	3-10/3-3	6	ALHGKRIYGVVALGELFTYFYMDV	58	24	2	3	3	/	3-21	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
[0328]	10-1288	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
	10-1284	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	45	12	3	12	1	2	0	
[0329]	10-1341*	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	49	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	45	12	3	12	1	2	0	
	10-1342	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	48	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	
[0330]	10-1369*	4-59	3-3/16	6	TKHGRRRIYGVVAFGEWFTYFYMDV	57	24	2	4	3	λ	3-21	3	HYDARPTNW	43	21	3	12	1	3	1	
	10-1478	4-59	3-3/16	6	ARRGQRIYGVV8FGEFFYYYYSMOV	47	24	2	3	4	λ	3-21	3	HMND8RSGFSWS	46	12	3	12	1	2	0	

[0331] VHmut和Vλmut标示VH和VL Ig基因中的突变总数。( - ) 和( + ) 分别标示Ig互补决定

区(CDR3)中带负电荷的和带正电荷的氨基酸的数目。Y标示IgH/L CDR3中的酪氨酸残基的数目(为绿色)。1基于Kabat命名(IgBLAS T,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Igblast>)。酸性和碱性分别为红色和蓝色。FRW1\_de1, IgL的框架区1(FRW1)中的缺失核苷酸的数目。FRW3\_Ins, 框架区3(FRW3)中插入核苷酸的数目。颜色阴影显示具有相同IgH序列的克隆成员,并且它们之中,限定克隆的IgL序列身份以粗体标示。<sup>\*</sup>标示标示生成并分析的代表性抗体变体。10-266IgL没有没克隆,并且10-1141IgG没有被生成。

[0314] 表4

[0315] 基础组上的体外TZM-b1中和测定法

<u>IC<sub>50</sub></u>	10-1369	10-259	PGT121	10-303	10-410	10-1130	10-1121	10-1146	10-996	10-1341	10-847	10-1074
BaL.26	0.069	0.021	0.021	0.045	0.018	0.013	0.046	0.064	0.045	0.032	0.022	0.033
<b>SS1196.1</b>	0.033	0.012	0.008	0.015	0.008	0.008	0.029	0.027	0.007	0.011	0.008	0.010
6535.3	0.023	0.005	0.007	0.014	0.003	0.003	0.008	0.022	0.018	0.009	0.011	0.007
QH0692.42	0.503	0.155	1.085	3.122	2.630	4.871	4.187	0.590	0.395	0.335	0.259	0.259
TRJO4551.58	0.569	0.189	3.896	14.401	18.511	36.880	15.360	0.548	0.518	0.333	0.210	0.170
<b>SC422661.8</b>	0.195	0.096	0.263	0.333	0.132	0.070	0.173	0.195	0.255	0.189	0.137	0.145
PVO.4	0.225	0.175	0.147	0.670	0.494	0.385	0.570	0.310	0.211	0.236	0.172	0.178
<b>CAAN5342.A2</b>	0.070	0.020	0.013	0.020	0.012	0.009	0.033	0.032	0.007	0.009	0.006	0.007
<b>YU-2</b>	0.210	0.135	0.098	0.190	0.089	0.078	0.152	0.275	0.258	0.234	0.161	0.143
R1166.c1	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
MuLV	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

[0316]

<u>IC<sub>80</sub></u>	10-1369	10-259	PGT121	10-303	10-410	10-1130	10-1121	10-1146	10-996	10-1341	10-847	10-1074
BaL.26	0.268	0.101	0.081	0.156	0.066	0.062	0.154	0.203	0.228	0.159	0.112	0.124
<b>SS1196.1</b>	0.033	0.037	0.030	0.055	0.030	0.037	0.098	0.073	0.040	0.040	0.026	0.027
6535.3	0.060	0.022	0.041	0.053	0.021	0.013	0.033	0.078	0.085	0.038	0.044	0.044
QH0692.42	1.714	0.551	14.976	18.122	12.071	>40	21.943	1.993	1.404	1.100	0.908	0.861
TRJO4551.58	3.818	0.965	26.930	>40	>40	>40	>23	2.604	4.265	1.226	0.768	0.693
<b>SC422661.8</b>	0.940	0.333	0.714	1.156	0.449	0.264	0.741	0.663	0.845	0.501	0.386	0.392
PVO.4	0.787	0.716	1.097	2.199	1.572	1.783	2.465	1.319	1.715	0.754	0.774	0.766
<b>CAAN5342.A2</b>	0.188	0.063	0.056	0.092	0.055	0.045	0.095	0.088	0.060	0.054	0.035	0.044
<b>YU-2</b>	0.738	0.382	0.356	0.502	0.243	0.313	0.340	0.750	0.891	0.766	0.537	0.398
R1166.c1	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 23	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
MuLV	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 23	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

[0317] 数字标示在TZM-b1中和测定法中达到IC<sub>50</sub>(顶部)和IC<sub>80</sub>(底部)的以μg/ml计的抗体IgG浓度。IC<sub>50/80</sub>值是颜色编码的,并且从暗绿色至暗红色标示增加的中和敏感性。>标示在测试的浓度没有达到给定病毒的IC<sub>50</sub>。鼠白血病病毒(MuLV)和R1166.c1(进化枝AE)是阴性对照。

[0318] 表5

[0319] 扩展组上的体外TZM-b1中和测定法- IC50值

病毒ID	进化枝	10-888	10-1074	PGT121	病毒ID	进化枝	10-888	10-1074	PGT121
6535.3	B	0.017	0.014	0.008	CNE58	BC	0.570	0.267	>50
QH0652.42	B	0.396	0.191	1.041	M3208_A1	A	>50	>50	>50
SC422661.8	B	0.173	0.091	0.101	Q23.17	A	0.008	0.006	0.010
PVO.4	B	0.186	0.074	0.131	Q461.e2	A	>50	>50	>50
TRO.11	B	0.012	0.008	0.005	Q769.d22	A	>50	>50	>50
AC10.0.29	B	0.067	0.022	0.037	Q259.d2.17	A	>50	>50	8.990
RHPA4259.7	B	0.034	0.021	0.014	Q842.d12	A	>50	>50	0.023
THRO4156.18	B	>50	>50	>50	3415.v1.c1	A	35.876	>50	>50
REJO4541.67	B	>50	>50	3.607	3365.v2.c2	A	0.286	0.131	0.921
TRJO4551.58	B	1.147	0.170	3.728	0260.v5.c36	A	0.160	0.099	0.054
WITO4160.33	B	0.538	0.185	0.459	191955_A11	A (T/F)	>50	>50	>50
CAANNS342.A2	B	0.013	0.007	0.011	191084_B7-19	A (T/F)	0.057	0.032	0.042
YU-2	B	0.256	0.143	0.098	900450_A3_4	A (T/F)	0.012	0.011	0.008
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0.147	0.104	0.083	T257-31	CRF02_AG	>50	>50	>50
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0.001	0.003	0.008	928-28	CRF02_AG	1.331	0.847	>50
1D54_07_TC4_1499	B (T/F)	0.250	0.129	0.115	263-8	CRF02_AG	10.919	0.666	3.347
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0.117	0.038	0.056	T250-4	CRF02_AG	<0.001	<0.001	0.001
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0.018	0.008	0.008	T251-18	CRF02_AG	0.939	1.081	>50
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0.095	0.068	0.128	T278-50	CRF02_AG	14.010	2.146	>50
6244_13_BS_4576	B (T/F)	0.353	0.202	0.249	T256-34	CRF02_AG	28.369	>50	6.725
62357_14_D3_4589	B (T/F)	29.300	>50	1.036	211-9	CRF02_AG	0.750	0.112	1.455
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0.069	0.052	0.093	235-47	CRF02_AG	0.128	0.050	0.332
Du156.12	C	0.018	0.015	0.007	620345.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
Du172.17	C	0.173	0.121	0.115	CNE8	CRF01_AE	>50	>50	>50
Du422.1	C	0.056	0.045	0.029	C1080.c03	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM197M.PB7	C	>50	>50	>50	R2184.c04	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM214M.PL15	C	0.413	0.174	0.236	R1166.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM233M.PB6	C	0.856	0.060	1.451	C2101.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM249M.PL1	C	>50	>50	>50	C3347.c11	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM53M.PB12	C	>50	>50	<0.001	C4118.c09	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM109F.PB4	C	>50	>50	7.894	CNE5	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM135M.PL10a	C	0.099	0.069	0.576	BJ0X09000.02.4	CRF01_AE	>50	>50	3.626
CAP45.2.00.G3	C	>50	>50	0.086	BJ0X015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
CAP210.2.00.E8	C	24.793	>50	5.082	BJ0X010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-001428-2.42	C	0.040	0.044	0.026	BJ0X025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-0013095-2.11	C	31.631	>50	>50	BJ0X028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-16055-2.3	C	>50	>50	0.444	X1193_c1	G	0.144	0.083	0.045
HIV-16845-2.22	C	1.325	1.169	12.685	P0402_c2_11	G	0.022	0.012	0.020
Ce1086_B2	C (T/F)	>50	>50	<0.001	X1254_c3	G	0.121	0.089	0.056
Ce0393_C3	C (T/F)	>50	>50	>50	X2088_c9	G	0.002	0.003	0.011
Ce1176_A3	C (T/F)	0.043	0.019	0.017	X2131_C1_B5	G	0.019	0.016	0.015
Ce2010_F5	C (T/F)	>50	>50	>50	P1981_CS_3	G	0.005	0.005	0.004
Ce0682_E4	C (T/F)	>50	>50	>50	X1632_S2_B10	G	>50	>50	>50
Ce1172_H1	C (T/F)	0.058	0.047	0.023	3016.v5.c45	D	>50	>50	>50
Ce2060_G9	C (T/F)	>50	>50	>50	A07412M1.vrc12	D	0.008	<0.001	0.001
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>50	>50	>50	231965.c01	D	>50	>50	>50
BF1266.431a	C (T/F)	>50	>50	>50	231966.c02	D	>50	>50	>50
246F C1G	C (T/F)	0.052	0.022	0.083	191821_E6_1	D (T/F)	>50	>50	>50
249M B10	C (T/F)	>50	>50	>50	3817.v2.c59	CD	8.147	3.148	>50
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	0.055	0.042	0.027	6480.v4.c25	CD	0.010	0.009	0.017
7D30102001ES(Rev-)	C (T/F)	0.013	0.006	0.010	6952.v1.c20	CD	0.044	0.037	0.085
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0.086	0.050	0.486	6811.v7.c18	CD	0.001	0.002	0.004
Ce704809221_1B3	C (T/F)	0.243	0.139	0.098	89-F1_2_25	CD	>50	>50	>50
CNE19	BC	3.452	50.000	0.018	3301.v1.c24	AC	0.016	0.013	0.014
CNE20	BC	<0.001	<0.001	0.002	6041.v3.c23	AC	>50	>50	>50
CNE21	BC	0.086	0.067	0.020	6540.v4.c1	AC	>50	>50	>50
CNE17	BC	4.040	2.686	45.289	6545.v4.c1	AC	>50	>50	>50
CNE30	BC	0.614	0.363	0.101	0815.v3.c3	ACD	0.061	0.030	0.022
CNE52	BC	4.525	1.226	3.741	3103.v3.c10	ACD	0.053	0.037	0.042
CNE53	BC	0.057	0.039	0.055					

[0321] 数字标示在TZM-b1中和测定法中达到IC<sub>50</sub>的以μg/ml计的抗体IgG浓度。IC<sub>50</sub>值是颜色编码的，并且从暗绿色至暗红色标示增加的中和敏感性。>标示在测试的浓度没有达到给定病毒的IC<sub>50</sub>。

[0322] 表6

[0323] 扩展组上的体外TZM-b1中和测定法-IC80值

病毒 ID	进化枝	10-898	10-1074	PGT121	病毒 ID	进化枝	10-898	10-1074	PGT121
6535.3	B	0.046	0.026	0.021	CNE58	BC	2.220	0.968	>50
QH0682.42	B	1.854	0.929	8.545	M0208_A1	A	>50	>50	>50
SC422661.8	B	0.627	0.418	0.460	Q23.17	A	0.030	0.021	0.031
PVO.4	B	0.952	0.360	0.945	Q461.e2	A	>50	>50	>50
TRO.11	B	0.081	0.057	0.051	Q759.d22	A	>50	>50	>50
AC10.0.29	B	0.250	0.110	0.169	Q259.d2.17	A	>50	>50	>50
RHPAA259.7	B	0.163	0.118	0.054	Q842.d12	A	>50	>50	0.074
THRO4156.18	B	>50	>50	>50	3415.v1.c1	A	>50	>50	>50
REJO4541.67	B	>50	>50	>50	3365.v2.c2	A	1.380	0.450	7.353
TRJO4551.58	B	7.269	0.634	35.291	0260.v3.c36	A	0.436	0.160	0.152
WITO4160.33	B	6.484	2.112	6.007	181955_A11	A (T/F)	>50	>50	>50
CAAN5342.A2	B	0.079	0.036	0.051	191084_B7-19	A (T/F)	0.144	0.128	0.128
YU-2	B	0.891	0.398	0.356	900408_A3_4	A (T/F)	0.050	0.030	0.026
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0.422	0.375	0.295	T257-31	CRF02_AG	>50	>50	>50
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0.019	0.013	0.023	928-28	CRF02_AG	7.151	4.696	>50
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0.901	0.563	0.696	263-8	CRF02_AG	>50	6.527	24.576
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0.563	0.272	0.303	T250-4	CRF02_AG	0.005	0.005	0.011
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0.111	0.059	0.038	T251-18	CRF02_AG	7.399	7.395	>50
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0.348	0.306	0.584	T278-50	CRF02_AG	>50	18.276	>50
6244_13_BS_4576	B (T/F)	1.296	0.922	1.878	T255-34	CRF02_AG	>50	>50	>50
62357_14_D3_4589	B (T/F)	>50	>50	45.559	211-9	CRF02_AG	3.848	0.425	8.840
SC05_BC11_2344	B (T/F)	0.174	0.123	0.275	235-47	CRF02_AG	0.381	0.163	1.676
Du156.12	C	0.101	0.076	0.033	620345.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
Du172.17	C	0.607	0.430	0.890	CNE8	CRF01_AE	>50	>50	>50
Du422.1	C	0.215	0.166	0.131	C1080.c03	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM197M.PB7	C	>50	>50	>50	R2184.c04	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM214M.PL15	C	3.251	2.367	3.150	R1166.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM233M.PB6	C	4.524	0.349	8.977	C2101.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM249M.PL1	C	>50	>50	>50	C3347.c11	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM53M.PB12	C	>50	>50	0.002	C4119.c09	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM109F.PB4	C	>50	>50	>50	CNE5	CRF01_AE	>50	>50	>50
ZM138M.PL10a	C	0.553	0.367	5.885	BJ0X009000.02.4	CRF01_AE	>50	>50	37.289
CAP45.2.00.G3	C	>50	>50	6.544	BJ0X015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
CAP210.2.00.E8	C	>50	>50	>50	BJ0X010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-001428-2.42	C	0.204	0.261	0.156	BJ0X025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-0013095-2.11	C	>50	>50	>50	BJ0X028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>50	>50	>50
HIV-16055-2.3	C	>50	>50	4.290	X1193_c1	G	0.482	0.475	0.202
HIV-16845-2.22	C	9.933	5.835	>50	P0402_c2_11	G	0.065	0.039	0.056
Ce1086_B2	C (T/F)	>50	>50	0.006	X1254_c3	G	0.420	0.297	0.199
Ce0393_C3	C (T/F)	>50	>50	>50	X2088_c9	G	0.014	0.014	0.029
Ce1176_A3	C (T/F)	0.151	0.070	0.058	X2131_C1_B5	G	0.085	0.064	0.058
Ce2010_F5	C (T/F)	>50	>50	>50	P1981_C5_3	G	0.018	0.017	0.015
Ce0682_E4	C (T/F)	>50	>50	>50	X1632_B2_B10	G	>50	>50	>50
Ce1172_H1	C (T/F)	0.173	0.166	0.088	3016.v5.c45	D	>50	>50	>50
Ce2060_G9	C (T/F)	>50	>50	>50	A07412M1.vrc12	D	0.070	0.048	0.406
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>50	>50	>50	231965.c01	D	>50	>50	>50
BF1266.431a	C (T/F)	>50	>50	>50	231966.c02	D	>50	>50	>50
246F C1G	C (T/F)	0.270	0.111	0.287	191821_E6_1	D (T/F)	>50	>50	>50
248M B10	C (T/F)	>50	>50	>50	3817.v2.c59	CD	34.619	14.880	>50
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	0.252	0.186	0.126	6480.v4.c25	CD	0.049	0.041	0.079
7D30102001ES(Rev-)	C (T/F)	0.044	0.021	0.043	6952.v1.c20	CD	0.188	0.138	0.605
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0.328	0.191	3.372	6811.v7.c18	CD	0.011	0.010	0.017
Ce704809221_1B3	C (T/F)	1.208	0.696	0.492	89-F1_2_25	CD	>50	>50	>50
CNE19	BC	>50	>50	0.189	3301.v1.c24	AC	0.054	0.042	0.043
CNE20	BC	<0.001	0.005	0.008	6041.v3.c23	AC	>50	>50	>50
CNE21	BC	0.255	0.181	0.061	6540.v4.c1	AC	>50	>50	>50
CNE17	BC	24.701	13.297	>50	6545.v4.c1	AC	>50	>50	>50
CNE30	BC	1.989	1.200	0.559	0815.v3.c3	ACD	0.251	0.138	0.105
CNE52	BC	43.834	13.147	32.935	3103.v3.c10	ACD	0.150	0.101	0.110
CNE53	BC	0.233	0.141	0.200					

