



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105209057 B

(45)授权公告日 2020.03.27

(21)申请号 201480026873.8

陈维灶 普拉巴卡兰·邦拉吉

(22)申请日 2014.03.12

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105209057 A

代理人 王达佐 洪欣

(43)申请公布日 2015.12.30

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(30)优先权数据

61/791,885 2013.03.15 US

(56)对比文件

W0 2011/146891 A2,2011.11.24,

CN 1738646 A,2006.02.22,

CN 102649818 A,2012.08.29,

Piyali Saha等.Design and

Characterization of Stabilized

Derivatives of Human CD4D12 and CD4D1.

《Biochemistry》.2011,第50卷(第37期),

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/024120 2014.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/150748 EN 2014.09.25

审查员 张丽华

(73)专利权人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

权利要求书1页 说明书23页

序列表26页 附图12页

(72)发明人 迪米特尔·S·蒂米特鲁夫

(54)发明名称

稳定的人单CD4结构域和融合蛋白

(57)摘要

本发明提供了包含单结构域CD4的多肽以及包含所述单结构域CD4和一种或多种融合伴侣的融合蛋白。还提供了编码所述多肽或融合蛋白的核酸,以及包含所述多肽、融合蛋白或核酸的混合物或细胞。

1. 构建体,其包含:

式(III)的两个融合蛋白,其中式(III)为:A-(任选的连接子)-C,以及

式(II)的两个融合蛋白,其中式(II)为:B-(任选的连接子)-D-(任选的连接子)-E-(任选的连接子)-B,

其中A为抗体或抗体片段,B为由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽,C为免疫球蛋白轻链恒定区,D为免疫球蛋白重链恒定区,并且E为Fc区或其部分,其中所述式(III)的融合蛋白包含SEQ ID NO:21,并且所述式(II)的融合蛋白包含SEQ ID NO:20。

2. 构建体,其包含:

式(I)的两个融合蛋白,其中式(I)为:A-(任选的连接子)-C-(任选的连接子)-B,以及

式(II)的两个融合蛋白,其中式(II)为:B-(任选的连接子)-D-(任选的连接子)-E-(任选的连接子)-B,

其中A为抗体或抗体片段,B为由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽,C为免疫球蛋白轻链恒定区,D为免疫球蛋白重链恒定区,并且E为Fc区或其部分,其中所述式(I)的融合蛋白包含SEQ ID NO:23,并且所述式(II)的融合蛋白包含SEQ ID NO:22。

3. 如权利要求1或2所述的构建体,其中所述连接子包含一个或多个G₄S基序。

4. 如权利要求1或2所述的构建体,其中所述连接子包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

5. 组合物,其包含权利要求1或2所述的构建体和载体。

6. 核酸,其编码权利要求1或2所述的构建体。

7. 重组载体,其包含权利要求6所述的核酸。

8. 细胞,其包含权利要求6所述的核酸。

9. 细胞,其包含权利要求7所述的载体。

10. 缀合物,其包含(a)权利要求1或2所述的构建体,以及(b)细胞毒性剂。

11. 如权利要求10所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂为毒素。

12. 组合物,其包含权利要求10所述的缀合物和载体。

13. 组合物,其包含权利要求11所述的缀合物和载体。

14. 权利要求1或2所述的构建体在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

15. 权利要求6所述的核酸在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

16. 权利要求7所述的载体在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

17. 权利要求8所述的细胞在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

18. 权利要求9所述的细胞在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

19. 权利要求10所述的缀合物在制备用于预防性或治疗性抑制细胞或宿主中病毒感染的药物中的用途,其中所述病毒感染为HIV-1感染。

稳定的人单CD4结构域和融合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2013年3月15日提交的美国临时专利申请第61/791,885号的权益,该临时专利申请通过引用并入。

[0003] 序列表

[0004] 随本文同时提交的核苷酸/氨基酸序列表通过引用整体并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] CD4为在大多数胸腺细胞和成熟的T细胞亚群(CD4⁺T细胞)的表面表达的非多态性跨膜糖蛋白(参见Germain,Curr.Biol.,7:R640-R644(1997))。它由四个免疫球蛋白样细胞外结构域、跨膜区段和与src-家族酪氨酸激酶Lck非共价缔合的胞质尾区组成。作为免疫系统的重要组分,CD4起到帮助CD4⁺T细胞上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的II类主要组织相容性复合物(MHCII)更强缔合的共受体的作用。该缔合足以触发T-细胞信号转导,从而导致CD4⁺T细胞的活化。

[0007] CD4也经由其激酶连接的胞质尾区通过驱动信号级联来直接促进信号转导。人CD4-鼠MHCII的晶体结构显示仅CD4的第一细胞外结构域(D1)与MHCII接触(参见Wang et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,98:10799-10804(2001))。然而,突变分析表明除了D1之外,其它结构域也影响与MHCII的结合(参见Moebius等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:8259-8263(1993))。而且,CD4的寡聚化对于与MHCII的稳定相互作用以及有效的T-细胞活化是必需的(参见Sakihama et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:6444-6448(1995))。

[0008] CD4还是HIV-1的主要受体(参见Dalgleish et al.,Nature,312:763-767(1984))。HIV-1进入通过病毒包膜糖蛋白(Env) gp120结合于细胞受体CD4来引发。这一相互作用在共受体(CCR5或CXCR4)参与之后引起gp120以及随后gp41的广泛构象重排。Envs的结构重排以及Envs与细胞受体及共受体的相互作用将病毒膜带向靶细胞膜,并最终引起膜融合和病毒进入。因为CD4在HIV-1感染中起着重要作用,所以含有所有四个(T4)(参见Deen et al.,Nature,331:82-84(1988))或前两个胞外结构域(D1D2)(参见Traunecker et al.,Nature,331:84-86(1988))的重组可溶性表达的CD4(sCD4)为HIV-1进入的有效抑制剂并被用于单独的结晶化(参见Wu et al.,Nature,387:527-530(1997)和Ryu et al.,Nature,348:419-429(1990))或与gp120一起的结晶化(参见Kwong et al.,Nature,393:648-659(1998))。

[0009] 在Sharma et al.(Biochemistry,44:16192-16202(2005))中,通过使用突变策略生成D1并将其从大肠杆菌的超声处理上清液中纯化。然而,纯化的蛋白质仅在低pH(4.0)下为稳定的,部分错误地折叠,并且具有的亲和力比D1D2或T4所具有的亲和力低数倍。

[0010] 在Chen et al.(J.Virol.,85:9395-9405(2011))中,鉴别了两种稳定的单体D1突变体,mD1.1和mD1.2,所述突变体比D1D2显著更可溶的并且与Env gp120的结合强于(50倍)D1D2,能比D1D2更有效地中和一组来自不同进化枝的HIV-1原代分离物,诱导gp120的构象变化以及使HIV-1对于通过CD4诱导的抗体中和敏感。

[0011] 然而,仍存在对以下新的D1的需要:其在生理条件下为正确折叠的、高度可溶的并

且稳定的;同时不仅保存了结合活性和特异性,而且保存了其它功能,如诱导HIV-1gp120的构象变化。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了包含单结构域CD4的多肽,如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2以及包含单结构域CD4和一种或多种融合伴侣的融合蛋白,其中所述一种或多种融合伴侣任选地经由连接子连接于单结构域CD4。另外,提供了包含多价融合蛋白的构建体。还提供了编码单结构域CD4和融合蛋白的核酸以及包含单结构域CD4、融合蛋白、构建体或核酸的组合物或细胞。

[0014] 本发明还提供了抑制细胞或宿主中HIV感染的方法,其包括向细胞或宿主施用多肽、融合蛋白或构建体以使得HIV感染被抑制。

[0015] 附图中几个视图的简述

[0016] 图1为人单结构域CD4 (D1) 及其突变体的氨基酸序列比较。

[0017] 图2为含有多个融合蛋白的构建体的描述,其中A表示抗体或抗体片段(例如m36.4),B表示单结构域CD4(例如本发明的多肽),C表示轻链恒定区,D表示重链恒定区,以及E表示Fc区或其部分。连接上述区的直线表示连接子序列。线代表任选键。

[0018] 图3A和3B为描述D1突变体与两种不同的HIV-1包膜糖蛋白-gp140_{Con-s} (A) 和gp140_{CH12.0544.2} (B) 结合的图。在每个图中,在450nm处的光密度显示在y-轴上并且D1突变体浓度(nM)显示在x-轴上。

[0019] 图4为描述D1突变体对CD41抗体m36h1Fc与HIV-1gp140_{Con-s}结合的增强作用的图。在450nm处的光密度显示在y-轴上并且sCD4浓度(nM)显示在x-轴上。

[0020] 图5A和5B为显示D1突变体主要由 β -链二级结构组成(A)以及mD1.22具有比mD1.2或mD1.23高的热稳定性(B)的图。在图5A中, $[\theta]$ (103deg cm²dmol⁻¹)显示在y-轴并且波长(nm)显示在x-轴。在图5B中,折叠的部分(如通过圆二色性法测定的)显示在y-轴并且温度(°C)显示在x-轴。

[0021] 图6A为显示D1突变体为单体(在尺寸排阻色谱法中洗脱为一个峰)的图。

[0022] 图6B显示mD1.22在高浓度下不倾向于聚集,如通过动态光散射显示的。在第0天或在第7天,4°C或37°C下的强度百分比显示在y-轴并且mD1.22的大小(d.nm)指示在x-轴。

[0023] 图7显示mD1.22的Fc-融合蛋白(mD1.22Fc)不结合于表达MHC的细胞(人血B (BJAB) 和T (SUP-T1) 细胞系)。深色曲线仅含有参考细胞,而浅色曲线含有细胞和Fc-融合蛋白。

[0024] 图8A为显示与D1D2Fc相比,D1D2Fc的A55V突变体(D1D2mFc)与HIV-1gp140_{Con-s}的结合显示出增加的图。

[0025] 图8B显示相对于D1D2Fc,D1D2Fc的A55V突变体(D1D2mFc)与人血B和T细胞系(BJAB 和SUP-T1)的相互作用降低。

[0026] 图9为显示A55V突变大幅减少CD4D1-特异性抗体D9与mD1.22Fc和D1D2mFc的结合的图,这表明突变诱导D1的构象变化。在450nm处的光密度显示在y-轴并且D9浓度(nM)显示在x-轴。

[0027] 图10为显示mD1.22-36.4融合蛋白(不同价)与表达MHC的细胞(人血B (BJAB) 细胞系)的结合比D1D2Fc低得多的图。

[0028] 图11A和11B为描述与D1D2相比,4Dm2m和6Dm2m在低浓度时不增强对两种HIV-1原

代分离物(在图11A中为Ba1,在图11B中为JRFL)的HIV-1感染性的图。在每个图中,感染性百分比显示在y-轴并且浓度(nM)显示在x-轴。IgG1m102.4(参见Zhu et al., J. Infect. Dis., 197:846-853 (2008))为对Nipah和Hendra病毒特异的对照抗体,其不抑制任何病毒。

[0029] 图12A和12B为显示4Dm2m和6Dm2m针对在PBS和人血清中降解的稳定性的图。在每个图中,浓度(nM)显示在y-轴并且孵育时间(天数)显示在x-轴。CD4-Ig被用作对照。

[0030] 发明详述

[0031] 本发明提供了具有全长CD4的结合活性和特异性并维持其它功能,如诱导HIV-1gp120的构象变化的单结构域CD4。由于分子尺寸减小,单结构域CD4具有极好的生物学性质,包括改善的结合动力学,在大肠杆菌中的可溶性表达,较高的溶解度、稳定性和特异性,使在动物中的免疫原性最小化以及更好地渗透入组织,如HIV-1主要在其中复制和扩展的浓密填充的淋巴样环境(例如脾、淋巴结和肠)。

[0032] 本发明的单结构域CD4包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列,基本上由或由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。本发明还提供包含具有至多20(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)个添加、缺失、取代或插入的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体的多肽。优选地,本发明提供包含具有至多10个添加、缺失、取代或插入的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的多肽,其中所述多肽不包含SEQ ID NO:4。

[0033] 本发明的多肽优选为重组或合成多肽,其并非天然存在的。

[0034] 本发明的多肽可单独提供,或作为包含所述多肽和一种或多种融合伴侣的融合蛋白的一部分来提供。融合伴侣可为基本上不抑制多肽结合其靶标的能力的任何合适的部分。理想地,与不存在融合伴侣时多肽的稳定性或效力相比,融合伴侣增强多肽的稳定性 and/或效力。例如,融合伴侣可为天然存在的蛋白质或其片段,与不存在融合蛋白时的多肽相比,其通过体内内源机制抵抗降解或消除从而增加融合蛋白的半衰期。

[0035] 合适的融合伴侣的实例包括:(a)来自细胞外基质的蛋白质,如胶原蛋白、层粘连蛋白、整合蛋白和纤连蛋白;(b)在血液中的蛋白质,如血清白蛋白、血清白蛋白-结合肽(SAbp)、纤维蛋白原A、纤维蛋白原B、血清淀粉样蛋白A、触珠蛋白(heptaglobin)蛋白、泛素、子宫球蛋白、 β -2微球蛋白、纤溶酶原、溶菌酶、胱蛋白酶抑制剂(cystatin)C、 α -1-抗胰蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂;(c)免疫血清蛋白,如IgE、IgG、IgM及其片段(例如Fc);(d)转运蛋白,如视黄醇结合蛋白;(e)防御素,如 β -防御素1、嗜中性粒细胞防御素1、2和3;(f)在血脑屏障或神经组织中存在的蛋白质,如黑皮质素受体、髓磷脂、抗坏血酸转运蛋白;(g)转铁蛋白受体特异性配体-神经药物(neuropharmaceutical agent)融合蛋白、脑毛细血管内皮细胞受体、转铁蛋白、转铁蛋白受体、胰岛素、胰岛素样生长因子1(IGF1)受体、胰岛素样生长因子2(IGF 2)受体、胰岛素受体;(h)定位于肾脏的蛋白质,如多囊蛋白(polycystin)、IV型胶原蛋白、有机阴离子转运蛋白K1、Heymann抗原;(i)定位于肝脏的蛋白质,如醇脱氢酶、G250;(j)血液凝固因子X;(k) α -1抗胰蛋白酶;(l)HNF 1 α ;(m)定位于肺的蛋白质,如分泌组分;(n)定位于心脏的蛋白质,如HSP 27;(o)定位于皮肤的蛋白质,如角蛋白;(p)骨特异性蛋白质,如骨形态发生蛋白(BMP),例如BMP-2、-4、-5、-6、-7(也称为成骨蛋白(OP-I)和-8(OP-2));(q)肿瘤特异性蛋白质,如人滋养层抗原、赫赛汀(herceptin)受体、雌激素受体、组织蛋白酶,例如组织蛋白酶B(存在于肝脏和脾);(r)疾病特异性蛋白质,如仅在活化T细胞

