



(21) 申请号 201880057824.9	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2018.08.31	C07K 16/10 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111344302 A	(56) 对比文件
(43) 申请公布日 2020.06.26	CN 106885903 A,2017.06.23
(30) 优先权数据	EP 2980099 A1,2016.02.03
PCT/EP2017/071891 2017.08.31 EP	Karin Stettler, et al..Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection.《SCIENCE》.2016,第353卷(第6301期),
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.02.28	Chengbin Wu,et al..Simultaneous targeting of multiple disease mediators.《NATURE BIOTECHNOLOGY》.2007,第25卷(第11期),
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2018/073489 2018.08.31	覃直然等.寨卡病毒检测技术研究进展.《华南预防医学》.2016,第42卷(第5期),
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/043166 EN 2019.03.07	审查员 高赞
(73) 专利权人 胡默波斯生物医学公司 地址 瑞士贝林佐纳	
(72) 发明人 达维德·科尔蒂	
(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413 专利代理师 刘晶晶 刘继富	
	权利要求书6页 说明书99页 序列表124页 附图28页

(54) 发明名称

特异性结合至寨卡病毒表位的多特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及多特异性抗体及其抗原结合片段,其特异性结合不同的寨卡病毒表位并有效中和ZIKV的感染。本发明还涉及编码此类抗体和抗体片段的核酸。另外,本发明涉及本发明的抗体和抗体片段在预防和治疗ZIKV感染中的用途。

1. 一种分离的多特异性抗体或其抗原结合片段, 其特异性结合不同的寨卡病毒表位, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含表位结合位点, 所述表位结合位点包含 (i) 分别根据 SEQ ID NO: 19 至 23 和 25 的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 氨基酸序列和 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 氨基酸序列; 或 (ii) 分别根据 SEQ ID NO: 19 至 22 和 24 至 25 的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 氨基酸序列和 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段中和寨卡病毒感染。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段消除寨卡病毒逃逸突变体的生成。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段不促进寨卡病毒感染的抗体依赖性增强。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段是双特异性、三特异性、四特异性或五特异性的。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段是二价、三价、四价、六价或八价的。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体分子恰好包含每个不同表位结合位点的两个拷贝, 其特异性结合至少两个不同的寨卡病毒表位。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段为 IgG 型。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段包含 Fc 部分。

11. 根据权利要求 10 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段在 Fc 部分中包含突变, 所述突变减少抗体与 Fc 受体的结合。

12. 根据权利要求 11 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段包含 CH2L4A 突变、CH2L5A 突变或两者。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段具有串联 Fab-Ig 抗体形式。

14. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段具有 DVD-Ig 抗体形式。

15. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段不包含 Fc 受体的结合位点。

16. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白上的不同表位特异性结合。

17. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白的结构域 III (EDIII) 结合。

18. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白的表位结合, 所述表位包含 EDIII 侧向脊 (LR) 的一个或多于

一个氨基酸残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。

19. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段能够抑制ZIKV的附着后步骤。

20. 根据权利要求19所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段能够防止膜融合。

21. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段能够引起ZIKV颗粒的聚集。

22. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含 (i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (ii) 根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (iii) 根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (iv) 根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (v) 根据SEQ ID NO:55至59和61的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (vi) 根据SEQ ID NO:55至58和60至61的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列; (vii) 根据SEQ ID NO:73至77和79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或 (viii) 根据SEQ ID NO:73至76和78至79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

23. 根据权利要求22所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含

(a) 第一表位结合位点,其包含 (i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;和

(b) 第二表位结合位点,其包含 (i) 根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

24. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),其中所述重链可变区 (VH) 包含根据SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或由其组成;并且所述轻链可变区 (VL) 包含根据SEQ ID NO:27的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或由其组成;其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变。

25. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段还包含 (i) 根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少

97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变; (ii) 根据SEQ ID NO:44的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:45的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变; (iii) 根据SEQ ID NO:62的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:63的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:55至59和61的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:55至58和60至61的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变;或 (iv) 根据SEQ ID NO:80的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:81的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:73至77和79的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:73至76和78至79的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变。

26. 根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含

(a) 第一表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变;和

(b) 第二表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具

有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变。

27. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段为串联Fab-Ig (FIT-Ig) 形式,并且所述FIT-Ig形式的外部Fab包含表位结合位点,所述表位结合位点包含 (i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;并且所述FIT-Ig形式的内部Fab包含表位结合位点,所述表位结合位点包含 (i) 根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或 (ii) 根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

28. 根据权利要求27所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述FIT-Ig形式的外部Fab包含表位结合位点,所述表位结合位点包含根据SEQ IDNO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变。

29. 根据权利要求28所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述FIT-Ig形式的内部Fab包含表位结合位点,所述表位结合位点包含根据SEQ IDNO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;其中 (i) 分别根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、和CDRL3氨基酸序列或 (ii) 分别根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列保持不变。

30. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是纯化的抗体或单链抗体。

31. 一种核酸分子,其包含至少一个编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

32. 根据权利要求31所述的核酸分子,其中所述核酸分子是单顺反子或多顺反子。

33. 根据权利要求32所述的核酸分子,其中所述核酸分子是双顺反子。

34. 根据权利要求31或32所述的核酸分子,其中所述核酸分子是DNA或RNA。
35. 根据权利要求34所述的核酸分子,其中所述核酸分子是DNA质粒或mRNA。
36. 一种载体,其包含根据权利要求31或32所述的核酸分子。
37. 多个核酸分子,每个核酸分子包含至少一个编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的多肽链的多核苷酸,其中所述多个核酸编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段。
38. 多个载体,其编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段。
39. 一种细胞,其表达根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段;或包含根据权利要求36所述的载体或根据权利要求38所述的多个载体。
40. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31或32所述的核酸分子、根据权利要求36所述的载体、根据权利要求37所述的多个核酸分子、根据权利要求38所述的多个载体和/或根据权利要求39所述的细胞。
41. 根据权利要求40所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。
42. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31或32所述的核酸分子、根据权利要求36所述的载体、根据权利要求37所述的多个核酸分子、根据权利要求38所述的多个载体、根据权利要求39所述的细胞或根据权利要求40所述的药物组合物,其用于预防或治疗寨卡病毒感染。
43. 根据权利要求42所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其用于预防或治疗诊断为寨卡病毒感染的对象中或出现寨卡感染症状的对象中的寨卡病毒感染。
44. 根据权利要求42所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其用于无症状的对象。
45. 根据权利要求42或43所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其用于怀孕对象。
46. 根据权利要求42或43所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其中在寨卡病毒感染后至多七天施用所述抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物感染。
47. 根据权利要求42或43所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述核酸、所述载体、所述多个核酸分子、所述多个载体、所述细胞或所述药物组合物与检查点抑制剂联合施用。
48. 根据权利要求42或43所述使用的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、多个核酸分子、多个载体、细胞或药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述核酸、所述多个核酸分子、所述多个载体、所述载体、所述细胞或所述药物组合物以0.005mg/kg至100mg/kg的剂量施用。
49. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段用于通过检查抗寨卡疫苗的抗原包含正确构象的特定表位来监测所述疫苗的质量的用途。
50. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断寨卡病毒感染的

诊断试剂中的用途。

51. 一种成套试剂盒,其包含至少一种根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、至少一种根据权利要求31或32所述的核酸、至少一种根据权利要求36所述的载体、根据权利要求37所述的多个核酸分子、根据权利要求38所述的多个载体、至少一种根据权利要求39所述的细胞或至少一种根据权利要求40所述的药物组合物。

特异性结合至寨卡病毒表位的多特异性抗体及其用途

[0001] 本发明涉及特异性结合至不同的寨卡病毒 (ZIKV) 表位的多特异性抗体及其抗原结合片段。这样的抗体有效地中和了寨卡病毒 (ZIKV) 的感染,并最小化或消除寨卡病毒逃逸突变体的生成。本发明还涉及编码此类抗体和抗体片段的核酸。另外,本发明涉及本发明的抗体和抗体片段在预防和治疗 ZIKV 感染中的用途。

[0002] 寨卡病毒 (ZIKV) 是一种由蚊子传播的黄病毒,其导致公共卫生突发事件。ZIKV 于 1947 年首次从乌干达的寨卡森林中猕猴中分离出来 (G.W.A.Dick, S.F.Kitchen, A.J.Haddow, Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 46, 509-520 (1952)), 1954 年在尼日利亚报道了第一例人类感染 F.N.Macnamara, Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 48, 139-145 (1954))。此后,在非洲和东南亚零星地报道了 ZIKV 感染 (D.Musso, Van Mai Cao-Lormeau, D.J.Gubler, Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? The Lancet. 386, 243-244 (2015)), 但密克罗尼西亚在 2007 年报道了疫情 (M.R.Duffy et al., Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med. 360, 2536-2543 (2009)), 法属波利尼西亚在 2013 年至 14 年报道了疫情,该病毒随后传播到大洋洲的其他国家 (V.-M.Cao-Lormeau, D.Musso, Emerging arboviruses in the Pacific. Lancet. 384, 1571-1572 (2014); D.Musso, E.J.Nilles, V.-M.Cao-Lormeau, Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. Clin. Microbiol. Infect. 20, 0595-6 (2014))。自 2015 年引入巴西以来, ZIKV 迅速传播, 2016 年 2 月, 世界卫生组织 (WHO) 宣布其为国际关注的突发公共卫生事件 (L.R.Baden, L.R.Petersen, D.J.Jamieson, A.M.Powers, M.A.Honein, Zika Virus. N. Engl. J. Med. 374, 1552-1563 (2016); A.S.Fauci, D.M.Morens, Zika Virus in the Americas-Yet Another Arbovirus Threat. N Engl J Med, 160113142101009 (2016); D.L.Heymann et al., Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? Lancet. 387, 719-721 (2016))。ZIKV 感染的主要途径是通过伊蚊蚊子叮咬, 但该病毒也可能是性传播 (D.Musso et al., Potential sexual transmission of Zika virus. Emerg Infect Dis. 21, 359-361 (2015)) 和垂直传播 (J.Mlakar et al., Zika Virus Associated with Microcephaly. N Engl J Med. 374, 951-958 (2016))。尽管大多数 ZIKV 感染是无症状的或仅引起轻度症状, 但有证据表明 ZIKV 感染可导致神经系统并发症, 例如成人的吉兰-巴雷 (Guillain-Barré) 综合征 (V.-M.Cao-Lormeau et al., Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Lancet. 0 (2016), doi: 10.1016/S0140-6736 (16) 00562-6) 和先天性出生缺陷, 包括发育中的胎儿的小头畸形 (G.Calvet, R.S.Aguiar, A.Melo, S.A.Sampaio, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. Lancet Infect Dis (2016), doi: 10.1016/s1473-3099 (16) 00095-5; J.Mlakar et al., Zika Virus Associated with Microcephaly. N Engl J Med. 374, 951-958 (2016);

E.J.Rubin,M.F.Greene,L.R.Baden,Zika Virus and Microcephaly.N Engl J Med (2016),doi:10.1056/NEJMe1601862),这可能是由于其感染人类神经祖细胞的能力(H.Tang et al.,Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth.Stem Cell,1-5(2016))。

[0003] ZIKV属于黄病毒属,还包括西尼罗河病毒、登革热病毒、蜱传脑炎病毒、黄热病病毒以及其他几种可能引起脑炎的病毒。黄病毒由具有二十面体和球形的几何形状包封。直径约为50nm。基因组是线性的正义RNA并且是非分段型,长度约10kb至11kb。黄病毒的基因组编码3个结构蛋白(衣壳、prM和包膜)和8个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5和NS5B)。

[0004] 黄病毒包膜(E)蛋白介导融合并成为中和抗体的主要靶标,但非结构蛋白1(NS1)由感染的细胞分泌,并与免疫逃逸和发病机理相关(D.A.Muller,P.R.Young,The flavivirus NS1 protein:molecular and structural biology,immunology,role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker.Antiviral Res.98,192-208(2013))。最近的两项结构研究表明,ZIKV的E蛋白与其他黄病毒例如登革热病毒(DENV)、黄热病病毒(YFV)和西尼罗河病毒(WNV)的E蛋白具有高度的结构相似性,而且还揭示了可能与ZIKV亲神经性有关的独特特征(L.Dai et al.,Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody.Cell Host Microbe(2016),doi:10.1016/j.chom.2016.04.013;D.Sirohi et al.,The **3.8 Å** resolution cryo-EM structure of Zika virus.Science,aaf5316(2016))。同样,尽管其具有不同的静电特性,但ZIKV NS1的结构分析揭示了与其他黄病毒NS1保守的特征(J.Kim et al.,Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses,1-6(2016))。

[0005] 某些黄病毒特征性的现象是由异源病毒先前感染引起的交叉反应性抗体的增强疾病活性。就已知4种血清型的登革热病毒(DENV)而言,流行病学证据表明,原发感染防止相同血清型的再次感染,但表现出在再次感染不同血清型后发生严重疾病的危险因素(S.B.Halstead,Dengue Antibody-Dependent Enhancement:Knowns and Unknowns.Microbiol Spectr.2,249-271(2014))。恶化的疾病是由E和prM特异性抗体引发的,这些抗体无法中和传入的病毒,但却通过表达Fc受体(FcR^+)的细胞增强了对病毒的捕获,从而导致病毒复制增强和交叉反应性记忆T细胞的激活。所产生的细胞因子风暴被认为是最严重的疾病形式的基础,被称为登革出血热/登革休克综合征(S.B.Halstead,Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses.Adv Virus Res.60,421-467(2003);G.Screaton,J.Mongkolsapaya,S.Yacoub,C.Roberts,New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection.Nat Rev Immunol.15,745-759(2015)。抗体在严重登革热中的作用得到了研究的支持,研究表明婴儿中母体抗体水平的下降表示发生严重登革热疾病的风险更高(S.B.Halstead,Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses.Adv Virus Res.60,421-467(2003);S.B.Halstead et al.,Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored.Emerging Infect Dis.8,1474-1479(2002);T.H.Nguyen et al.,Dengue hemorrhagic fever in infants:a study of clinical and

cytokine profiles. *J Infect Dis.* 189, 221-232 (2004); A.L. Rothman, Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 113, 946-951 (2004))。

[0006] 最近发现,大多数与DENV包膜蛋白反应的抗体也与ZIKV结合,但是那些识别主要线性融合环表位(FLE)的抗体并未中和ZIKV,而是促进ZIKV感染的抗体依赖性增强(ADE) (Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR: Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol.* 2016年6月23日. doi:10.1038/ni.3515. [Epub 提前发行])。

[0007] 此外,具有高突变率的生物例如各种病毒如寨卡病毒通常依赖于所谓的“突变逃逸”作为避免被宿主细胞破坏的机制。即,病毒可以通过使其基因型和表型发生突变(称为“逃逸突变”)来保护自己免受宿主免疫应答的影响。因此,逃逸突变体(即携带逃逸突变的病毒)的产生会降低抗体药物的功效。