[0325] 数字标示在TZM-b1中和测定法中达到IC<sub>80</sub>的以μg/ml计的抗体IgG浓度。IC<sub>80</sub>值是颜色编码的，并且从暗绿色至暗红色标示增加的中和敏感性。>标示在测试的浓度没有达到给定病毒的IC<sub>80</sub>。

[0326] 表7

[0327] 依照N332 PNGS的中和敏感性

病毒 ID	进化枝	N332	S334	IC50 T/F	IC50 P/F	IC50 I	病毒 ID	进化枝	N332	S334	IC50 T/F	IC50 P/F	IC50 I
6535.3	B	-	-				CNE58	BC	-	(T)			
QH0692.42	B	-	-				M0208_A1	A	-	-			
SC422661.8	B	-	-				Q23.17	A	-	(T)			
PVO.4	B	-	-				Q451.e2	A	V	N			
TR0.11	B	-	-				Q769.d22	A	-	N			
AC10.0.29	B	-	-				Q259.d2.17	A	T	N			
RHPA4259.7	B	-	-				Q842.d12	A	-	N			
THRO4156.18	B	T	N				3415.v1.c1	A	-	-			
REJO4541.67	B	T	N				3365.v2.c2	A	-	-			
TRJO4551.58	B	-	-				0260.v5.c36	A	-	-			
WITO4160.33	B	-	-				191955_A11	A (T/F)	K	N			
CAAN5342.A2	B	-	-				191084_B7-19	A (T/F)	-	-			
YU-2	B	-	-				900408_A3_4	A (T/F)	-	-			
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	-	-				T257-31	CRF02_AG	K	N			
1006_11_C3_1601	B (T/F)	-	-				928-28	CRF02_AG	-	-			
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	-	-				263-8	CRF02_AG	-	-			
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	-	-				T250-4	CRF02_AG	-	-			
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	-	-				T251-18	CRF02_AG	-	-			
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	-	-				T278-50	CRF02_AG	-	-			
6244_13_B5_4576	B (T/F)	-	-				T255-34	CRF02_AG	-	-			
62357_14_D3_4589	B (T/F)	-	-				211-9	CRF02_AG	-	-			
SC05_8C11_2344	B (T/F)	-	-				235-47	CRF02_AG	-	-			
Du156.12	C	-	-				620345.c01	CRF01_AE	E	N			
Du172.17	C	-	-				CNE8	CRF01_AE	E	N			
Du422.1	C	-	-				C1080.c03	CRF01_AE	E	N			
ZM197M.PB7	C	D	-				R2184.c04	CRF01_AE	V	N			
ZM214M.PL15	C	-	-				R1166.c01	CRF01_AE	E	N			
ZM233M.PB6	C	-	-				C2101.c01	CRF01_AE	E	N			
ZM249M.PL1	C	-	-				C3347.c11	CRF01_AE	E	N			
ZM53M.PB12	C	I	N				C4118.c09	CRF01_AE	E	D			
ZM109F.PB4	C	K	N				CNE5	CRF01_AE	E	N			
ZM135M.PL10s	C	-	-				BJOX0290000.02.4	CRF01_AE	E	N			
CAP45.2.00.G3	C	-	N				BJOX0150000.11.5	CRF01_AE (T/F)	E	N			
CAP210.2.00.E8	C	-	-				BJOX0100000.06.2	CRF01_AE (T/F)	K	N			
HIV-001428-2.42	C	-	-				BJOX0250000.01.1	CRF01_AE (T/F)	E	N			
HIV-0013095-2.11	C	-	-				BJOX0280000.10.3	CRF01_AE (T/F)	-	-			
HIV-16055-2.3	C	-	K				X1193_c1	G	-	-			
HIV-16845-2.22	C	-	-				F0402_c2_11	G	-	-			
Ce1086_B2	C (T/F)	-	N				X1254_c3	G	-	-			
Ce0393_C3	C (T/F)	-	D				X2088_c9	G	-	(T)			
Ce1176_A3	C (T/F)	-	-				X2131_C1_B5	G	-	-			
Ce2010_F5	C (T/F)	T	N				P1981_C6_3	G	-	-			
Ce0682_E4	C (T/F)	-	-				X1632_B2_B10	G	-	N			
Ce1172_H1	C (T/F)	-	-				3016.v5.c45	D	T	D			
Ce2060_G9	C (T/F)	-	(T)				A07412M1.vrc12	D	-	-			
Ce703010054_2A2	C (T/F)	D	N				231965.c01	D	-	-			
BF1266.431a	C (T/F)	T	N				231966.c02	D	-	-			
246F C1G	C (T/F)	-	-				191821_E6_1	D (T/F)	-	-			
249M B10	C (T/F)	-	-				3817.v2.c59	CD	-	-			
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	-	(T)				6480.v4.c25	CD	-	-			
7D30102001E5(Rev-)	C (T/F)	-	-				6952.v1.c20	CD	-	-			
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	-	-				6811.v7.c18	CD	-	-			
Ce704809221_1B3	C (T/F)	-	-				89_F1_2_25	CD	T	-			
CNE19	BC	-	-				3301.v1.c24	AC	-	(T)			
CNE20	BC	-	-				6041.v3.c23	AC	D	N			
CNE21	BC	-	-				6540.v4.c1	AC	T	N			
CNE17	BC	-	-				6545.v4.c1	AC	T	N			
CNE30	BC	-	-				0815.v3.c3	ACD	-	-			
CNE52	BC	-	-				3103.v3.c10	ACD	-	-			
CNE53	BC	-	-										

[0329] 点分别标示位置332和334中天冬氨酸和丝氨酸残基的存在。位置332和334 (HXB2序列编号方式) 处的突变以取代氨基酸标示。IC50值是颜色编码的，并且从暗绿色至暗红色标示在TZM-b1测定法中增加的中和敏感性。

[0330] 表8

[0331] 基于PBMC的体外中和测定法

病毒ID	3BNC66	3BNC89	3BNC117	BANC134	5NC8	45-46	3BNC195	12A12	4E10	b12	2G12	2F5	PQ9	PQ16	VRC91	45-46 54W	POT121	15-16T4	
P035.E.4	1.918	0.023	<0.0002	0.034	0.461	0.037	>50	0.110	1.043	11.665	<0.36	3.400	>1	>1	<0.078	0.032	15.471	0.059	
P035.E.D10	0.550	0.029	0.002	0.239	0.031	0.053	>50	0.130	2.941	10.756	<2.115	0.150	>1	>1	0.150	0.018	0.887	0.143	
P151.37.C7	>50	0.019	>50	0.248	<0.0002	>50	<0.0002	0.792	<1.25	<0.39	1.900	>1	>1	0.390	0.020	0.174	0.110		
P151.37.F1	1.297	0.125	0.161	1.633	<2.08	0.203	0.136	10.043	0.980	<12.5	<25	1.372	<0.016	<0.016	0.250	0.472	>50	>50	
P151.37.F10	3.770	0.311	0.249	4.651	>50	0.375	>50	18.883	9.314	0.452	<25	<0.39	<0.016	<0.016	1.150	0.172	>50	>50	
P153.10.2.49	15.864	0.763	0.661	17.208	46.735	0.069	0.206	>50	12.256	7.988	0.825	0.918	>1	0.431	>5	34.912	42.823	1.466	
P153.10.2.50	20.588	1.020	0.208	23.124	>50	0.030	>50	2.478	0.881	<1.25	3.562	24.193	>1	0.853	0.890	0.325	1.863	0.620	
P153.10.2.610	11.225	0.548	0.211	2.105	>50	0.108	>50	10.856	2.762	9.212	<0.38	22.382	>1	<0.016	>5	>50	>50		
P156.12.1.D10	0.061	0.061	0.105	>50	0.075	0.165	0.091	7.268	<25	9.333	<25	2.462	>1	>1	>22.865	0.021	0.212		
P156.12.2.F4	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	4.903	11.075	15.711	15.711	10.783	21.988	3.181	>1	>1	3.320	15.929	0.026
P156.12.2.G2	1.036	<0.0002	<0.0002	>50	0.048	0.017	>50	0.088	15.711	10.783	15.711	10.783	>1	>1	>5	16.388	0.018	0.106	
P156.31.A6	0.032	0.136	<0.0002	0.171	0.238	0.052	0.099	0.208	2.934	0.496	<25	3.884	>1	>1	0.590	>50	>50		
P156.31.A10	0.252	0.024	0.025	>50	0.263	0.020	0.071	>50	1.248	0.986	<25	<0.39	>1	4.800	>50	>50			
P156.31.F11	0.569	0.064	0.137	>50	0.076	>50	33.131	2.301	<12.5	<25	2.306	>1	>1	1.930	>50	>50			
P019.1.D2	0.948	0.164	0.027	>50	>50	0.057	>50	14.812	0.432	<0.39	<0.39	0.226	<0.016	>5	>50	>50			
P019.1.D6	3.122	0.738	0.635	>50	>50	5.787	>50	>50	2.443	<12.5	9.371	<0.38	<0.016	<0.016	0.226	0.051	0.191		
P019.1.G7	6.034	3.536	4.570	>50	>50	5.962	>50	20.992	1.073	<12.5	6.784	<0.39	0.260	0.034	<0.078	<0.0032	0.518		
P175.10.D7	2.539	0.936	3.568	>50	42.895	17.723	>50	35.808	1.407	1.369	<0.39	<25	>1	0.110	1.100	0.022	0.068		
P175.10.D12	0.706	0.410	0.067	>50	0.317	0.175	1.233	10.548	0.963	<12.5	<0.39	<25	>1	0.150	0.170	0.032	0.041		
P175.10.G10	2.506	0.563	0.621	>50	33.008	0.364	22.413	18.554	1.147	<12.5	2.163	1.300	0.729	0.032	1.860	0.017	0.059		
P013.18.A9	0.125	0.102	0.079	>50	0.198	0.018	0.428	0.205	0.798	<12.5	<25	2.763	>1	>1	0.583	5.644	>50		
P154.44.C8	>50	0.863	1.042	>50	>50	16.440	0.825	>50	>12.5	<25	<25	<0.39	0.800	>5	>50	>50			
P154.44.G8	>50	1.220	2.172	>50	>50	25.616	1.969	>50	4.460	<12.5	<25	<25	<0.016	0.800	>5	>50			
P183.50.2.H3	2.197	0.116	0.121	12.049	4.079	0.161	>50	0.478	3.890	5.923	6.686	1.527	>1	>1	1.031	0.195	2.106	0.185	
P003.3.2.B9	0.076	<0.0002	0.053	0.325	0.142	>50	0.472	1.722	1.230	2.132	1.073	>1	>1	0.340	0.056	5.073	0.286		
P004.38.P5	0.416	0.048	0.047	8.133	0.329	0.133	>50	0.197	<0.39	<12.5	<25	<0.39	<0.016	<0.016	>5	0.946	1.573	0.048	
P004.38.H4	2.180	0.333	1.919	>50	>50	6.118	>50	0.080	0.200	<12.5	<25	<0.39	<0.016	4.300	0.051	2.648	0.052		
P002.39.C8	15.016	0.117	0.172	2.192	12.154	0.546	>50	0.80	1.925	<12.5	2.216	<25	<0.39	0.450	1.129	0.034			
P002.39.F9	>50	26.699	>50	13.090	>50	0.404	>50	0.084	0.954	<12.5	<25	<25	<0.016	<0.016	0.226	0.049			
P002.39.H10	1.472	0.765	0.725	14.160	0.147	<0.017	>50	0.500	1.530	<12.5	<0.39	1.500	<0.016	0.048	3.030	0.017	1.565	0.042	
P034.6.E	37.003	0.161	0.176	11.339	1.137	0.236	>50	0.802	1.164	11.122	0.644	0.673	0.088	0.122	<0.078	0.059	0.027	<0.0032	
P034.6.G10	40.877	0.348	0.237	22.461	1.428	<0.017	>50	0.196	0.020	8.598	<0.39	1.257	>1	>1	0.017	0.224	3.110	0.127	
P034.6.H5	>50	0.417	0.267	20.730	0.620	0.248	>50	0.686	0.391	<12.5	<25	1.183	<0.016	0.021	0.127	0.037	0.018		
P101.20.1.F1	>50	>50	>50	>50	>50	0.090	>50	0.474	0.902	<12.5	<25	1.719	>1	>1	1.470	0.081	<0.0032	<0.0032	
P127.46.A8	>50	>50	>50	>50	>50	0.366	>50	0.686	1.211	8.730	2.348	1.671	<0.079	<0.016	<0.078	0.143	>50		
P127.46.D1	1.342	0.024	0.043	5.403	2.556	0.169	>50	0.227	1.092	<12.5	<0.39	0.921	>1	>1	0.191	0.150	0.230	>50	
P127.46.D2	1.125	0.173	0.221	>50	2.291	>50	>50	0.494	1.813	0.195	<25	1.126	<0.379	0.023	0.016	3.630	0.088	0.017	
P174.28.E11	2.396	0.463	0.716	>50	13.061	0.894	>50	2.104	1.143	0.074	1.674	>1	>1	0.023	0.016	3.910	1.853	0.065	
P177.25.G19	0.986	0.191	0.169	>50	1.026	0.261	>50	0.130	1.665	<12.5	<25	5.881	>1	>1	<0.078	0.325	0.126	0.034	
P177.25.B84	1.179	0.060	0.041	23.869	0.364	0.190	>50	0.038	3.728	<12.5	<25	1.241	>1	>1	0.480	0.530	0.039	0.023	
P177.25.2.D1	>50	1.949	1.359	>50	46.825	11.464	>50	7.601	1.140	7.770	<25	1.232	>1	>1	3.630	0.088	0.017	0.016	
P180.14.G5	1.359	0.066	0.058	>50	>50	0.034	>50	0.022	1.162	1.768	0.685	>1	>0.026	0.016	1.000	2.094	0.139	0.026	
P180.14.G8	46.246	0.116	0.122	2.449	13.361	0.159	0.220	0.093	4.009	<12.5	2.968	<25	<0.016	<0.016	2.380	0.036	0.174	0.020	
P180.14.G10	23.444	0.052	0.035	0.022	1.490	0.024	0.703	0.729	15.759	<12.5	2.400	<25	<0.016	0.016	1.240	0.102	0.026	0.026	
P187.25.1.D2	>50	0.266	0.194	1.490	1.137	0.016	0.016	0.072	1.462	<12.5	1.234	<25	<0.016	0.020	0.025	14.267	0.065		
P187.25.1.D7	>50	0.762	0.019	0.019	7.058	0.051	0.016	0.016	2.601	<12.5	1.231	<25	<0.016	0.016	0.078	0.072	23.417	0.092	
P187.25.1.H1	>50	0.017	0.019	<0.003	<0.003	0.026	<0.003	0.754	0.754	1.079	0.208	0.080	>1	>1	0.016	0.016	0.078	0.072	
P187.25.13.D3	5.406	0.403	0.422	40.937	5.847	0.040	>50	0.031	0.024	0.471	<0.39	1.137	>1	>1	0.254	0.071	0.018		
P187.25.18.F10	0.935	0.063	0.064	5.646	0.402	0.094	0.125	0.499	1.360	0.378	0.304	ND	ND	>5	0.580	0.020	0.019	<0.0032	
P187.25.18.H5	4.725	0.219	0.762	1.100	19.220	0.027	0.450	43.854	3.320	0.467	0.966	0.618	0.140	<0.016	0.016	4.780	0.187		
P187.25.18.I5	0.291	0.021	<0.0032	0.115	0.278	0.056	>50	0.037	2.012	1.115	0.614	0.678	>1	>1	0.044	0.470	0.031	0.017	
P187.25.18.P12	0.659	0.057	0.066	2.882	2.131	0.037	>50	5.279	0.818	0.413	<0.39	3.830	0.190	>5	ND	ND	ND		
1140.SF5	0.325	0.029	<0.0032	5.219	6.915	0.264	>50	13.917	21.480	<12.5	<25	3.790	<0.016	<0.016	0.032	0.017	0.019	0.024	
1140.SG9	0.748	0.116	0.114	4.222	0.096	0.147	>50	0.220	5.710	3.270	<12.5	1.520	<0.016	<0.016	0.078	0.019	0.112	0.024	
P115.2	5.406	0.403	0.422	40.937	5.847	0.040	>50	17.250	16.580	17.370	<25								

[0334] 表9

[0335] 数据收集和细化统计学(分子替换)