上表达的抗原:包括LAG-3(淋巴细胞活化基因);骨保护素配体(OPGL);OX40;金属蛋白酶,包括CG6512果蝇、人截瘫蛋白(human paraplegin)、人FtsH、人AFG3L2、鼠ftsH;血管生成生长因子,包括酸性成纤维细胞生长因子(FGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)、血管内皮生长因子/血管渗透因子(VEGF/VPF)、转化生长因子- α (TGF- α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管生成素、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-8(IL-8)、血小板衍生内皮生长因子(PD-ECGF)、胎盘生长因子(PIGF)、中期因子(midkine)血小板衍生生长因子-BB(PDGF)、分形趋化因子(fractalkine);(s)应激蛋白(热休克蛋白);以及(t)Fc运输中涉及的蛋白质。结合本文使用的另外的融合伴侣描述于WO 2009/089295。

[0036] 在一个实施方案中,融合伴侣为免疫球蛋白Fc区或其部分(例如CH2或CH3区),尤其是人免疫球蛋白的Fc区,如人IgG1Fc区。在本发明中使用的Fc区或其部分的实例包括但不限于SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0037] 在另一实施方案中,融合伴侣为抗体或抗体片段(例如Fab、scFv、dAb等)。优选地,抗体为单结构域抗体(a.k.a.“结构域抗体(“dAb”)或“工程化抗体结构域”(“eAd”)),其为由来自重链或轻链的单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。例如,eAd可包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16,在本文也分别被称为m36、m36.1、m36.2、m36.4或m36.5抗体。

[0038] 在另一实施方案中,融合伴侣为HIV(例如HIV-1或HIV-2)包膜糖蛋白。HIV包膜糖蛋白的实例包括gp120和gp140。优选地,HIV包膜糖蛋白为HIV-1gp120。

[0039] 融合蛋白包含一种或多种融合伴侣(例如两种、三种、四种、五种或更多种融合伴侣)。例如,融合蛋白可包含本发明的多肽、eAd(例如分别为SEQ ID NO:12-16的m36、m36.1、m36.2、m36.4或m36.5抗体)以及稳定性增强的融合伴侣,如免疫球蛋白Fc区(例如人IgG1Fc)或其部分(例如CH3)。

[0040] 本发明的多肽和一种或多种融合伴侣可经由连接子(即柔性分子连接,如柔性多肽链)连接。连接子可为任何长度的任何合适的连接子,但优选长度为至少约15(例如至少约20、至少约25、至少约30、至少约35、至少约40、至少约45、至少约50或它们的范围)个氨基酸。在一个实施方案中,连接子为天然存在于宿主的免疫球蛋白分子中的氨基酸序列,这样使得连接子的存在不会产生针对哺乳动物的连接子序列的免疫应答。合适的连接子的实例包括但不限于包含一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)G4S基序的连接子,如SEQ ID NO:9-11的连接子。

[0041] 通过进一步的举例说明,根据本发明的融合蛋白的实例可具有下述构型:(第一融合伴侣)-(任选的第一连接子)-(本发明的多肽(被称为mD1))-(任选的第二连接子)-(任选的第二融合伴侣)。更具体的示例性实例包括下述:mD1-Fc(SEQ ID NO:17)、gp120-连接子-mD1、eAd-连接子-mD1、mD1-连接子-CH3、eAd-连接子-mD1-连接子-CH3和eAd-连接子-mD1-Fc。

[0042] 本发明还提供了融合蛋白,其包含:

[0043] A-(任选的连接子)-C-(任选的连接子)-B(式(I))或

[0044] B-(任选的连接子)-D-(任选的连接子)-E-(任选的连接子)-B(式(II))其中A表示抗体或抗体片段(例如Fab、scFv、eAd等),B表示本发明的多肽(SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2;被称为mD1),C表示免疫球蛋白轻链恒定区(例如人IgG1 κ 轻链恒定区),D表示免疫球蛋白

重链恒定区(例如人IgG1重链恒定区),并且E表示Fc区或其部分(例如来自人IgG1的Fc区)。具体实例包括mD1.22-连接子-人IgG1重链恒定区-连接子-mD1和36.4eAd-连接子-人IgG1轻链恒定区-连接子-mD1.22。

[0045] 可将两个或更多个融合蛋白缀合或以其它方式连接在较大的构建体中。例如,可将以上式(I)的两个融合蛋白以及以上式(II)的两个融合蛋白组装在单个构建体中,如图2所示(6Dm2m)。在一个实施方案中,式(I)的融合蛋白包含SEQ ID NO:23以及式(II)的融合蛋白包含SEQ ID NO:22。

[0046] 可选地,可将以上式(II)的两个融合蛋白以及A-(任选的连接子)-C(式III)的两个融合蛋白组装在单个构建体中,如图2所示(4Dm2m)。在一个实施方案中,式(III)的融合蛋白包含SEQ ID NO:21以及式(II)的融合蛋白包含SEQ ID NO:20。

[0047] 在另一实施方案中,可将以上式(III)的两个融合蛋白以及B-(任选的连接子)-D-(任选的连接子)-E(式IV)的两个融合蛋白组装在单个构建体中,如图2所示(2Dm2m)。式(III)的融合蛋白可包含SEQ ID NO:19以及式(IV)的融合蛋白可包含SEQ ID NO:18。

[0048] 多个单独的融合蛋白可以以典型的IgG型构建体的方式连接,如通过恒定重链区与恒定轻链区之间以及Fc区之间的二硫键。理想地,以单个构建体连接的两个或更多个融合蛋白可提供多价(二价、四价甚或八价)分子。

[0049] 因此,包含两个或更多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)本发明融合蛋白的构建体也涵盖在本发明内。

[0050] 在一个实施方案中,组装融合蛋白(例如自组装)以形成图2中所示的其中一个构建体,其中A表示抗体或抗体片段(例如m36.4eAd),B表示本发明的多肽(例如mD1.22),C表示免疫球蛋白轻链恒定区(例如人IgG1 κ 轻链恒定区),D表示免疫球蛋白重链恒定区(例如人IgG1重链恒定区),并且E表示Fc区(例如来自人IgG1的Fc区)。

[0051] 多肽和融合蛋白可为聚乙二醇化的,或被偶联至类似结构、功能和目的的聚合物以赋予增强的稳定性和半衰期。相对于非聚乙二醇化的(例如抗体)多肽,聚乙二醇化可提供增加的半衰期和对降解的抗性而无活性的丧失(例如结合亲和力)。因为聚乙二醇化对于一些靶标可能不是有利的,特别是那些空间受阻的表位,所以应使多肽或融合蛋白最低程度地聚乙二醇化以便不会负面影响尺寸受限的抗原的可及性。多肽或融合蛋白可通过本领域已知的任何合适的手段偶联至PEG或PEG样聚合物。合适的PEG或PEG样部分可为合成的或天然存在的,并且包括但不限于直链或支链聚亚烷基聚合物、聚亚烯基聚合物或聚氧亚烷基聚合物、或分枝或不分枝的多糖,诸如同多糖或杂多糖。合成聚合物的优选实例包括直链或支链聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇)或聚(乙烯醇)及其衍生物或取代形式。用于连接至结构域抗体的取代的聚合物也包括取代的PEG,包括甲氧基(聚乙二醇)。除了或代替PEG之外,可使用的天然存在的聚合物部分包括例如,乳糖、直链淀粉、右旋糖酐或糖原及其衍生物。

[0052] 多肽或融合蛋白可被多聚化为例如,异源-或同源二聚体、异源-或同源三聚体、异源-或同源四聚体、或更高阶异源-或同源多聚体。多聚化可增加抗原结合强度,其中结合强度与多个结合位点的结合亲和力的总和相关。具体地说,可将半胱氨酸残基引入多肽或融合蛋白的氨基酸序列,从而允许在多聚化形式中形成链间二硫键。同源二聚的或异源二聚的(或多聚化)融合蛋白可包括相同或不同融合伴侣(例如eAd)的组合,使得相同构建体可在一次靶向多于一个表位。此类表位可最近地定位于靶标(例如在HIV靶标上),使得一

个表位的结合促进多聚化融合蛋白与第二个或更多个表位的结合。多聚化融合蛋白靶向的表位也可位于远端。

[0053] 可将另外的肽序列添加至融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体),这可起到促进稳定性、纯化和/或检测的作用。例如,可使用报告肽部分(例如绿色荧光蛋白(GFP)、 β -半乳糖苷酶或其可检测的结构域)。促进纯化的肽序列包括来源于或获得自麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或硫氧还蛋白(TRX)的那些。多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)还能够或可选择地用表位标记,所述表位可为抗体纯化的(例如Flag表位,其可从Kodak(New Haven,Connecticut)商购获得)、六组氨酸肽,如从QIAGEN,Inc.(Chatsworth,California)获得的pQE载体提供的标签,或HA标签(如在,例如Wilson et al.,Cell,37,767(1984)中所述)。

[0054] 可通过任何合适的方法来制备多肽和融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)。例如,多肽和融合蛋白可通过以下制备:合成氨基酸序列或在细胞中表达编码氨基酸序列的核酸并从细胞收获所得的多肽或融合蛋白。也可使用此类方法的组合。从头合成肽的方法和重组产生肽的方法为本领域已知的(参见,例如Chan et al.,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2005;Peptide and Protein Drug Analysis,ed.Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,ed.Westwood et al.,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY 2001;和Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994)。

[0055] 本发明还涵盖这样的缀合物,其包含缀合至诸如以下的细胞毒性剂的本发明的多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体):化学治疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段;小分子毒素)、放射性同位素(即放射性缀合物)或抗病毒化合物(例如抗HIV化合物)的本发明的多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)。可选地,可将多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)与细胞毒性剂、抗病毒化合物等共同施用。

[0056] 可将包含细胞毒性剂(例如毒素)的缀合物用于靶向病毒(例如HIV,如HIV-1)感染的细胞并根除(破坏)此类细胞。例如,对于包含(i)细胞毒性剂和(ii)如本文所述的含有抗体或抗体片段的构建体的缀合物,缀合物的(ii)抗体或抗体片段部分靶向(检测)病毒感染的细胞的表面蛋白以及缀合物的(i)细胞毒性剂部分根除(破坏)所述靶向的病毒感染的细胞。优选地,待靶向的细胞为HIV(例如HIV-1)感染的细胞并且缀合物检测/靶向在HIV感染的细胞上表达的HIV(例如HIV-1)包膜糖蛋白。缀合物的施用能够用于破坏对象中病毒(例如HIV,如HIV-1)感染的细胞,从而促使成功治疗(治愈)对象中的病毒(例如HIV)感染。因此,本发明提供了治疗对象中病毒感染的方法,其包括向对象施用本发明的缀合物,从而通过破坏对象中病毒感染的细胞来治疗(治愈)对象中的病毒感染。

[0057] 将多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)缀合于细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、抗菌化合物和抗病毒化合物等的方法为本领域熟知的。例如,可使用诸如以下的多种双官能蛋白偶联剂来制备缀合物:N-琥珀酰亚胺基-3-2-(吡啶二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚胺基硫烷(iminothiolane,IT)、亚胺酯的双官能衍生物(如二亚胺代己二酸二甲酯二·盐酸盐

(dimethyl adipimidate HCL))、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯(toluene)2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0058] 也可将诸如荧光化合物的可检测试剂添加至多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)。示例性荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。多肽或融合蛋白也可用诸如以下的可检测酶衍生化:碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。当多肽或融合蛋白构建体用可检测酶衍生化时,通过添加酶利用其产生可检测的反应产物的另外试剂来检测多肽或融合蛋白构建体。多肽或融合蛋白构建体也可用生物素衍生化,并通过间接测量亲和素或链霉亲和素结合来检测。

[0059] 本发明还提供编码多肽或融合蛋白的氨基酸序列的核酸。该核酸可包含DNA或RNA,可为单链或双链的。此外,核酸可包含核苷酸类似物或衍生物(例如肌苷或硫代磷酸酯核苷酸等)。

[0060] 可将核酸提供为构建体的一部分,所述构建体包含核酸以及能够使核酸递送至细胞和/或能够使核酸在细胞中表达的元件。此类元件包括例如,表达载体、启动子以及转录和/或翻译序列。合适的载体、启动子、转录/翻译序列和其它元件以及制备此类核酸和构建体的方法为本领域已知的(例如Sambrook et al.,同上;和Ausubel et al.,同上)。

[0061] 本发明还提供包含核酸的重组载体。合适载体的实例包括质粒(例如DNA质粒)、酵母(例如酵母属)和病毒载体,如痘病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、甲病毒、杆状病毒和Sindbis病毒。当载体为质粒(例如DNA质粒)时,质粒可与壳聚糖复合。

[0062] 当将载体施用于宿主(例如人)时,载体优选在靶细胞中具有低复制效率(例如产生不超过约1子代/细胞,更优选地,不超过0.1子代/细胞)。可通过在感染靶细胞之后测定病毒滴度而容易地凭经验确定复制效率。

[0063] 可将多肽、融合蛋白、缀合物或构建体以包含编码所述多肽或融合蛋白的核酸的细胞形式(任选地以载体的形式)施用于哺乳动物。因此,本发明还提供了包含编码多肽或融合蛋白的载体或核酸的细胞,所述多肽或融合蛋白理想地从所述细胞分泌。可使用任何合适的细胞。实例包括诸如以下的宿主细胞:大肠杆菌(例如大肠杆菌Tb-1、TG-2、DH5 α 、XL-Blue MRF' (Stratagene)、SA2821和Y1090)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、粘质沙雷菌(Serratia marcescens)、假单胞菌属(例如铜绿假单胞菌(P.aeruginosa))、N.grassia、昆虫细胞(例如Sf9、Ea4)、酵母(酿酒酵母)细胞和来源于哺乳动物的细胞,包括人细胞系。合适的真核细胞的具体实例包括VERO、HeLa、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、W138BHK、COS-7和MDCK细胞。可选地且优选地,根据本文所述的方法来自待治疗的哺乳动物如人的细胞可以用作宿主细胞。在一个实施方案中,所述细胞为人B细胞。