[0008] 鉴于上述情况,本发明的目的是提供有效中和寨卡病毒(ZIKV)的多特异性抗体。此类抗体优选不促进寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)。本发明的另一个目的是提供消除或最小化ZIKV逃逸突变体的生成的高度特异性的抗ZIKV抗体。

[0009] 通过所要求保护的权利要求实现了本发明的目的。

[0010] 尽管下面详细描述了本发明,但应理解的是,本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为它们可以变化。还应理解,本文使用的术语并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0011] 在下文中,将描述本发明的元素。这些元素与特定实施方案一起列出,但应该理解的是,它们可以以任何方式和任何数量组合以产生其他实施方案。各种描述的实施例和优选实施方案不应被解释为将本发明限制为仅明确描述的实施方案。该描述应被理解为支持并涵盖将明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选要素相结合的实施方案。此外,除非上下文另外指出,否则应认为本申请的描述中公开了本申请中所有所描述要素的任何排列和组合。

[0012] 在整个本说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另外要求,否则术语“包括”及其变体例如“包含”和“含有”应理解为暗示包括提到所述的构件、整数或步骤,但不排除任何其他未陈述的构件、整数或步骤。术语“由……组成”是术语“包括”的具体实施方案,其中排除任何其他未陈述的构件、整数或步骤。在本发明的上下文中,术语“包括”涵盖术语“由……组成”。因此,术语“包括”涵盖“包含”以及“由……组成”例如,“包括”X的组合物可以仅由X组成、或可以包含其他部分,例如X+Y。

[0013] 在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)术语前不使用数量词限定、和术语“该”以及类似指代的使用应被解释为涵盖单数和复数,除非本文中另有说明或者与上下文明显矛盾。本文中对数值范围的引用仅旨在用作单独提到落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文另有说明,否则将每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独引用一样。说明书中的任何语言都不应解释为表示对于本发明的实践必不可少的任何未要求保护的要素。

[0014] 词语“基本上”不排除“完全”，例如，“基本上没有”Y的组合物可以完全没有Y。必要时，可以从本发明的定义中省略词语“基本上”。

[0015] 相对于数值x的术语“约”是指 $x \pm 10\%$ 。

[0016] 本文所用的术语“疾病”意在通常与术语“病症”和“症状”（如在医学状况中）同义，并可互换使用，因为所有这些都反映了人类或动物身体或其一个部分的损害正常功能的异常状况，并且通常通过可辨别的病症和症状来表现，并导致人类或动物的寿命缩短或生活质量降低。

[0017] 如本文所用，对对象或患者的“治疗”是指包括防治、预防、减毒、改善和治疗。术语“对象”或“患者”在本文可互换使用，以表示包括人类在内的所有哺乳动物。对象的实例包括人类、牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。在一个实施方案中，患者为人类。

[0018] 如本文所用，术语“抗原结合片段”、“片段”和“抗体片段”可互换使用，是指保留抗体的抗原结合活性的本发明抗体的任何片段。抗体片段的实例包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。此外，本文所用的术语“抗体”包括抗体及其抗原结合片段。

[0019] 如本文所用，术语“抗体”涵盖各种形式的抗体，包括但不限于完整抗体、抗体片段，特别是抗原结合片段、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体和基因工程化抗体（变体或突变抗体），只要保留本发明的特征即可。优选单克隆抗体，特别优选具有人CDR或人可变区的单克隆抗体。特别地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选源自人抗体（即，它们包含人抗体的CDR和/或可变区）。更优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段还包含人抗体的恒定区。最优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段的所有恒定区和可变区都是人源的，即人恒定区和人可变区，例如人抗体的恒定区和可变区。

[0020] 人抗体在现有技术中是众所周知的（van Dijk, M.A., 和 van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374）。人抗体也可以在转基因动物（例如小鼠）中产生，所述转基因动物在免疫后能够在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生完整的人抗体库或人抗体选择对象。在这种种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体（参见，例如 Jakobovits, A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., 等人, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., 等人, Year Immunol. 7 (1993) 3340）。人抗体也可以在噬菌体展示文库中产生（Hoogenboom, H.R., 和 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., 等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597）。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体（Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); 和 Boerner, P., 等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95）。优选地，如 Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med. 10 (8): 871-5 中所述，通过使用改进的EBV-B细胞永生化来制备人单克隆抗体。如本文所用，术语“人抗体”也包括这样的抗体，其例如在可变区或恒定区被修饰，以产生本文所述的根据本发明的性质。

[0021] 本发明的抗体可以是任何同种型抗体（例如，IgA、IgG、IgM，即 α 、 γ 或 μ 重链），但优选是IgG。在IgG同种型中，抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类，其中IgG1是优选的。本发明的抗体可以具有 κ 或 λ 轻链。

[0022] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以是纯化的抗体或单链抗体,例如双特异性单链Fv片段(scFv)。

[0023] 本发明还提供了本发明的抗体的片段,特别是保留了抗体的抗原结合活性的片段。尽管在说明书包括权利要求书中的某些地方,术语“抗体”或“本发明的抗体”可以明确地指代抗原的结合片段、抗体片段、抗体的变体和/或衍生物,但应理解的是,术语“抗体”或“本发明的抗体”包括所有类别的抗体,即,抗原结合片段、抗体片段、抗体变体和衍生物。本发明的抗体的片段可通过以下方法从抗体获得:通过包括用酶,例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化的方法,和/或通过由化学还原造成的二硫键裂解。或者,可以通过克隆和表达重链或轻链的部分序列来获得抗体的片段。例如,本发明包括双特异性scFv,其包含来自本发明抗体的CDR。本发明的抗体片段可以赋予单价或多价相互作用,并包含在多种结构中。例如,可以合成scFv分子以产生三价的“三抗体”或四价的“四抗体”。scFv分子可包含Fc区的结构域,从而产生二价微抗体。

[0024] 本发明的抗体可以纯化形式提供。通常,抗体将存在于基本上不含其他多肽的组合物中,例如,其中少于90重量%,通常少于60重量%,更通常少于50重量%的组合物由其他多肽构成。

[0025] 根据本发明的抗体可以在人和/或非人(或异源)宿主例如小鼠中具有免疫原性。例如,抗体可以具有在非人宿主中具有免疫原性但在人宿主中不具有免疫原性的独特型。用于人的本发明抗体包括不能容易从例如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等的宿主中分离的抗体,并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得。

[0026] 如本文所用,“中和抗体”是可以中和,即预防、抑制、减少、阻碍或干扰病原体在宿主中引发和/或持久感染的能力的抗体。术语“中和抗体”和“中和的抗体”在本文可互换使用。这些抗体可以根据适当的配方单独或组合用作预防剂或治疗剂,并与主动疫苗接种一起用作诊断工具或本文所述的生产工具。

[0027] 剂量通常与体重有关。因此,以[g、mg、或其他单位]/kg(或g、mg等)表示的剂量通常是指[g、mg、或其他单位]“每kg(或g、mg等)体重”,即使未明确提及术语“体重”。

[0028] 术语“特异性结合”和类似引用不包括非特异性黏附。

[0029] 如本文所用,术语“疫苗”通常被理解为提供至少一种抗原,优选免疫原的预防或治疗物质。抗原或免疫原可以源自适合于疫苗接种的任何物质。例如,抗原或免疫原可以源自病原体,例如源自细菌或病毒颗粒等,或源自肿瘤或癌组织。抗原或免疫原刺激人体的适应性免疫系统,以提供适应性免疫应答。特别地,“抗原”或“免疫原”通常是指可以被免疫系统识别的物质,优选地被适应性免疫系统识别的物质,并且能够触发抗原特异性免疫应答,例如通过形成抗体和/或抗原特异性T细胞作为适应性免疫应答的一部分。通常,抗原可以是或可以包含可由MHC呈递给T细胞的肽或蛋白质。

[0030] 如本文所用,“序列变体”(也称为“变体”)是指参考序列中的任何改变,其中参考序列是“序列和SEQ ID编号表”(序列表)中列出的任何序列,即SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:273。因此,术语“序列变体”包括核苷酸序列变体和氨基酸序列变体。值得注意的是,本文所指的序列变体特别是功能性序列变体,即保持例如抗体的生物学功能的序列变体。在本发明的上下文中,这种维持的生物学功能优选是中和ZIKV感染和/或抗体与ZIKV E蛋白的结合。因此,优选的序列变体是与参考序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至

少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的功能序列变体。本文所用的短语“具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的其功能序列变体”指(i)序列变体如本文所述行使功能,并且(ii)序列同一性%越高,则序列变体越优选。换句话说,短语“具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的其功能序列变体”特别是指功能序列变体与各自的参考序列具有至少70%的序列同一性,优选至少75%的序列同一性,优选至少80%的序列同一性,更优选至少85%的序列同一性,更优选至少88%的序列同一性,甚至更优选至少90%的序列同一性,甚至更优选至少92%的序列同一性,还更优选至少95%的序列同一性,还更优选至少96%的序列同一性,特别优选至少97%的序列同一性,特别优选至少98%的序列同一性,最优选至少99%的序列同一性。

[0031] 术语“序列变体”特别包括这样的变体,其与参考序列相比包含突变和/或取代。Fc部分序列的示例性变体包括但不限于在位置CH24、CH25或两者具有L被A取代的那些。

[0032] 通常根据参考序列(即本申请中所述的序列)的全长来计算序列同一性。如本文所指,同一性百分比可以例如使用BLAST使用由NCBI(美国国家生物技术信息中心;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)指定的默认参数来确定[Blosum 62矩阵;空位开放罚分=11,空位延伸罚分=1]。

[0033] 如本文所用,“核苷酸序列变体”具有改变的序列,其中将参考序列中的一个或多个核苷酸删除或取代,或将一个或多个核苷酸插入参考核苷酸序列的序列中。核苷酸在本文中用标准的一个字母表示(A、C、G或T)。由于遗传密码的简并性,“核苷酸序列变体”可以导致相应的参考氨基酸序列的改变,即“氨基酸序列变体”的改变或不变。优选的序列变体是这样的核苷酸序列变体,其不产生氨基酸序列变体(沉默突变),但是其他非沉默突变也在范围内,特别是突变核苷酸序列,其产生与参考序列具有至少80%,优选至少90%,更优选至少95%的序列同一性的氨基酸序列。

[0034] “氨基酸序列变体”具有改变的序列,其中将参考序列中的一个或多个氨基酸删除或取代,或将一个或多个氨基酸插入参考氨基酸序列的序列中。作为改变的结果,氨基酸序列变体具有的氨基酸序列与参考序列具有至少80%同一性,与参考序列具有优选至少90%同一性,更优选至少95%同一性,最优选至少99%同一性。相对于参考序列的每100个氨基酸,具有至少90%同一性的变体序列具有不超过10个改变,即删除、插入或取代的任意组合。

[0035] 尽管可以具有非保守的氨基酸取代,但优选地,取代是保守的氨基酸取代,其中取代的氨基酸具有与参考序列中相应氨基酸相似的结构或化学性质。举例来说,保守的氨基酸取代涉及一种脂肪族或疏水性氨基酸例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸用其他脂肪族或疏水性氨基酸取代;一种含羟基的氨基酸例如丝氨酸和苏氨酸用其他含羟基的氨基酸取代;一种酸性残基例如谷氨酸或天冬氨酸用其他酸性残基取代;一种含酰胺的残基例如天冬酰胺和谷氨酰胺用其他含酰胺的残基取代;一种芳香族残基例如苯丙氨酸和酪氨酸用其他芳香族残基取代;一种碱性残基例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸用其他碱性残基取代;一种小氨基酸例如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和甘氨酸用其他小氨基酸取代。

[0036] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基到含有一百个或多于一百个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括氨基酸序列的N-或C-末端与报告分子或酶的融合。

[0037] 重要的是,序列变体中的改变并不消除各自参考序列的功能,在该情况下,例如抗体序列或其抗原结合片段结合相同表位和/或充分中和ZIKV感染的功能。通过使用本领域众所周知的计算机程序,可以找到在不消除这种功能的情况下分别确定哪些核苷酸和氨基酸残基可以被取代、插入或删除的指南。

[0038] 本文所用的核酸序列或氨基酸序列“源自”指定的核酸、肽、多肽或蛋白质是指核酸、肽、多肽或蛋白质的来源。优选地,源自特定序列的核酸序列或氨基酸序列具有与该序列或其一部分来源的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列,由此“基本相同”包括如上定义的序列变体。优选地,源自特定肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列源自特定肽或蛋白质中的相应结构域。由此,“对应”特别是指相同的功能。例如,“细胞外结构域”对应于(另一种蛋白质的)另一“细胞外结构域”,或“跨膜结构域”对应于(另一种蛋白质的)另一“跨膜结构域”。肽、蛋白质和核酸的“相应”部分因此对于本领域普通技术人员而言是容易识别的。同样,“源自”其他序列的序列通常容易被本领域普通技术人员认为是其来源于该序列。

[0039] 优选地,源自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可以与(其来源的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质相同。然而,源自另一核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列也可以相对于(其来源的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质具有一个或多个于一个突变,特别地,源自另一核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可以是如上所述的(其来源的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质的功能序列变体。例如,在肽/蛋白质中,一个或多个于一个氨基酸残基可以被其他氨基酸残基取代,或者可以发生一个或多个于一个氨基酸残基的插入或缺失。

[0040] 如本文所用,术语“突变”是指与参考序列例如相应的基因组序列相比,核酸序列和/或氨基酸序列的变化。突变,例如与基因组序列相比,其可以是例如(天然存在的)体细胞突变、自发突变、诱导突变,例如由酶、化学物质或辐射引起的诱导突变,或通过定点诱变获得的突变(用于在核酸序列和/或氨基酸序列中进行特异性和有意改变的分子生物学方法)。因此,术语“突变”应被理解为还包括用物理的方式进行突变,例如在核酸序列或氨基酸序列中进行突变。突变包括一个或多个于一个核苷酸或氨基酸的取代、缺失和插入,以及几个连续核苷酸或氨基酸的倒位。为了实现氨基酸序列的突变,优选可以将突变引入编码所述氨基酸序列的核苷酸序列中,以表达(重组)突变的多肽。突变可以例如通过例如定点诱变改变编码一个氨基酸的核酸分子的密码子以产生编码不同氨基酸的密码子来实现,或通过合成序列变体来实现,例如通过知晓编码多肽的核酸分子的核苷酸序列,并且通过设计包含编码该多肽的变体的核苷酸序列的核酸分子的合成而无需使核酸分子的一个或多个于一个核苷酸突变。

[0041] 在本说明书的全文中引用了若干文献。无论是上文还是下文,本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书等)均通过引用整体并入本文。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权由于在先发明而先于此类公开内容。