	PGT121 Fab “无配体”	10-1074 Fab	GL Fab	PGT121 Fab “有配体”
<b>数据收集</b>				
空间群	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
晶胞维度	□□			
a, b, c (Å)	56.75, 74.67, 114.917	61.38, 40.26, 84.46	54.93, 344.74, 55.23	67.79, 67.79, 94.11
□□□□a, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 95.39, 90.00	90.00, 91.95, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
分辨率 (Å)	2.78-35.5 (2.78-2.93)	1.80-36.31 (1.80-1.91)	2.42-38.60 (2.42-2.55)	2.33-38.66 (2.33-2.47)
R 合并	0.099 (0.293)	0.075 (0.558)	0.072 (0.482)	0.161 (0.603)
I / σ <sub>I</sub>	8.8 (3.1)	8.7 (1.8)	11.0 (1.9)	8.7 (2.9)
完整性 (%)	96.7 (84.8)	93.49 (98.0)	95.5 (80.1)	92.2 (98.9)
Redundancy	3.2 (2.7)	2.7 (2.8)	3.1 (2.6)	5.3 (5.8)
<b>Refinement</b>				
分辨率 (Å)	3.0	1.9	2.42	2.4
No. reflections	10,076	31,363	74,237	16,831
R <sub>工作</sub> / R <sub>游离</sub>	0.216/0.264	0.187/0.223	0.194/0.237	0.201/0.249
原子数				
蛋白质	3,276	3,346	12,881	3,127
配体/原子	0	0	0	129
水	0	300	527	203
B-因子				
蛋白质	32.78	29.17	44.67	31.48
配体/原子	-	-	-	45.1
水	-	37.37	40.27	36.78
R.m.s.偏差				
键长 (Å)	0.005	0.007	0.005	0.006
键角 (°)	0.971	1.234	0.951	0.949

[0337] \*从单个晶体获得每个结构的数据

[0338] \*括号中的数值用于最高分辨率壳

[0339] 表10

[0340] Fab的Ca比对的RMSD值

Fab1/Fab2	RMSD <sub>VH</sub> (Å)	# 残基	RMSD <sub>VL</sub> (Å)	# 残基	RMSD <sub>VH+VL</sub> (Å)	# 残基
PGT121/PGT128	1.159	116/130	1.63	95/100	1.462	207/235
PGT121/PGT145	2.93	124/130	1.91	94/105	1.75	206/235
PGT121/10-1074	0.74	128/130	1.2	102/105	1.26	226/235
PGT121/GL	1.33	129/130	1.37	94/105	1.6	225/235
10-1074/GL	1.38	130/130	1.35	92/105	1.39	220/235
PGT121/PGT121 <sub>有配体</sub>	0.79	125/128	0.5	100/100	0.78	225/228

[0342] 表11

[0343] PGT121 Fab和结合的聚糖之间的接触

聚糖原子	蛋白质原子	水	距离 (Å)	聚糖原子	蛋白质原子	水	距离 (Å)
GlcNAc <sup>6</sup> -O3	Asn <sup>58</sup> -N52		2.91	Sia <sup>10</sup> -O8	Asp <sup>31</sup> -O		2.72
GlcNAc <sup>6</sup> -O7	Asn <sup>58</sup> -O51		2.94	Sia <sup>10</sup> -O10	His <sup>97</sup> -N		3.18
GlcNAc <sup>6</sup> -O6		H <sub>2</sub> O <sup>471</sup>	3.15	Sia <sup>10</sup> -O9	His <sup>97</sup> -O		3.19
GlcNAc <sup>6</sup> -O4		H <sub>2</sub> O <sup>477</sup>	3.05	Sia <sup>10</sup> -O8	Ser <sup>32</sup> -Oy	H <sub>2</sub> O <sup>480</sup>	3.19
GlcNAc <sup>6</sup> -O3		H <sub>2</sub> O <sup>481</sup>	2.94	Man <sup>1</sup> -O3	Asn <sup>58</sup> -O51		3.70*
Man <sup>1</sup> -O4		H <sub>2</sub> O <sup>410</sup>	3.02	Man <sup>1</sup> -O6		H <sub>2</sub> O <sup>477</sup>	2.58
Man <sup>1</sup> -O4		H <sub>2</sub> O <sup>420</sup>	2.66	GlcNAc <sup>4</sup> -O5	Thr <sup>57</sup> -O		3.35
Man <sup>1</sup> -O3		H <sub>2</sub> O <sup>410</sup>	3.35	GlcNAc <sup>4</sup> -N2		H <sub>2</sub> O <sup>479</sup>	3.33
Man <sup>1</sup> -O2		H <sub>2</sub> O <sup>477</sup>	3.14	Fuc <sup>9</sup> -O2		H <sub>2</sub> O <sup>471</sup>	2.57
Man <sup>1</sup> -O5		H <sub>2</sub> O <sup>477</sup>	2.62		Asp <sup>31</sup> -O	H <sub>2</sub> O <sup>435</sup>	3.09
Man <sup>2</sup> -O6	Thr <sup>100</sup> -Oy1		3.34		Asp <sup>31</sup> -O51	H <sub>2</sub> O <sup>480</sup>	3.32
Man <sup>2</sup> -O2		H <sub>2</sub> O <sup>410</sup>	3.41		Tyr <sup>10</sup> -OH	H <sub>2</sub> O <sup>481</sup>	2.8
Man <sup>2</sup> -O5		H <sub>2</sub> O <sup>446</sup>	2.95		His <sup>52</sup> -Nc2	H <sub>2</sub> O <sup>435</sup>	3.16
Man <sup>2</sup> -O6		H <sub>2</sub> O <sup>446</sup>	3.26		Ser <sup>54</sup> -Oy	H <sub>2</sub> O <sup>410</sup>	3.2
GlcNAc <sup>7</sup> -N2	Tyr <sup>33</sup> -OH		2.72		Ser <sup>54</sup> -O	H <sub>2</sub> O <sup>420</sup>	3.16
GlcNAc <sup>7</sup> -O5		H <sub>2</sub> O <sup>410</sup>	3.38		Gly <sup>55</sup> -O	H <sub>2</sub> O <sup>479</sup>	2.85
GlcNAc <sup>7</sup> -O7		H <sub>2</sub> O <sup>411</sup>	3.00		Asp <sup>56</sup> -O51	H <sub>2</sub> O <sup>481</sup>	3.49
GlcNAc <sup>7</sup> -O3	His <sup>97</sup> -N52		3.60*		Asp <sup>56</sup> -O52	H <sub>2</sub> O <sup>446</sup>	3.07
GlcNAc <sup>7</sup> -O7	His <sup>97</sup> -Nt2		3.70*		Asn <sup>58</sup> -N52	H <sub>2</sub> O <sup>481</sup>	3.15
Gal <sup>8</sup> -O3	Lys <sup>53</sup> -N $\zeta$		2.97		Arg <sup>59</sup> -N $\epsilon$	H <sub>2</sub> O <sup>411</sup>	2.58
Gal <sup>8</sup> -O4		H <sub>2</sub> O <sup>480</sup>	3.47		Thr <sup>100</sup> -Oy1	H <sub>2</sub> O <sup>411</sup>	2.94
Gal <sup>8</sup> -O4		H <sub>2</sub> O <sup>435</sup>	2.76				
Gal <sup>8</sup> -O5		H <sub>2</sub> O <sup>435</sup>	3.17				

[0344] [0345] 氢键标准: 键距<3.5。O-H-O/N-H-O角度>90°

[0346] \*接触接近氢键距离截留, 并且作为可能的相互作用包括在内。

[0347] 表12

[0348] PGT121GM和10-1074GM的体外中和活性

病毒ID	进化枝	PGT121	PGT121 <sub>GM</sub>	10-1074	10-1074 <sub>GM</sub>
Q842.d12	A	0.074	>50	>50	>50
3365.v2.c2	A	7.353	>50	0.450	0.467
0260.v5.c36	A	0.152	>50	0.160	0.618
YU.2	B	0.356	1.355	0.398	0.262
TRO.11	B	0.051	0.258	0.057	0.049
TRJO4551.58	B	35.291	>50	0.634	0.721
QH0692.42	B	8.545	>50	0.929	0.376
PVO.4	B	0.945	47.564	0.360	0.138
RHPA4259.7	B	0.054	20.801	0.118	0.087
WITO4160.33	B	6.007	>50	2.112	0.406
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0.696	>50	0.563	0.193
6244_13_B5_4576	B (T/F)	1.878	46.680	0.922	0.394
62357_14_D3_4589	B (T/F)	45.559	>50	>50	40.782
CNE19	BC	0.189	48.092	50	0.379
CNE17	BC	>50	>50	13.297	4.816
CNE58	BC	>50	>50	0.968	1.158
CNE30	BC	0.559	8.401	1.200	1.045
CNE52	BC	32.935	>50	13.147	6.664
ZM233M.PB6	C	8.977	>50	0.349	0.232
[0349]	ZM53M.PB12	C	0.002	>50	>50
	CAP45.2.00.G3	C	6.544	>50	>50
	HIV-16055-2.3	C	4.290	>50	>50
	HIV-16845-2.22	C	>50	>50	5.835
	ZM214M.PL15	C	3.150	>50	2.367
	ZM135M.PL10a	C	5.885	>50	0.367
	Ce1086_B2	C (T/F)	0.006	>50	>50
	Ce1172_H1	C (T/F)	0.088	0.180	0.166
	1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	3.372	2.120	0.191
	3817.v2.c59	CD	>50	>50	14.880
[0350]	6952.v1.c20	CD	0.605	>50	0.138
	BJOX009000.02.4	CRF01_AE	37.289	>50	>50
	211-9	CRF02_AG	8.840	>50	0.425
	928-28	CRF02_AG	>50	>50	4.696
	T251-18	CRF02_AG	>50	>50	7.395
	T278-50	CRF02_AG	>50	>50	18.276
	263-8	CRF02_AG	24.576	>50	6.527
	235-47	CRF02_AG	1.876	>50	0.163
	A07412M1.vrc12	D	0.406	16.947	0.048
	X1193_c1	G	0.202	11.859	0.475
	X1254_c3	G	0.199	0.222	0.297

[0350] 数字指示在TZM-b1中和测定法中达到IC<sub>50</sub>的以μg/ml计的抗体IgG浓度。IC<sub>50</sub>值是颜色编码的，并且从暗绿色至暗红色标示增加的中和敏感性。>标示在测试的浓度没有达到给定病毒的IC<sub>50</sub>。

[0351] 表13

<b>SHIV<sub>AD8EO</sub></b>							<b>SHIV<sub>DH12-V3AD8</sub></b>						
动物ID	Abs	剂量	受保护的	Abs conc 滴度(TZM- ( $\mu$ g/ml) b1)			动物ID	Abs	剂量	受保护的	Abs conc 滴度(TZM-b1) ( $\mu$ g/ml)		
				第0天	第0天	第0天					第0天	第0天	第0天
RHDEGF	VRC01	50mg/Kg	是	586.9	1:162		RHKJ3	VRC01	30mg/Kg	是	395.8	1:52	
RHDEH3			否	711.0	1:176		RHKZ1			否	306.0	1:70	
RHDEI1L		20mg/Kg	否	206.5	1:85		RHKZA	PGT121	20mg/Kg	是	215.1	1:13120	
RHJEN			否	188.1	1:88		RHKTL			是	200.7	1:13805	
RHKNX	PGT121	20mg/Kg	是	267.9	1:2495		RHPZ9			是	282.7	1:12669	
RHMK4			是	253.6	1:2773		RHKZ2			是	133.1	1:12055	
RHDEUJ		5mg/Kg	是	55.7	1:583		RHM78			否	15.1	1:422	
RHPNR			否	47.2	1:618		RHDEEB			是	29.9	1:599	
RHDCGI		1mg/Kg	是	24.0	1:116		RHDEP2			否	3.1	1:159	
RHKNE			是	19.7	1:55		RHMF2			是	1.6	1:101	
RHK44		0.2mg/Kg	否	1.8	<120		RHKGA			否	1.0	<120	
RHK49			否	1.8	1:17		RHKIM	10-1074	20mg/Kg	否	1.3	<120	
[0352]	RHDEEM	10-1074	20mg/Kg	是	289.8	1:2004	RHKWM			是	290.3	1:1972	
RHKIL			是	257.7	1:2075	RHMJW			是	173.3	1:2282		
RHME1		5mg/Kg	是	112.9	1:633	RHMJT			是	96.6	1:420		
RHPNV			是	117.5	1:384	RHDENI			是	96.3	1:376		
RHPD		1mg/Kg	否	19.9	1:56	RHJHZ			否	28.4	1:106		
RHDCHX			否	24.8	1:53	RHHEB			否	18.6	1:136		
RHPZE	3BNC117	5mg/Kg	是	105.4	1:272	RHKC2			否	19.4	1:39		
RHPM5			是	76.1	1:372	RHMFA	3BNC117	20mg/Kg	是	19.7	1:35		
RHKMH		1mg/Kg	否	39.6	1:55	RHMER			是	294.9	1:143		
RHMJ5			否	15.1	1:75	RHKIV			是	272.7	1:142		
RHPLD	45-46m2	20mg/Kg	否	15.0	1:27	RHKPI			是	114.6	1:80		
RHMA9			否	17.6	<120	RHDEBD			否	133.1	1:90		
RHMC6		5mg/Kg	否	2.3	<120	RHDEW7			是	23.3	1:20		
RHDE0CA			否	2.2	<120	RHMEV			否	29.6	1:18		
RHML1	DEN8	20mg/Kg	否	ND	<120	RHMF9			否	3.9	<120		
RHMAA			否	ND	<120	RHICZMA	45-46m2	5mg/Kg	否	5.7	<120		
						RHKNP			否	2.1	ND		
						RHJII	hu-IgG	100mg/Kg	否	4.0	ND		
						RHJK1			否	ND	ND		

[0353] 表14

样品ID	TZM-b1细胞中的IC <sub>50</sub>								层表型
	S321	C500	B520	G435	T520b	M263	M600c	HIVIG ( $\mu$ g/ml)	
R5 SHIV <sub>DH12-V3AD8</sub>	321	289	77	172	168	429	134	132	2
R5 SHIV <sub>AD8-EO</sub>	48	36	39	31	41	44	48	1768	2
X4 SHIV <sub>DH12-CL7</sub>	110	94	50	65	109	115	65	530	2
HIV-1 <sub>CAAN5342.A2</sub>	84	<20	27	<20	<20	77	185	638	2
HIV-1 <sub>MN 3</sub>	13944	9152	822	8432	3968	43722	1709	1.81	1

[0355] 数值是相对于病毒对照孔(无测试样品)相比相对发光单位(RLU)降低50%的血清稀释度。

表15

[0356]

表15

SHIVADBE0

终点中和 血浆中的滴度	动物数目		累积数值		受保护的 比率 %
	受保护的 1	感染的 0	受保护的 12	感染的 <sup>b</sup> 0	
2773	1	0	11	0	12/12 100%
2495	1	0	10	0	11/11 100%
2075	1	0	9	0	10/10 100%
2004	1	0	8	0	9/9 100%
633	1	0	7	1	8/8 100%
618	0	1	6	1	7/8 88%
563	1	0	6	1	7/8 88%
384	1	0	6	1	6/7 86%
372	1	0	5	1	5/6 83%
272	1	0	4	1	4/5 80%
176	0	1	3	2	3/5 60%
162	1	0	3	2	3/5 60%
115	1	0	2	2	2/4 50%
75	0	1	1	3	1/4 25%
68	0	1	1	4	1/5 20%
65	0	1	1	5	1/6 17%
56	0	1	1	6	1/7 14%
55	1	0	1	6	1/7 14%
55	0	1	0	7	0/7 0%
53	0	1	0	8	0/8 0%
27	0	1	0	9	0/9 0%
20	0	1	0	10	0/10 0%
20	0	1	0	11	0/11 0%
20	0	1	0	12	0/12 0%
20	0	1	0	13	0/13 0%
17	0	1	0	14	0/14 0%

<sup>a</sup>从底部起的总数<sup>b</sup>从顶部起的总数

c终点保护滴度(50%阳性滴度)计算为1:115

表16

[0357]

SHIV/DH12-Y3A08	终点中和 血浆中的滴度	动物数目		累积数值	受保护的 感染的 <sup>a</sup>	受保护的 比率	%受保护的
		受保护的	感染的				
13805	1	0	16	0	0	16/16	100%
13120	1	0	15	0	15/15	100%	100%
12669	1	0	14	0	14/14	100%	100%
12055	1	0	13	0	13/13	100%	100%
2282	1	0	12	0	12/12	100%	100%
1972	1	0	11	0	11/11	100%	100%
539	0	1	10	1	10/11	91%	91%
422	1	0	10	1	10/11	91%	91%
420	1	0	9	1	9/10	90%	90%
376	1	0	8	1	8/9	89%	89%
159	1	0	7	1	7/8	88%	88%
143	1	0	6	1	6/7	86%	86%
142	1	0	5	1	5/6	83%	83%
136	0	1	4	2	2/4	50%	67%
106	1	0	4	2	2/4	50%	67%
101	1	0	3	2	2/3	67%	67%
90	0	1	2	2	2/5	40%	40%
80	1	0	2	1	1/2	50%	50%
70	0	1	1	1	1/2	50%	50%
52	1	0	1	1	1/2	50%	50%
39	0	1	0	0	0/5	0%	0%
35	0	1	0	0	0/6	0%	0%
20	0	0	1	0	0/7	0%	0%
20	0	0	0	0	0/8	0%	0%
20	0	0	0	0	0/9	0%	0%
20	0	0	0	0	0/10	0%	0%
20	0	0	0	0	0/11	0%	0%
20	0	0	0	0	0/12	0%	0%
20	0	0	0	0	0/13	0%	0%