[0064] 将载体导入分离的宿主细胞以及体外培养和选择转化的宿主细胞的方法为领域中已知的并且包括使用氯化钙介导的转化、转导、接合、三亲株交配、DEAE、右旋糖酐介导的转染、感染、与脂质体的膜融合、DNA包被的微粒弹的高速轰击、直接微注射至单细胞和电穿孔(参见,例如Sambrook et al.,同上,Davis et al.,Basic Methods in Molecular

Biology(1986)和Neumann et al.,EMBO J.1,841(1982))。理想地,包含载体或核酸的细胞表达编码多肽或融合蛋白的核酸使得所述核酸序列被细胞有效地转录和翻译。

[0065] 可分离多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞。本文使用的术语“分离的”包括已经从生物环境(例如细胞、组织、培养基、体液等)中移开或以其它方式纯度增加至任何程度(例如分离自合成培养基)的化合物或组合物。因此,分离的化合物和组合物可为合成的或天然产生的。

[0066] 可将多肽、融合蛋白、缀合物、核酸、载体或细胞施用于有需要的任何宿主(例如哺乳动物,优选为人)。由于将多肽、融合蛋白、缀合物、核酸、载体或细胞施用于哺乳动物的结果,哺乳动物的病毒感染(例如HIV感染)被抑制。本发明的方法可预防性或治疗性抑制任何类型的HIV的感染,但优选地抑制HIV-1和/或HIV-2感染。可将本发明的方法用于抑制任何HIV群组(例如群组M和/或O)和亚型(例如进化枝A、B、C、D、E、EA、F、和/或G)的感染。

[0067] 另外,可将多肽、融合蛋白、缀合物、核酸、载体或细胞用于抑制广谱病毒(参见,例如Principles of Virology:Molecular Biology,Pathogenesis,and Control,Flint et al.,eds.,ASM Press:Washington,D.C.(2000),特别是第19章)。根据本发明可以治疗的病毒的实例包括但不限于C型和D型逆转录病毒、HTLV-1、HTLV-2、FIV、FLV、SIV、MLV、BLV、BIV、马科动物感染性病毒、贫血病毒、禽肉瘤病毒如Rous肉瘤病毒(RSV)、肝炎A型病毒、肝炎B型病毒、肝炎C型病毒、肝炎非A型病毒和肝炎非B型病毒、虫媒病毒、水痘病毒、人疱疹病毒(例如HHV-6)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、丝状病毒(例如Ebola,诸如Ebola菌株Sudan,Zaire,Cote d'Ivoire和Reston)、SARS、流感病毒和风疹病毒。

[0068] 当以治疗性提供时,在诊断病毒(例如HIV)感染时或之后提供多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物。

[0069] 当以预防性提供时,在病毒(例如HIV)感染之前,诸如向处于暴露于病毒(例如HIV)的风险或最近已经暴露于病毒(例如HIV)的患者或对象提供多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物。此类患者和对象的实例包括例如,医疗保健工作者,母亲被感染或处于被感染风险的胎儿、新生儿或婴幼儿(例如乳儿),静脉注射药物使用者,输血、血液制品或移植组织的接受者以及已经暴露于含有或可能含有HIV的体液的其它个体。多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物的预防性施用防止、缓解或延迟病毒(例如HIV)感染。在新近暴露于病毒(例如HIV)但在血液或其它体液中尚未显示出病毒存在(如通过PCR或检测病毒的其它测定来测量)的对象中,用多肽、融合蛋白、缀合物、核酸、载体、细胞或其组合物的有效治疗部分地或完全抑制或延迟暴露个体的血液或其它体液中病毒的出现或使病毒的水平最小化。

[0070] 多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物的功效可以以熟练的从业者熟知的不同方式评估。例如,本领域普通技术人员通过观察到多肽或融合蛋白降低病毒载量或延迟或防止病毒载量进一步增加,会理解本发明的多肽或融合蛋白在治疗或抑制对象中的病毒(例如HIV)感染中是有效的。病毒载量可通过本领域已知的方法来测量,例如,使用PCR测定以检测病毒(例如HIV)核酸的存在或抗体测定以检测来自对象或患者的样品(例如血液或另一体液)中病毒(例如HIV)蛋白的存在,或通过测量患者循环中抗病毒(例如抗-HIV)抗体的水平。多肽或融合蛋白治疗的功效也可通过测量HIV-感染的对象中CD4+T细胞的数目来确定。延迟或抑制HIV-阳性对象或患者中CD4+T细胞的起始或进一步降

低或引起HIV-阳性对象中CD4+T数目增加的治疗可被认为是有效的。

[0071] 可将多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞配制成包含所述多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞以及载体(例如药学上或生理上可接受的载体)的组合物(例如药物组合物)。此外,本发明的多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或组合物可单独用于或作为药物制剂的一部分用于本文所述的方法中。

[0072] 包含多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞的组合物(例如药物组合物)可包含载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。

[0073] 合适的载体及其制剂描述于A.R.Gennaro,ed.,Remington:The Science and Practice of Pharmacy(19th ed.),Mack Publishing Company,Easton,PA(1995)。药物载体包括无菌水、盐水、林格氏液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液以及在生理pH的缓冲溶液。通常,将适量的药学上可接受的盐用于制剂中以使得制剂等渗。制剂的pH优选为约5至约8(例如约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5及其范围)。更优选地,pH为约7至约7.5。其它的载体包括缓释制剂,如含有融合蛋白的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质呈现成形物的形式(例如膜、脂质体或微粒)。对本领域技术人员显而易见的是某些载体可为更优选的,这取决于例如施用途径以及被施用的组合物的浓度。

[0074] 组合物(例如药物组合物)可包含本发明的多于一种的多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞。可选地或另外地,组合物可包含一种或多种其它的药物活性剂或药物。可以适合用于药物组合物的此类其它药物活性剂或药物的实例包括抗癌剂(例如化学治疗药物)、抗生素、抗病毒药物、抗真菌药物、环磷酰胺以及它们的组合。合适的抗病毒剂(例如抗-HIV剂)包括但不限于核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂(例如拉米夫定、阿巴卡韦、齐多夫定、司他夫定、去羟肌苷、恩曲他滨和替诺福韦(tenofovir))、非核苷逆转录酶抑制剂(例如地拉韦啉(delavirdine)、依法韦伦、依曲韦林(etravirine)和奈韦拉平)、蛋白酶抑制剂(例如氨普那韦(amprenavir)、呋山那韦(fosamprenavir)、阿扎那韦(atazanavir)、地瑞纳韦(darunavir)、茚地那韦(indinavir)、洛匹那韦(lopinavir)、利托那韦(ritonavir)、奈非那韦(nelfinavir)、沙奎那韦(saquinavir)和替拉那韦(tipranavir))、融合或进入抑制剂(例如恩夫韦地(enfuvirtide)和马拉维若(maraviroc))、整合酶抑制剂(例如雷特拉韦(raltegravir))以及它们的组合疗法。

[0075] 将多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物施用于宿主的合适方法为本领域已知的。该宿主可为任何合适的宿主,如哺乳动物(例如啮齿类动物(如小鼠、大鼠、仓鼠或荷兰猪)、兔、猫、犬、猪、羊、牛、马、灵长类或人)。

[0076] 施用可为局部的(包括眼科的、阴道的、直肠的、鼻内的、经皮的等)、口服、通过吸入或肠胃外(包括通过静脉滴注或皮下注射、腔内注射、腹腔注射或肌肉注射)。局部的鼻内施用是指通过一个或两个鼻孔将组合物递送至鼻和鼻道,并且可包括通过喷雾机制或微滴机制或通过核酸、载体或融合蛋白的雾化来递送。通过吸入施用组合物可以经由通过喷雾或微滴机制的递送通过鼻或口来实现。也可经由插管法直接递送至呼吸系统(例如肺)的任何区域。

[0077] 用于局部施用的制剂包括软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾、液体和粉剂。常规药物载体、水性、粉状、或油性基质、增稠剂等可以是必需或期望的。

[0078] 如果肠胃外施用组合物,通常通过注射施用。注射剂可以以常规的形式制备,如作

为液体溶液或悬浮液、适于注射前悬浮于液体的固体形式或作为乳液。另外，肠胃外施用可涉及缓释或持续释放系统的制备，使得维持恒定剂量。用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液或不挥发油。静脉内媒介物包括液体和营养物补充剂、电解质补充剂，(如基于林格氏右旋糖的那些物质)等。也可存在防腐剂和/或其它添加剂，诸如例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0079] 用于口服施用的组合物包括粉剂或粒剂、水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、囊(袋)剂或片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是期望的。

[0080] 一些组合物可以潜在地作为药学上可接受的酸加成盐或碱加成盐被施用，所述药学上可接受的酸加成盐或碱加成盐通过与无机酸，如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸以及与有机酸，如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸反应，或者通过与无机碱，如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾以及有机碱，如单-、二-、三烷基和芳基胺以及取代的乙醇胺反应而形成。

[0081] 多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体或细胞可与药学上可接受的载体一起施用并且可通过本领域熟知的多种机制(例如裸DNA的摄取、脂质体融合、经由基因枪的DNA的肌肉注射、胞吞等)体内和/或离体递送至哺乳动物细胞。

[0082] 另外，本发明设想了益生菌治疗。可将含有本发明的核酸或载体并表达融合蛋白或缀合物的活宿主细胞直接用作将融合蛋白递送至体内期望部位的递送媒介物。将融合蛋白或缀合物直接递送至期望部位，诸如例如递送至选定的体腔的优选宿主细胞可包括细菌。更具体地，此类宿主细胞可包括乳杆菌、肠球菌或已知通常定居于体腔的其它常见细菌如大肠杆菌正常菌株的合适工程化菌株。更具体地，此类宿主细胞可包括一种或多种选定的乳杆菌的非病原菌株，如Andreu et al., J. Infect. Dis., 171 (5), 1237-43 (1995)所述的那些，尤其是与上皮细胞(例如阴道上皮细胞)具有高的粘附性能并且使用本发明的核酸或载体适于转化的那些菌株。

[0083] 如果使用离体方法，根据本领域已知的标准方案，可取出细胞或组织并将其维持在体外。可经由诸如以下的任何基因转移机制将组合物导入细胞：磷酸钙介导的基因递送、电穿孔、微注射或蛋白脂质体。然后，根据针对细胞或组织类型的标准方法，可注入转导的细胞(例如与药学上可接受的载体一起)或将转导的细胞同伦(homotopically)移植回哺乳动物。将不同细胞移植或注入哺乳动物的标准方法是已知的。

[0084] 治疗病毒感染(例如HIV感染)所需的组合物的精确量因哺乳动物的不同而不同，取决于哺乳动物的物种、年龄、性别、体重和一般状况，病毒的性质，病毒感染的存在性和程度，使用的具体融合蛋白、核酸、载体或细胞，施用途径以及其它药物是否包括在方案内。因此，规定每种组合物的精确量是不可能的。然而，考虑到本文给出的教导，本领域普通技术人员仅利用常规实验就能够确定合适的量。可凭经验测定施用本发明的核酸分子、载体、细胞和融合蛋白的有效剂量和方案并且进行此种测定在本领域技术人员范围内。施用组合物的剂量范围为足够大以产生期望效果的那些；然而，剂量不应大到引起显著的不良副作用，诸如不良的交叉反应、过敏反应等。给药剂量可以变化且可以以每日一次或多次(例如两次

或多次、三次或多次、四次或多次或五次或多次)的剂量来施用,持续一天或多天。组合物可在病毒(例如HIV)感染前或在确定病毒(例如HIV)感染时立即施用并且持续施用直至检测不到病毒。

[0085] 将多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物以预防性或治疗性抑制HIV感染的有效量施用于宿主(例如哺乳动物,诸如人)。多肽、融合蛋白、缀合物、构建体、核酸、载体、细胞或其组合物作为HIV感染抑制剂的功效可以通过本领域已知的体内或体外参数来测定。

[0086] 可将任何合适剂量的多肽融合蛋白、缀合物、核酸、载体、细胞或其组合物施用于宿主。适当剂量取决于诸如以下的因素而变化:宿主的年龄、体重、身高、性别、一般医疗状况、先前的医疗史和病毒(例如HIV)感染进展,并且可由临床医生来确定。例如,可以以每天约1 μ g/kg至高达100mg/kg体重(例如5 μ g/kg、10 μ g/kg、50 μ g/kg、100 μ g/kg、200 μ g/kg、300 μ g/kg、400 μ g/kg、500 μ g/kg、600 μ g/kg、700 μ g/kg、800 μ g/kg、900 μ g/kg、1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg及其范围)或更多的剂量将多肽、融合蛋白或缀合物施用于宿主(例如哺乳动物,如人)。可提供几种剂量(例如1、2、3、4、5、6或更多种)(例如在数周或数月的时间内)。

[0087] 当载体为病毒载体时,合适的剂量可包括约1 $\times 10^5$ 至约1 $\times 10^{12}$ (例如1 $\times 10^6$ 、1 $\times 10^7$ 、1 $\times 10^8$ 、1 $\times 10^9$ 、1 $\times 10^{10}$ 、1 $\times 10^{11}$ 及它们的范围)个噬斑形成单位(pfu),尽管可将更低或更高剂量施用于宿主。例如,可施用约2 $\times 10^8$ 个pfu(例如在约0.5mL的体积中)。

[0088] 可将本发明的细胞以约1 $\times 10^5$ 至2 $\times 10^{11}$ (例如1 $\times 10^6$ 、1 $\times 10^7$ 、1 $\times 10^8$ 、1 $\times 10^9$ 、1 $\times 10^{10}$ 及其范围)个细胞/注入的剂量施用于宿主。可以以例如一至三(例如两)次注入施用细胞。除了施用细胞之外,可向宿主施用生物反应调节剂,如白细胞介素2(IL-2)。