[0042] 应当理解的是,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为它们可以变

化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0043] 结合不同寨卡病毒表位的多特异性抗体

[0044] 除其他发现外,本发明基于发现特异性结合不同寨卡病毒表位的多特异性抗体及其抗原结合片段。这样的抗体最小化或消除了寨卡病毒逃逸突变体的产生。特别是,目前尚无针对寨卡病毒感染的预防/治疗方法。根据本发明的抗体在预防以及治疗或减轻寨卡病毒感染方面非常有效。而且,由于抗体对寨卡病毒的特异性,它们并不引起ADE,而是阻断ADE。

[0045] 在第一方面,本发明提供了分离的多特异性抗体或其抗原结合片段,其特异性结合不同的寨卡病毒表位。换句话说,本发明提供了分离的多特异性抗体或其抗原结合片段,其包含至少两个表位结合位点,该结合位点特异性结合不同的寨卡病毒表位。

[0046] 重要的是,与仅表现出一种单一特异性的常规(“普通”)抗体相反,多特异性抗体能够结合至少两个不同的表位。在当前情况下,多特异性抗体特异性结合(至少两个)不同的寨卡病毒表位。

[0047] 因此,如本文所用,术语“多特异性”是指结合至至少两个不同表位的能力,所述两个不同表位例如在不同抗原上如不同寨卡病毒(ZIKV)蛋白、或在相同抗原上如相同ZIKV蛋白。优选地,根据本发明的多特异性抗体或其抗原结合片段结合至同一ZIKV蛋白上的至少两个不同表位,最优选地结合至寨卡病毒包膜(E)蛋白上的至少两个不同表位。

[0048] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是双特异性、三特异性、四特异性或五特异性的,更优选地,抗体或其抗原结合片段是双特异性、三特异性或四特异性的,甚至更优选地,抗体或其抗原结合片段是双特异性或三特异性的,最优选地,抗体或其抗原结合片段是双特异性的。

[0049] 如本文所用,术语如“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等是指抗体或其抗原结合片段可以结合的不同表位的数目。例如,常规的单特异性IgG型抗体具有两个相同的表位结合位点(互补位),因此仅可以结合相同的表位(但不结合不同的表位)。相反,多特异性抗体具有至少两种不同类型的表位结合位点(互补位),因此可以结合至少两种不同的表位。如本文所用,术语“互补位”是指抗体的表位结合位点。因此,术语“互补位”和“表位结合位点”在本文中可互换使用。此外,单个“特异性”可以指单个抗体中的一个、两个、三个或多于三个相同的互补位。一个单个抗体分子中互补位的实际数目称为“价”。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是二价、三价、四价、六价或八价的,更优选地,抗体或其抗原结合片段是二价或四价的,最优选地抗体或其抗原结合片段是四价的。

[0050] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是双特异性和四价的。

[0051] 还优选的是,根据本发明的抗体或其抗原结合片段恰好包含每个不同表位结合位点的两个(相同)拷贝,其特异性结合至少两个不同寨卡病毒表位。

[0052] 例如,单个天然IgG抗体是单特异性和二价的,因为它具有两个相同的互补位(两个相同的拷贝)。然而,多特异性抗体包含至少两个(不同的)互补位。因此,术语“多特异性”是指具有多于一个的互补位并且具有结合两个或多于两个不同表位的能力的抗体和抗原结合片段。术语“多特异性抗体/抗原结合片段”特别地包括如上文所定义的双特异性抗体,

但是通常还包括蛋白质,例如特别结合三个或多于三个不同表位的抗体、支架,即具有三个或多于三个互补位的抗体。

[0053] 特别地,多特异性抗体或其抗原结合片段可以包含两个或多于两个互补位,其中一些互补位可以是相同的,以使得抗体的所有互补位属于至少两种不同的互补位类型,因此抗体具有至少两种特异性。例如,根据本发明的多特异性抗体或其抗原结合片段可包含四个互补位,其中每两个互补位是相同的(即具有相同的特异性),因此,抗体或其片段是双特异性和四价的(两个相同的互补位对应两种特异性中的每一种)。因此,“一种特异性”特别是指表现出相同特异性的一个或多于一个互补位(这通常意味着这样的—个或多于一个互补位是相同的),因此,“两种特异性”可以通过两个、三个、四个、五个、六个或多于六个互补位来实现,只要它们仅指两种特异性即可。例如,多特异性抗体可包含针对每种(至少两种)特异性的一个单一互补位,即,多特异性抗体总共包含至少两个互补位。例如,双特异性抗体包含针对两种特异性的每一种的一个单一的互补位,即该抗体总共包含两个互补位。最优选地,抗体恰好包含针对两种特异性中的每一种的两个(相同)互补位,即抗体总共包含四个互补位。或者,抗体可以包含针对两种特异性中的每一种的三个(相同)互补位,即抗体总共包含六个互补位。

[0054] 如本文所用,术语“抗原”是指充当适应性免疫应答的受体的靶标的,特别是充当抗体、T细胞受体和/或B细胞受体的靶标的任何结构性物质。“表位”,也称为“抗原决定簇”,是被免疫系统,特别是被抗体、T细胞受体和/或B细胞受体识别的抗原的部分(或片段)。因此,一个抗原具有至少一个表位,即一个抗原具有一个或多于一个表位。抗原可以是(i)肽、多肽或蛋白质,(ii)多糖,(iii)脂质,(iv)脂蛋白或脂肽,(v)糖脂,(vi)核酸,或(vii)小分子药物或毒素。因此,抗原可以是肽、蛋白质、多糖、脂质、包括脂蛋白和糖脂的组合、核酸(例如DNA、siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、诱饵DNA、质粒)或小分子药物(例如环孢霉素A、紫杉醇、阿霉素、甲氨蝶呤、5-氨基乙酰丙酸)或其任何组合。优选地,抗原选自(i)肽、多肽或蛋白质,(ii)多糖,(iii)脂质,(iv)脂蛋白或脂肽,和(v)糖脂;更优选地,抗原是肽、多肽或蛋白质。

[0055] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至少两个不同的寨卡病毒表位。至少两个不同的寨卡病毒表位可以位于不同的寨卡病毒抗原上,例如不同的寨卡病毒(ZIKV)蛋白,或位于相同的寨卡病毒抗原上,例如在相同的ZIKV蛋白上。ZIKV抗原/蛋白的优选实例包括衣壳、prM、包膜和非结构蛋白NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5和NS5B。最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白(ZIKV E蛋白)上的(至少两个)不同的表位结合。换句话说,最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含特异性结合至寨卡病毒包膜蛋白(ZIKV E蛋白)上的不同表位的至少两个表位结合位点。ZIKV包含核壳核心,其中包含被核心蛋白包裹的单链RNA。核壳核心被具有“膜蛋白”和“包膜蛋白”的脂质双层膜包裹。ZIKV包膜蛋白(E蛋白)是优势抗原。ZIKV E蛋白的结构和结构域描述于例如 Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, Zhang Y, Yuan Y, Song H, Haywood J, Xiao H, Yah J, Shi Y, Qin CF, Qi J, Gao GF. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. Cell Host Microbe. 2016 May 11;19(5):696-704。

[0056] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段所结合的(至少两个)不同的寨卡病

毒表位是非重叠的表位。特别地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段所结合的形成第一寨卡病毒表位的氨基酸不同于根据本发明的抗体或其抗原结合片段所结合的形成第二寨卡病毒表位的氨基酸。

[0057] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以是任何抗体形式。特别地,多特异性抗体优选涵盖“整个”抗体,例如完整的IgG-或IgG-样分子,而在本发明的上下文中,抗原结合片段优选是指小的重组形式,例如基于双特异性T细胞衔接器的形式(**BiTE®**);除了在本发明的上下文中,两种特异性都针对寨卡病毒,因此,**BiTE®**的T细胞特异性可以被(第二)ZIKV特异性替代)、串联的单链可变片段分子(taFv)、双抗体(Db)、单链双抗体(scDb)和它们的各种其他衍生物(参见Byrne H.等人(2013) Trends Biotech, 31(11):621-632描述的双特异性抗体形式,其中图2显示了多种双特异性抗体形式;Weidle UH等人(2013) Cancer Genomics and Proteomics 10:1-18,特别是图1显示了多种双特异性抗体形式;以及Chan, AC和Carter, P.J. (2010) Nat Rev Immunol 10:301-316,其中图3显示了各种双特异性抗体形式)。双特异性抗体形式的实例包括但不限于,串联Fab-Ig、DVD-Ig、四源杂交瘤细胞、化学结合的Fab(片段抗原结合)和**BiTE®**(双特异性T细胞衔接器)。在本发明的一个实施方案中,抗体优选是串联Fab-Ig(FIT-Ig)或DVD-Ig。

[0058] 因此,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以选自串联Fab-Ig(FIT-Ig);DVD-Ig;杂交杂交瘤(四源杂交瘤细胞);多特异性Anticalin平台(Pieris);双抗体;单链双抗体;串联单链Fv片段;TandAb,三特异性抗体(Affimed)(105kDa至10kDa);Dart(双重亲和力重靶向;Macrogenics);双特异性Xmab(Xencor);双特异性T细胞衔接器(Bites;Amgen;55kDa);三抗体;三体=Fab-scFv融合蛋白(Creative Biolabs)多功能重组抗体衍生物(110kDa);Duobody平台(Genmab);Dock和lock平台;杵臼结构(KIH)平台;人源化双特异性IgG抗体(REGN1979)(Regeneron);Mab²双特异性抗体(F-Star);DVD-Ig=双重可变结构域免疫球蛋白(Abbott);κ-λ体;TBTI=四价双特异性串联Ig;和CrossMab。

[0059] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以选自包含CrossMab的双特异性IgG样抗体(BsIgG);DAF(二合一);DAF(四合一);DutaMab;DT-IgG;杵臼结构普通LC;杵臼组装体;Fab臂交换;SEEDbody;Triomab;LUZ-Y;Fcab;κλ体;和正交Fab。这些双特异性抗体形式例如在Spiess C., Zhai Q.和Carter P.J. (2015) Molecular Immunology 67:95-106中显示和描述,尤其是图1和相应的描述,例如第95至101页。

[0060] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可选自包含纳米抗体;纳米抗体-HAS;BiTE;双抗体;DART;TandAb;sc双抗体;sc-双抗体-CH3;双抗体-CH3;三抗体;微型抗体;微抗体;TriBi微抗体;scFv-CH3KIH;Fab-scFv;scFv-CH-CL-scFv;F(ab')₂;F(ab')₂-scFv₂;scFv-KIH;Fab-scFv-Fc;四价HCAb;sc双抗体-Fc;双抗体-Fc;串联scFv-Fc;和胞内抗体的双特异性抗体片段。这些双特异性抗体形式例如在Spiess C., Zhai Q.和Carter P.J. (2015) Molecular Immunology 67:95-106中显示和描述,尤其是图1和相应的描述,例如第95至101页。

[0061] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以选自具有附加的包含DVD-IgG;IgG(H)-scFv;scFv-(H)IgG;IgG(L)-scFv;scFv-(L)IgG;IgG(L,H)-Fv;IgG(H)-V;V(H)-IgG;IgG(L)-V;V(L)-IgG;KIH IgG-scFab;2scFv-IgG;IgG-2scFv;scFv4-Ig;scFv4-Ig;Zybody;和DVI-IgG(四合一)在内的抗原结合部分的IgG附加抗体。这些双特异性抗体形

式例如在spiess C.,Zhai Q.和Carter P.J.(2015)Molecular Immunology 67:95-106中显示和描述,尤其是图1和相应的描述,例如第95至101页。在那些抗体形式中,甚至更优选DVD-Ig(双可变结构域免疫球蛋白(Abbott))。这种抗体形式在以下文献中有详细描述,例如Wu C,Ying H,Grinnell C,Bryant S,Miller R,Clabbers A,Bose S,McCarthy D,Zhu RR,Santora L,Davis-Taber R,Kunes Y,Fung E,Schwartz A,Sakorafas P,Gu J,Tarcsa E,Murtaza A,Ghayur T.Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin.Nat Biotechnol.2007 Nov;25(11):1290-7;或DiGiammarino E,Ghayur T,Liu J.Design and generation of DVD-IgTM molecules for dual-specific targeting.Methods Mol Biol.2012;899:145-56。

[0062] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是串联Fab-Ig (FIT-Ig)形式的IgG-附加抗体。换句话说,根据本发明的抗体或其抗原结合片段最优选为串联Fab-Ig (FIT-Ig)形式。串联Fab-Ig (FIT-Ig)形式在以下文献中有详细描述,例如WO 2015/103072 A1,其通过引用整体并入本文,或Gong S,Ren F,Wu D,Wu X,Wu C:Fab-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets.MAbs 2017。类似于DVD-Ig,FIT-Ig也是双特异性四价对称形式。FIT-Ig可以使用三种多肽制备:多肽1通常包含与优选位于内部Fab重链的N-末端区域融合的外部Fab的轻链,优选不具有接头。多肽2通常包含外部Fab的重链可变区和CH1区域,且多肽3通常包含内部Fab的轻链。因此,FIT-Ig形式的抗体通常包含“内部Fab”和“外部Fab”。

[0063] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段中和寨卡病毒感染。换句话说,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选降低寨卡病毒的病毒感染性。

[0064] 为了在实验室中研究和定量病毒感染性(或“中和”),本领域技术人员知晓各种标准的“中和测定”。针对中和测定,通常在细胞和/或细胞系中繁殖动物病毒。在本发明的上下文中,优选中和测定,其中在存在(或不存在)待测抗体的情况下,将培养的细胞与固定量的寨卡病毒(ZIKV)一起孵育。例如可以使用流式细胞仪作为读取装置。或者,也可以想到其他读取方式,例如确定分泌到培养上清液中的ZIKV非结构蛋白(例如ZIKV NS1)的量。例如,基于ZIKV非结构蛋白1(NS1)抗原捕获酶联免疫吸附测定(ELISA)的组织培养物感染剂量50(TCID50)测试(TCID50-ELISA)可用于滴定寨卡病毒的标准菌斑测定的替代方法,与针对登革热病毒(DENV)的Li J,Hu D-M,Ding X-X,Chen Y,Pan Y-X,Qiu L-W,Che X-Y:Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus.PLoS ONE 2011,6:e22553中所描述的类似的方法。在这种测定中,例如可以有利地使用本申请中描述的ZIKV NS1结合抗体。