<sup>a</sup>从底部起的总数  
<sup>b</sup>从顶部起的总数  
<sup>c</sup>终点保护滴度(50%阳性滴度)计算为1:95.5

表16

[0358] 表17

动物	感染后 的周	感染前		mAb处理前		临床状态
		CD4+ T细胞 细胞/ $\mu$ l	CD4+ T细胞 细胞/ $\mu$ l	病毒负荷 RNA 拷贝 /ml		
[0359]	DBZ3	159	650	118	1.08E+04	无症状的
	DC99A	159	623	165	7.60E+03	无症状的
	DBXE	163	1585	158	1.96E+05	间歇的
	DCF1	157	1203	105	1.44E+05	间歇的
	DCM8	163	608	43	1.59E+03	间歇的

[0360] 表18

动物	处理时间 (天)	每10 <sup>8</sup> 个细胞Eq 的SIV Gag RNA 拷贝	每10 <sup>8</sup> 个细胞Eq 的SIV Gag RNA 拷贝
DBZ3	0	9000	6700
DBZ3	10	360	7500
DBZ3	20	2400	14000
DC99A	0	31000	1400
DC99A	14	18000	5600
DC99A	20	8100	2700
[0361]			
DBXE	0	470000	71000
DBXE	14	17000	33000
DBXE	17	11000	22000
DCM8	0	110000	8600
DCM8	14	1700	1600
DCM8	20	22000	6600
DCF1	0	240000	15000
DCF1	14	190000	11000
DCF1	20	1100000	14000

[0362] 优选实施方案的前述实施例和描述应当解释为例示的,而非限制本发明,如由权利要求书限定的。如应当容易领会的,可以在不背离如权利要求书中列出的本发明的前提下利用上文列出的特征的多种变型和组合。认为此类变型不偏离本发明的范围,并且所有此类变型意图包括在所附权利要求书的范围内。通过提及将本文中引用的所有参考文献完整收入本文。

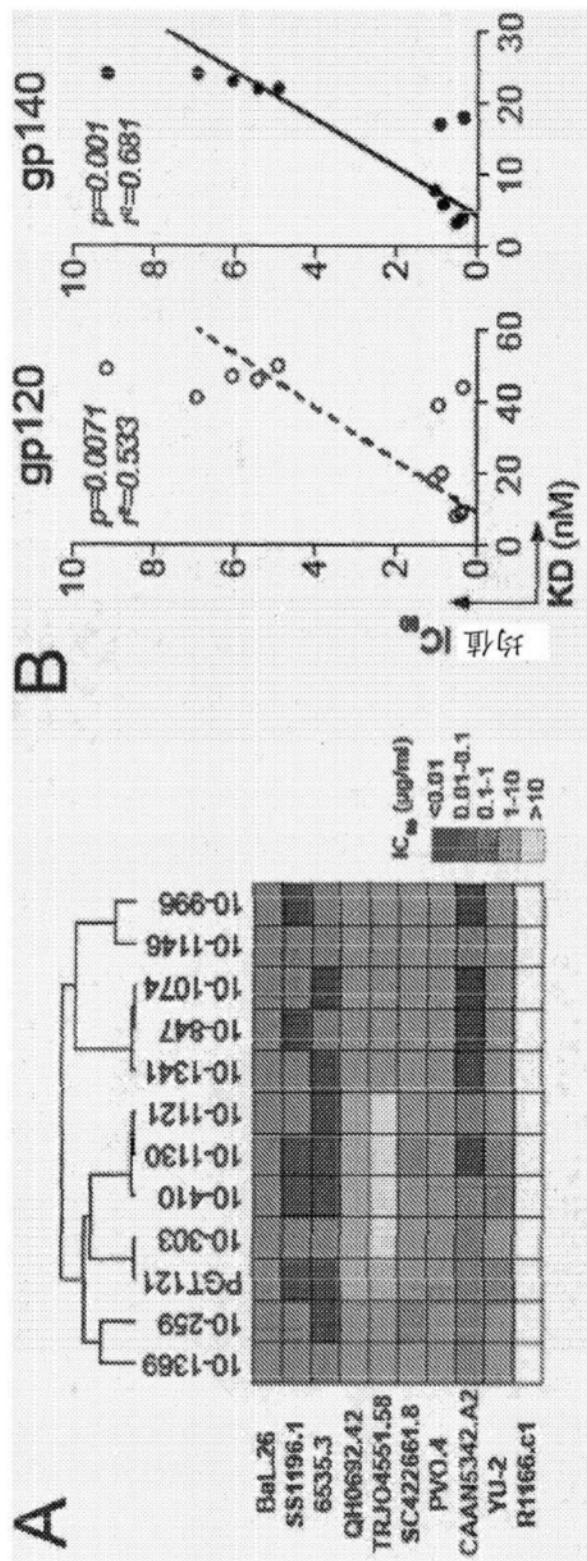


图1

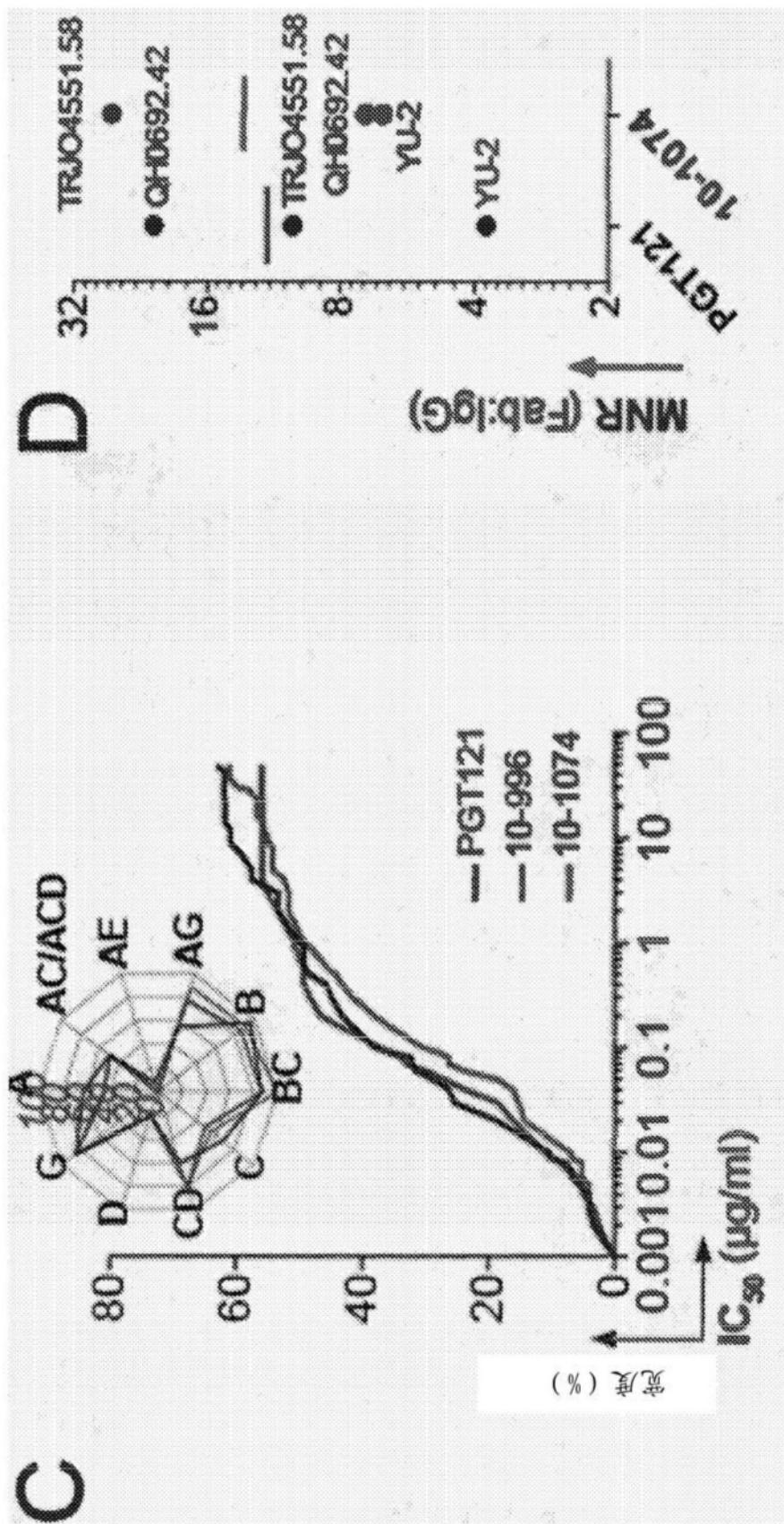


图1(续)

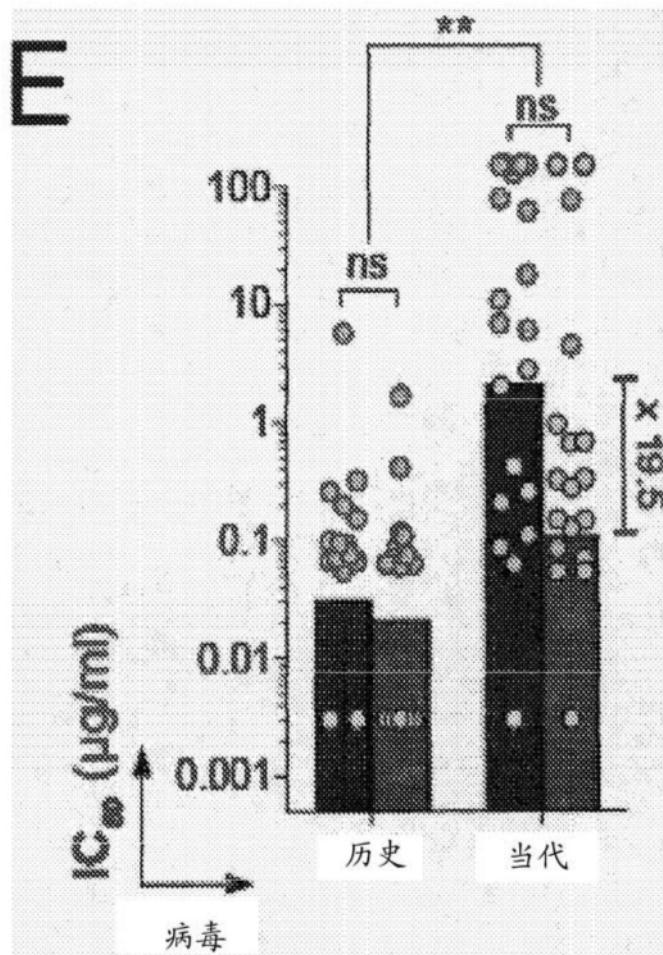


图1(续)

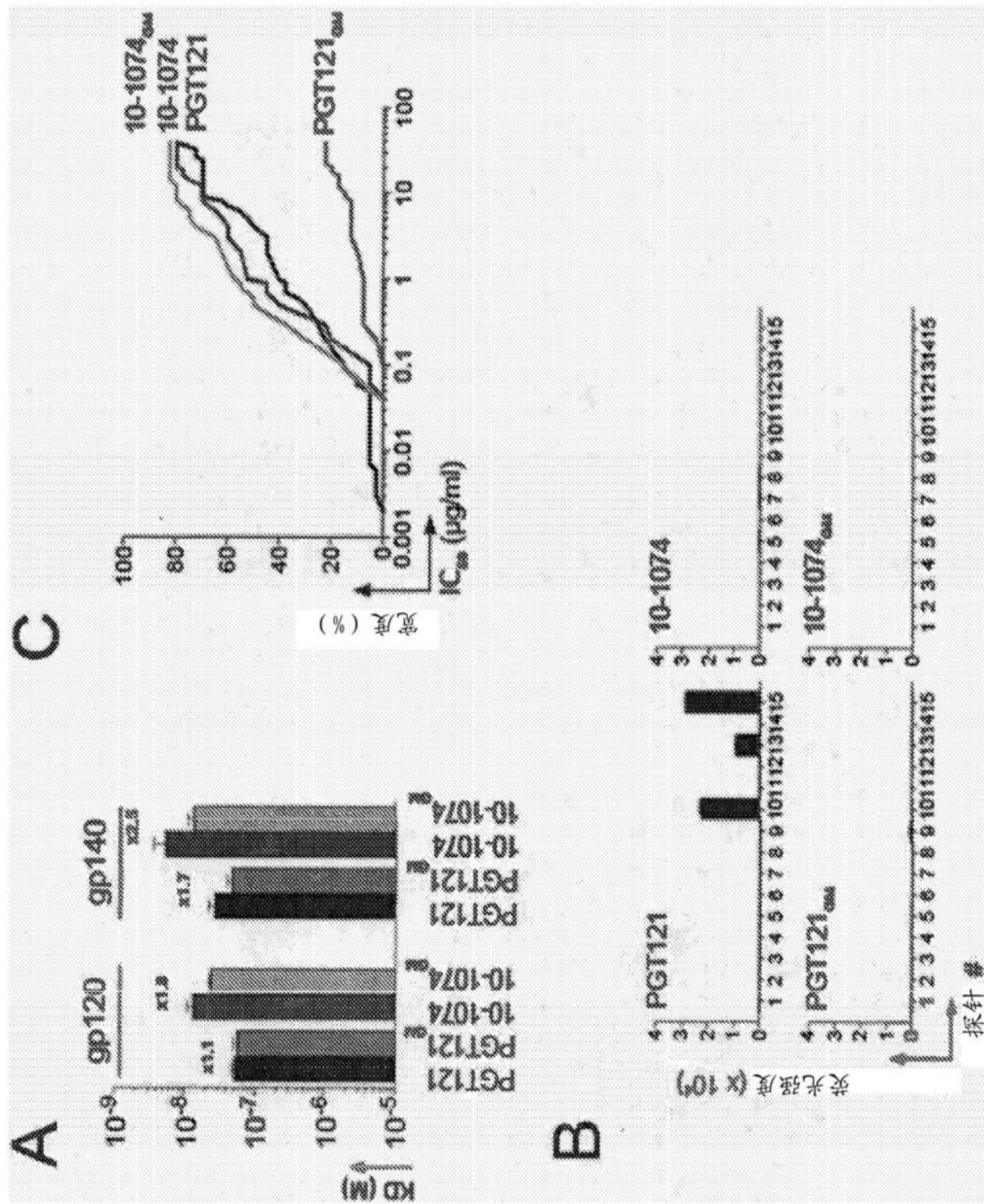


图2

A Kabat MGT	FWR1		CDR1		FWR2		CDR2		FWR3		CDR3		FWR4		CDR4	
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
92-3847	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
92-1341	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
92-1024	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
92-3146	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
92-3896	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG1-3369	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG1-122	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG2-265	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG3-1123	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG3-1128	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG3-1121	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG4-410	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG5-121	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG6-308	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
PG7-300	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