[0089] 可将多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)与已经使用的其它熟知的病毒(例如HIV)疗法以及预防性疫苗组合使用。本发明的融合蛋白的组合可与目前的疗法产生累加或协同效应。本发明的多肽或融合蛋白(或含有融合蛋白的构建体)可与其它HIV和AIDS疗法和疫苗组合,所述其它疗法和疫苗如高效抗逆病毒疗法(HAART),其包含蛋白酶抑制剂和逆转录酶抑制剂的组合、叠氮胸苷(AZT)、HAART的计划性间断治疗,细胞因子免疫增强疗法(例如白细胞介素(IL)-2、IL-12、CD40L+IL-12、IL-7、HIV蛋白酶抑制剂(例如利托那韦(ritonavir)、茚地那韦和奈非那韦等)以及干扰素(IFN)、细胞替代疗法、重组病毒载体疫苗、DNA疫苗、灭活的病毒制剂、免疫抑制剂如环孢菌素A、cyanovirin疗法(参见,例如美国专利第6,015,876号)、scytovirin疗法(参见,例如美国专利第7,491,798号)和griffithsin疗法(参见,例如美国专利申请公开2009-0092557)。此类疗法可以以已经在提供治疗或预防效果的已知治疗中使用的方式施用(参见,例如Silvestri et al. Immune Intervention in AIDS. In: Immunology of Infectious Disease, H.E. Kauffman, A. Sher, and R. Ahmed eds., ASM Press, Washington DC (2002))。

[0090] 以下实例进一步说明了本发明,但当然不应理解为以任何方式限制其范围。

[0091] 实施例1

[0092] 该实施例描述了鉴定具有改善的可溶性表达、稳定性和特异性的单结构域CD4(D1)。

[0093] 将结构引导的腔填充和文库筛选用于鉴定具有改善的可溶性表达、稳定性和特异

性的D1突变体。筛选产生两种突变体:mD1.22 (SEQ ID NO:1) 和mD1.23 (SEQ ID NO:2) (参见图1)。

[0094] 如表1所述,上述突变体在大肠杆菌周质和PBS中的可溶性显著超过先前鉴定的D1突变体 (mD1.2;Chen et al.,J.Virol.,85:9395-9405 (2011))。

[0095] 表1.单结构域CD4突变体的性质。

[0096]	单结构域 CD4	在大肠杆菌中的可溶性 表达 (mg/L)	在 PBS (pH 7.4)中的溶解 度 (mg/mL)
	mD1.2	0.75	>92.6
	mD1.22	5	175
	mD1.23	6	ND

[0097] ND=未测定

[0098] 实施例2

[0099] 该实施例显示mD1.22和mD1.23的表征。

[0100] 在不同的D1浓度下评估mD1.2 (Chen et al.,2011,同上)、mD1.22 (SEQ ID NO:1) 和mD1.23 (SEQ ID NO:2) 与HIV-1gp140的结合特性。

[0101] 用gp140_{Con-s}和gp140_{CH12.0544.2}进行ELISA,所述gp140_{Con-s}为通过比对M组的大于1,000个序列设计的共有gp140 (参见Liao et al.,Virology,353:268-282 (2006))。通过HRP-缀合的抗-六组氨酸标签抗体 (Sigma-Aldrich,St.Louis,MO) 来检测结合的mD1.2和mD1.22以及mD1.23突变体。

[0102] 如图3A和3B所显示,两种突变体针对测试的gp140为交叉反应的。

[0103] 还通过利用单循环方法的Biacore X100装置 (GE Healthcare) 上的表面等离子体共振 (SPR) 分析遗传上多样化的HIV-1Envs的结合。简言之,将纯化的HIV-1gp140在乙酸钠 (pH 5.0) 中稀释并经由标准的胺偶联方法直接固定在CM5传感芯片上。将参考池用N-羟基琥珀酰亚胺-1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺和乙醇胺注射而未注射gp140。将D1突变体和D1D2用电泳缓冲液HSB-EP (100mM HEPES (pH 7.4), 1.5M NaCl, 30mM EDTA, 0.5% 表面活性剂20) 稀释。在500、100、20、4和0.8nM浓度下测试所有分析物。由用BiacoreX100评价软件2.0的单价结合模型拟合的传感图 (sensograms) 计算动力学常数。

[0104] 在四种HIV-1Env gp140的SPR分析中,mD1.22显示出的亲和力与mD1.2的亲和力相当或高于mD1.2亲和力 (参见表8)。

[0105] 实施例3

[0106] 该实施例显示D1突变体维持全长CD4的功能活性。

[0107] CD4诱导gp120的构象变化,从而导致CD4-可诱导的 (CD4i) 表位的暴露。为确定D1突变体是否诱导此类构象变化,在不存在或存在mD1.2 (SEQ ID NO:3)、mD1.22 (SEQ ID NO:1) 或mD1.23 (SEQ ID NO:2) 的情况下测试基于CD4i抗体的融合蛋白,m36h1Fc (参见Chen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105:17121-17126 (2008)) 与gp140_{Con-s}的结合。将两个结构域的人CD4 (D1D2;SEQ ID NO:5) 用作阳性对照,并且将Fab b12用作阴性对照,所述Fab b12为靶向gp120上CD4-结合位点的HIV-1广泛中和抗体 (参见Roben et al.,J.Virol.,68:4821-4828 (1994))。

[0108] 相对于对照,在存在D1突变体的情况下,m36h1Fc与gp140_{Con-s}的结合增加(参见图4)。另外,m36h1Fc与gp140_{Con-s}的结合在分别存在D1D2和mD1.2的情况下增加或与在分别存在D1D2和mD1.2的情况下所观察到的结合相当(参见图4)。

[0109] 实施例4

[0110] 该实施例显示D1突变体的其它表征。

[0111] 通过圆二色性(CD)光谱法测定mD1.2(SEQ ID NO:3)、mD1.22(SEQ ID NO:1)和mD1.23(SEQ ID NO:2)的二级结构和热稳定性。将纯化的蛋白质以0.33mg/mL的终浓度溶解于PBS并将CD光谱记录于AVIV Model 202CD光谱仪(Aviv Biomedical)。在25℃下使用针对天然结构测量的0.1-cm光程长比色杯记录波长谱。通过记录在25-90℃的温度范围,加热速率为1℃/min的CD信号来测量216nm处的热稳定性。用外部探针传感器记录温度并通过校准计算微量比色池内部的温度;它比通过外部传感器测量的温度低约2-3℃(对于20至80℃的温度,范围为1.9至3.8℃)。在加热之后,在90℃记录波长谱。

[0112] 如通过图5A所证明,mD1.22和mD1.23主要由β-链二级结构组成。mD1.22的热稳定性高于mD1.2和mD1.23(参见图5B)。

[0113] 与mD1.2类似,mD1.22和mD1.23在pH 7.4的PBS中为均一单体的,如通过尺寸排阻色谱法所测定的。D1D2也为单体,但其未洗脱为单峰(参见图6A)。mD1.22在高浓度(10mg/mL)下不倾向于聚集,如通过动态光散射所显示的(参见图6B)。

[0114] 实施例5

[0115] 该实施例显示包含D1突变体的Fc融合蛋白的表征。

[0116] 使用常规方法制备D1D2、D1D2m(具有A55V突变;SEQ ID NO:6)、mD1.2和mD1.22的Fc-融合蛋白(分别为D1D2Fc、D1D2mFc、mD1.2Fc和mD1.22Fc)。

[0117] 评估m36h1Fc(阴性对照)、D1D2Fc、D1D2mFc、mD1.2Fc和mD1.22Fc与表达MHC的细胞-人血细胞系BJAB(B细胞)和SUP-T1(T细胞)的结合。如图7和图8B所证实的,相对于其它融合蛋白,mD1.22或D1D2m的Fc融合物显示出与表达MHC的细胞的结合降低。

[0118] 为确定A55V突变是否导致构象变化,评估与CD4D1-特异性抗体(D9)的相互作用。如图9所显示,在mD1.22Fc和D1D2mFc中存在的A55V突变大幅降低了与D9抗体的结合。这表明该突变诱导D1的构象变化。然而,如上所述,存在A55V突变导致与HIV-1gp140的结合增加(参见图8A)。

[0119] 实施例6

[0120] 该实施例显示包含mD1.22的双特异性多价融合蛋白的表征。

[0121] 制备如图2中例示的mD1.22(SEQ ID NO:1)和m36.4的双特异性多价融合蛋白(2Dm2m、4Dm2m和6Dm2m)。m36.4(SEQ ID NO:15)为靶向HIV-1gp120的CD4i表位的工程化的单一人抗体结构域。

[0122] 在每个双特异性多价融合蛋白中,A对应于m36.4,B对应于mD1.22,C对应于轻链恒定区,D对应于重链恒定区,并且E对应于Fc区。具体地说,2Dm2m包含含有SEQ ID NO:18的两个融合蛋白以及含有SEQ ID NO:19的两个融合蛋白。4Dm2m包含含有SEQ ID NO:20的两个融合蛋白以及含有SEQ ID NO:21的两个融合蛋白。6Dm2m包含含有SEQ ID NO:22的两个融合蛋白以及含有SEQ ID NO:23的两个融合蛋白。

[0123] 类似于实施例5中所述的结果,mD1.22-m36.4多价融合蛋白与表达MHC的BJAB细胞

的结合比D1D2Fc与表达MHC的BJAB细胞的结合低得多(参见图10)。

[0124] 为测定D1突变体中和HIV-1的效力和广度,包括具有来自代表进化枝A-E的HIV-1分离物的Env的假型病毒,并使用CCR5 (R5) 或CXCR4 (X4) 或两者 (R5X4) 作为共受体。假病毒来源于293T细胞,并使用HOS-CD4-CCR5 (对于所有R5和双嗜性病毒) 或HOS-CD4-CXCR4细胞系以一式两份进行中和测定,如Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105:17121-17126 (2008)) 所述。在感染后48小时测量发光并通过下式来计算中和百分比: (1-含有抑制剂的孔的平均RLU/平均RLU或仅含病毒的孔) x 100。中和的IC₅₀和IC₉₀分别被指定为观察到50%和90%中和时的抑制剂浓度。

[0125] 如表2和表3所显示, mD1.22和含有mD1.22的融合蛋白中和来自几种不同进化枝的HIV-1原代分离物。明显地, 4Dm2m和6Dm2m比广泛中和单克隆抗体VRC01更有效(参见表3)。

[0126] 另外, mD1.22和含有mD1.22的融合蛋白抑制HIV-1包膜糖蛋白介导的细胞融合(参见表4和5)。如表5所显示, 4Dm2m和6Dm2m在抑制HIV-1包膜糖蛋白介导的细胞-细胞融合中比VRC01更有效。

[0127] 在基于TZM-bl细胞的测定中(参见Brown et al., Virology, 375:529-538 (2008)), 其中使用TZM-bl细胞和随机选自A至D、AE和AG (总计n=12) 的各个进化枝的HIV-1分离物, 当比较其IC₅₀和IC₉₀的几何平均值时, 4Dm2m和6Dm2m比b12和CD4-Ig有效得多, 并且比VRC01的效力大约10倍(参见表6)。

[0128] 在使用一组来源于主要在中国流行的41HIV-1分离物的具有Env的假病毒的另一基于TZM-bl细胞的测定中(参见Yao et al., J. Biol. Chem., 287:6788-6796 (2012); 和Shang et al., J. Biol. Chem., 286:14531-14541 (2011)), 基于针对上述组的中和活性, 将4Dm2m和6Dm2m与T20 (恩夫韦地)、C34和CD4-Ig进行比较, 所述T20为FDA批准的来源于HIV-1 Env gp41C-末端七肽重复 (CHR) 的肽抑制剂, 所述C34为另一有效的CHR肽抑制剂。4Dm2m和6Dm2m中和所有病毒, IC₅₀几何平均值为大约0.20nM, 该值比T20、C34和CD4-Ig的值 (11、3.5和42nM) 分别低约50倍 (P=0.002, 学生配对t检验)、16倍 (P<0.001, 学生配对t检验) 和200倍 (P<0.001, 学生配对t检验) (参见表7)。当比较IC₉₀时, 也观察到4Dm2m和6Dm2m的优越效力。

[0129] 也已经显示4Dm2m和6Dm2m在低浓度时不会增强HIV-1感染性, 这与D1D2相反(参见图11)。

[0130] 实施例7

[0131] 该实施例显示双特异性多价融合蛋白的溶解性、稳定性和聚集倾向。

[0132] 为评价进一步开发成药物的潜能, 测试了几种药物相关的性质, 包括溶解度、稳定性和聚集倾向。将PBS中的4Dm2m和6Dm2m在高速离心之后分别浓缩至25.0和25.9mg/ml, 而无可见沉淀。将它们在4℃储存2周, 未观察到另外的沉淀, 这表明蛋白质具有高溶解度。

[0133] 为测试4Dm2m和6Dm2m的可溶性聚集体是否在延长孵育期间形成, 使用了动态光散射 (DLS)。将在PBS中浓缩至10mg/ml的蛋白质储存在80℃并在测量之前于冰上缓慢解冻。结果显示: 4Dm2m和m909 (呈IgG1形式的对照人抗体(参见Feng et al., Arthritis Res. Ther. 13:R59 (2011))) 的颗粒主要为小的 (平均直径分别为16.3和12.7nm)。4Dm2m的少量聚集体在4℃和37℃孵育的第一天内消失, 而m909聚集体在37℃孵育之后继续存在。相比之下, 约30%至50%的CD4-Ig颗粒为大的, 平均直径为大约100nm并且在孵育的全部时段内

聚集体持续存在。在冻融循环之后,6Dm2m部分聚集;虽然孵育之后聚集被削弱,但是其产生了相对宽的粒径分布。

[0134] 这些结果表明:如同典型的IgG1,4Dm2m具有低的聚集倾向,其低于CD4-Ig的聚集倾向。

[0135] 然后,在与PBS (参见图12A) 或人血清 (参见图12B) 于37℃下孵育15天期间评估蛋白质针对降解的稳定性。在PBS中孵育10天未引起功能性4Dm2m的量的显著下降,然而分别为约20%和30%的6Dm2m和CD4-Ig丧失与gp140_{Con-s}的结合活性 (参见图12A)。此后,4Dm2m开始降解,6Dm2m继续降解,而CD4-Ig看起来为稳定的。最终,约90%的4Dm2m保留功能性,略微超过保留功能性的6Dm2m和CD4-Ig的百分比 (80%)。

[0136] 关于人血清,在前5天孵育期间,所有蛋白质水平以类似速率下降 (参见图12B)。然而,在接下来5天的孵育期间,4Dm2m和6Dm2m的降解变得比CD4-Ig的降解缓慢。在测量期结束时,保留结合活性的CD4-Ig的水平略微高于功能性4Dm2m和6Dm2m的水平,但量的差异并非统计学上显著的。