[0065] 在ZIKV中和测定的优选实施方案中,在存在或不存在待测试的抗体的情况下,将培养的细胞例如Vero细胞与固定量的ZIKV一起孵育例如约4天。孵育后,可以清洗细胞并进一步培养。为了测量病毒的感染性,可以使用流式细胞仪。为此,细胞可以例如用2%甲醛固定,例如以PBS(磷酸盐缓冲盐水)中1%FCS(胎牛血清)0.5%皂苷透化,并例如用小鼠抗体4G2进行染色。然后可以将细胞与缀合至例如Alexa Fluor488染料的山羊抗小鼠IgG一起孵育,并通过流式细胞仪进行分析。或者,可以使用例如WST-1试剂(Roche)通过流式细胞术检测活细胞。用于这种中和测定的优选的ZIKV毒株是ZIKV H/PF/2013。

[0066] 本发明的抗体和抗原结合片段具有高中和效力。与无抗体对照相比,中和寨卡病毒的50%所需的抗体浓度(IC_{50})为例如至多约3 μ g/ml或至多约1 μ g/ml。优选地,中和ZIKV的50%所需的本发明的抗体的浓度(IC_{50})为至多约500ng/ml,更优选地,中和ZIKV的50%所需的本发明的抗体的浓度(IC_{50})为至多约250ng/ml,甚至更优选中和ZIKV的50%所需的本发明抗体的浓度(IC_{50})为至多约150ng/ml。最优选地,中和ZIKV的50%所需的本发明抗体的浓度(IC_{50})为约100ng/ml或低于100ng/ml,例如约90ng/ml或低于90ng/ml、约80ng/ml或低于80ng/ml、约70ng/ml或低于70ng/ml、约60ng/ml或低于60ng/ml、约50ng/ml或低于50ng/ml、约45ng/ml或低于45ng/ml、约40ng/ml或低于40ng/ml、约35ng/ml或低于35ng/ml、约30ng/ml或低于30ng/ml、约25ng/ml或低于25ng/ml、约20ng/ml或低于20ng/ml,特别优选约15ng/ml或低于15ng/ml。特别地,中和ZIKV的50%所需的本发明抗体的浓度(IC_{50})优选为约50ng/ml或低于50ng/ml。这意味着ZIKV的50%中和仅需低浓度的抗体。中和ZIKV的50%所需的本发明抗体的浓度(IC_{50})可以使用本领域技术人员已知的标准中和测定法来测定,特别是如上所述的。

[0067] 通常,可以通过使用技术人员众所周知的标准ELISA(酶联免疫吸附测定)来评估抗体的结合。示例性标准ELISA可以按以下方式进行:ELISA板可以用足量(例如1 μ g/ml)的蛋白/复合物/颗粒(抗体与其的结合待检测)包覆,例如在PBS中,进行测试(例如,在4 $^{\circ}$ C过夜)(例如,如下所述测试DENV结合,使用DENV E蛋白和/或DENV VLP)。然后可以例如用1% w/v的牛血清白蛋白(BSA)在PBS中的溶液封闭板,并与要测试的抗体一起孵育(例如在室温下约1.5小时)。洗涤后,例如使用山羊抗人IgG结合的碱性磷酸酶,可以显示出抗体结合。然后可以洗涤板,可以添加所需的底物(例如,p-NPP),并且可以例如在405nm读取板。可以通过测量在饱和时达到50%最大结合所需的mAb浓度(EC_{50})来确定抗体结合的相对亲和力。可以通过用具有可变斜率的四参数非线性回归拟合的结合曲线的插值来计算 EC_{50} 值。

[0068] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段基本上不与登革热病毒样颗粒和/或登革热包膜蛋白结合。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段基本上不结合登革病毒样颗粒和/或不结合四种DENV血清型DENV1、DENV2、DENV3和DENV4中任何一种的登革热包膜蛋白。因此,“基本上不结合”是指对于抗体或其抗原结合片段,在登革热病毒样颗粒(DENV VLP)和/或登革热包膜蛋白(DENV E蛋白)的标准ELISA中,可以确定 EC_{50} 值不超过至多10²ng/ml,优选地至多10³ng/ml,更优选地至多5 $\times$ 10³ng/ml,更优选至多8 $\times$ 10³ng/ml,最优选至多10⁴ng/ml。换句话说,在标准ELISA中,达到与登革病毒样颗粒(DENV VLP)和/或登革病毒包膜蛋白(DENV E蛋白)在饱和(EC_{50})状态下最大结合50%所需的抗体或其抗原结合片段的浓度通常大于10²ng/ml,优选大于10³ng/ml,更优选大于5 $\times$ 10³ng/ml,甚至更优选大于8 $\times$ 10³ng/ml,最优选大于10⁴ng/ml。

[0069] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段不促进寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段阻断寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)。

[0070] 可以使用例如培养的细胞或细胞系例如K562细胞,通过基于流式细胞术的测定来评估ADE。例如,可以将待测抗体和ZIKV在37 $^{\circ}$ C混合1小时,然后将其添加到5000个K562细胞/孔中。四天后,可将细胞固定、透化并用m4G2染色,例如如上文中和测定所述的。如上文中和测定所述,通过流式细胞术确定感染细胞的数目。

[0071] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段消除了ZIKV逃逸突变体的产生。逃逸突变体产生的消除可以由本领域技术人员容易地评估。例如,为了鉴定抗体或抗体片段产生逃逸突变体的倾向,在亚中和浓度的目的抗体或其抗原结合片段存在下重复传代ZIKV。如本申请的实施例10和11所示,ZIKV逃逸突变体(“MARM”)通常出现在ZIKV的第三或第四代之后。因此,如果即使在亚中和浓度的该抗体或其抗原结合片段的存在下病毒(ZIKV)五次传代后,也没有鉴定出ZIKV逃逸突变体,那么可以认为抗体消除了ZIKV逃逸突变体的产生。更优选地,根据本发明,在亚中和浓度的抗体或其抗原结合片段的存在下,病毒(ZIKV)传代六次后,没有鉴定出ZIKV逃逸突变体。甚至更优选地,根据本发明,在亚中和浓度的抗体或其抗原结合片段的存在下,病毒(ZIKV)传代七次后,没有鉴定出ZIKV逃逸突变体。最优选地,根据本发明,在亚中和浓度的抗体或其抗原结合片段的存在下,病毒(ZIKV)传代八次后,没有鉴定出ZIKV逃逸突变体。

[0072] 例如,为了评估抗体或抗体片段产生逃逸突变体的倾向,将ZIKV例如H/PF/2013株,例如在大约37℃(体温)下与各种亚中和浓度的目标抗体/抗原结合片段一起孵育,例如持续至少30分钟。此后,加入(活的)细胞例如Vero细胞,然后例如在大约37℃(体温)下孵育至少一天,优选3天至4天,以使病毒繁殖。然后,可以选择三种条件的上清液:可以观察到单层的完全保护的目标抗体/抗原结合片段最低浓度;可以观察到部分CPE对细胞单层的作用的一种浓度;可以观察到ZIKV CPE破坏了100%细胞单层的一种浓度。所选中清液的一部分可用于微中和测定和病毒的后继测序(以鉴定逃逸突变体),而另一部分(相同)所选中清液可用于下一选择步骤(传代)。即,对于下一次传代,可以将所选中清液(的一部分)与各种亚中和浓度的目标抗体/抗原结合片段混合,并如上所述进行孵育,然后添加(活)细胞并进行如上所述的孵育,以最终再次选择上清液。重复该选择和繁殖过程,以达到至少五代,优选至少六代,更优选至少七代,最优选至少八代。

[0073] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段的具有至少一个表位结合位点的每个CDR或每个可变区分别是人CDR或人可变区。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段中包含的每个CDR或每个可变区分别是人CDR或人可变区。最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段中包含的所有恒定区和可变区是人恒定区和人可变区。

[0074] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体,优选为其中根据本发明的抗体或其抗原结合片段中包含的每个CDR或每个可变区分别是人CDR或人可变区的单克隆抗体。

[0075] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是IgG型的,例如IgG1型、IgG2型、IgG3型或IgG4型,更优选地是IgG1型。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i) IgG1 CH1-CH2-CH3型的重链恒定区,其中“CH1”是指重链的恒定域1、“CH2”是指重链的恒定域2、“CH3”是指重链的恒定域3;(ii) IgG CL型的轻链恒定区,其中“CL”是指轻链的恒定域。甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含IgG1 CH1-CH2-CH3型的重链恒定区和IgG CL型的轻链恒定区,该重链恒定区包含根据SEQ ID NO:91或92的氨基酸序列或其功能序列变体或由其组成,该轻链恒定区包含根据SEQ ID NO:93或94的氨基酸序列或其功能序列变体或由其组成。

[0076] 因此,优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含Fc部分。更优选地,Fc部分源自人源,例如源自人IgG1、人IgG2、人IgG3和/或人IgG4,其中人IgG1是特别优选的。包含Fc

部分的多种多特异性抗体形式是本领域已知的。包含Fc部分的优选抗体形式是上述IgG附加的抗体形式。通常,包含Fc部分的抗体比没有Fc部分的抗体或抗体片段更有效并且显示出更长的半衰期。

[0077] 如本文所用,术语“Fc部分”指源自免疫球蛋白重链部分的序列,该序列始于木瓜蛋白酶切割位点正上游的铰链区(例如,天然IgG中的残基216,重链恒定区的第一个残基为114),终止于免疫球蛋白重链的C端。因此,Fc部分可以是完整的Fc部分或其一部分(例如结构域)。完整的Fc部分至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域(例如,EU氨基酸第216至446位)。附加的赖氨酸残基(K)有时会出现在Fc部分的末端C末端,但通常会从成熟抗体上切割下来。Fc部分内的每个氨基酸位置已经根据本领域公认的Kabat EU编号系统进行编号,其参见例如Kabat等人的“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 1983和1987。

[0078] 优选地,在本发明的上下文中,Fc部分包含以下至少一种:铰链(例如,上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体、部分、或片段。在优选的实施方案中,Fc部分至少包含铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域。更优选地,Fc部分是完整的Fc部分。相对于天然存在的Fc部分,Fc部分还可包含一个或多于一个氨基酸插入、缺失或取代。例如,可以缺失铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域(或其一部分)中的至少一个。例如,Fc部分可包含以下或由以下组成:(i)与CH2结构域(或其一部分)融合的铰链结构域(或其一部分)、(ii)与CH3结构域(或其一部分)融合的铰链结构域(或其一部分)、(iii)与CH3结构域(或其一部分)融合的CH2结构域(或其一部分)、(iv)铰链结构域(或其一部分)、(v)CH2结构域(或其一部分)或(vi)CH3结构域或其一部分。

[0079] 本领域普通技术人员将理解,可以修饰Fc部分,使得其氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子的完整Fc部分不同,同时保留天然存在的Fc部分赋予的至少一种所需功能。这样的功能包括Fc受体(FcR)结合、抗体半衰期调节、ADCC功能、蛋白A结合、蛋白G结合和补体结合。对这种功能负责和/或必需的天然存在的Fc部分的一部分是本领域技术人员众所周知的。

[0080] 例如,为了激活补体级联,C1q与至少两个IgG1分子或一个IgM分子结合,并与抗原靶标相连(Ward, E.S., 和Ghetie, V., Ther. Immunol. 2 (1995) 77-94)。Burton, D.R. 描述了包含氨基酸残基第318至337位的重链区参与补体固定(Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206)。Duncan, A.R. 和Winter, G. (Nature 332 (1988) 738-740) 使用定点诱变,报道了Glu318、Lys320和Lys322形成C1q的结合位点。Glu318、Lys320和Lys 322残基在C1q结合中的作用被含有这些残基的短合成肽抑制补体介导的裂解的能力所证实。

[0081] 例如,FcR结合可以通过(抗体的)Fc部分与Fc受体(FcR)的相互作用来介导,所述Fc受体是造血细胞上的特化细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族,并显示通过免疫复合物的吞噬作用介导抗体包被的病原体的去除,以及通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性来介导红细胞和由相应抗体包被的各种其他细胞靶标(例如肿瘤细胞)的裂解(ADCC; Van de Winkel, J.G., 和Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524)。FcR通过其对免疫球蛋白类别的特异性来定义;IgG抗体的Fc受体称为Fc γ R、IgE的称为Fc ϵ R、IgA的称为Fc α R,依此类推,新生Fc受体称为FcRn。Fc受体结合描述于例如Ravetch, J.V., 和Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., 等人, Immunomethods 4 (1994) 25-

34; de Haas, M., 等人, J Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; 和 Gessner, J. E., 等人, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248。

[0082] 受体通过天然IgG抗体(Fc γ R)的Fc结构域交联,触发了多种效应子功能,包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性、炎症介质的释放以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。因此,优选提供受体交联的Fc部分(Fc γ R)。在人类中,已鉴定出三类Fc γ R,它们是:(i)Fc γ RI(CD64),其以高亲和力结合单体IgG,并在巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达;(ii)Fc γ RII(CD32),其以中等至低亲和力结合复合IgG,并且广泛表达,特别是在白细胞上表达,并且已知是抗体介导的免疫中的核心角色,其可分为Fc γ RIIA, Fc γ RIIB和Fc γ RIIC并在免疫系统中发挥不同的功能,但具有与IgG-Fc的结合力相似的低亲和力,这些受体的胞外域高度同源;(iii)Fc γ RIII(CD16),其以中等至低亲和力结合IgG,并分为两种类型:存在于NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及一些单核细胞和T细胞上,并介导ADCC的Fc γ RIIIA和在嗜中性粒细胞上高度表达的Fc γ RIIIB。在参与杀伤的许多细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞)中发现了Fc γ RIIA,并且其似乎能够激活杀伤过程。Fc γ RIIIB似乎在抑制过程中起作用,并发现于B细胞、巨噬细胞以及肥大细胞和嗜酸性粒细胞中。重要的是,在肝脏中发现了所有Fc γ RIIB的75% (Ganesan, L. P. 等人, 2012: Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. Journal of Immunology 189:4981-4988)。Fc γ RIIB在称为LSEC的肝窦内皮细胞上大量表达,在肝脏的库普弗(Kupffer)细胞和LSEC中是小免疫复合物清除的主要位点 (Ganesan, L. P. 等人, 2012: Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. Journal of Immunology 189:4981-4988)。

[0083] 因此,在本发明中,优选这样的抗体及其抗原结合片段,其能够结合Fc γ RIIb,例如包含用于结合Fc γ RIIb的Fc部分,特别是Fc区的抗体,例如IgG型抗体。此外,可以通过引入突变S267E和L328F来工程改造Fc部分以增强Fc γ RIIB结合,如Chu, S. Y. 等人, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926-3933所述的。从而可以增强免疫复合物的清除 (Chu, S., 等人, 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor Fc γ RIIb. Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts)。因此,在本发明的情况下,优选这样的抗体或其抗原结合片段,其包含具有突变S267E和L328F的工程改造的Fc部分,特别是如S. Y. 等人, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926-3933中所述的。

[0084] 在B细胞上,其似乎可以起到抑制其他免疫球蛋白产生和同种型转换例如IgE类的作用。在巨噬细胞上,Fc γ RIIB抑制通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞中,b形式可通过IgE与其独立受体的结合来帮助抑制这些细胞的活化。