图3

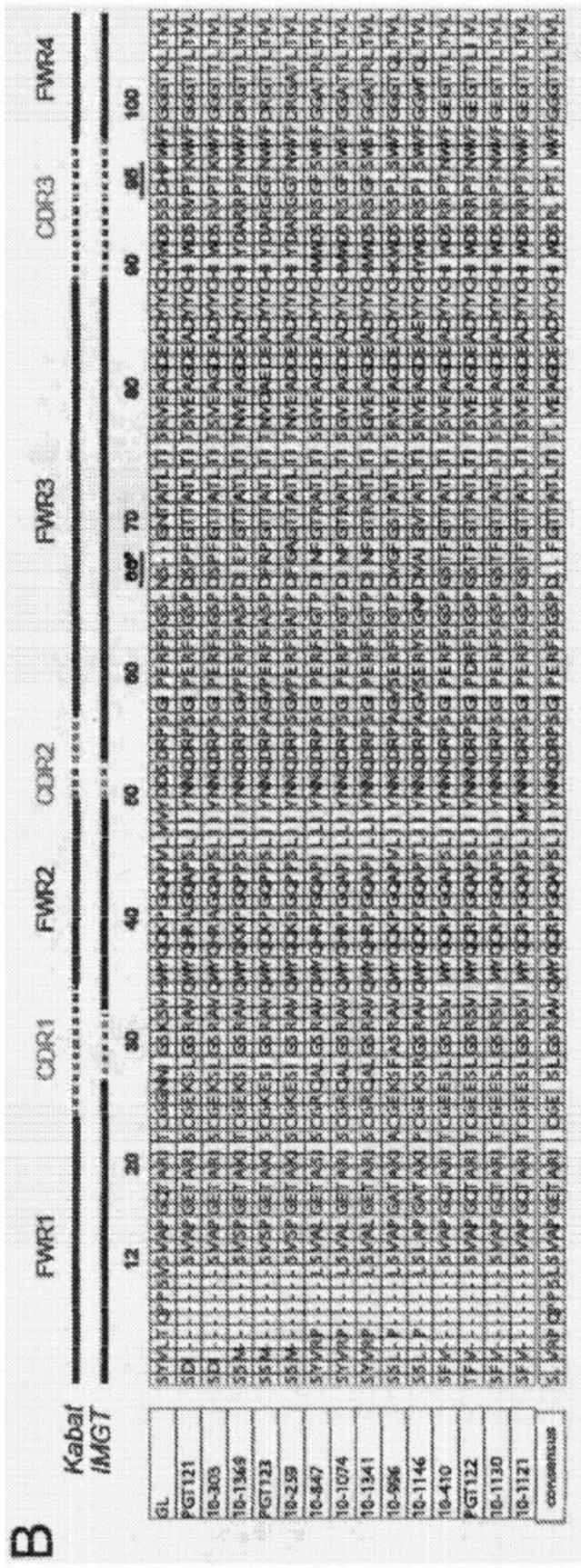
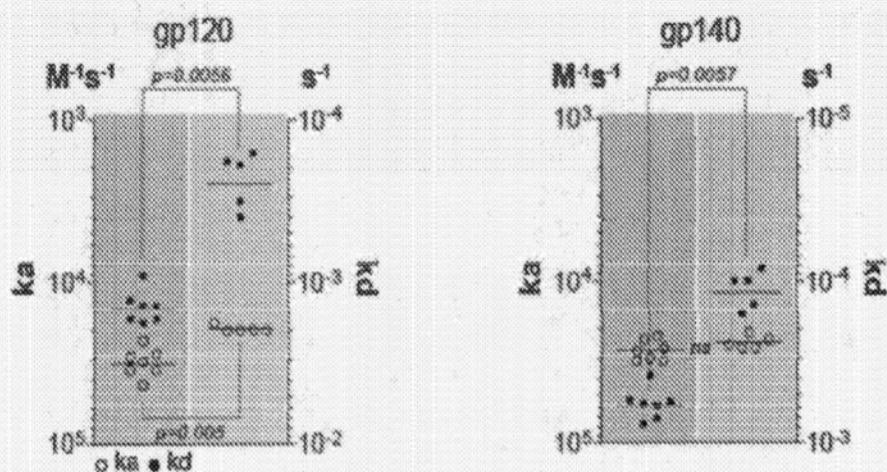


图3(续)

A

	gp120				gp140					
	ka (Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KA (M-1)	$\chi^2$ (RUP)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KA (M-1)	$\chi^2$ (RUP)
10-259	2.9E+04	1.3E-03	4.4E-08	2.3E+07	4.7E-01	3.0E+04	5.5E-04	1.8E-08	5.5E+07	1.6E+00
10-303	4.3E+04	1.0E-03	4.1E-08	2.4E+07	3.1E-01	2.2E+04	5.4E-04	2.4E-08	4.2E+07	7.9E-01
10-410	3.5E+04	1.7E-03	4.7E-08	2.1E+07	4.9E-01	3.1E+04	7.0E-04	2.3E-08	4.4E+07	1.4E+00
10-847	2.0E+04	1.8E-04	8.9E-09	1.1E+08	1.6E+00	2.6E+04	1.0E-04	3.9E-09	2.6E+08	3.0E+00
10-996	1.8E+04	3.2E-04	1.8E-08	5.5E+07	7.5E-01	2.1E+04	1.6E-04	7.8E-09	1.3E+08	1.4E+00
10-1074	2.0E+04	1.9E-04	9.5E-09	1.1E+08	1.4E+00	2.6E+04	1.0E-04	4.0E-09	2.5E+08	2.9E+00
10-1121	3.1E+04	1.4E-03	4.6E-08	2.2E+07	4.4E-01	2.7E+04	5.9E-04	2.2E-08	4.6E+07	1.4E+00
10-1130	3.5E+04	1.7E-03	4.9E-08	2.0E+07	4.3E-01	3.1E+04	7.6E-04	2.4E-08	4.1E+07	1.4E+00
10-1146	2.0E+04	4.0E-04	2.0E-08	4.9E+07	1.1E+00	2.3E+04	1.4E-04	5.8E-09	1.7E+08	2.6E+00
10-1341	2.0E+04	1.6E-04	8.2E-09	1.2E+08	1.5E+00	2.5E+04	8.3E-05	3.3E-09	3.1E+08	4.0E+00
10-1369	2.3E+04	9.1E-04	3.9E-08	2.6E+07	7.0E-01	2.3E+04	3.8E-04	1.7E-08	6.0E+07	1.6E+00
PGT121	2.8E+04	1.4E-03	5.0E-08	2.0E+07	4.0E-01	2.6E+04	5.7E-04	2.2E-08	4.6E+07	1.5E+00
GL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

B



C

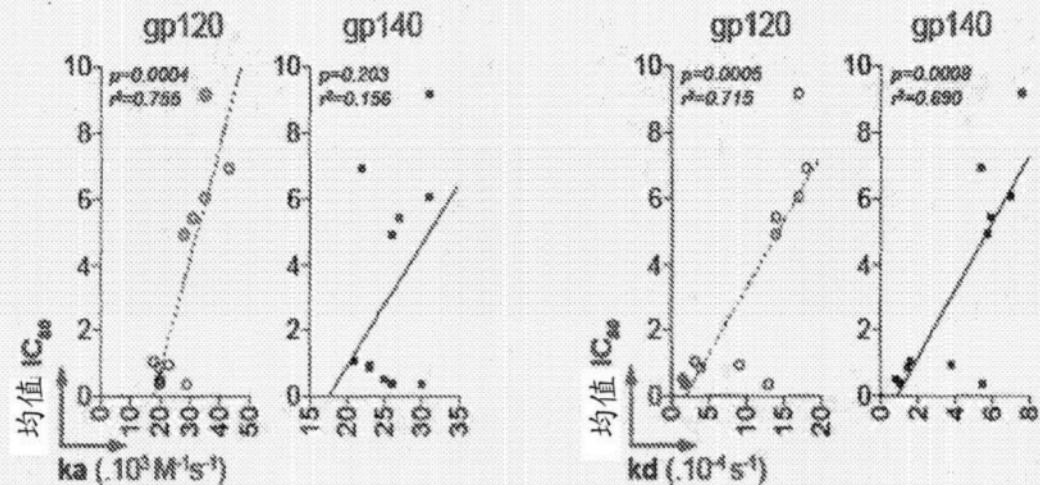


图4

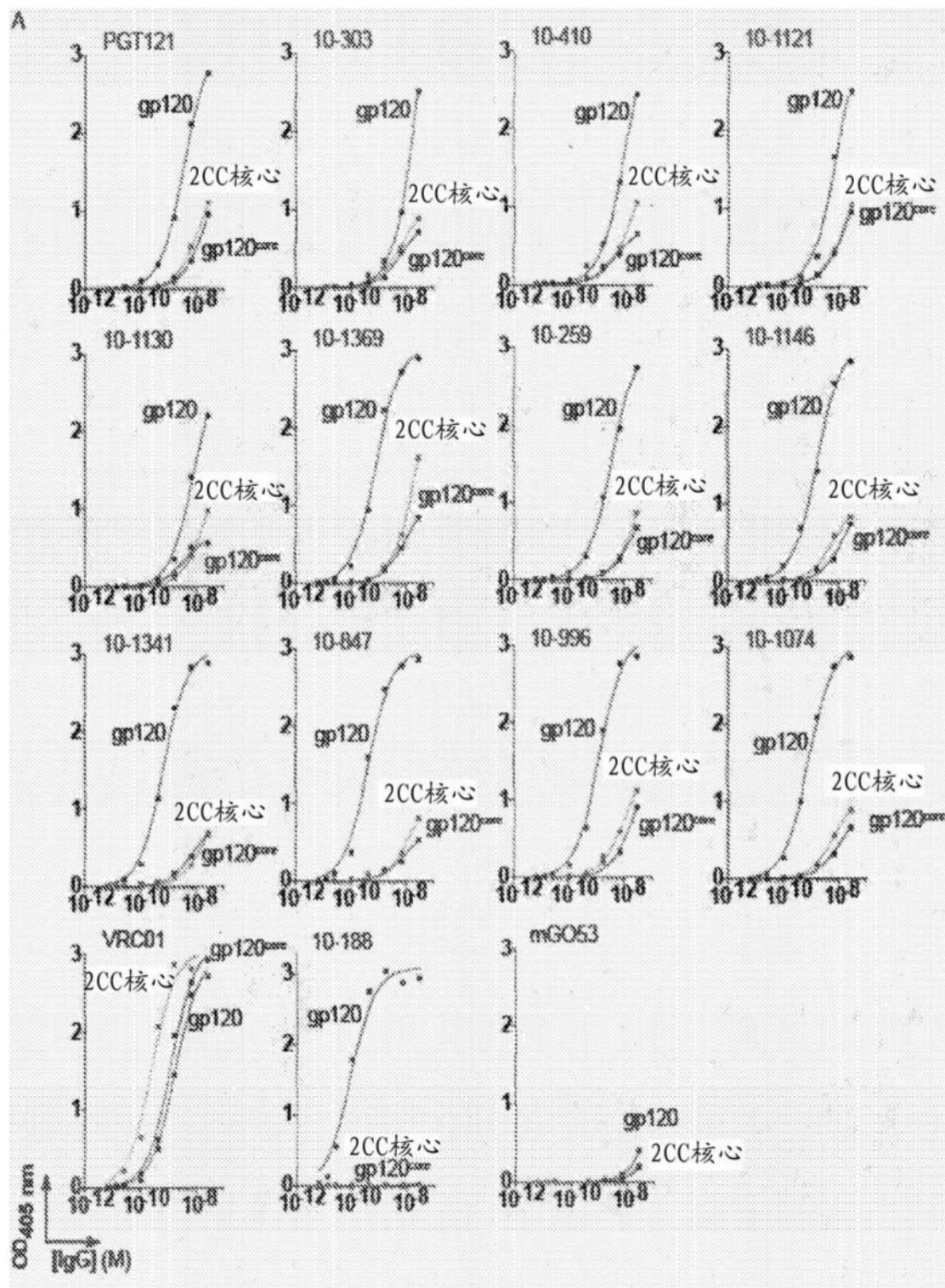


图5

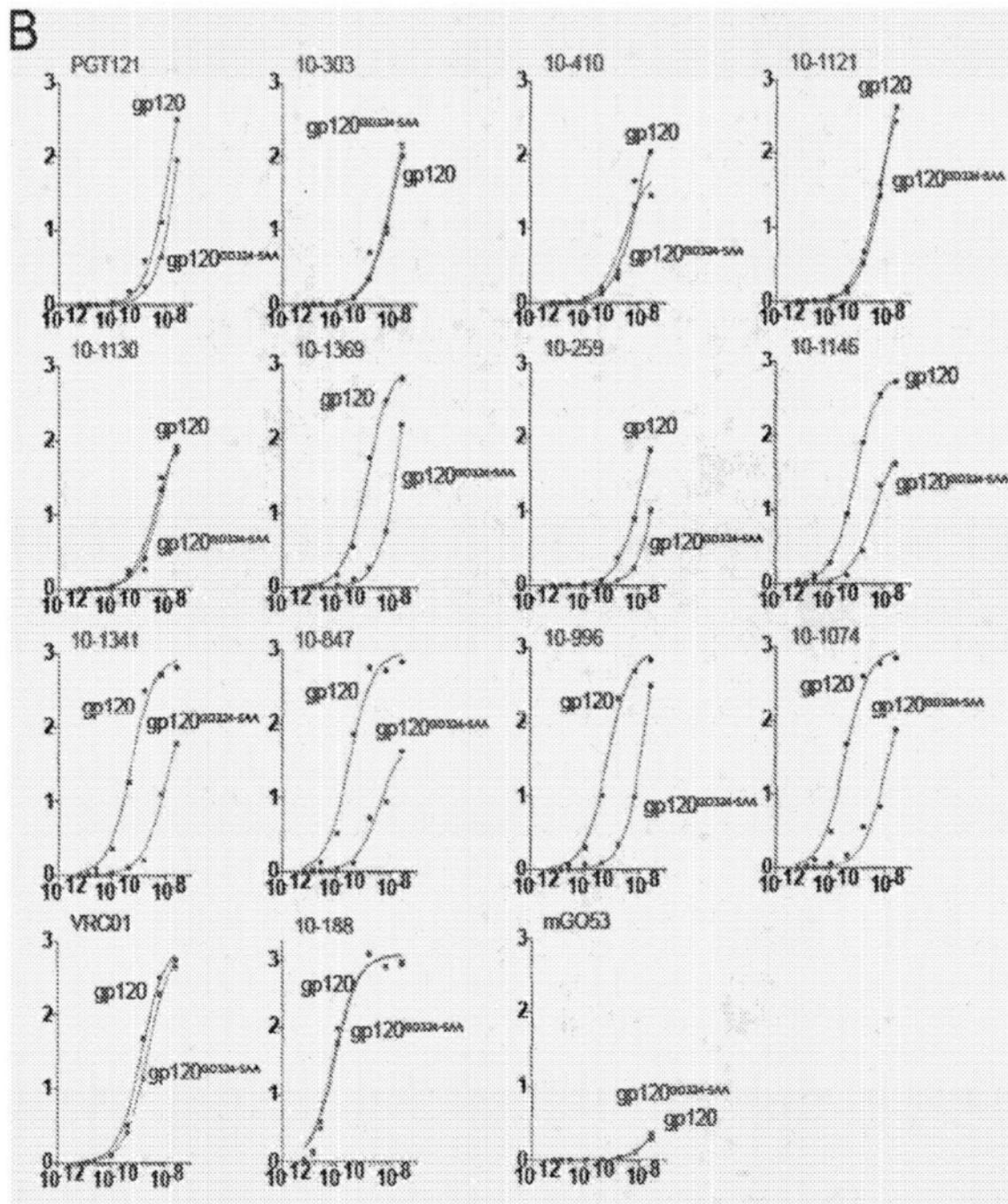


图5(续)

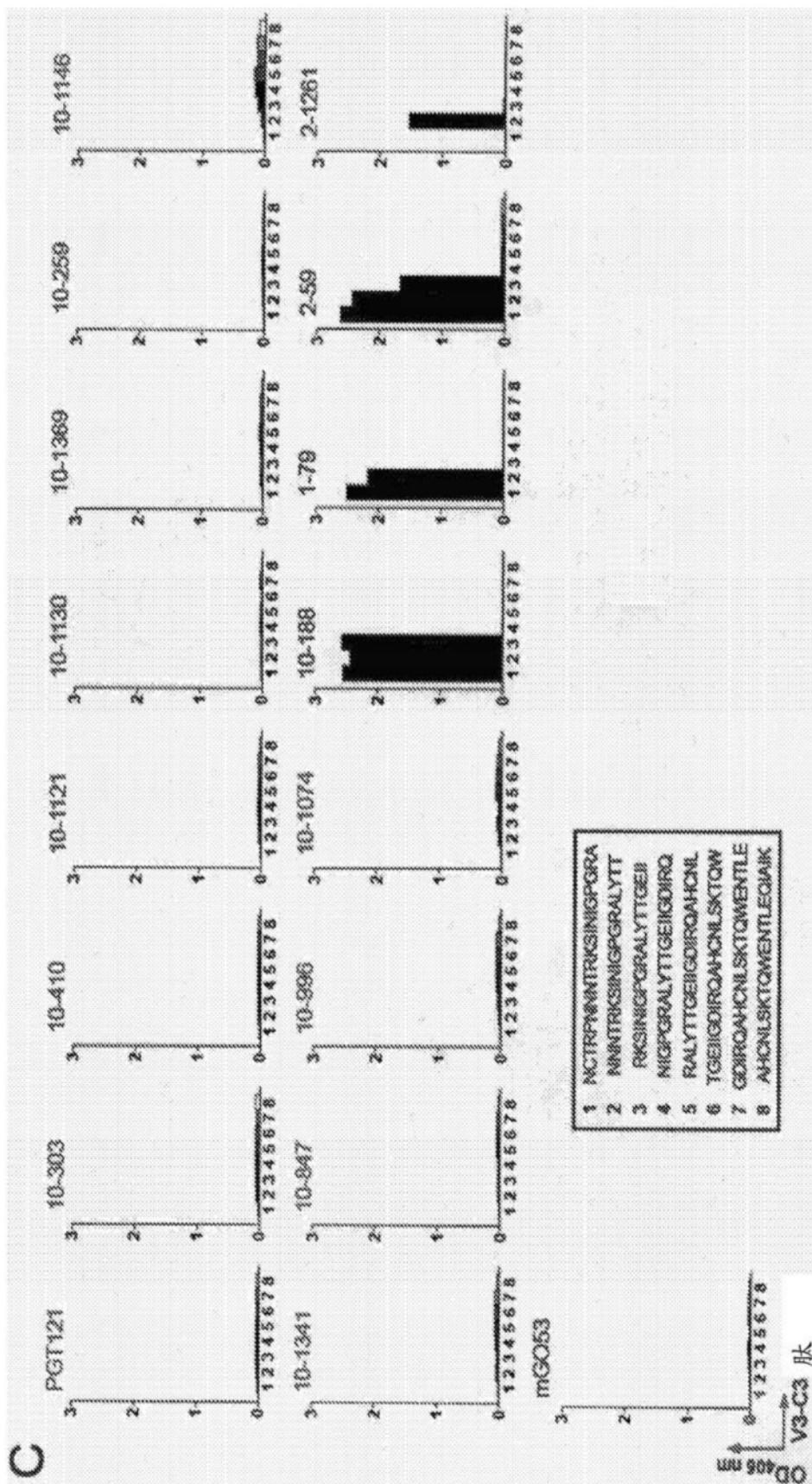


图5(续)