[0137]

表 2. 通过不同价的 mD1.22 中和假型 HIV-1。

病毒	进化枝	向性	m36.4		mD1.22		mD1.22Fc		2Dm2m		4Dm2m		6Dm2m	
			IC ₅₀ ^a	IC ₉₀ ^b	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
Bal	B	R5	16 ± 1	75 ± 18	2.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	0.40 ± 0.00	1.9 ± 0.2	0.34 ± 0.15	0.59 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.36 ± 0.06	0.063 ± 0.004	0.22 ± 0.02
JRFL	B	R5	18 ± 5	106 ± 4	2.9 ± 0.4	25 ± 1	1.2 ± 0.1	25 ± 6	0.090 ± 0.008	0.59 ± 0.06	0.060 ± 0.014	0.29 ± 0.09	0.043 ± 0.004	0.21 ± 0.01

^a 导致抑制 50% 病毒感染的抗体浓度 (nM)。
^b 导致抑制 90% 病毒感染的抗体浓度 (nM)。

[0138]

表 3. 4Dm2m、6Dm2m 和 bnmAbs 对具有来自不同进化枝的 Env 的假型 HIV-1 的中和。

病毒	进化枝	向性	2G12		VRC01		4Dm2m		6Dm2m	
			IC ₅₀ ^a	IC ₉₀ ^b	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
92UG037.8	A	R5	0.53 ± 0.10	63 ± 4	0.33 ± 0.11	3.8 ± 4.3	0.051 ± 0.001	0.45 ± 0.01	0.14 ± 0.08	2.1 ± 0.6
Bal	B	R5	3.1 ± 0.0	41 ± 1	0.11 ± 0.04	0.56 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.50 ± 0.07	0.12 ± 0.01	0.38 ± 0.02
JRFL	B	R5	3.0 ± 0.5	13 ± 3	0.31 ± 0.21	0.82 ± 0.40	0.14 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.43 ± 0.04
JRCSF	B	R5	0.58 ± 0.17	9.3 ± 8.0	0.28 ± 0.18	5.6 ± 2.1	0.29 ± 0.18	3.0 ± 2.9	0.21 ± 0.14	1.0 ± 0.1
AD8	B	R5	1.2 ± 0.1	18 ± 3	0.36 ± 0.13	4.3 ± 0.4	0.13 ± 0.01	0.74 ± 0.06	0.11 ± 0.01	0.60 ± 0.08
R2	B	R5	0.68 ± 0.11	4.6 ± 0.1	0.34 ± 0.01	4.4 ± 0.1	0.028 ± 0.011	0.43 ± 0.18	<0.021	0.14 ± 0.04
IIIB	B	X4	1.5 ± 0.0	9.3 ± 2.4	0.26 ± 0.01	0.83 ± 0.04	0.037 ± 0.001	0.10 ± 0.01	<0.021	0.086 ± 0.006
NL4-3	B	X4	1.3 ± 0.2	18 ± 10	0.25 ± 0.02	2.6 ± 0.6	0.094 ± 0.002	0.15 ± 0.02	0.068 ± 0.004	0.19 ± 0.02
89.6	B	R5X4	1.3 ± 1.1	43 ± 11	0.37 ± 0.10	14 ± 2	<0.021	<0.021	<0.021	<0.021
GXC	C	R5	- ^c	-	2.1 ± 0.1	6.6 ± 4.8	0.61 ± 0.36	4.0 ± 0.0	0.63 ± 0.06	1.7 ± 0.1
Z2Z6	D	R5	0.70 ± 0.01	14 ± 2	0.11 ± 0.01	0.85 ± 0.14	0.14 ± 0.04	1.1 ± 0.1	0.045 ± 0.006	0.50 ± 0.00
CM243	E	R5	-	-	0.53 ± 0.11	9.5 ± 2.1	0.29 ± 0.11	1.2 ± 0.6	0.15 ± 0.05	1.8 ± 0.4
GXE	E	R5	-	-	2.0 ± 0.4	26 ± 23	0.83 ± 0.11	8.2 ± 1.3	0.83 ± 0.38	6.3 ± 5.2
算术平均值 ^d			1.4	23	0.57	6.1	0.22	1.6	0.19	1.2
几何平均值 ^d			1.2	17	0.37	3.4	0.12	0.56	0.083	0.46

^a 导致抑制 50% 病毒感染的抗体浓度 (nM)。^b 导致抑制 90% 病毒感染的抗体浓度 (nM)。^c 在测试的最高抗体浓度 (67 nM) 下无显著中和。^d 计算所有病毒的算术平均值和几何平均值，所述病毒包括具有 <0.021 nM 的值的值的那些，这些值被指定为 0.01 的值。基于被显著中和的 10 个分离物的值计算 2G12 的平均值。

[0139]

表 4. 通过不同价的 mD1.22 抑制 HIV-1 Env-介导的细胞-细胞融合。

病毒	进化枝	向性	m36.4		mD1.22		mD1.22Fc		2Dm2m		4Dm2m		6Dm2m	
			IC ₅₀ ^a	IC ₉₀ ^b	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
Bal	B	R5	11 ± 1	235 ± 49	21 ± 0	108 ± 4	24 ± 4	135 ± 21	21 ± 6	113 ± 39	4.1 ± 0.1	13 ± 3	3.0 ± 0.0	5.0 ± 0.8
JRFL	B	R5	128 ± 5	1075 ± 35	66 ± 1	208 ± 4	66 ± 1	>222	7.5 ± 0.0	80 ± 9	1.6 ± 0.7	11 ± 2	0.46 ± 0.07	10 ± 3

^a 导致抑制 50% 的细胞-细胞融合的抗体浓度(nM)。

^b 导致抑制 90% 的细胞-细胞融合的抗体浓度(nM)。

表 5. 通过 4Dm2m、6Dm2m 和 bnmAbs 抑制 HIV-1 Env-介导的细胞-细胞融合

病毒	进化枝	向性	2G12		VRC01		4Dm2m		6Dm2m	
			IC ₅₀ ^a	IC ₉₀ ^b	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
Bal	B	R5	38 ± 31	>67	2.6 ± 0.0	24 ± 2	4.1 ± 0.1	12 ± 0	2.3 ± 0.2	6.7 ± 2.2
JRFL	B	R5	14 ± 2	67 ± 5	3.1 ± 0.6	21 ± 1	3.6 ± 0.2	8.8 ± 0.4	2.3 ± 0.3	5.8 ± 1.1

^a 导致抑制 50% 的细胞-细胞融合的抗体浓度(nM)。

^b 导致抑制 90% 的细胞-细胞融合的抗体浓度(nM)。

[0140]

表 6. 在基于 TZM-bl 细胞的测定中 HIV-1 的中和

病毒	进化枝	向性	IC ₅₀ (nM) ^a					IC ₉₀ (nM) ^a				
			b12 ^b	VRC01 ^b	D1D2Fc	4Dm2m	6Dm2m	b12	VRC01	D1D2Fc	4Dm2m	6Dm2m
KNH1088.EC5	A	R5	117	3.0	>250	0.48	1.0	>167	18	>250	18	33
KNH1144.EC1	A	R5	>167	2.2	4.8	0.081	0.11	>167	9.5	42	1.0	1.1
BaL.EC1 TC	B	R5	1.2	0.39	0.60	0.057	0.045	3.6	5.2	3.2	0.22	0.20
BZ167.ec9	B	X4	14	6.4	13	0.077	0.10	>167	31	60	0.50	0.76
GS-015.EC12	C	R5	0.085	>167	0.20	0.022	0.027	1.6	>167	3.2	0.17	0.17
PBL286.VRC36aPV	C	R5	4.0	2.1	87	2.0	2.1	19	10	>250	14	12
A07412VRC12A	D	R5	12	1.3	57	0.75	0.76	>167	6.0	>250	5.7	6.1
57128.VRC18	D	R5	2.3	>167	5.4	0.40	0.44	30	>167	41	2.8	2.6
CM240.EC1	AE	R5	82	0.66	20	0.45	0.40	>167	11	>250	3.7	3.6
N1 1046.e3 PV	AE	R5	138	4.2	183	3.5	3.1	>167	18	>250	27	30
CAM0015BBY.EC3	AG	R5	81	21	41	0.72	1.4	>167	>167	>250	7.4	7.6
55815.EC3	AG	R5	>167	0.33	6.2	0.084	0.077	>167	2.6	116	0.61	0.67
算术平均值 ^c			71	37	60	0.72	0.80	138	59	172	6.8	8.2
几何平均值 ^c			17	4.2	14	0.28	0.32	67	21	82	2.4	2.6

^a 以一式双份进行测定。结果呈现为无标准差的平均值。仅当重复测定的结果之间的差异在 3 倍之内时才计算平均值。

^b 在中和测定中使用的 bnAb b12 和 VRC01 呈 IgG1 形式。

^c 计算所有病毒的算术平均值和几何平均值, 病毒包括具有值>167 nM 的那些(将该值指定为 200 的值)以及具有值>250(将该值指定为 300 的值)的那些。

[0141]

表 7. 在基于 TZM-bl 细胞测定中主要在中国流行的 HIV-1 分离物的中和

病毒	进化枝	向性	IC ₅₀ (nM) ^a						IC ₉₀ (nM) ^a					
			T20	C34	D1D2Fe	2Dm2m	4Dm2m	6Dm2m	T20	C34	D1D2Fe	2Dm2m	4Dm2m	6Dm2m
CH64	BC	R5	3.1	1.2	48	1.7	0.17	0.13	25	6.7	>250	14	1.6	0.80
CH70	BC	R5	65	7.6	7.3	0.40	0.11	0.09	>750	84	109	3.1	1.2	0.67
CH91	BC	R5	8.6	2.3	35	3.7	0.39	0.27	310	12	>250	56	10	3.5
CH110	BC	R5	4.3	0.78	28	0.93	0.11	0.09	262	6.3	>250	8.7	0.83	0.58
CH114	BC	R5	102	5.4	23	1.5	0.11	0.18	>750	25	198	19	4.0	1.9
CH117	BC	R5	2.3	0.60	27	5.4	0.33	0.22	34	3.2	>250	62	15	5.1
CH119	BC	R5	2.0	3.3	85	2.7	0.17	0.13	25	20	>250	25	3.4	1.1
CH120	BC	R5	11	4.6	104	4.3	0.33	0.27	443	39	>250	46	6.6	3.5
CNE7	BC	R5	4.3	6.4	19	1.5	0.18	0.14	58	22	161	8.1	1.8	1.2
CNE15	BC	R5	14	3.8	106	3.0	0.29	0.17	157	22	>250	20	2.6	1.3
CNE16	BC	R5	14	11	11	0.77	0.08	0.07	169	51	229	8.5	1.2	0.71
CNE20	BC	R5	5.5	3.3	65	11	0.05	0.29	41	14	>250	>100	5.3	2.9
CNE23	BC	R5	15	2.1	>250	5.4	0.49	0.48	228	18	>250	35	4.9	9.9
CNE30	BC	R5	26	14	17	0.58	0.07	0.06	285	110	211	3.6	0.44	0.31
CNE40	BC	R5	4.9	0.77	0.06	0.04	0.01	0.01	108	7.8	0.50	0.33	0.11	0.09
CNE46	BC	R5	26	6.4	99	3.8	0.27	0.21	743	115	>250	81	9.4	2.8
CNE47	BC	R5	4.9	1.9	152	1.5	0.11	0.12	42	14	>250	30	2.8	1.2
CNE49	BC	R5	9.1	2.3	21	0.40	0.05	0.05	236	12	224	2.6	0.56	0.44
CNE53	BC	R5	51	2.0	14	2.8	0.24	0.47	721	23	>250	95	5.5	12
CNE68	BC	R5	32	2.2	9.7	0.40	0.11	0.04	321	12	133	4.5	0.78	0.89
CNE1	B'	X4	1.6	0.73	197	0.47	0.11	0.22	17	6.8	>250	4.1	0.61	2.2
CNE4	B'	R5	1.7	6.3	3.9	0.40	0.11	0.13	14	23	24	0.40	2.4	0.80
CNE6	B'	R5	1.4	1.6	68	1.7	0.33	0.22	15	15	192	6.9	2.3	1.4
CNE9	B'	R5	1.7	0.87	9.9	1.1	0.22	0.22	14	5.8	63	7.0	3.2	1.7
CNE11	B'	R5	3.5	4.6	>250	1.8	0.33	0.36	36	42	>250	11	2.6	3.4
CNE14	B'	R5	9.7	3.9	105	0.80	0.17	0.18	305	17	248	4.13	2.4	1.6
CNE57	B'	X4	2.5	2.0	250	2.1	1.2	0.71	24	14	>250	>100	19	22

[0142]

CNE64	B'	R5	1.9	5.1	12	1.4	0.56	0.22	16	21	113	6.5	3.2	1.5
CNE17	C	R5	42	3.2	11	2.4	0.11	0.13	676	82	231	36	2.4	0.84
CNE58	C	R5	54	2.0	>250	10	2.1	1.1	745	13	>250	>100	>28	>28
CNE65	C	R5	5.9	3.1	15	1.1	0.28	0.22	78	16	115	12	3.3	1.5
CNE66	C	R5	129	2.1	159	1.2	0.17	0.09	729	11	>250	>100	7.7	3.1
CNE3	AE	R5	5.6	7.1	>250	1.9	0.39	0.31	38	71	>250	11	2.8	2.0
CNE5	AE	R5	2.1	5.9	94	1.8	0.67	0.53	19	63	236	15	8.7	5.9
CNE55	AE	R5	26	7.9	213	5.9	0.45	0.46	549	103	>250	42	10	5.1
CNE59	AE	R5	1.4	3.4	10	0.93	0.17	0.18	17	28	220	16	2.7	3.8
CNE107	AE	X4	3.8	2.8	135	3.7	0.52	0.89	45	32	>250	33	18	21
AE20	AE	R5	212	7.4	50	1.5	0.72	0.49	572	69	>250	10	5.8	4.1
AE03	AE	R5	304	24	>250	5.7	0.67	0.40	510	85	>250	58	12	15
YN192.31	AE	R5	42	27	155	5.7	0.89	2.4	336	225	>250	65	21	19
GX2010.36	AE	R5	255	15	12	4.7	0.11	0.13	>750	165	>250	90	18	6.8
算术平均值 ^b			37	5.3	94	2.6	0.34	0.32	277	42	242	38	6.2	5.0
几何平均值 ^b			11	3.5	42	1.7	0.22	0.20	123	25	195	17	3.5	2.4