[0085] 关于Fc γ RI结合,E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329中的至少一种在天然IgG中的修饰降低了与Fc γ RI的结合。位于第233至236位的IgG2残基被取代为IgG1和IgG4,

其与Fc γ RI的结合降低了 10^3 倍,并消除了人单核细胞对抗体致敏的红细胞的反应(Armour, K.L., 等人Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624)。关于Fc γ RII结合,发现例如E233至G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414中至少一种的IgG突变减少了对Fc γ RIIA的结合。关于Fc γ RIII结合,发现例如E233至G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376中的至少一种突变减少了对Fc γ RIIIA的结合。对人IgG1上与Fc受体的结合位点的图、上述突变位点和测量与Fc γ RI和Fc γ RIIA结合的方法在Shields, R.L., 等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604中有所描述。

[0086] 关于与关键的Fc γ RII的结合,天然IgG Fc的两个区域似乎对Fc γ RII和IgG的相互作用至关重要,即(i) IgG Fc的下铰链位点,特别是氨基酸残基L、L、G、G (234至237, EU编号),和(ii) IgG Fc的CH2结构域的相邻区域,特别是与例如在P331的区域的相邻的上部CH2结构域中的环和链(Wines, B.D., 等人, J. Immunol. 2000; 164: 5313-5318)。此外,Fc γ RI似乎与IgG Fc上的相同位点结合,而FcRn和蛋白A结合于IgG Fc上的不同位点,似乎位于CH2-CH3界面(Wines, B.D., 等人, J. Immunol. 2000; 164: 5313-5318)。

[0087] 例如,Fc部分可以包含Fc部分的至少一部分或由其组成,该Fc部分的至少一部分是本领域已知的FcRn结合或延长半衰期所需的部分。或者或另外,本发明抗体的Fc部分包含本领域已知的蛋白质A结合所需的至少一部分和/或本发明抗体的Fc部分包含本领域已知的蛋白质G结合所需的Fc分子的至少一部分。优选地,所保留的功能是寨卡病毒感染的中和,假定它是由Fc γ R结合介导的。因此,优选的Fc部分包含本领域已知的Fc γ R结合所需的至少一部分。如上所述,优选的Fc部分可因此至少包含(i)天然IgG Fc的下铰链位点,尤其是氨基酸残基L、L、G、G (234-237, EU编号),和(ii)天然IgG Fc的CH2结构域的邻近区域,特别是上部CH2结构域中与下部铰链区相邻的环和链,例如在P331的区域中,例如在P331周围的天然IgG Fc的上部CH2结构域中的至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的区域,例如在天然IgG Fc的氨基酸第320和340位之间(EU编号)。

[0088] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含Fc区。如本文所用,术语“Fc区”是指由抗体重链的两个或多于两个Fc部分形成的免疫球蛋白的部分。例如,Fc区可以是单体或“单链”Fc区(即,scFc区)。单链Fc区由在单个多肽链内连接的Fc部分组成(例如,在单个连续核酸序列中编码)。WO 2008/143954 A2中公开了示例性的scFc区。优选地,Fc区是二聚体Fc区。“二聚体Fc区”或“dcFc”是指由两个分开的免疫球蛋白重链的Fc部分形成的二聚体。二聚体Fc区可以是两个相同的Fc部分的同二聚体(例如,天然存在的免疫球蛋白的Fc区)或两个不同的Fc部分的异二聚体。

[0089] Fc区的Fc部分可以是相同或不同的类和/或亚类。例如,Fc部分可以源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的免疫球蛋白(例如人免疫球蛋白)。优选地,Fc区的Fc部分具有相同的类和亚类。然而,Fc区(或Fc区的一个或多于一个Fc部分)也可以是嵌合的,由此嵌合Fc区可以包含源自不同免疫球蛋白类和/或亚类的Fc部分。例如,二聚或单链Fc区的至少两个Fc部分可以来自不同的免疫球蛋白类和/或亚类。另外或或者,嵌合Fc区可包含一个或多于一个嵌合Fc部分。例如,嵌合Fc区或部分可包含源自第一亚类(例如IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的一个或多于一个部分,而Fc区或部分的其余部分属于不同的亚类。例如,Fc多肽的Fc区或部分可以包含源自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG4亚类)的CH2

和/或CH3结构域和源自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG3亚类)的铰链区。例如,Fc区或部分可以包含源自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG4亚类)的铰链和/或CH2结构域和源自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的CH3结构域。例如,嵌合Fc区可以包含来自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG4亚类)的Fc部分(例如,完整Fc部分)和来自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的Fc部分。例如,Fc区或部分可包含来自IgG4免疫球蛋白的CH2结构域和来自IgG1免疫球蛋白的CH3结构域。例如,Fc区或部分可包含来自IgG4分子的CH1结构域和CH2结构域以及来自IgG1分子的CH3结构域。例如,Fc区或部分可包含来自抗体的特定亚类的CH2结构域的一部分,例如CH2结构域的EU第292至340位。例如,Fc区或Fc部分可包含氨基酸,其中CH2的第292至340位源自IgG4部分,而CH2的其余部分源自IgG1部分(或者,CH2的第292至340位可源自IgG1部分,并且CH2的其余部分源自IgG4部分)。

[0090] 此外,Fc区或Fc部分可以(另外或或者)例如包含嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以例如部分源自IgG1、IgG2或IgG4分子(例如,上部、下部、中部铰链序列),并且部分源自IgG3分子(例如,中部铰链序列)。在另一个实例中,Fc区或部分可包含部分源自IgG1分子且部分源自IgG4分子的嵌合铰链。在另一个实例中,嵌合铰链可包含来自IgG4分子的上部和下部铰链结构域和来自IgG1分子的中部铰链结构域。可以例如通过在IgG4铰链区的中间铰链结构域的EU第228位引入脯氨酸取代(Ser228Pro)来制备这种嵌合铰链。在另一个实施方案中,嵌合铰链可包含位于EU第233至236位的氨基酸,其来自IgG2抗体和/或Ser228Pro突变,其中铰链的其余氨基酸来自IgG4抗体(例如,序列ESKYGPPCPPCPAPPVAGP的嵌合铰链)。可以根据本发明的抗体的Fc部分中使用的其他嵌合铰链描述于US 2005/0163783 A1中。

[0091] 在本发明中,优选的是,Fc部分或Fc区包含或由源自人免疫球蛋白序列的氨基酸序列(例如,源自人IgG分子的Fc区或Fc部分)组成。然而,多肽可包含来自其他哺乳动物物种的一个或多个氨基酸。例如,灵长类动物Fc部分或灵长类动物结合位点可包括在主题多肽中。或者,在Fc部分或Fc区中可存在一种或多种鼠类氨基酸。

[0092] 优选地,根据本发明的抗体,特别是除了如上所述的Fc部分之外,还包含源自恒定区,特别是源自IgG的恒定区,优选源自IgG1的恒定区,更优选源自人IgG1恒定区的其他部分。更优选地,根据本发明的抗体,特别是除了如上所述的Fc部分之外,还包含恒定区的所有其他部分,特别是IgG恒定区的所有其他部分,优选IgG1恒定区的所有其他部分,更优选人IgG1恒定区的所有其他部分。

[0093] 恒定区的特别优选的序列是根据SEQ ID NO:91至94的氨基酸序列(例如,分别由根据SEQ ID NO:95至98的核酸序列编码)。优选地,如本文所述,IgG1 CH1-CH2-CH3的氨基酸序列是根据SEQ ID NO:91的或是其功能序列变体。甚至更优选地,如本文所述,IgG1 CH1-CH2-CH3的氨基酸序列是根据SEQ ID NO:92的或是其功能序列变体,其中维持“LALA”突变。

[0094] 如上所述,根据本发明的特别优选的抗体包含源自人IgG1的(完整)Fc区。更优选地,根据本发明的抗体,特别是除源自人IgG1的(完整)Fc区之外,还包含IgG恒定区的所有其他部分,优选IgG1恒定区的所有其他部分,更优选人IgG1恒定区的所有其他部分。

[0095] 不受任何理论的束缚,认为寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)是通过抗体的Fc部分特别是IgG分子重链的Fc部分与Fc受体例如宿主细胞上的Fc γ 受体的结合来实现的。因此,优选本发明的抗体或其抗原结合片段在Fc部分中包含一个或多个突变。突变

可以是减少抗体与Fc受体 (FcR) 的结合,特别是减少抗体与Fc γ 受体 (Fc γ R) 的结合的任何突变。另一方面,优选地,根据本发明的抗体包含(完整的)Fc部分/Fc区,其中与FcRn的相互作用/结合没有受到损害。因此,特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段在Fc部分中包含一个或多于一个突变,其(i)减少抗体与Fc γ 受体的结合,但是不会损害与FcRn的相互作用。这种突变的一个实例是下述“LALA”突变。

[0096] 通常,可以通过技术人员已知的各种方法例如ELISA (Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthal DN, Parren PWHI, 等人:Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007, 449:101-104; Grevys A, Bern M, Foss S, Bratlie DB, Moen A, Gunnarsen KS, Aase A, Michaelsen TE, Sandlie I, Andersen JT: Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. 2015, 194:5497-5508) 或流式细胞仪 (Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC: Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. *J Virol* 2009, 83:7397-7410; Piccoli L, Campo I, Fregni CS, Rodriguez BMF, Minola A, Sallusto F, Luisetti M, Corti D, Lanzavecchia A: Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Commun* 2015, 6:1-9) 来评估抗体与Fc受体的结合。

[0097] 通常,根据本发明的抗体可以被糖基化。例如,附着在重链CH2结构域上的N-连接聚糖可以影响C1q和FcR的结合,且糖基化抗体对这些受体的亲和力较低。因此,根据本发明的抗体的Fc部分的CH2结构域可包含一个或多于一个突变,其中糖基化残基被非糖基化残基取代。聚糖结构也可以影响活性,例如补体介导的细胞死亡的差异可能取决于聚糖二天线链(biantennary chain)末端的半乳糖的数量(0、1或2)。优选地,抗体的聚糖在施用后不导致人免疫原性应答。

[0098] 此外,与未经修饰的抗体相比,可以通过将随机氨基酸突变引入重链的CH2或CH3结构域的特定区域来修饰根据本发明的抗体,以改变它们与FcR的结合亲和力和/或其血清半衰期。此类修饰的实例包括但不限于重链恒定区的至少一个氨基酸的取代,其选自氨基酸残基第250、314和428位。

[0099] 特别优选地,本发明的抗体的Fc部分在位置CH2 4、CH2 5或两者上包含取代。通常,野生型IgG1和IgG3的CH2的4和5位的氨基酸是亮氨酸(“L”)。优选地,根据本发明的抗体在位置CH2 4、CH2 5或两者处包含不是L的氨基酸。更优选地,根据本发明的抗体在位置CH2 4、CH2 5或两者处包含丙氨酸(“A”)。最优选地,根据本发明的抗体同时包含CH2L4A和CH2L5A取代。这样的抗体在本文中称为“LALA”变体。值得关注的是,Fc部分中的此类“LALA”突变不仅导致在寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)中缺乏相应抗体的帮助,而且还阻断了寨卡病毒感染的抗体依赖性增强(ADE)。包含“LALA”突变的IgG1 CH1-CH2-CH3的示例性氨基酸序列是根据SEQ ID NO:92的。因此,如本文所述,IgG1 CH1-CH2-CH3的氨基酸序列优选是根据SEQ ID NO:92的或是其功能序列变体,其中维持“LALA”突变。最优选地,抗体是如上所述的FIT-Ig形式,其在本文所述的Fc部分中包含“LALA”突变。

[0100] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段不包含Fc受体的结合位点。更优选地,抗体或其抗原结合片段不包含Fc区域,甚至更优选地,抗体或其抗原结合片段不包含Fc部分。没有Fc部分的多种多特异性抗体形式是本领域已知的并且如上所述。

[0101] 如上所述,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选与寨卡病毒包膜蛋白(ZIKV E蛋白)上的(至少两个)不同表位特异性结合。更优选地,抗体或其抗原结合片段结合至寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII,也称为“DIII”)。换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的表位,该表位包含寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII)的一个或多于一个氨基酸残基。ZIKV包含核壳体核心,其中包含被核心蛋白包裹的单链RNA。核壳体核心被具有“膜蛋白”和“包膜蛋白”的脂质双层膜包裹。ZIKV包膜蛋白(E蛋白)是优势抗原。包膜蛋白的胞外域包含三个不同的结构域:E蛋白结构域I(EDI)、E蛋白结构域II(EDII)和E蛋白结构域III(EDIII)。EDIII在不同的ZIKV病毒株之间高度保守(不同ZIKV病毒株的EDIII氨基酸序列的比对见图8)。与寨卡病毒包膜蛋白结构域I/II(EDI/II)结合的抗体相比,与寨卡病毒包膜蛋白结构域III(EDIII)结合的抗体显示出(i) ZIKV中和作用增强,以及(ii)与DENV的交叉反应性降低(特别是基本上与DENV没有交叉反应性)。

[0102] 因此,抗体或其抗原结合片段更优选结合寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII),EDIII具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:263):

[0103] **TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCCKXPXQMAVDXQTLTPVGRRLITANPVITEXTENS
KMMLELDPPFGDSYIVIGXGXKKITHHWHRS**

[0104] 其中X可以是任何(天然存在的)氨基酸。换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的表位,该表位包含一个或多于一个SEQ ID NO:263的氨基酸残基。

[0105] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段更优选结合寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII),EDIII具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:265):

[0106] **X₁GX₂X₃YSLCTAAFTFTKX₄PAEX₅X₆HGTVTVEX₇QYX₈GX₉DGPCCKX₁₀PX₁₁QMAVDX₁₂QTLTP
VGRRLITANPVITEX₁₃TX₁₄NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX₁₅GX₁₆X₁₇KITHHWHRSC**

[0107] 其中X₁可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选K、A或E;

[0108] X₂可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选V、F或L;

[0109] X₃可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选S或F;

[0110] X₄可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选I或V;

[0111] X₅可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选T或V;

[0112] X₆可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选L或D;

[0113] X₇可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选V或G;

[0114] X₈可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选A或G;

[0115] X₉可以是除R以外的任何(天然存在的)氨基酸,优选T或A;

[0116] X₁₀可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选V或I;

[0117] X₁₁可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选A或V;

[0118] X₁₂可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选M或T;

[0119] X₁₃可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选S或G;

- [0120] X14可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选E或K;
[0121] X15可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选V或I;
[0122] X16可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选为E、A、K或D;和
[0123] X17可以是任何(天然存在的)氨基酸,优选为E、A或K,更优选K或A。

[0124] 换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的表位,该表位包含一个或多个SEQ ID NO:265的氨基酸残基。