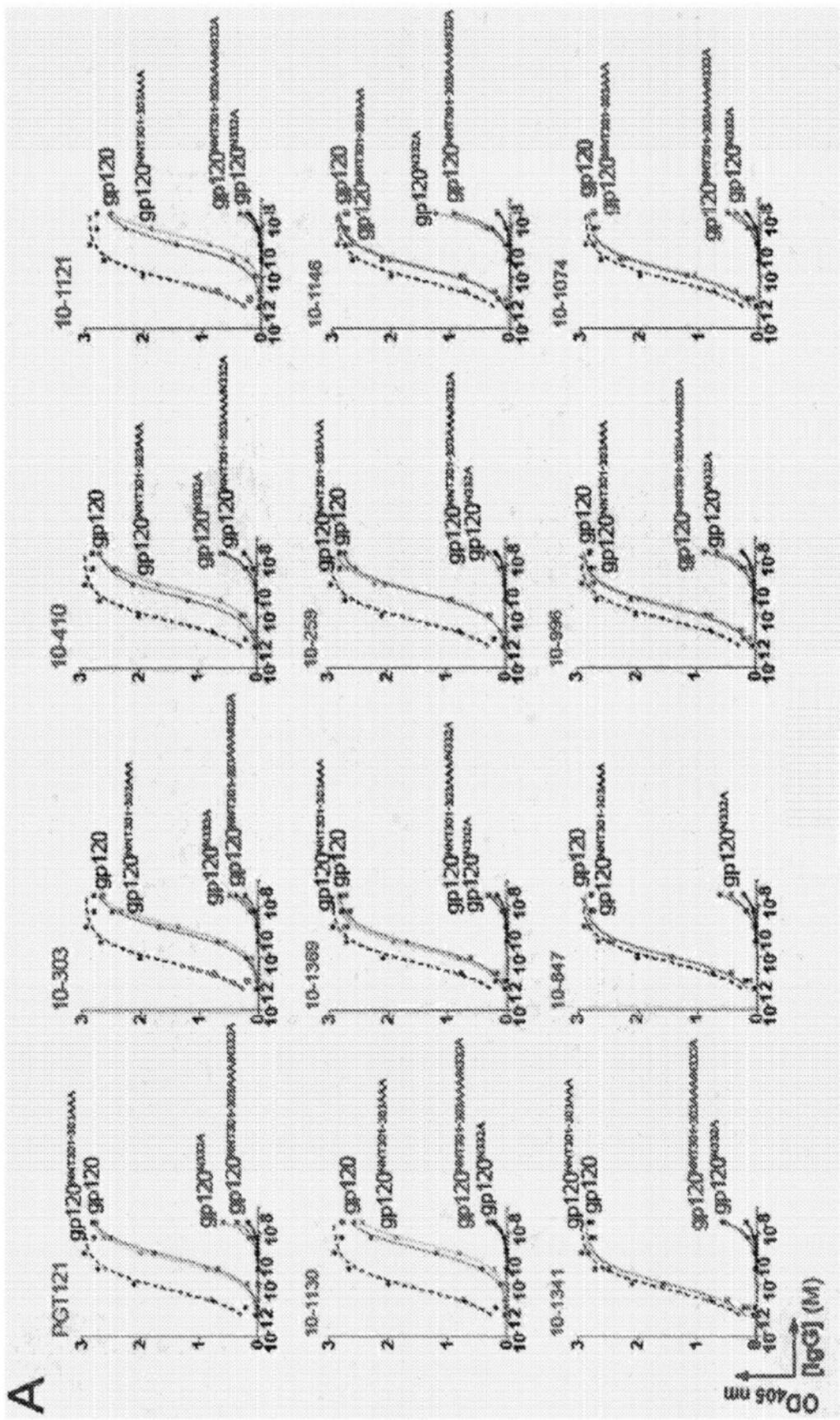


图6

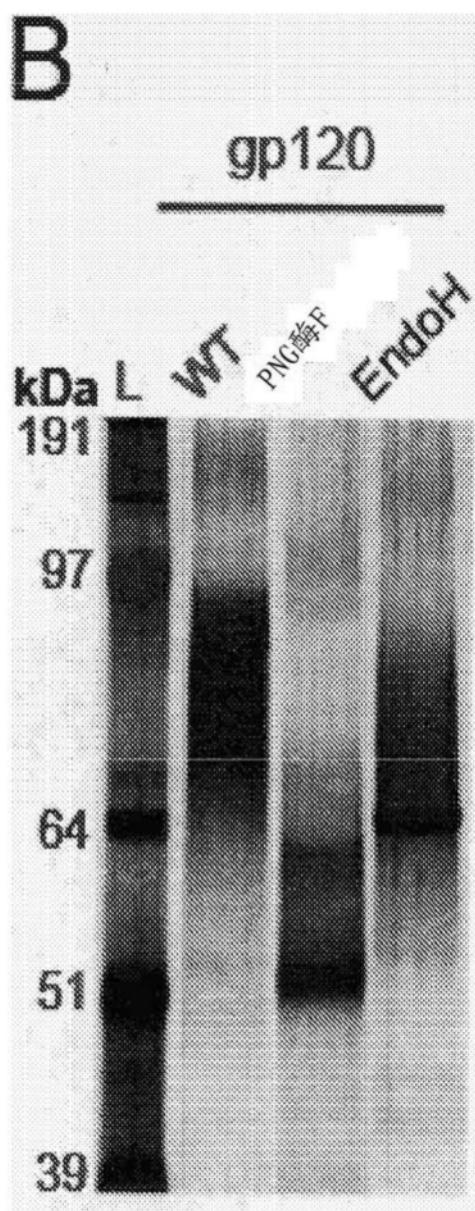


图6(续)

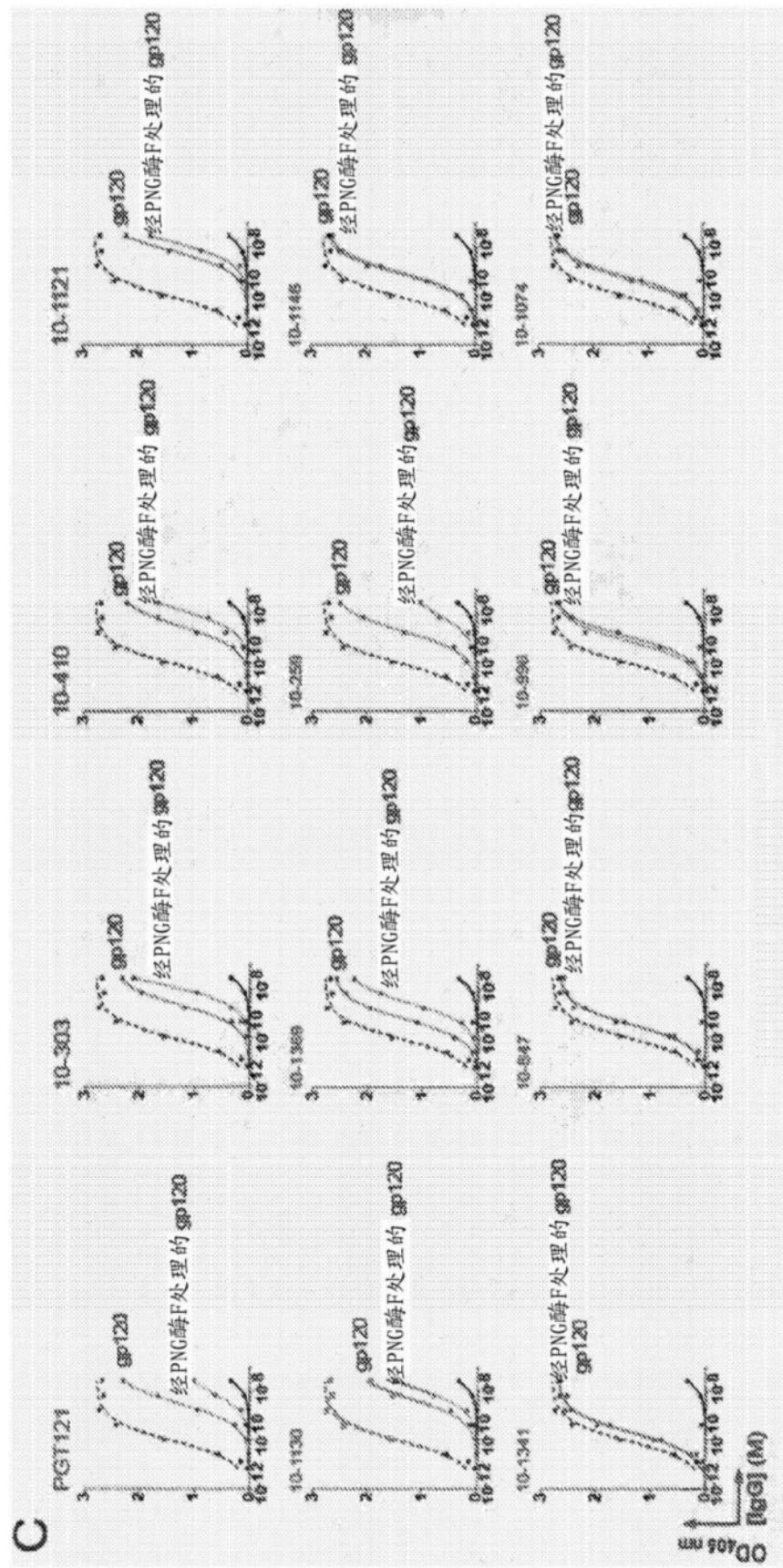


图6(续)

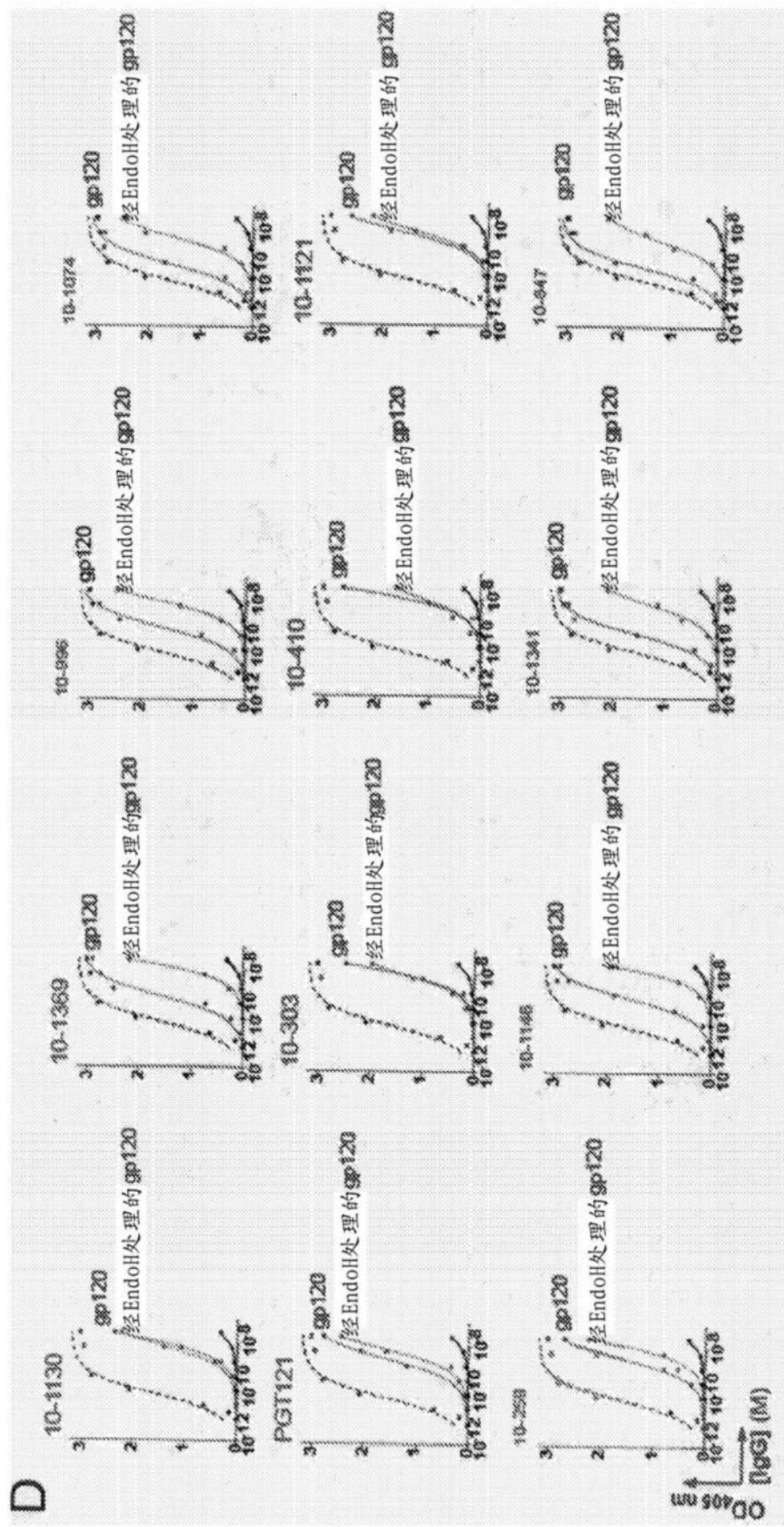


图6(续)