^a 以一式双份进行测定。结果呈现为无标准差的平均值。仅当重复测定的结果之间的差异在 3 倍之内时才计算平均值。
^b 计算所有病毒的算术平均值和几何平均值，病毒包括具有值>750 nM 的那些(将该值指定为 800 的值)，具有值>250 nM 的那些(将该值指定为 300 的值)，具有值>100 的那些(将该值指定为 150 的值)以及具有值>28 nM 的那些(将该值指定为 30 的值)。

[0143]

表 8. 如通过 SPR 所测量的 mD1.2 和 mD1.22 与 HIV-1 gp140 的结合动力学

HIV-1 gp140	进化枝	mD1.2			mD1.22		
		K_a ($M^{-1} s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)	K_a ($M^{-1} s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
Gp140 _{Con-s}	共有 ^a	1.7×10^5	9.3×10^{-4}	5.4	1.7×10^5	7.7×10^{-4}	4.4
Gp140 _{MS}	A	4.2×10^5	1.0×10^{-4}	0.24	3.8×10^5	7.3×10^{-5}	0.19
Gp140 _{89,6}	B	3.4×10^5	4.0×10^{-4}	1.2	2.5×10^5	2.1×10^{-4}	0.87
Gp140 _{CH12.0544.2}	B	1.5×10^5	1.1×10^{-4}	0.72	1.2×10^5	2.0×10^{-5}	0.17

^a通过比对 HIV-1 的 M 组的大于 1,000 个序列设计的共有 gp140.
 K_a , 结合速率常数。
 K_d , 解离速率常数。
 K_D , 平衡解离常数

[0144] 本文所述的实施例显示了新的D1突变体的鉴定。具体地说,mD1.22具有改善的可溶性表达和稳定性,与人血B和T细胞系没有显示出可测量的相互作用,并保存了与HIV-1gp120的结合和交叉反应性。mD1.22-m36.4融合蛋白已经显示为有效的HIV-1中和剂并且多价mD1.22-m36.4融合蛋白不倾向于增强HIV-1感染性。因此,这些新鉴定的突变体可用于HIV-1的预防和治疗,以及也可作为研究HIV-1进入的机制以及免疫应答中CD4的生物学功能的有价值的工具。

[0145] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入,其程度如同每份参考文献单独地和具体地表示为通过引用并入并且在本文以其整体示出。

[0146] 在描述本发明的上下文中使用的术语“一个/一种”和“所述”和“至少一种/一个”以及类似的指示物(特别是在以下权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数两者,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“至少一种/一个”之后一项或多项列举(例

如,“A和B中的至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B),除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式的术语(即意指“包括,但不限于”),除非另外指明。本文数值的范围的描述仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记法,除非本文另外指出,并且将每个单独数值并入说明书,如同其在本文中被独立描述一样。本文描述的所有方法可以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(如“诸如”)的使用仅仅旨在更好地阐明本发明,并且不会对以其它方式要求保护的本发明范围构成限制。不应将本说明书中的语言解释为表明任何未要求保护的组分对实施本发明是必要的。

[0147] 本发明的优选实施方案在本文中描述,包括发明人已知的实施该发明的最佳模式。对本领域的普通技术人员来说,阅读上述说明后这些优选的实施方案的变型可以是显而易见的。发明人期望本领域技术人员酌情利用这些变型,并且发明人有意以不同于本文具体描述的方式实施该发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括在所附的权利要求中所述主题的所有变化和等同物。而且,在其所有可能的变型中上述要素的任何组合包括于本发明中,除非本文另外说明或与上下文明显矛盾。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部
<120> 稳定的人单CD4结构域和融合蛋白
<130> 716226
<150> US 61/791,885
<151> 2013-03-15
<160> 23
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 99
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 1

[0001]

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

<210> 2
<211> 99
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Lys Lys Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asp Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

[0002] Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val
85 90 95

Val Val Gly

<210> 3

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

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

Val Phe Gly

<210> 4
<211> 99
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 4

[0003]

Lys Lys Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

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

Val Val Gly

<210> 5
<211> 178
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

[0004]

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

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
165 170 175

Leu Ala

<210> 6

<211> 178

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 6

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
 20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
 35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
 50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
 65 70 75 80

[0005] Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
 85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
 100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
 115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
 130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
 165 170 175

Leu Ala

<210> 7

<211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

[0006]

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 8

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

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

[0007]

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

	<400> 9 ggggsggggs ggggs	15
	<210> 10 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
	<400> 10 ggggsggggs ggggsggggs ggggsggggs	30
	<210> 11 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
	<400> 11 ggggsggggs ggggsggggs ggggsggggs ggggsggggs ggggs	45
[0008]	<210> 12 <211> 117 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的	
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (26)..(33) <223> 互补决定区(CDR) 1.	
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (51)..(58) <223> CDR2.	
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (96)..(106) <223> CDR3.	
	<400> 12 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	

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

[0009]

<210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(33)
 <223> CDR1.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(58)
 <223> CDR2.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96)..(106)
 <223> CDR3.

 <400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

[0010] Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26).. (33)
 <223> CDR1.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51).. (58)
 <223> CDR2.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96).. (106)
 <223> CDR3.

<400> 14

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

[0011] Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26).. (33)
 <223> CDR1.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51).. (58)
 <223> CDR2.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96).. (106)
 <223> CDR3.

<400> 15

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

[0012]

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26).. (33)
<223> CDR1.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51).. (58)
<223> CDR2.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (96).. (106)
<223> CDR3.

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asp Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Asp Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

[0013]

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Lys Lys Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln

	50		55		60														
	Gly	Asn	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile	Lys	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Asp			
	65					70					75					80			
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val			
					85					90					95				
	Val	Val	Gly	Gly	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala			
				100					105					110					
	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro			
			115					120					125						
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val			
	130						135					140							
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val			
	145					150					155					160			
[0014]	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln			
					165					170					175				
	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln			
				180					185					190					
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala			
			195					200					205						
	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro			
		210					215					220							
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr			
	225					230					235					240			
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser			
					245					250					255				
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr			
				260					265					270					
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr			
			275					280					285						

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 18
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

Lys Lys Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

[0015] Thr Ala Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

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

Val Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

41

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0017]

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asp Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Asp Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

	100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125		
	Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 130 135 140		
	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu 145 150 155 160		
	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp 165 170 175		
	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp 180 185 190		
	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys 195 200 205		
[0018]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln 210 215 220		
	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235		
	<210> 20 <211> 560 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成的		
	<400> 20		
	Lys Lys Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys 1 5 10 15		
	Thr Ala Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn 20 25 30		
	Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro 35 40 45		

	Ser	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Val	Asp	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Trp	Asp	Gln
	50						55					60				
	Gly	Asn	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile	Lys	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Asp
	65					70					75					80
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val
					85					90					95	
	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
				100					105					110		
	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115						120					125			
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
		130					135					140				
	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150					155					160
[0019]	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
					165					170					175	
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
		210					215					220				
	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	225					230					235					240
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
					245					250					255	
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
				260					265					270		
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr

	275	280	285	
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 290	295	300	
	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305	310	315	320
	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 325	330	335	
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340	345	350	
	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355	360	365	
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370	375	380	
[0020]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385	390	395	400
	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405	410	415	
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420	425	430	
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly 435	440	445	
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys Val 450	455	460	
	Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser 465	470	475	480
	Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys 485	490	495	
	Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu 500	505	510	

Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe
515 520 525

Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile
530 535 540

Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val Val Val Gly
545 550 555 560

<210> 21
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 21

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

[0021] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asp Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Asp Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

130	135	140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
145	150	155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	165	170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
	180	185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
	195	200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln		
	210	215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

[0022] <210> 22
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 22

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

	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val	
				85						90					95		
	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			100						105					110			
	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115						120					125				
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165						170					175		
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180						185					190			
[0023]	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
			195					200					205				
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
		210					215					220					
	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245						250					255		
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260						265					270			
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		275						280					285				
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		290					295					300					
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	

	305		310		315		320
	Lys Val Ser Asn	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser					
		325			330		335
	Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro					
		340			345		350
	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val						
		355			360		365
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly						
		370			375		380
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp						
		385			390		395
	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp						
		405			410		415
[0024]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His						
		420			425		430
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly						
		435			440		445
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys Val						
		450			455		460
	Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser						
		465			470		475
	Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys						
		485			490		495
	Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu						
		500			505		510
	Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe						
		515			520		525
	Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile						
		530			535		540

Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val Val Val Gly
545 550 555 560

<210> 23
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asp Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

[0025] Gly Glu Ile Asn Asp Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Gly Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

	165	170	175
	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp 180 185 190		
	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys 195 200 205		
	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln 210 215 220		
	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly 225 230 235 240		
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys 245 250 255		
[0026]	Val Val Tyr Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala 260 265 270		
	Ser Gln Lys Lys Asn Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile 275 280 285		
	Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys 290 295 300		
	Leu Asn Asp Arg Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn 305 310 315 320		
	Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Asp Thr Tyr 325 330 335		
	Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val Val Val 340 345 350		
	Gly		

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	SEQ ID NO:
D1	K	V	L	G	K	G	T	V	E	L	T	1
mD1.2	Y	Y	N	N	N	I	K	I	L	N	G	3
mD1.22	Y	Y	N	N	N	I	K	I	L	N	G	4
mD1.23	Y	Y	N	N	N	I	K	I	L	N	G	1