[0125] 例如,EDIII从ZIKV H/PF/2013病毒株(Genbank登录号KJ776791)的ZIKV E蛋白的氨基酸309延伸至氨基酸403。因此,抗体或其抗原结合片段最优选结合寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII),EDIII具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:264):

[0126] **TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLITANPVITESTENS
KMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHS.**

[0127] 换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的表位,该表位包含一个或多个SEQ ID NO:264的氨基酸残基。

[0128] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的表位,该表位包含EDIII的侧向脊(LR)的一个或多个氨基酸残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。EDIII侧向脊和EDI-EDIII铰链区域是技术人员已知的并且见述于例如Zhao,H.,Fernandez,E.,Dowd,K.A.,Speer,S.D.,Platt,D.J.,Gorman,M.J.,Govero,J.,Nelson,C.A.,Pierson,T.C.,Diamond,M.S.,等人(2016).Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection.Cell 166(4):1016-27和Kostyuchenko VA,Lim EX,Zhang S,Fibriansah G,Ng TS,Ooi JS,Shi J,Lok SM.Structure of the thermally stable Zika virus.Nature.2016 May 19;533(7603):425-8中。不受任何理论的束缚,假设(i)与LR的结合可通过捕获病毒的融合过渡状态来抑制融合,并且(ii)与EDI-EDIII铰链和EDIII的结合可阻碍EDIII的移动以形成三聚体融合后结构,从而停止膜融合。

[0129] 因此,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(能够)抑制ZIKV的附着后步骤。“附着后”通常是指ZIKV附着于(由ZIKV靶向的细胞的)细胞膜后ZIKV感染的任何步骤。例如,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选地(能够)防止膜融合。此外,还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(能够)引起ZIKV(颗粒)的聚集。最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(能够)(i)抑制ZIKV的附着后步骤和(ii)引起ZIKV(颗粒)的聚集。

[0130] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含至少一个CDR,优选所有六个CDR,更优选可变区,甚至更优选两个可变区(即表位结合位点),特别是结合ZIKV EDIII的示例性人抗体ZKA190的特异性(参见实施例1,图1)。根据本发明,优选包含在抗体或其抗原结合片段中的ZKA190的CDR和可变区的氨基酸序列在下表1和2中描述。

[0131] 还优选的是,抗体或其抗原结合片段结合在ZIKV感染性病毒体上展示的四级表位。尽管具有相当高的中和活性,但此类抗体在标准ELISA(如上所述)中,即在体外测试,尤其是在纯化形式下测试时(即ZIKV E蛋白“在病毒颗粒、病毒样颗粒等外,或不具有病毒颗粒、病毒样颗粒等”),通常没有可检测到的与重组ZIKV E蛋白或ZIKV EDIII的结合。因此,“没有可检测到的结合”通常意味着在标准ELISA中没有检测到至多10000ng/ml的EC₅₀。换句话说,如果在标准ELISA中可检测到的EC₅₀高于10000ng/ml,则称为“没有可检测到的结合”。

[0132] 因此,此类抗体在本文中也称为“中和非E结合”(NNB)抗体。ZIKV感染性病毒体上显示的四级表位通常是构象表位。例如,展示在ZIKV感染性病毒体上的四级表位可以在构成二聚体的两个包膜蛋白单体的界面处形成(“包膜二聚体表位”;EDE),也可以在相邻的二聚体之间形成(“人字形表位”)。

[0133] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含至少一个CDR,优选所有六个CDR,更优选可变区,甚至更优选两个可变区(即表位结合位点),特别是结合在ZIKV感染性病毒体上展示的四级表位上的示例性人抗体ZKA230的特异性(参见实施例1,图1)。根据本发明,优选包含在抗体或其抗原结合片段中的ZKA230的CDR和可变区的氨基酸序列在下表1和2中描述。

[0134] 还优选抗体或其抗原结合片段结合寨卡病毒包膜蛋白的结构域II(EDII)。EDII是细长的指状结构域,包含保守的融合环,该融合环与宿主细胞的内体膜相互作用,约从ZIKV E蛋白的52位氨基酸延伸到132位氨基酸,约从ZIKV E蛋白的193位延伸到280位氨基酸(Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, Zhang Y, Yuan Y, Song H, Haywood J, Xiao H, Yan J, Shi Y, Qin CF, Qi J, Gao GF. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. Cell Host Microbe. 2016 May 11; 19(5):696-704)。

[0135] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含至少一个CDR,优选所有六个CDR,更优选可变区,甚至更优选两个可变区(即表位结合位点),特别是结合ZIKV EDII的示例性人抗体ZKA185的特异性。根据本发明,优选包含在抗体或其抗原结合片段中的ZKA185的CDR和可变区的氨基酸序列在下表1和2中描述。

[0136] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(i)结合至寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII),且(ii)结合至寨卡病毒包膜蛋白的结构域II(EDII)。换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)与寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII)特异性结合的表位结合位点,和(ii)与寨卡病毒包膜蛋白的结构域II(EDII)特异性结合的表位结合位点。如上所述,优选寨卡病毒包膜蛋白的结构域III包含SEQ ID NO:263或265所示,特别是SEQ ID NO:264所示的氨基酸序列或由其组成。此外,如上所述,还优选抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白的表位结合,该表位包含EDIII侧向脊(LR)的一个或多个氨基酸残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。换句话说,靶向EDIII的表位结合位点优选结合至EDIII的侧向脊(LR)的一个或多个氨基酸残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。

[0137] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(i)结合至寨卡病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII),且(ii)结合至在ZIKV感染性病毒体上展示的四级表位。换句话说,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)与Zika病毒包膜蛋白的结构域III(EDIII)特异性结合的表位结合位点,和(ii)与ZIKV感染性病毒体上展示的四级表位特异性结合的表位结合位点。如上所述,优选寨卡病毒包膜蛋白的结构域III包含SEQ ID NO:263或265所示,特别是SEQ ID NO:264所示的氨基酸序列或由其组成。此外,如上所述,还优选抗体或其抗原结合片段与寨卡病毒包膜蛋白的表位结合,该表位包含EDIII侧向脊(LR)的一个或多个氨基酸残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。换句话说,靶向EDIII的表位结合位点优选结合至EDIII的侧向脊(LR)的一个或多个氨基酸

残基和/或EDI-EDIII铰链区的一个或多个氨基酸残基。

[0138] 通常,根据本发明的抗体或其抗原结合片段的单个表位结合位点(也称为“互补位”或“抗原受体”)优选包含在重链上的三个互补决定区(CDR)和在轻链上的(至少)三个CDR。通常,互补决定区(CDR)是存在于重链可变域和轻链可变域中的高变区。通常,抗体的重链的CDR和所连接轻链一起形成抗原受体(表位结合位点)。通常,三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)在可变域中非连续排列。由于表位结合位点通常由两个可变域组成(例如,在两条不同的多肽链上,即重链和轻链上),因此每个表位结合位点有六个CDR(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。重链和/或轻链上的CDR可以通过框架区分开,其中框架区(FR)是可变域中“可变性”比CDR小的区域。例如,链(或每条链分别)可能由三个CDR隔开的四个框架区域组成。

[0139] 确定了各种示例性人抗ZIKV E蛋白抗体的重链和轻链的序列,其在重链上包含三个不同的CDR,在轻链上包含三个不同的CDR(参见下表1和2)。CDR氨基酸的位置根据IMGT编号系统确定(IMGT:<http://www.imgt.org/>;参见Lefranc,M.-P.等人(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含以下示例性抗体的至少一个CDR。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含以下示例性抗体的(表位结合位点的)所有六个CDR。甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含以下示例性抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

[0140] 表1 显示了示例性抗体的重链CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3)和重链可变区(称为“VH”)的氨基酸序列的SEQ ID NO:

[0141]

抗体名称	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKA190	1	2	3	8
ZKA185	19	20	21	26
ZKA230	37	38	39	44
ZKA78	55	56	57	62
ZKA64	73	74	75	80
ZKA3	99	100	101	102
ZKA4	103	104	105	106
ZKA5	107	108	109	110
ZKA6	111	112	113	114
ZKA7	115	116	117	118
ZKA8	119	120	121	122
ZKA76	123	124	125	126
ZKA117	127	128	129	130

[0142]

抗体名称	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKB27	131	132	133	134
ZKB29	135	136	137	138
ZKB34	139	140	141	142
ZKB39	143	144	145	146
ZKB46	147	148	149	150
ZKB53	151	152	153	154
ZKC26	155	156	157	158
ZKD5	159	160	161	162
ZKD7	163	164	165	166
ZKD8	167	168	169	170
ZKD15	171	172	173	174
ZKD16	175	176	177	178
ZKD17	179	180	181	182
ZKD20	183	184	185	186
ZKA134	187	188	189	190
ZKA246	191	192	193	194
ZKA256	195	196	197	198
ZKB42	199	200	201	202
ZKB85	203	204	205	206
ZKB47	207	208	209	210
ZKC6	211	212	213	214
ZKA160	215	216	217	218
ZKA172	219	220	221	222
ZKA174	223	224	225	226
ZKA189	227	228	229	230
ZKA195	231	232	233	234
ZKA215	235	236	237	238
ZKA218	239	240	241	242
ZKB75	243	244	245	246
ZKB83	247	248	249	250

[0143]

抗体名称	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKC3	251	252	253	254
ZKC18	255	256	257	258
ZKD1	259	260	261	262

[0144] 下表2显示了示例性抗体的轻链CDR (CDRL1、CDRL2和CDRL3) 和轻链可变区 (称为

“VL”)的氨基酸序列的SEQ ID NO:

[0145]	抗体名称	CDRL1	CDRL2	CDRL2 长	CDRL3	VL
	ZKA190	4	5	6	7	9
	ZKA185	22	23	24	25	27
	ZKA230	40	41	42	43	45
	ZKA78	58	59	60	61	63
	ZKA64	76	77	78	79	81

[0146] 因此,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含与表1和/或表2中所示的至少一个CDR序列、VH序列和/或VL序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0147] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、75、39、21、57、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、249、253、257和261中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。

[0148] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、21、和39、57和75中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、21、和39中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。

[0149] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:21或根据SEQ ID NO:39的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。

[0150] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个

CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。

[0151] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0152] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:1、19、37、55、73、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243、247、251、255和259中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0153] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:2、20、38、56、74、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244、248、252、256和260中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0154] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、21、39、57、75、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、249、253、257和261中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0155] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0156] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:1、19、37、55和73中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0157] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:2、20、38、56和74中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0158] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、21、39、57和75中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0159] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个

CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0160] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:1、19、和37中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0161] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:2、20、和38中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0162] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3、21、和39中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0163] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0164] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:73的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0165] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:74的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0166] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:75的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0167] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0168] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:37的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0169] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:38的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0170] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:39的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0171] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0172] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少

97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；

[0173] (ii) 至少一个CDRH2包含根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0174] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0175] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0176] (i) 至少一个CDRL1包含根据SEQ ID NO:4、22、40、58和76中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0177] (ii) 至少一个CDRL2包含根据SEQ ID NO:5、6、23、24、41、42、59、60、77和78中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0178] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据SEQ ID NO:7、25、43、61和79中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0179] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0180] (i) 至少一个CDRL1包含根据SEQ ID NO:4、22、和40中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0181] (ii) 至少一个CDRL2包含根据SEQ ID NO:5、6、23、24、41和42中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和/或

[0182] (iii) 至少一个CDRL3包含根据SEQ ID NO:7、25、和43中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0183] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3,该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中

[0184] (i) 至少一个CDRL1包含根据SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:76的氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;

[0185] (ii) 至少一个CDRL2包含根据SEQ ID NO:5、6、77和78中任一项的氨基酸序列,或

具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；和/或

[0186] (iii) 至少一个CDRL3包含根据SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:79的氨基酸序列；或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0187] 还优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3，该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3，其中

[0188] (i) 至少一个CDRL1包含根据SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:40的氨基酸序列；或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；

[0189] (ii) 至少一个CDRL2包含根据SEQ ID NO:23、24、41和42中任一项的氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；和/或

[0190] (iii) 至少一个CDRL3包含根据SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:43的氨基酸序列；或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0191] 最优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，该重链包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3，该轻链包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3，其中

[0192] (i) 至少一个CDRL1包含根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；

[0193] (ii) 至少一个CDRL2包含根据SEQ ID NO:5或6的氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；和/或

[0194] (iii) 至少一个CDRL3包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0195] 优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 根据SEQ ID NO:1至3的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列；或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(ii) 根据SEQ ID NO:19至21的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(iii) 根据SEQ ID NO:37至39的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(iv) 根据SEQ ID NO:55至57的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列，或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少

[illegible]

[illegible]

列变体；(xxxiv) 根据SEQ ID NO:211至213的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(xxxv) 根据SEQ ID NO:215至217的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(xxxvi) 根据SEQ ID NO:219至221的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(xxxvii) 根据SEQ ID NO:223至225的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(xxxviii) 根据SEQ ID NO:227至229的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(xxxix) 根据SEQ ID NO:231至233的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1) 根据SEQ ID NO:235至237的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1i) 根据SEQ ID NO:239至241的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1ii) 根据SEQ ID NO:243至245的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1iii) 根据SEQ ID NO:247至249的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1iv) 根据SEQ ID NO:251至253的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(x1v) 根据SEQ ID NO:255至257的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；或(x1vi) 根据SEQ ID NO:259至261的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0196] 因此,优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(ii) 根据SEQ ID NO:1至

4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iii)根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iv)根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(v)根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(vi)根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(vii)根据SEQ ID NO:55至59和61的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(viii)根据SEQ ID NO:55至58和60至61的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(ix)根据SEQ ID NO:73至77和79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(x)根据SEQ ID NO:73至76和78至79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0197] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(ii)根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iii)根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iv)根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序

列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(v)根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(vi)根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(vii)根据SEQ ID NO:73至77和79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(viii)根据SEQ ID NO:73至76和78至79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0198] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(ii)根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iii)根据SEQ ID NO:73至77和79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(iv)根据SEQ ID NO:73至76和78至79的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0199] 优选地,优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(ii)根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;(iii)根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(iv)

根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0200] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii)根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0201] 优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii)根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0202] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含

[0203] (a) 第一表位结合位点,其包含(i)根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii)根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和

[0204] (b) 第二表位结合位点,其包含(i)根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii)根据SEQ ID NO:19至22和24至25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0205] 还优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii)根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨

氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0206] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含

[0207] (a) 第一表位结合位点,其包含 (i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或 (ii) 根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和

[0208] (b) 第二表位结合位点,其包含 (i) 根据SEQ ID NO:37至41和43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或 (ii) 根据SEQ ID NO:37至40和42至43的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0209] 另外,还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和任选地轻链可变区 (VL),其中重链可变区 (VH) 包含根据SEQ ID NO:8、26、44、62、80、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、226、230、234、238、242、246、250、254、258和262中任一项的氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体,或由其组成。