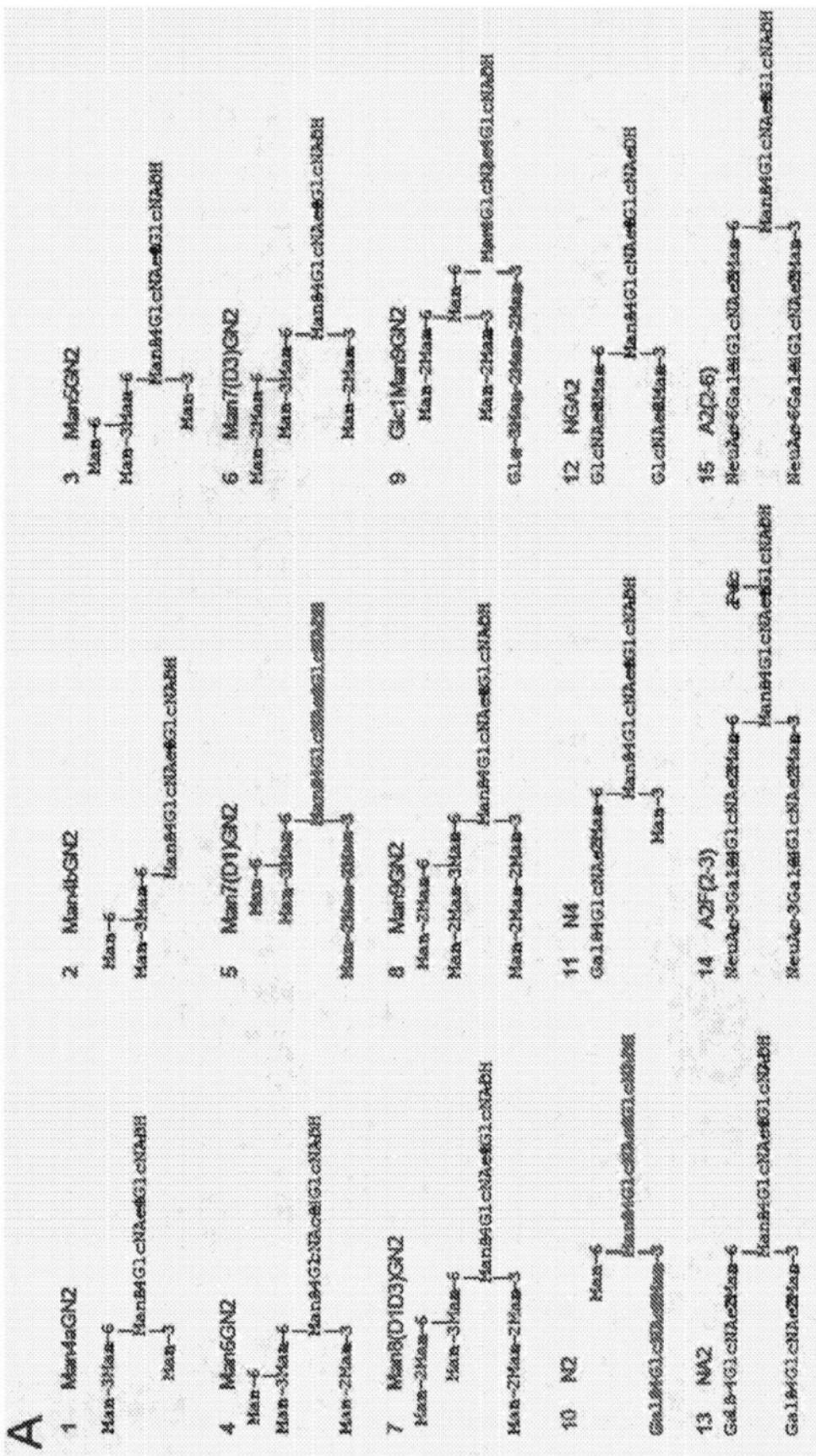


图7

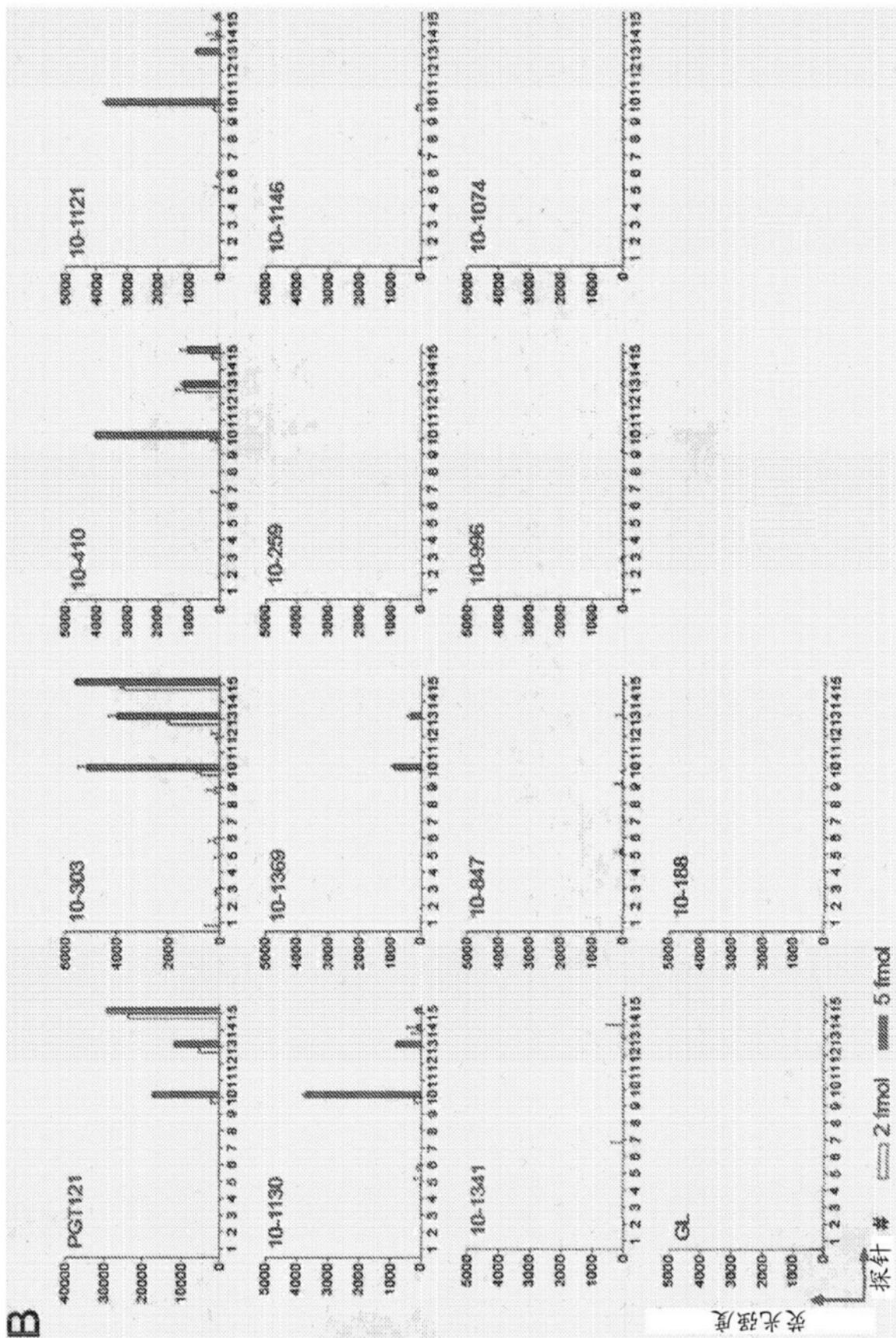


图7(续)

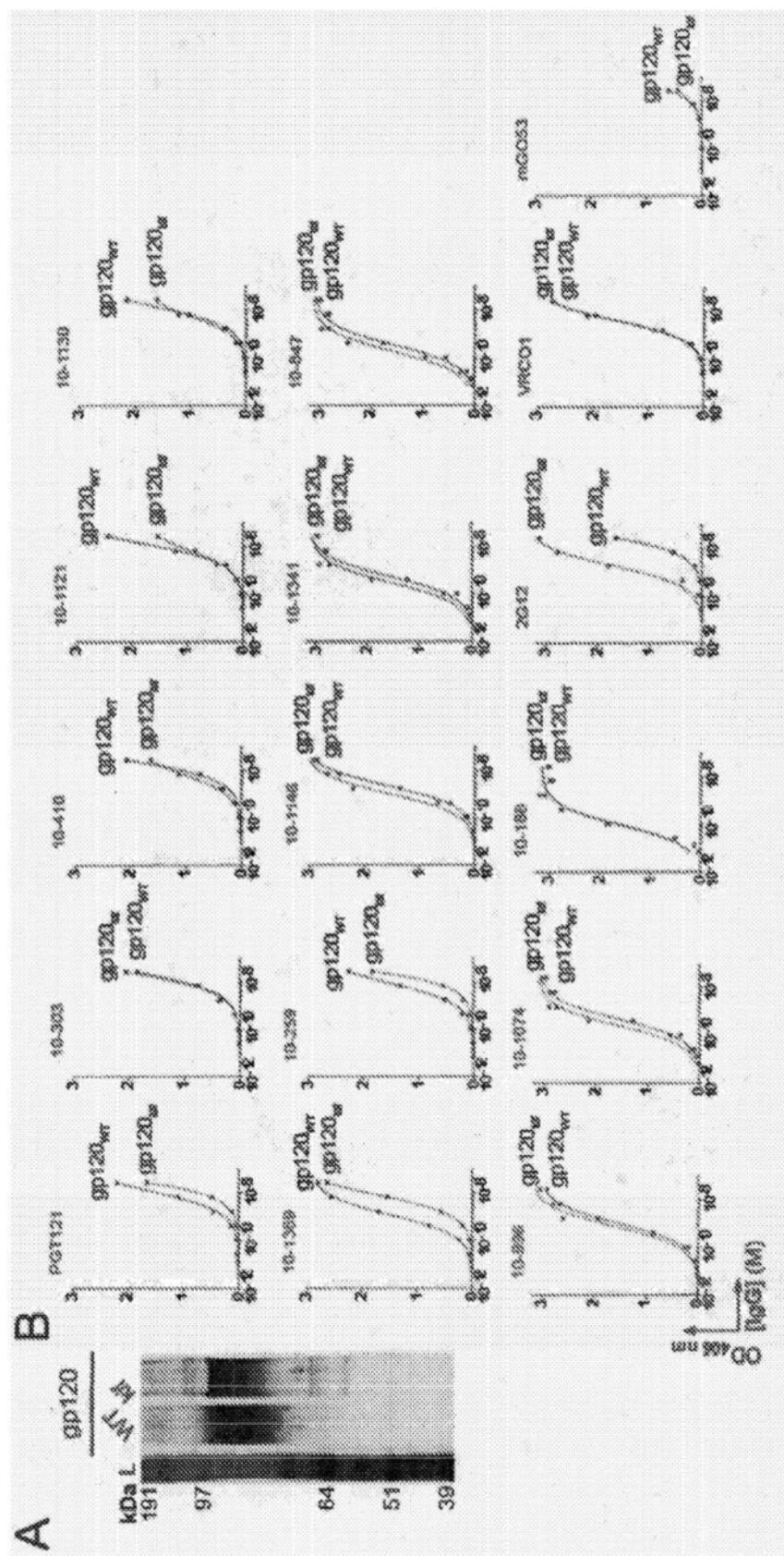


图8

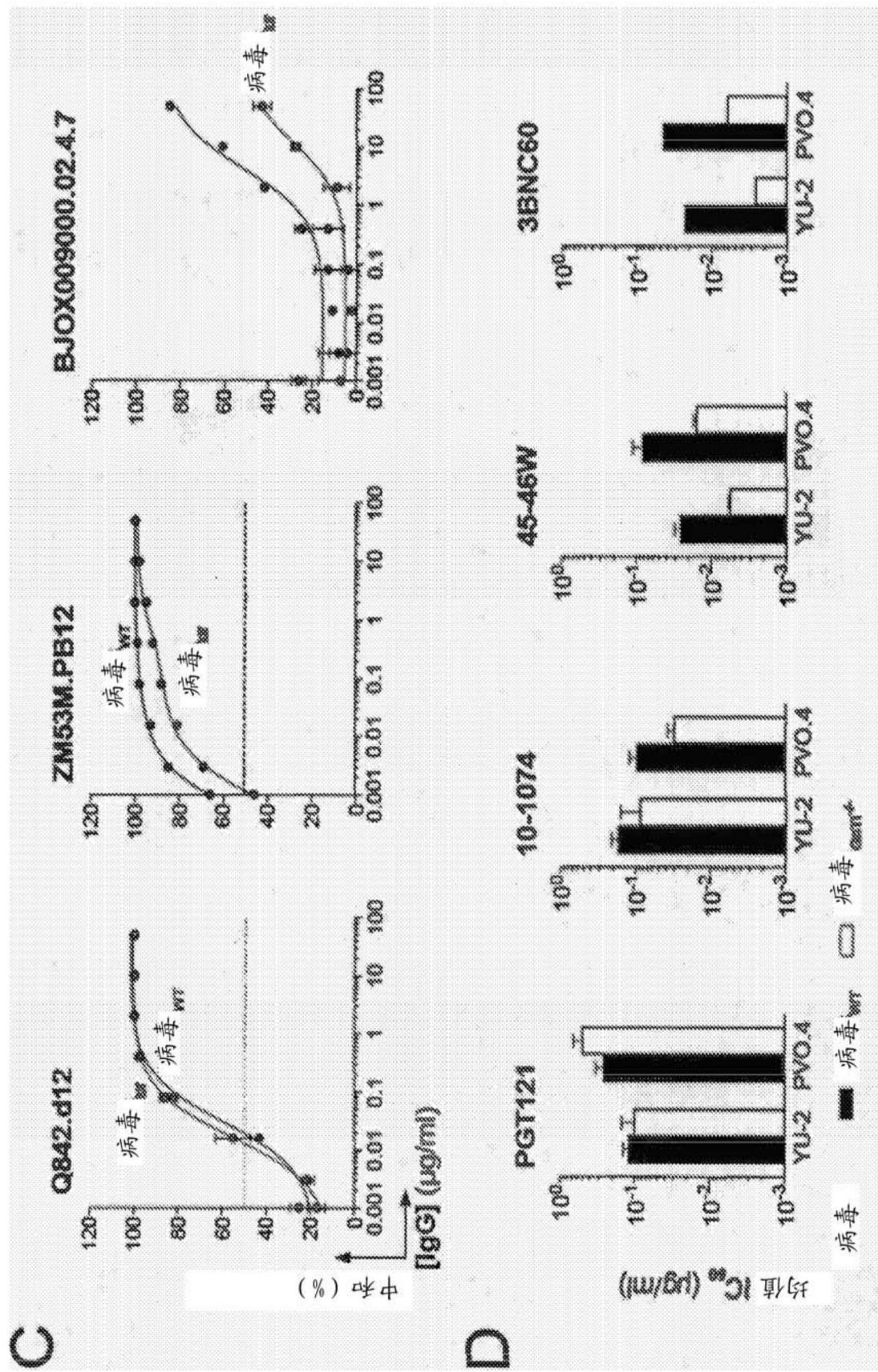


图8(续)

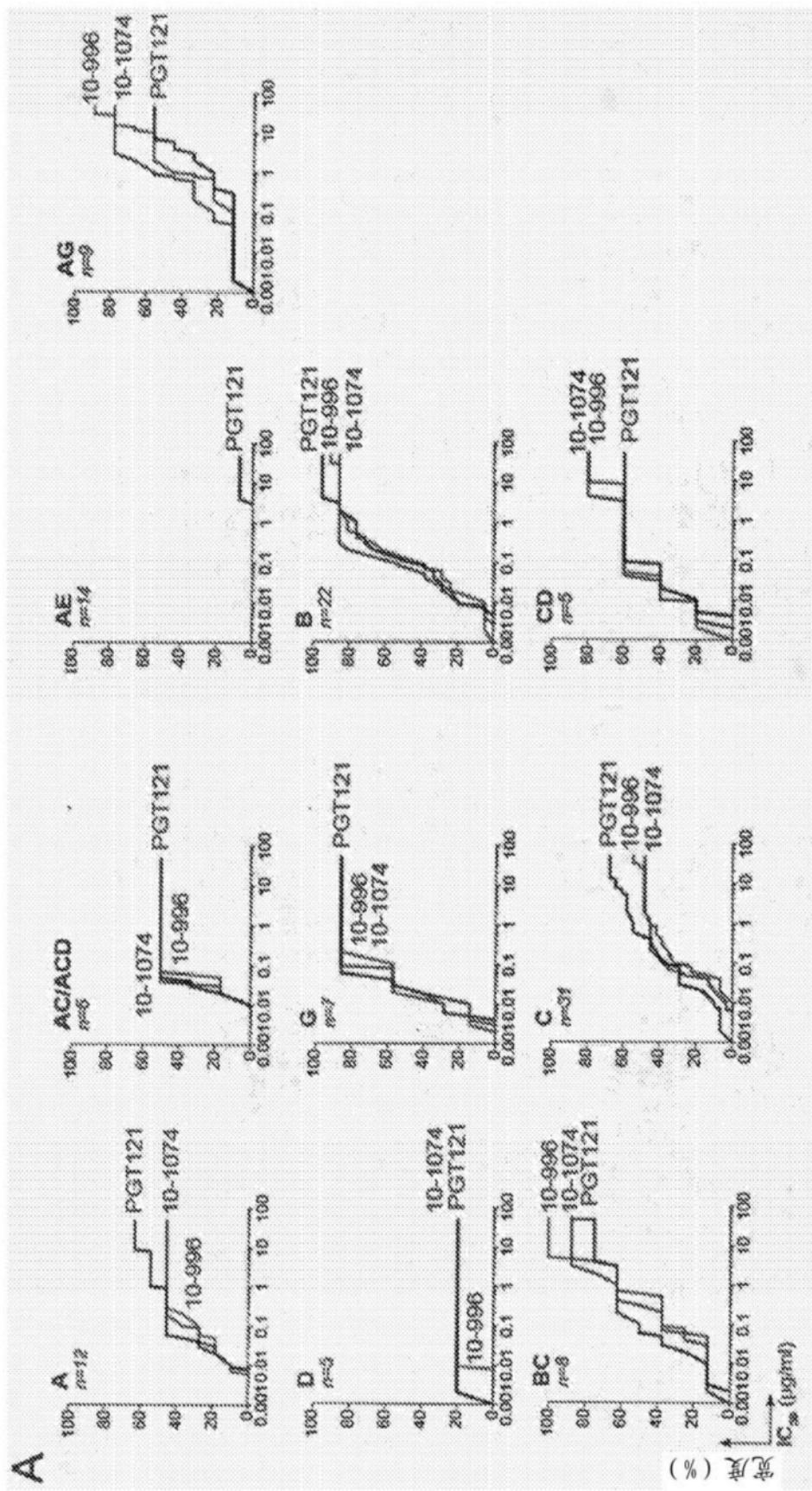


图9

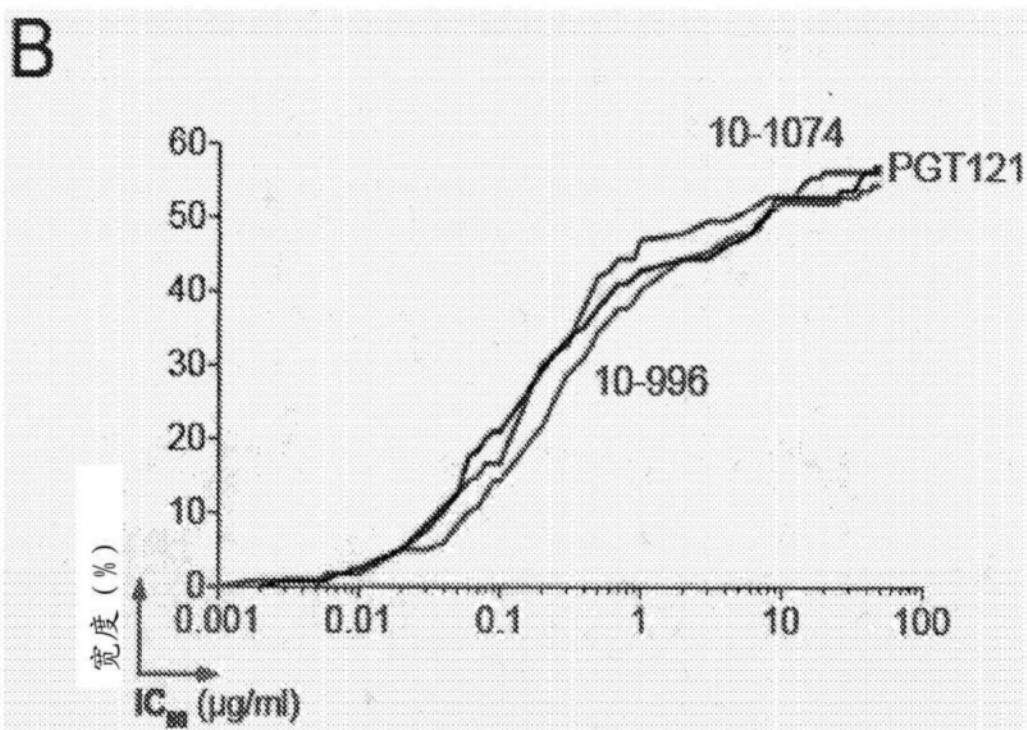


图9(续)