图1

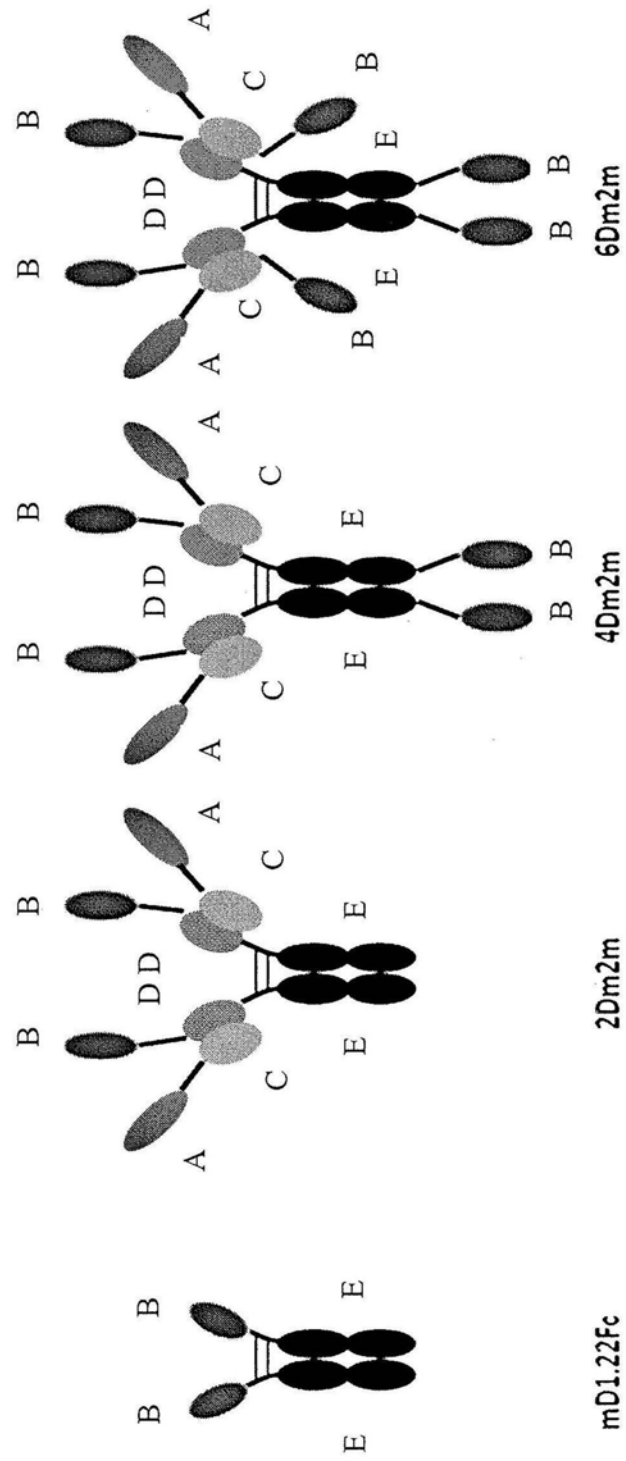


图2

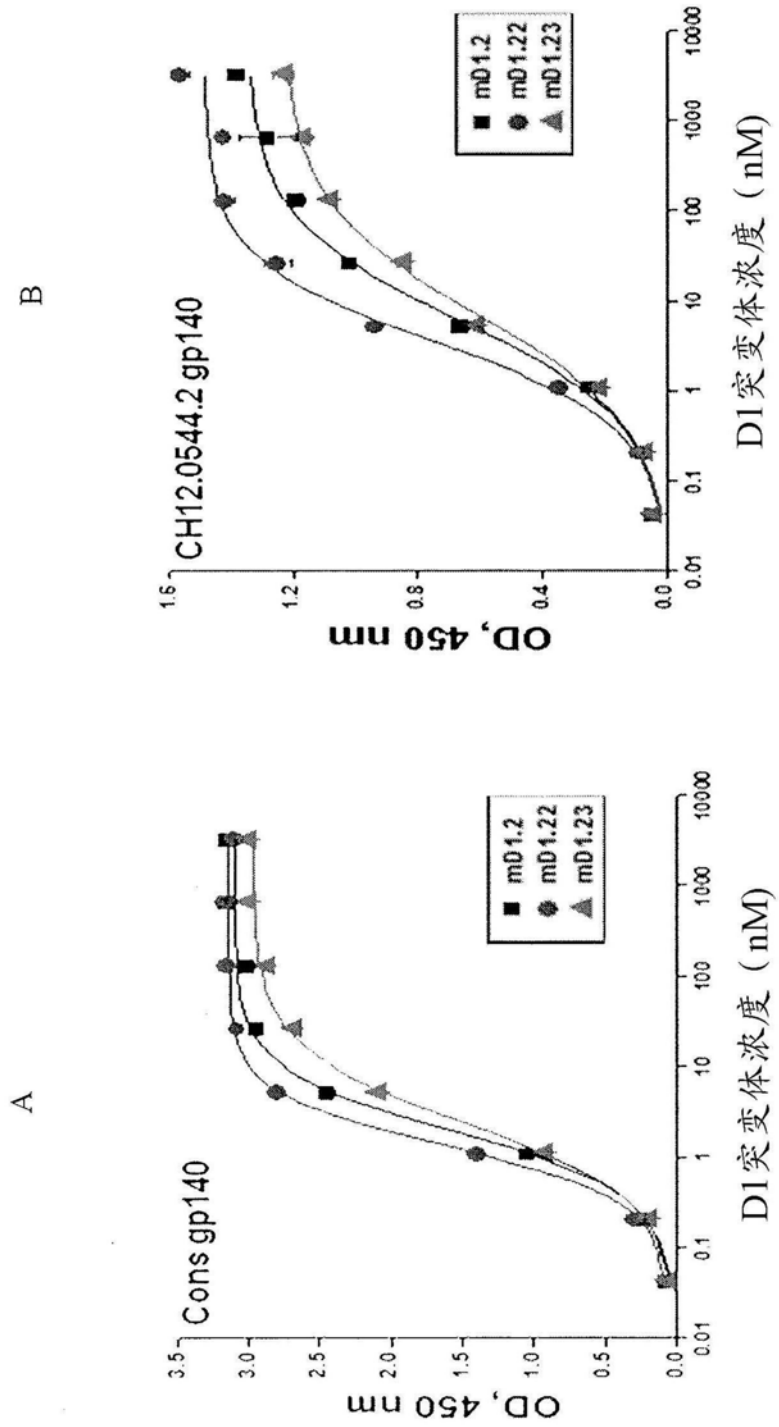


图3

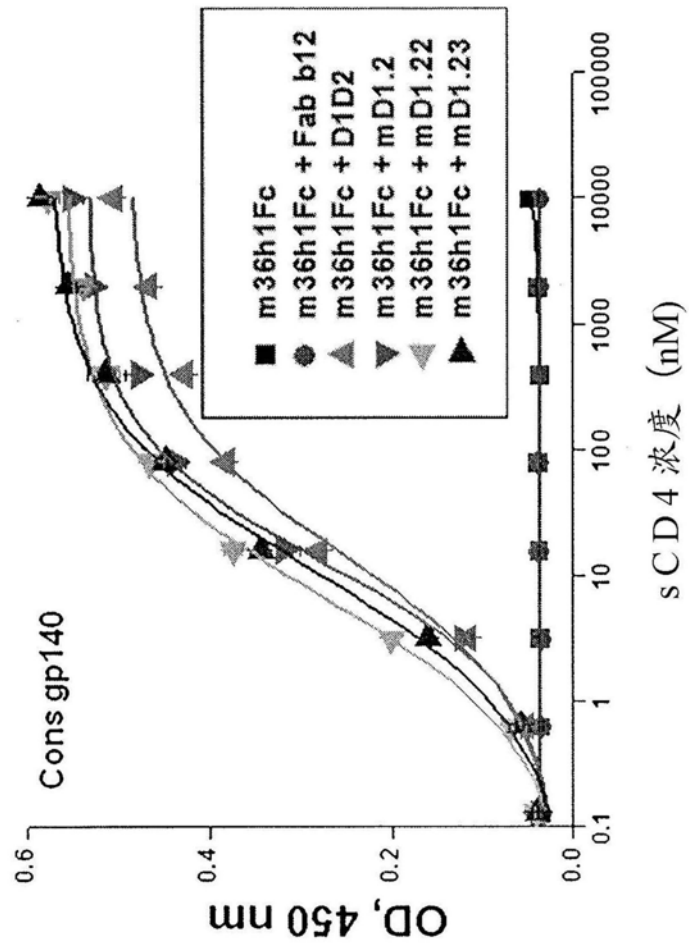


图4

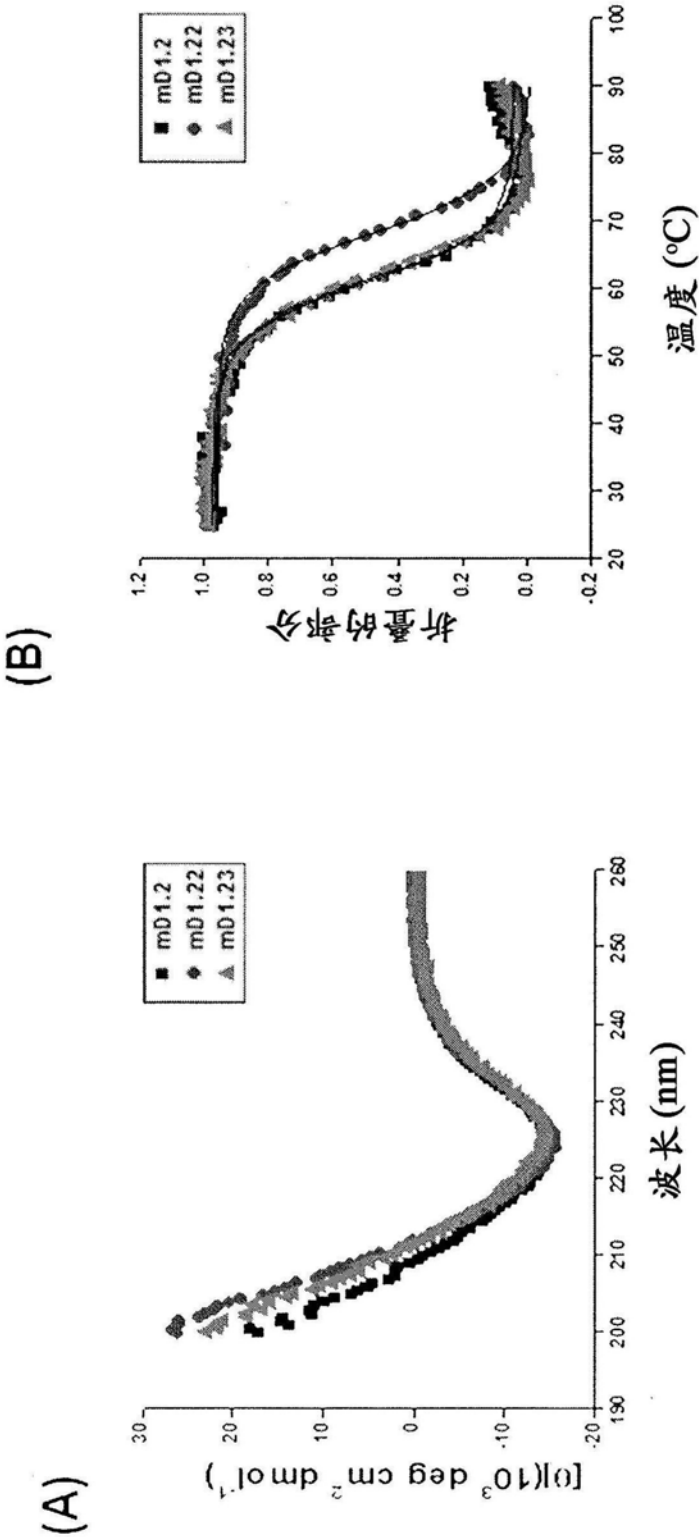


图5

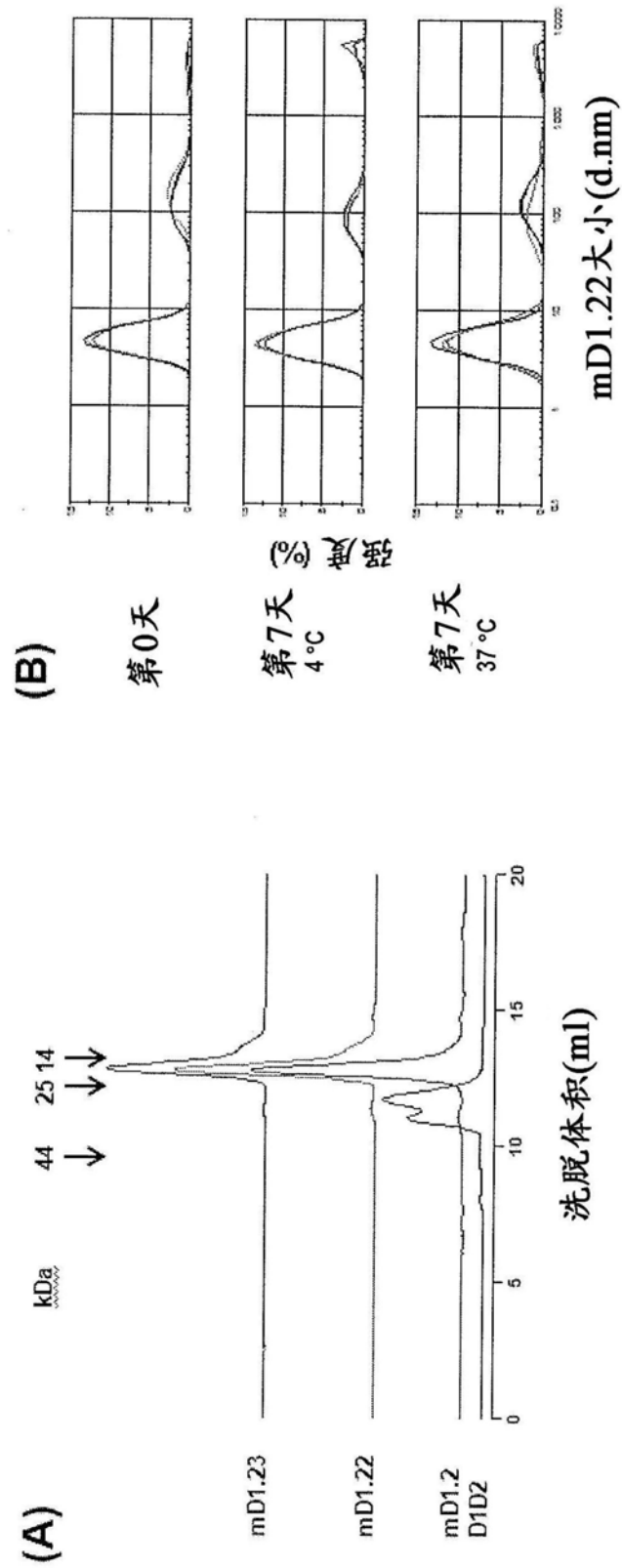


图6

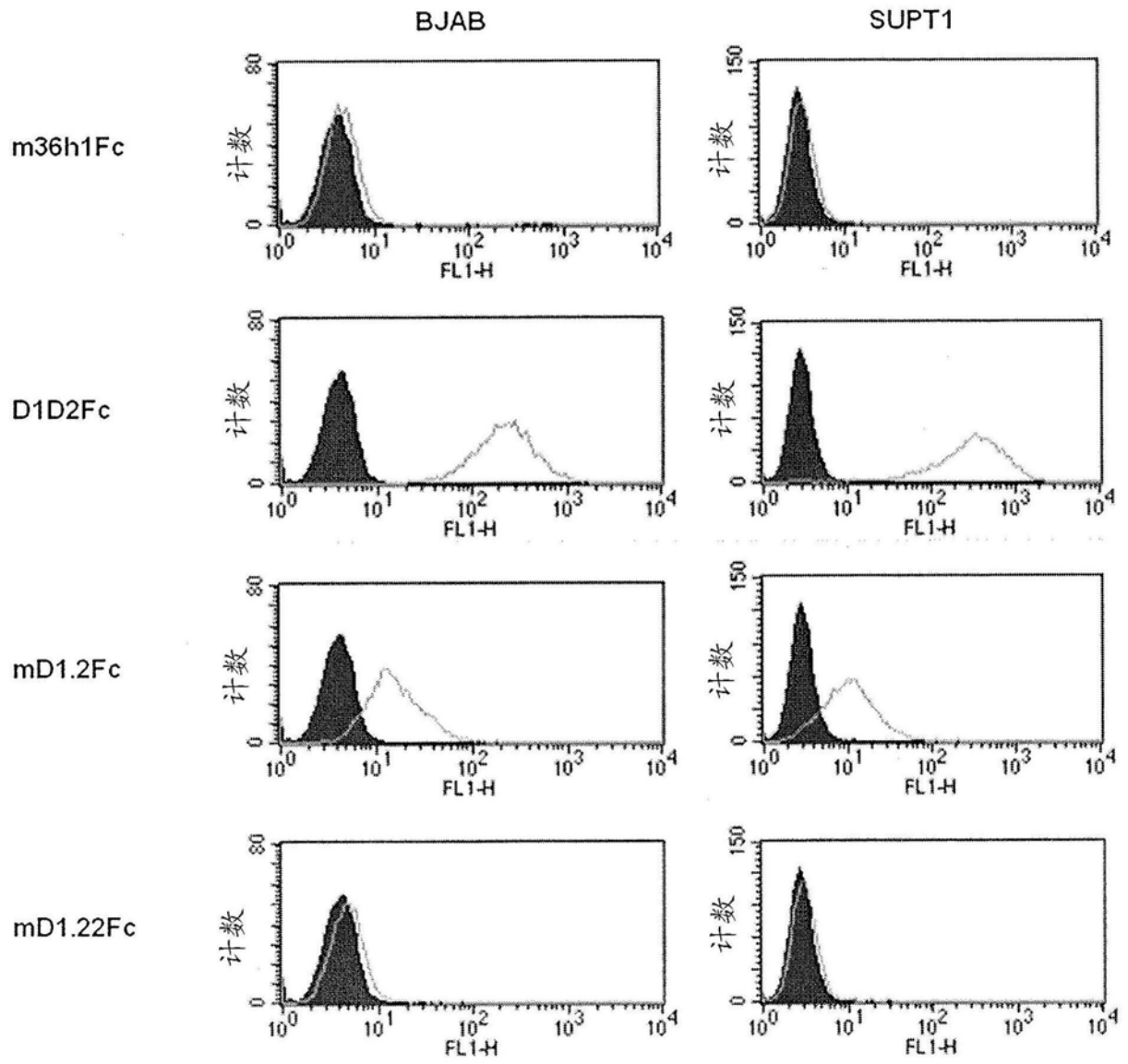