[0210] 此外,还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体; (ii) 根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体; (iii) 根据SEQ ID NO:44的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:45的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有

至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(iv) 根据SEQ ID NO:62的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:63的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；或(v) 根据SEQ ID NO:80的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:81的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0211] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i) 根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(ii) 根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；(iii) 根据SEQ ID NO:44的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:45的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；或(iv) 根据SEQ ID NO:80的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:81的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0212] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i) 根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体；或(ii) 根据SEQ ID NO:80的

重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:81的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0213] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或 (ii) 根据SEQ ID NO:44的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:45的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0214] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0215] 还优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0216] 最优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含

[0217] (a) 第一表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和

[0218] (b) 第二表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:26的重链可变区 (VH) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至

少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0219] 还优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:44的重链可变区(VH)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:45的轻链可变区(VL)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0220] 更优选地,如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含

[0221] (a) 第一表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区(VH)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区(VL)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;和

[0222] (b) 第二表位结合位点,其包含根据SEQ ID NO:44的重链可变区(VH)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:45的轻链可变区(VL)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0223] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段为串联Fab-Ig (FIT-Ig) 形式,并且FIT-Ig形式的外部Fab包含表位结合位点,该表位结合位点包含(i) 根据SEQ ID NO:1至5和7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii) 根据SEQ ID NO:1至4和6至7的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。更优选地,FIT-Ig形式的外部Fab包含表位结合位点,该表位结合位点包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区(VH)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:9的轻链可变区(VL)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。甚至更优选地,FIT-Ig形式的内部Fab包含表位结合位点,该位点结合位点包含(i) 根据SEQ ID NO:19至23和25的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列;或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体;或(ii) 根据SEQ ID NO:19至22和24至25的

CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。仍更优选地,FIT-Ig形式的内部Fab包含表位结合位点,该表位结合位点包含根据SEQ ID NO:26的重链可变区(VH)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:27的轻链可变区(VL)氨基酸序列,或具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的其功能序列变体。

[0224] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段用作药物。换句话说,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可用于药物的制备。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段用于预防和/或治疗寨卡病毒感染。换句话说,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可用于药物的制备或用于预防和/或治疗寨卡病毒感染中的用途。该方面在下面更详细地描述。

[0225] 核酸分子

[0226] 在另一方面,本发明还提供了一种核酸分子,其包含至少一个编码如上所述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸或其片段,其中该片段包含抗体或其抗原结合片段的至少一个CDR。

[0227] 核酸分子是包含核酸组分,优选由核酸组分组成的分子。术语核酸分子优选是指DNA或RNA分子。特别地,其与术语“多核苷酸”同义使用。优选地,核酸分子是包含核苷酸单体或由核苷酸单体组成的聚合物,所述核苷酸单体通过糖/磷酸盐骨架的磷酸二酯键彼此共价连接。术语“核酸分子”还涵盖经修饰的核酸分子,例如经碱基修饰、经糖修饰或经骨架修饰等的DNA或RNA分子。

[0228] 在根据本发明的核酸分子中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段的编码片段包含抗体或其抗原结合片段的至少一个CDR。表1和表2提供了根据本发明的示例性抗体的CDR和VH和VL的氨基酸序列的SEQ ID号。因此,根据本发明的核酸分子优选包含编码表1和表2中所示的一种或多种氨基酸序列的多核苷酸。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段的编码片段包含三个CDR,更优选地,表位结合位点的所有三个重链CDR(CDRH1、CDRH2、CDRH3)和/或表位结合位点的所有三个轻链CDR(CDRL1、CDRL2、CDRL3)。因此,优选抗体或其抗原结合片段的编码片段包含(恰好)三个或六个CDR。因此,根据本发明的核酸分子优选包含编码表1和表2中所示的三个或六个CDR氨基酸序列的多核苷酸,特别是对应的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列和/或CDRL1、CDRL2和CDRL3序列。更优选地,抗体或其抗原结合片段的编码片段包含可变区,例如重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。因此,优选抗体或其抗原结合片段的编码片段包含(恰好)一个或两个可变区。因此,根据本发明的核酸分子优选包含编码表1和表2中所示的一个或两个可变区氨基酸序列的多核苷酸。最优选地,抗体或其抗原结合片段的编码片段包含根据本发明的抗体或其抗原结合片段的(完整)多肽链。这种(完整)多肽链可以是例如(完整)重链或(完整)轻链。然而,这种(完整的)多肽链也可以包括重链和轻链元件两者,这在本领域中对于许多多特异性抗体形式是已知的(例如,多肽链包括重链恒定区,但是也包括例如除了一个或多个重链可变区之外的轻链可变区)。

[0229] 核酸分子可以是单顺反子、双顺反子或多顺反子,例如三顺反子。双顺反子或多顺反子核酸分子通常是通常可以具有两个(双顺反子)或多于两个(多顺反子)开放阅读框(ORF)的核酸分子。本文中的“开放阅读框”是可翻译为肽或蛋白质的密码子序列。更一般地,根据本发明,本发明的核酸分子包含编码至少一种抗体或其抗原结合片段的至少一种多核苷酸。如果根据本发明的核酸分子包含多于一个的编码多核苷酸,则第二、第三等编码多核苷酸可以编码其他肽/蛋白质和/或也可以编码抗体,例如根据本发明的抗体或其片段,其可以与第一抗体编码区相同或不同。在优选的实施方案中,本发明的核酸分子包含至少两个编码多核苷酸,例如(恰好)两个或三个编码多核苷酸,它们全部编码相同或不同的抗体或其片段或变体。例如,根据本发明的抗体的不同片段或其抗原结合片段可以由相同核酸分子上的不同多核苷酸编码。在本发明的另一个实施方案中,本发明的核酸分子可在同一编码区内编码超过一个抗体或抗体片段。总之,本发明的核酸分子可以是单顺反子、双顺反子或多顺反子。

[0230] 例如,在一个优选的实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以是单链抗体。在这种情况下,优选抗体的完整单链或其抗原结合片段由一种单个多核苷酸编码。因此,优选地,根据本发明的核酸分子是单顺反子,特别地,其可以包含根据本发明的编码抗体或其抗原结合片段的一种(单个)多核苷酸。

[0231] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(恰好)两种不同的多肽链,例如重链和轻链。这可以通过经典的天然IgG分子来说明,该分子包含两个相同的重链和两个相同的轻链,因此包含两种不同的多肽链(即使该抗体最终包含四个多肽链,它们也可能由两种(不同的)多核苷酸编码)。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段的这种两种不同的多肽链(例如,重链和轻链)可以由可以位于同一核酸分子上的两种不同的多核苷酸编码,其例如在双顺反子核酸分子中或在(恰好两种)不同的核酸分子上(例如,每个核酸分子可以是单顺反子)。因此,优选地,根据本发明的核酸分子是双顺反子,特别地,其可以(恰好)包含(一起)编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的两个多核苷酸。还优选如上所述,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的片段的(至少或恰好)一种多核苷酸(例如,(完整)多肽链)。因此,优选地,根据本发明的核酸分子是单顺反子。此外,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以由多个(例如单顺反子)核酸分子编码。例如,包含两种不同多肽链的抗体可以由位于两种不同核酸分子上的两种多核苷酸编码。

[0232] 还优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(恰好)三种不同的多肽链。因此,优选核酸分子是三顺反子(例如,编码包含在根据本发明的该抗体或其抗原结合片段中的所有三个多肽链)。然而,核酸分子还优选是单顺反子或双顺反子,例如编码包含在根据本发明的这种抗体或其抗原结合片段中的一种或两种多肽链。例如,多种核酸分子,例如两种或三种核酸分子,可以(一起)编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0233] 例如,根据本发明的抗体或其抗原结合片段特别优选地为串联Fab-Ig (FIT-Ig)形式,其通常包含以下三种多肽链:

[0234] -包含外部Fab的轻链和内部Fab的重链或由其组成的多肽1,该重链包含优选具有如上所述的“LALA”突变的恒定结构域CH1-CH2-CH3,其中优选地,外部Fab的轻链与内部Fab的重链的N末端融合,优选不具有接头。

[0235] -包含外部Fab的重链或由其组成的多肽2(外部Fab的VH和CH1);和

[0236] -包含内部Fab的轻链或由其组成的多肽3。

[0237] 因此,这种FIT-Ig可优选由一种(例如三顺反子)核酸分子、三种(例如单顺反子)核酸分子或两种(例如一种单顺反子、一种双顺反子)核酸分子编码。

[0238] 因此,优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽2或多肽3的多核苷酸。这种核酸分子优选是单顺反子。

[0239] 还优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽2的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1或多肽3的多核苷酸。这种核酸分子优选是单顺反子。

[0240] 还优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽3的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1或多肽2的多核苷酸。这种核酸分子优选是单顺反子。

[0241] 还优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1的多核苷酸和编码多肽2的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽3的多核苷酸。这种核酸分子优选是双顺反子。

[0242] 还优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1的多核苷酸和编码多肽3的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽2的多核苷酸。这种核酸分子优选是双顺反子。

[0243] 还优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽2的多核苷酸和编码多肽3的多核苷酸。更优选地,核酸分子不包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1的多核苷酸。这种核酸分子优选是双顺反子。

[0244] 特别优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据本发明的FIT-Ig抗体的多肽1的多核苷酸、编码多肽2的多核苷酸和编码多肽3的多核苷酸。这种核酸分子优选是三顺反子。

[0245] 通常,核酸分子可以是DNA分子或RNA分子。核酸分子和/或多核苷酸的实例包括例如重组多核苷酸、载体、寡核苷酸、RNA分子例如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA,或DNA分子例如cDNA。优选地,核酸分子是DNA质粒或mRNA分子。DNA质粒是环状的,优选双链DNA分子。

[0246] 下表3提供了编码根据本发明的示例性抗体的CDR和VH和VL的示例性核酸序列的SEQ ID编号。由于遗传密码的丰余,本发明还包括这些核酸序列的序列变体,尤其是编码相同的氨基酸序列的这种序列变体。

[0247] 表3 显示了五种示例性抗体(“ZKA190”、“ZKA64”、“ZKA230”、“ZKA185”、“ZKA78”)的CDR和重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的示例性核酸序列。

[0248]

ZKA190	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	10	ggattcaccttcagtaaataatggc
CDRH2	11	atatcatatgaggggaagtaataaa
CDRH3	12	gcgaaatcggggacccaatactatgatactactgggttatg agtatagggggtttggaataactttggctac
CDRL1	13	cagagtgttagtagcagttac
CDRL2	14	gatgcatcc
CDRL2 长	15	ctcatctatgatgcatccagcagggcc
CDRL3	16	cagcagtatggtaggtcaaggtggaca
VH	17	caggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt caccttcagtaaataatggcatgcactgggtccgccaggct ccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcatatg aggggaagtaataaataattatgcagactccgtgaagggccg attcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaataaacagcctgagagctgaggacacggcagtg attactgtgcgaaatcggggacccaatactatgatactac

[0249]

		tggttatgagtataggggtttggaatactttggctactgg ggccagggaaacctggtcaccgtctcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagtcctccaggcaccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtca gagtgttagtagcagttacttagcctggtagccagcagaaa cgtggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatcca gcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtgg gtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag cctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtatggta ggtcaaggtggacattcggccaagggaccaaggtggaaat caaac
ZKA185	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	28	ggatatagttttaccagttactgg
CDRH2	29	tttgatcctagtgcactctcaaac
CDRH3	30	gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggaca at
CDRL1	31	gcattgccaaataaattt
CDRL2	32	gaggacaac
CDRL2 长	33	gtcatctatgaggacaacaaacgaccc
CDRL3	34	tactcaacagacagcagttctaatcccctgggagta
VH	35	gaagtgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaaaagc ccggggagtcctcgaggatctcctgtaagggttctggata tagttttaccagttactggatcacctgggtgcgccagatg ccgggaaaggcctggagtggatggcgaagtgtgatccta gtgactctcaaaccaactacagcccgtccttccaaggcca cgtcaccatctcagttgacaagtccatcagcactgcctac ttgcagtggagcagcctgaaggcctcggacacogccatgt attactgtgcgagaagatattgtagtagtagtagttgta

[0250]

		tgtggacaattggggccaggggaaccctggtcaccatcttc tcag
VL	36	tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgtccc caggacaaacggccaggatcacctgctctggagat gcatt gccaaataaattttg cttattgggtaccggcagaagtcaggc caggccccctgttctggtcatctat gaggaca acaaacgac cctccgggatccctgagagattctctgggtccagctcagg gacaatggccaccttgactatcagtggggcccagggtggag gatgaagctgactaccactgt tactcaacagacagcagtt cta atccct gggag tattcggcggaggggaccaagctgac cgtcctag
ZKA230	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	46	gg tgggtccatcagtagtgactac
CDRH2	47	a tctattacagtgggagcacc
CDRH3	48	g cgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttg cttttgat atc
CDRL1	49	a gctccaacatcgggaggttaattat
CDRL2	50	a ttaatgat
CDRL2 长	51	ctcatctgt attaatgat caccggccc
CDRL3	52	g caacatgggatgacagcctgggtggccttgta
VH	53	caggtgcagctgcaggagtcggggccaggcctgggtgaagc cttcggagaccctgtccctcacctgcgcagtcctct gg tgg ctccatcagtagtgactact ggagctggatccggcagccc ccaggaagggaactggagtggattgggtatat ctattaca gtgggagc accaactacaacccctccctcaagagtcgagt caccatatcagtagacacgtccaagaaccacttctccctg aagctgaactctgtgaccgctgcggacacggcogtgatt actgt g cgaggaggaggaagtatgattccctttgggggag ttttg cttttgatatctggggccaagggaatggtcacc gtctcttcag
VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggaccc ccgggcagagggtcaccatctcttgttctggaagc agctc ca acatc ggaggt aattatgtatactgggtaccagcagctc ccaggaacggcccccaactcctcatctgt attaatgatc

		accggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaa gtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccag tccgaggatgaggctgattattactgt gcaacatgggatg acagcctgggtggccttgtattcggcgaggggaccaagct gaccgtcctag
ZKA78	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	64	ggcttcacttttagtaactatgca
CDRH2	65	atcgggcgcaacggggactctatc
CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaag ctgattat
CDRL1	67	cagtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac
CDRL2	68	tgggcttca
CDRL2 长	69	ctgatctatt tgggcttca acccgggaa
CDRL3	70	cagcagtactattctagtcctcgaact
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactgggtccagc ctggcggcagcctgacactgtcttgagtgatcag gctt cacttttagtaactatgcaat gggtgtgggcaaggcaggct cctgggaagggaactggagtatgtctctggcat cgggcgca acggggactctatctactatactgatagtgtgaaggccg gttcaccatcagcagagacaatagcaaatccatgggtgtac ctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtg actattgcgt gaaagatctggccatccccgagtcctacag aattgaagctgattattggggacagggcaccctgggtatc gtgagcgccg
VL	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtca gtctgggggagagggccactattaactgcaagagctccca gtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac ctgtct tggatcagcagaagcccggaagagccccctaaactgctga tctatt tgggcttca acccgggaaagcggcgctccagacag attctcaggcagcgggtccggaacagacttcaccctgaca attagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactatt gt cagcagtactattctagtcctcgaact tcggccaggg gaccaaggtggaaatcaaac
ZKA64	SEQ ID NO.	核酸序列