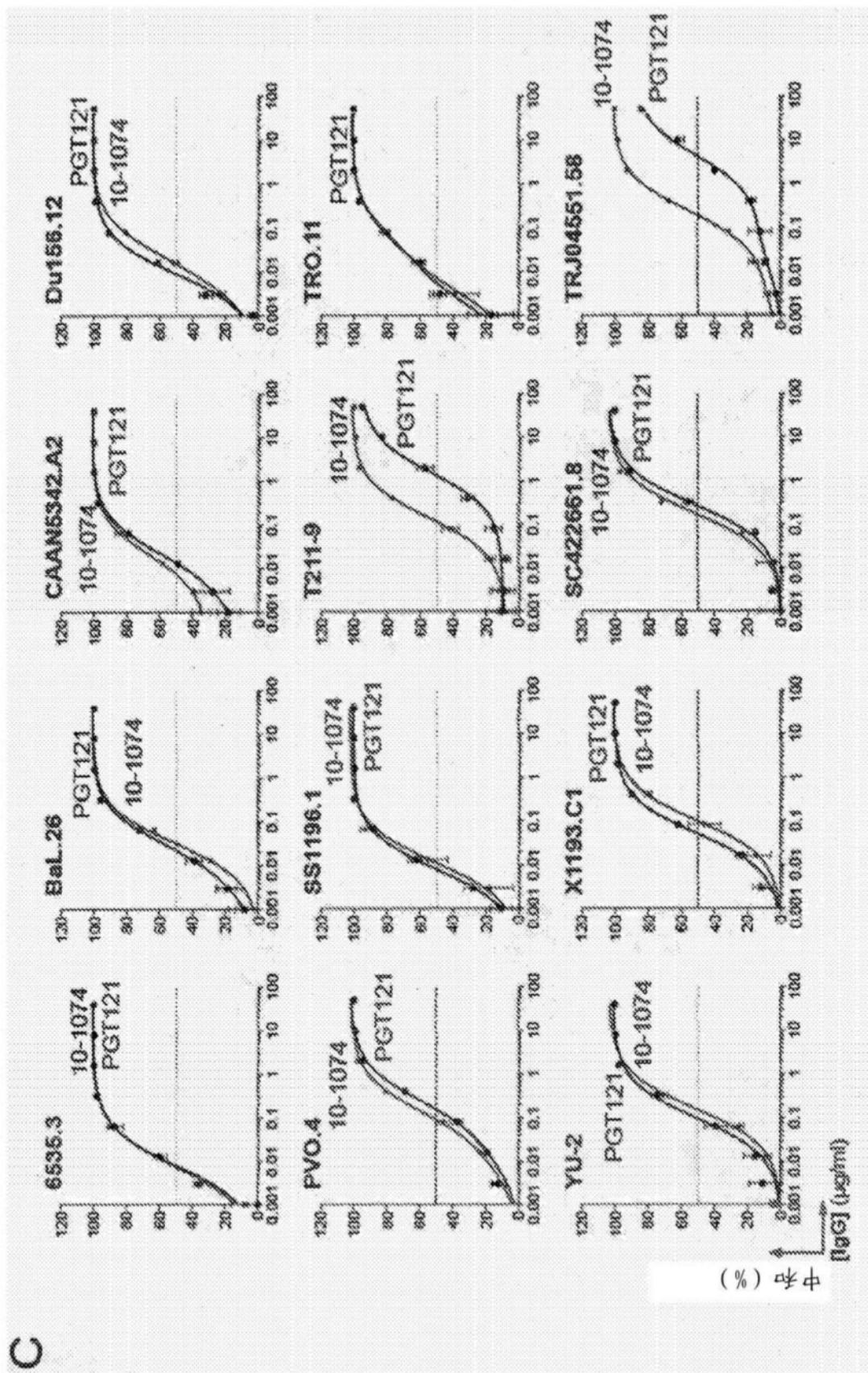


图9(续)

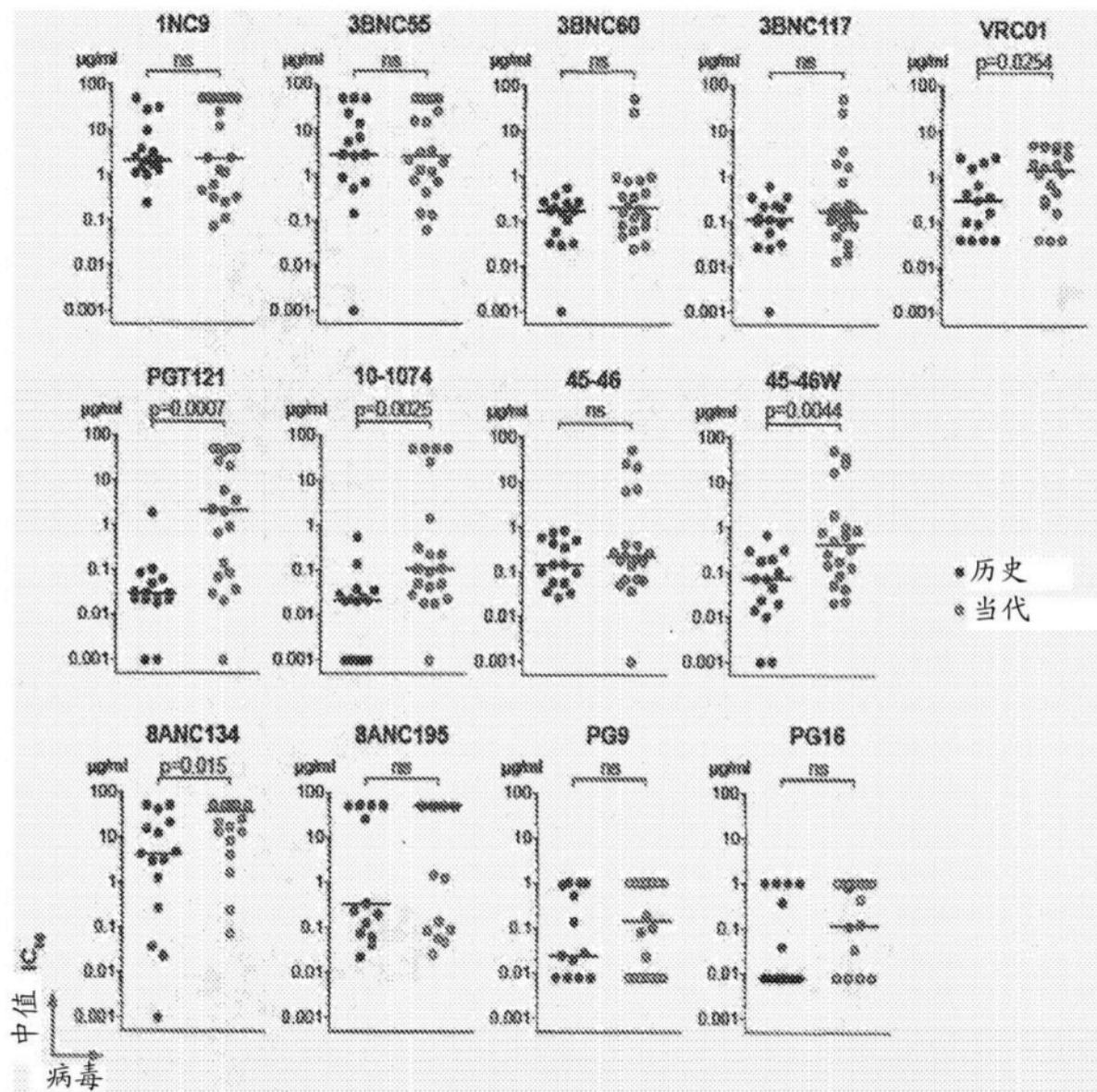


图10

**A**

IC50 TZM-bl (μg/ml)	
VRC01	0.94
NIH 45-46	0.92
45-46m2	0.29
45-46 G54W	0.28
3BNC117	0.14
12A12	6.36
1NC9	2.04
8ANC195	3.38
10-1074	0.15
PGT-121	0.10
PGT-126	0.09

**B**

IC50 TZM-bl (μg/ml)	
VRC01	2.35
NIH 45-46	1.48
45-46m2	0.52
45-46 G54W	0.44
3BNC117	0.39
12A12	86.27
1NC9	30.26
8ANC195	3.08
10-1074	0.06
PGT-121	0.01
PGT-126	0.16

图11

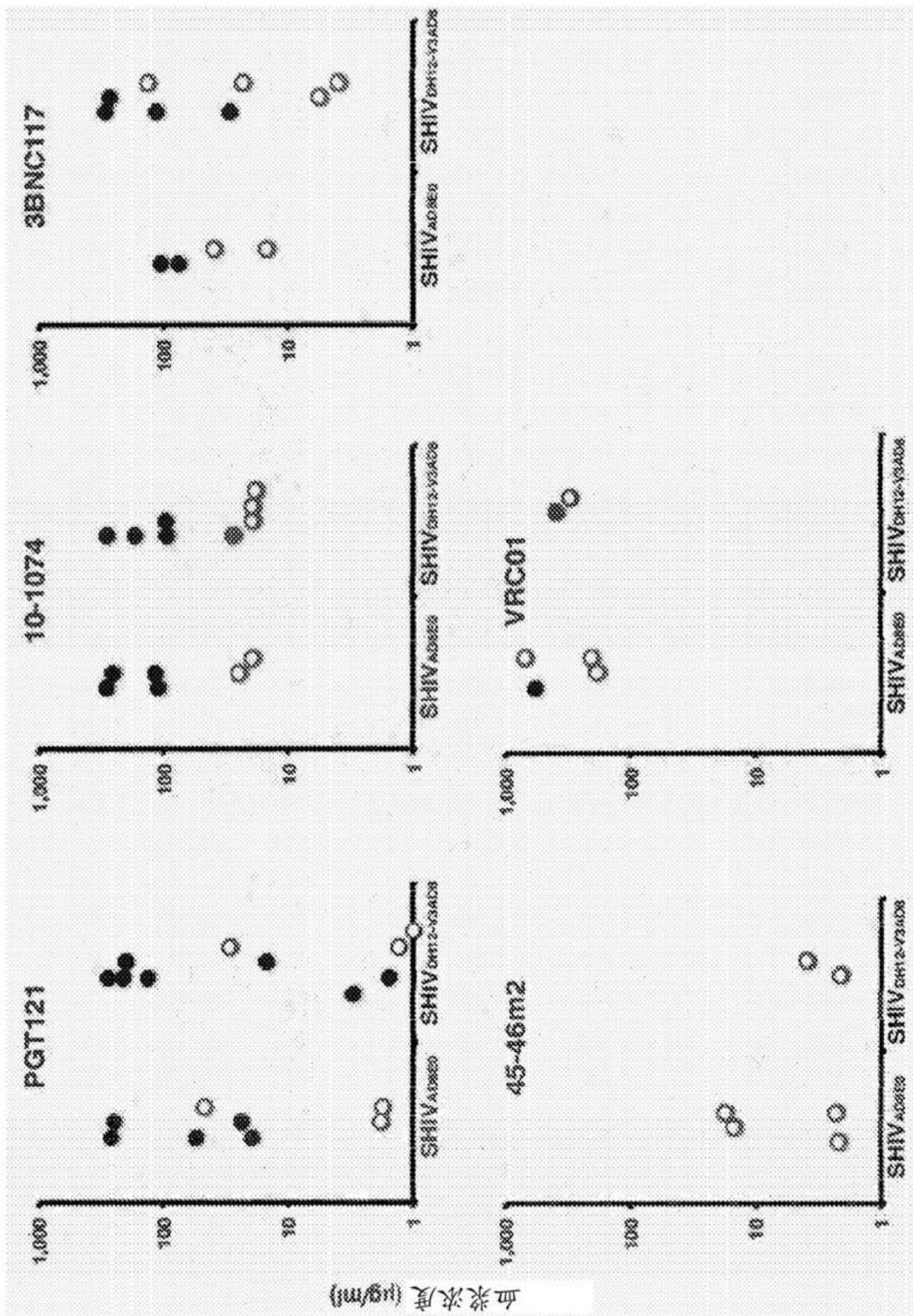


图12

**a**

	ID <sub>50</sub> (μg/ml)	
	10-1074	3BNC117
X2088_9	0.013	>100
Q769_d22	>100	0.024

**b**

血浆 + mAb	血清 ID <sub>50</sub> 滴度		转化成10-1074和3BNC117的相应抗体浓度的血清 ID <sub>50</sub> 滴度 (μg/ml)	
	X2088_9	Q769_d22	X2088_9	Q769_d22
preP_0.01_3BNC117	<20	<20	<0.26	<0.48
preP_0.1_3BNC117	<20	<20	<0.26	<0.48
preP_1_3BNC117	<20	27	<0.26	0.65
preP_10_3BNC117	<20	340	<0.26	8.16
preP_100_3BNC117	<20	54.11	<0.26	1.088
preP_0.01_10-1074	<20	<20	<0.26	<0.48
preP_0.1_10-1074	<20	<20	<0.26	<0.48
preP_1_10-1074	54	<20	0.70	<0.48
preP_10_10-1074	516	<20	0.71	<0.48
preP_100_10-1074	11.419	<20	146.49	<0.48

不同NHP的处理前血浆 \*(DBZ3, DC99A, DCM8, DCF1, DBXE)

ID <sub>50</sub> 滴度	μg/ml
>5000	>75
>1000 - 5000	>15 - 75
>200 - 1000	>5 - 15
40 - 200	1 - 5

图13

## NHP中的单抗水平

C

血浆 ID<sub>50</sub>滴度

转化成10-1074和  
3BNC117的相应抗体  
浓度的血浆ID50滴度  
(pp/ml)

NHP	注射后的 天数			10-1074	3BNC117
		X2888_9	Q788_622	<20	<0.26
DBZ3	出血前	<20	<20	<0.26	<0.48
	3	2124	1724	20.26	7.64
	6	2724	1450	25.39	26.04
	10	3150	846	45.35	20.35
	14	2114	567	27.45	13.61
	17	1321	317	17.30	7.61
	20	1303	188	18.80	4.51
	24	485	<20	6.31	<0.48
	27	333	<20	4.33	<0.48
	34	86	<20	1.11	<0.48
DCMB	出血前	<20	<20	<0.26	<0.48
	3	2124	1977	20.26	47.45
	8	4791	1388	42.39	23.31
	10	2432	877	31.62	21.05
	14	1222	477	16.39	11.45
DBXE	出血前	<20	<20	<0.26	<0.48
	3	2124	1437	20.26	35.93
	6	3827	927	49.78	22.26
	10	1446	504	18.80	12.10
	14	957	242	12.44	5.81
	17	696	208	9.85	4.99
DC98A	出血前	<20	24	<0.26	0.58
	3	2124	1437	20.26	35.93
	6	3827	927	49.78	22.26
	10	1446	504	18.80	12.10
	14	957	242	12.44	5.81
	17	696	208	9.85	4.99
	20	418	190	6.49	4.56
	23	378	131	4.91	3.14
	27	2242	540	29.15	12.86
	34	1638	384	21.29	9.22
DCF1	出血前	<20	24	<0.26	<0.48
	3	2124	1399	20.26	49.94
	6	3827	1589	49.78	38.28
	10	1446	1632	16.53	36.77
	14	949	717	14.56	17.21
	17	695	547	14.52	15.53
	20	418	540	29.15	12.86
DC98A	出血前	<20	24	<0.26	<0.48
	3	2124	1399	20.26	49.94
	6	3827	1589	49.78	38.28
	10	1446	1632	16.53	36.77
	14	949	717	14.56	17.21
	17	695	547	14.52	15.53
	20	418	540	29.15	12.86
DCF1	出血前	<20	24	<0.26	<0.48
	3	2124	1399	20.26	49.94
	6	3827	1589	49.78	38.28
	10	1446	1632	16.53	36.77
	14	949	717	14.56	17.21
	17	695	547	14.52	15.53
	20	418	540	29.15	12.86

ID <sub>50</sub> 滴度	pp/ml
<20	<0.48
>20 - <100	>1.5 - <10
>100 - <1000	>15 - <150
>1000	>150

图13(续)