图7

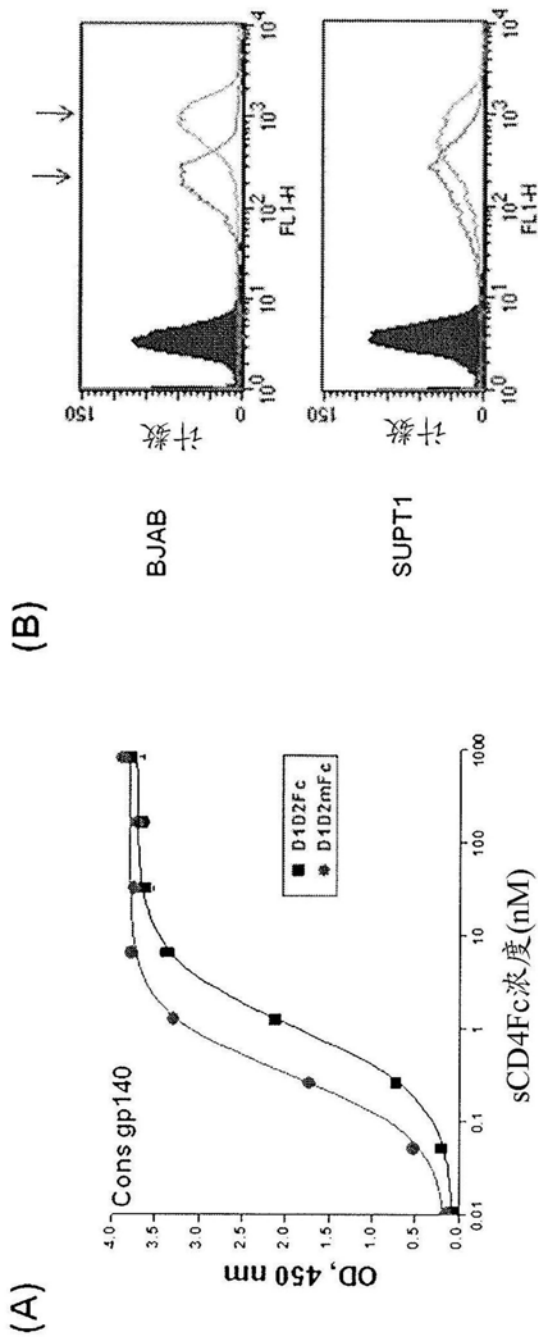


图8

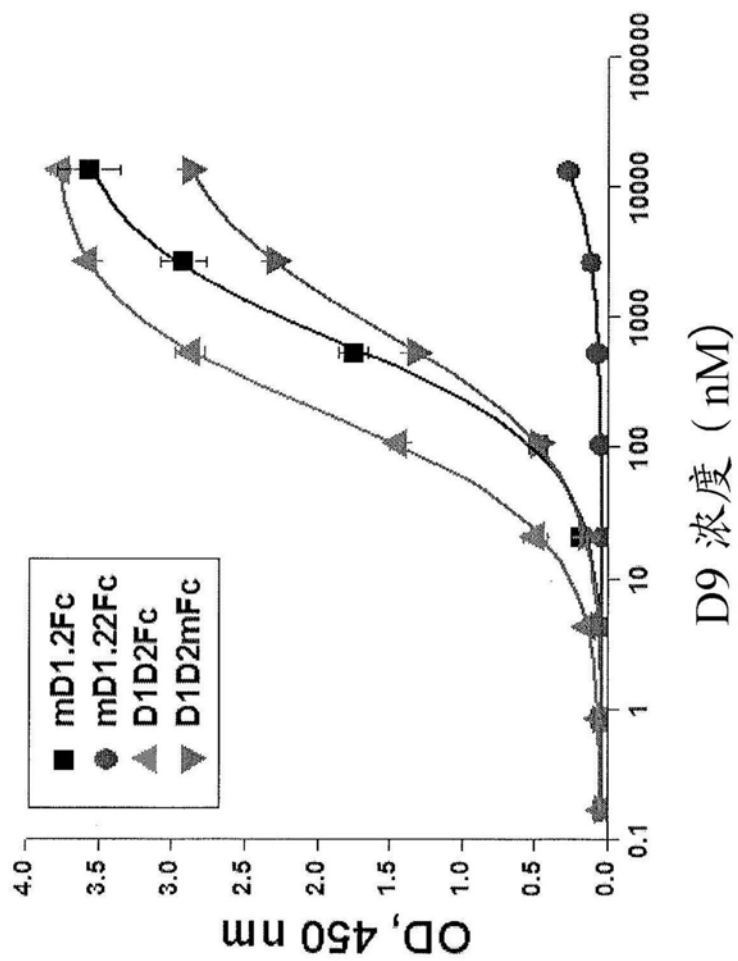


图6

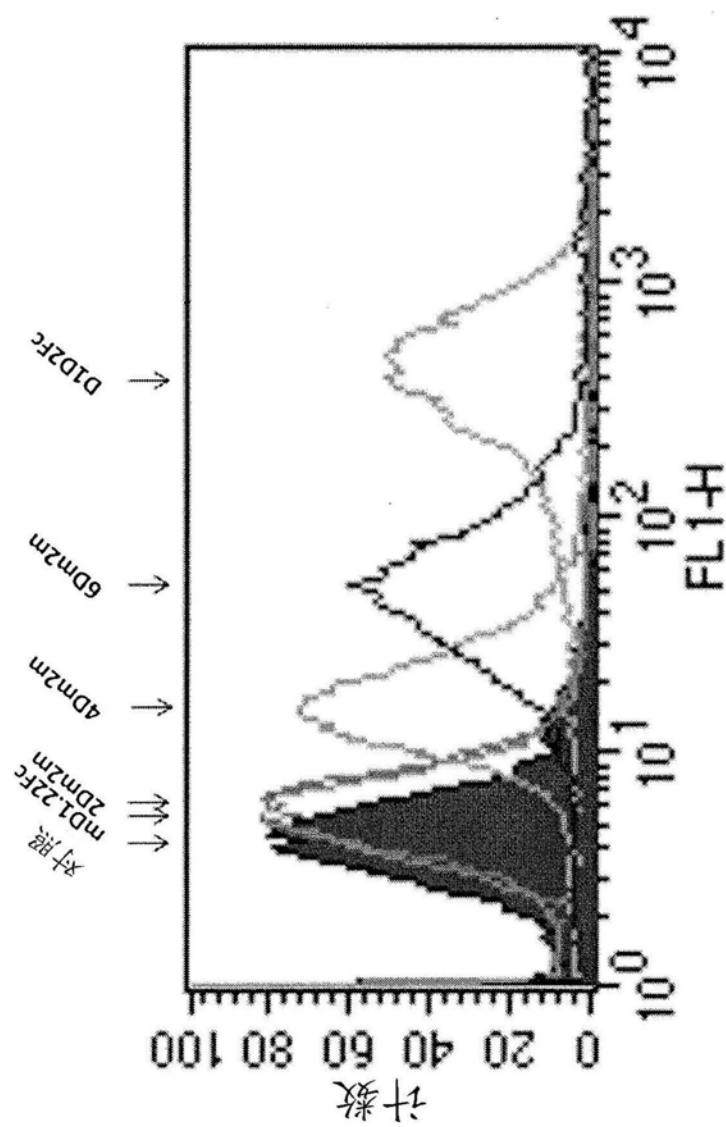


图10

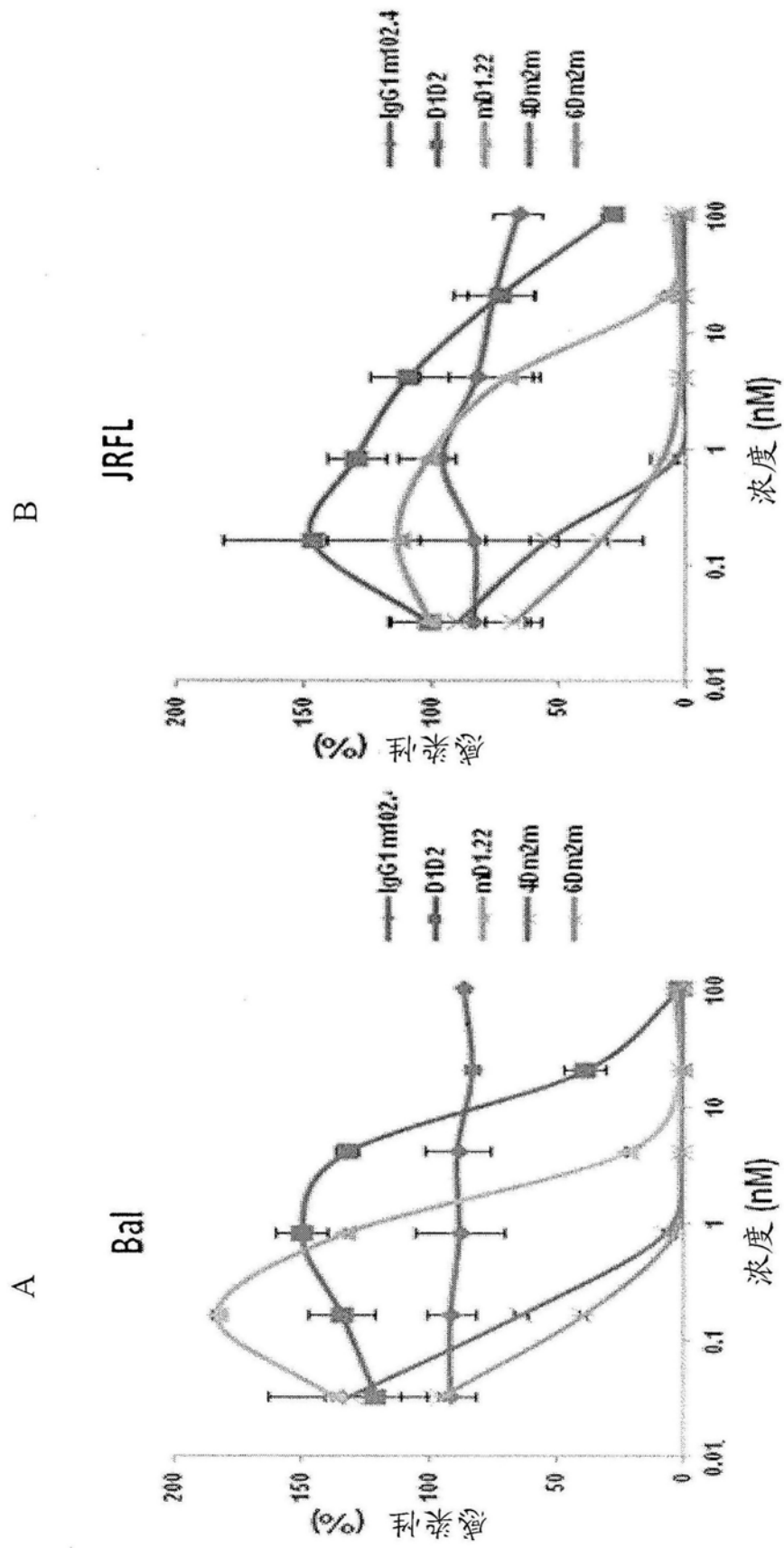


图11

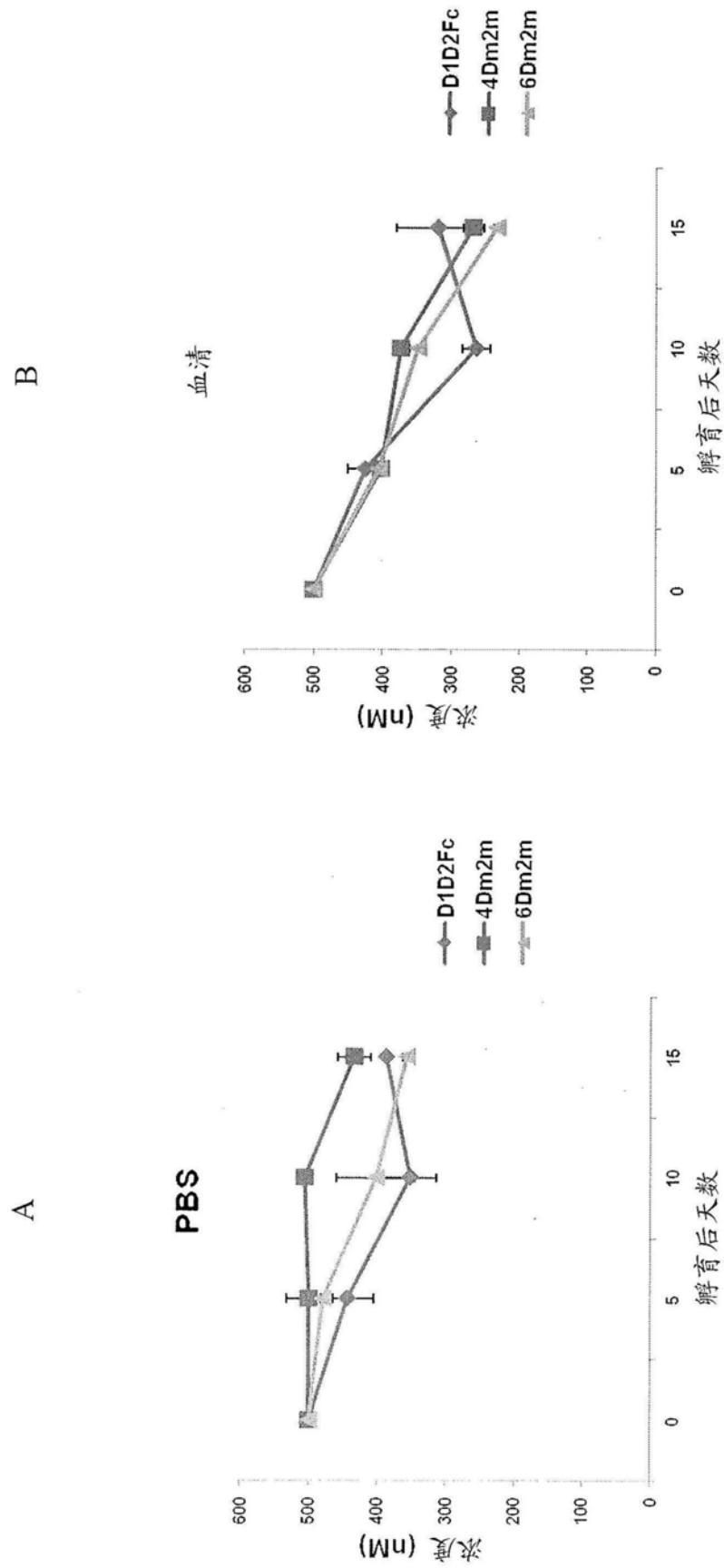


图12