[0251]

[0252]

CDRH1	82	ggctacaccttcacaggggtatcac
CDRH2	83	attaaccctaattctggcgggacc
CDRH3	84	gctcggatgagctcctctatttgggggttcgatcat
CDRL1	85	cagtctgtgctgattaac
CDRL2	86	ggagcatcc
CDRL2 长	87	ctgatctat ggagcatcctccagggct
CDRL3	88	cagcagtacaatgattggccccctatcaca
VH	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaac ccggcgccctcagtgaagggtcagctgcaaagcttcc ggcta caccttcacaggggtatcacatcgactgggtgaggcaggca agaggacagggactggaatggatgggacgg attaacccta attctggcgggaccaactacgcccagaagtttcagggccg agtgactatgaccagagacaccagcatctccacagcttat atgcagctgtcccggctgagatctgacgatagtgccgtct actattgt gctcggatgagctcctctatttgggggttcga tcattgggggcagggaacactggtgactgtcagttcag
VL	90	gagatcgtgatgactcagttccagccaccctgtcagtc gcccaggagaacgggcaaccctgtcttgagagcctcc ca gtctgtgctgattaacctggcttggtaccagcagaagcca ggccaggcaccccgactgctgatctat ggagcatcctcca gggctaccggcattcctgcacgcttcagtgatcaggaag cggaacagagtttaccctgacaatctctagtctgcagtc gaagacttcgctgtctactattgt cagcagtacaatgatt ggccccctatcacatttggccaggggactagactggagat caagc

[0253] 优选地,根据本发明的核酸分子的序列包含根据SEQ ID NO:10至18、28至36、46至54、64至72和82至90中任一项的核酸序列;或其功能序列变体或由其组成。

[0254] 还优选地,根据本发明的核酸序列包括与表1和表2中所示的编码CDR、VH序列和/或VL序列的核酸,例如与表3所示的核酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核酸序列。

[0255] 通常,可以操纵核酸分子以插入、缺失或改变某些核酸序列。这种操作的变化包括但不限于引入限制位点、修改密码子使用、添加或优化转录和/或翻译调节序列等的变化。也可以改变核酸以改变编码的氨基酸。例如,在抗体的氨基酸序列中引入一个或多个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等)氨基酸取代、缺失和/或插入可能是有用的。这样的点突变可以修饰效应子功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可以引入氨基酸以连接共价基团(例如标记),或可以引入标签(例如出于纯化目的)。突变可以被引入特定位点或可以被随机引入,然后进行选择(例如分子进化)。例如,可以将编码本发明的(示例性)抗体的任何CDR区、VH序列和/或VL序列中的任何一个或多个的核酸

随机或定向突变以在编码的氨基酸中引入不同的性质。此类变化可能是迭代过程的结果，其中保留了初始变化，并在其他核苷酸位置引入了新变化。此外，可以组合在独立步骤中实现的变化。引入编码的氨基酸中的不同性质可以包括但不限于增强的亲和力。

[0256] 在另一方面，本发明还提供了如上所述的多个核酸分子，其中每个核酸分子包含至少一种编码如上所述的本发明抗体片段或其抗原结合片段的多核苷酸。优选地，根据本发明，由多个核酸分子编码的多个片段形成抗体或其抗原结合片段。换句话说，优选地，根据本发明的多个核酸分子编码根据本发明的(完整)抗体或其(完整)抗原结合片段。这意味着，特别地，不需要其他核酸分子(除了根据本发明的多个核酸分子之外)来编码/产生根据本发明的(完整)抗体或其(完整)抗原结合片段。例如，根据本发明的多个核酸分子编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的所有多肽链。

[0257] 根据本发明的多个核酸分子的优选实例是(恰好)两个核酸分子，其中每个核酸分子包含一个或多于一个(例如两个或三个)多核苷酸，每个多核苷酸编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的(不同的)多肽链。因此，这样的多个核酸分子中的核酸分子优选是单顺反子或双顺反子。其实例是如上所述一起编码根据本发明的FIT-Ig抗体的两个核酸分子(例如，一个双顺反子核酸分子与相应的单顺反子核酸分子结合，使得FIT-Ig的多肽1、多肽2和多肽3由两个核酸分子编码；如上所述)。

[0258] 在另一个优选的实例中，本发明提供了(恰好)三个核酸分子，其中每个核酸分子包含一个编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的(不同的)多肽链的(单个)多核苷酸。因此，这样的多个核酸分子中的核酸分子优选为单顺反子。其实例是如上所述一起编码根据本发明的FIT-Ig抗体的三个核酸分子(例如，三个(例如，单顺反子)核酸分子，一个编码FIT-Ig的多肽1，另一个编码FIT-Ig的多肽2，和第三个编码FIT-Ig的多肽3；如上所述)。

[0259] 载体

[0260] 包含在本发明范围内的是包含根据本发明的核酸分子的载体，例如表达载体。优选地，载体包含如上所述的核酸分子。

[0261] 术语“载体”是指核酸分子，优选指重组核酸分子，即自然界中不存在的核酸分子。在本发明的上下文中，载体适合于掺入或包含期望的核酸序列。这样的载体可以是存储载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。存储载体是允许方便地存储核酸分子的载体。因此，载体可以包含例如对应于根据本发明的所需抗体或其抗体片段的序列。表达载体可用于产生表达产物例如RNA例如mRNA、或肽、多肽或蛋白质。例如，表达载体可以包含转录载体的序列段所需的序列，例如启动子序列。克隆载体通常是包含克隆位点的载体，其可用于将核酸序列掺入载体中。克隆载体可以是例如质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适于将核酸分子转移到细胞或生物中的载体，例如病毒载体。在本发明的上下文中，载体可以是例如RNA载体或DNA载体。优选地，载体是DNA分子，例如DNA质粒。例如，在本申请意义上的载体包括克隆位点、选择标志物例如抗生素抗性因子、和适合于载体复制的序列例如复制起点。优选地，在本申请的上下文中，载体是质粒载体。

[0262] 在另一方面，本发明还提供了多个根据本发明的载体，其优选地编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段。因此，如上所述的根据本发明的多个核酸分子的优选实施方案和实例也适用于根据本发明的多个载体。

[0263] 细胞

[0264] 在另一方面,本发明还提供了表达本发明的抗体或其抗原结合片段;和/或包含根据本发明的载体或根据本发明的多个载体的细胞。

[0265] 这种细胞的实例包括但不限于真核细胞例如酵母细胞、动物细胞或植物细胞。优选地,细胞是哺乳动物细胞,更优选地是哺乳动物细胞系。优选的实例包括人细胞、CHO细胞、HEK293T细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、人肝细胞、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0266] 特别地,可以用根据本发明的载体或根据本发明的多个载体,优选表达载体或多种表达载体来转染细胞。术语“转染”是指将核酸分子,例如DNA或RNA(例如mRNA)分子引入细胞,优选引入真核细胞。在本发明的上下文中,术语“转染”涵盖技术人员已知的用于将核酸分子引入细胞,优选地引入真核细胞例如哺乳动物细胞中的任何方法。这样的方法包括,例如电穿孔、脂转染例如基于阳离子脂质和/或脂质体的脂转染、磷酸钙沉淀、基于纳米颗粒的转染、基于病毒的转染或基于阳离子聚合物例如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺的转染等。优选地,引入是非病毒的。

[0267] 而且,本发明的细胞可以用根据本发明的载体或根据本发明的多个载体稳定或瞬时地转染,例如以用于表达根据本发明的抗体或其抗原结合片段。优选地,用编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的根据本发明的载体或根据本发明的多个载体稳定地转染细胞。或者,优选用编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的根据本发明的载体或根据本发明的多个载体瞬时地转染细胞。

[0268] 任选的抗体其他特征

[0269] 本发明的抗体可以例如结合至用于递送至治疗部位的药物,或结合至可检测的标记以促进包含目的细胞的部位的成像。使抗体与药物和可检测标记物结合的方法以及使用可检测标记物进行成像的方法在本领域中是众所周知的。标记的抗体可用于采用多种标记的多种测定中。通过将可检测物质附着到抗体上,可以促进本发明抗体与目的表位之间抗体-抗原复合物的形成的检测。合适的检测手段包括使用标记物,例如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、显色剂、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基基团复合物、自由基、颗粒、染料等。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基基团复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例是鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;合适的放射性物质的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。这种标记试剂可用于多种众所周知的测定中,例如放射免疫测定、酶免疫测定例如ELISA、荧光免疫测定等。因此,根据本发明的标记抗体可以用于例如US 3766162;US 3791932;US 3817837;和US 4233402中所述的测定中。

[0270] 本发明的抗体可以缀合至治疗部分例如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子或放射性同位素。放射性同位素的实例包括但不限于 I-131 、 I-123 、 I-125 、 Y-90 、 Re-188 、 Re-186 、 At-211 、 Cu-67 、 Bi-212 、 Bi-213 、 Pd-109 、 Tc-99 、 In-111 等。这种抗体缀合物可用于修饰给定的生物反应;药物部分不应解释为受限于经典化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有期望生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可以包括例如毒素如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素。

[0271] 将这种治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的。参见,例如,Arnon等人(1985)

“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy,”于Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy中,编辑Reisfeld等人(Alan R.Liss, Inc.),第243至256页;编辑Hellstrom等人(1987)“Antibodies for Drug Delivery,”于Controlled Drug Delivery中,编辑Robinson等人(第二版;Marcel Dekker, Inc.),第623至653页;Thorpe(1985)“Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review,”于Monoclonal Antibodies'84:Biological and Clinical Applications中,编辑Pinchera等人第475至506页(Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985);“Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy,”于Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy中,编辑Baldwin等人(Academic Press, New York, 1985),第303至316页;和Thorpe等人(1982) Immunol. Rev. 62:119-158。

[0272] 或者,可以将抗体或其抗体片段与第二抗体或其抗体片段缀合,以形成抗体异源缀合物,如US 4676980中所述的。另外,可以在标记和本发明的抗体之间使用接头,例如,如US 4831175中所述的。抗体或其抗原结合片段可以用放射性碘、铟、钇或本领域已知的其他放射性颗粒直接标记,例如,如US 5595721中所述的。治疗可以由同时或先后施用缀合的抗体和未缀合的抗体的联合治疗组成,例如根据W000/52031;W000/52473中所述的。

[0273] 本发明的抗体也可以附着在固体支持物上。另外,本发明的抗体或其功能性抗体片段可以通过与聚合物共价缀合而被化学修饰,以例如增加其循环半衰期。聚合物的实例以及将其附着至肽的方法在US 4766106;US 4179337;US 4495285和US 4609546中示出。在一些实施方案中,聚合物可以选自聚氧乙基化的多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG在室温下可溶于水,且通式为: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R可以是氢、或保护基例如烷基或烷醇基。优选地,保护基可具有1个至8个碳。例如,保护基是甲基。符号n是正整数。在一个实施方案中,n为1至1000。在另一个实施方案中,n为2至500。优选地,PEG的平均分子量为1000至40000,更优选地,PEG的分子量为2000至20000,甚至更优选地,PEG的分子量为3000至12000。此外,PEG可以具有至少一个羟基,例如PEG可以具有末端羟基。例如,活化末端羟基以与抑制剂上的游离氨基反应。然而,应理解的是,可以改变反应性基团的类型和数量以实现本发明的共价缀合的PEG/抗体。

[0274] 水溶性聚氧乙基化的多元醇也可用于本发明。它们包括聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油(POG)等。在一个实施方案中,使用POG。不受任何理论的束缚,因为聚氧乙基化甘油的甘油骨架是自然存在于例如动物和人类中的甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯中的同一骨架,所以该分支不一定会被看作是体内的外来物质。POG的分子量可以与PEG相同。可以用于增加循环半衰期的另一种药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法是本领域技术人员已知的。其他药物递送系统是本领域已知的,并且例如在Poznansky等人(1980)和Poznansky(1984)的文献中所述的。

[0275] 本发明的抗体可以以纯化形式提供。通常,抗体将存在于基本上不含其他多肽的组合物中,例如,其中少于90重量%,通常少于60重量%,更通常少于50重量%的组合物由其他多肽构成。

[0276] 本发明的抗体可以在非人类(或异源)宿主例如小鼠中具有免疫原性。特别地,抗体可以具有在非人类宿主中而不是人类宿主中具有免疫原性的独特位。特别地,用于人的

本发明抗体包括不能轻易从宿主例如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等中分离的抗体,并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得。

[0277] 药物组合物

[0278] 本发明还提供了包含以下一种或多于一种的药物组合物:

[0279] (i) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0280] (ii) 根据本发明的核酸分子或多个核酸分子;

[0281] (iii) 根据本发明的载体或多个载体;和/或

[0282] (iv) 根据本发明的细胞。

[0283] 换句话说,本发明还提供了药物组合物,其包含根据本发明的抗体或其抗原结合片段,根据本发明的核酸分子,根据本发明的多个核酸分子,根据本发明的载体,根据本发明的多个载体和/或根据本发明的细胞。

[0284] 药物组合物可优选还包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。尽管载体或赋形剂可以促进施用,但其本身不应诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体。它也不应是有毒的。合适的载体可以是大的缓慢代谢的高分子,例如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性的病毒颗粒。通常,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体可以是活性组分或非活性组分。优选地,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体不是关于寨卡病毒感染的活性成分。

[0285] 可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0286] 药物组合物中的药学上可接受的载体可以另外包含液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这种组合物中可以存在辅助物质,例如湿润剂或乳化剂或pH缓冲物质。这样的载体使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆液剂和混悬剂,以供对象摄取。

[0287] 本发明的药物组合物可以以各种形式制备。例如,可以将组合物制备成可注射剂、或液体溶液剂或混悬剂。也可以制备适合于在注射之前在液体载体中溶解或悬浮的固体形式(例如,类似于SynagisTM和HerceptinTM的冻干组合物,以用于用含有防腐剂的无菌水重构)。组合物可制备为局部施用,例如作为软膏剂、霜剂或散剂。组合物可制备为口服施用,例如作为片剂或胶囊剂、作为气雾剂、或作为糖浆剂(任选调味)。可以使用细粉或喷雾剂将组合物制备为用于肺部施用,例如作为吸入剂。组合物可制备为栓剂或阴道栓剂。可以将组合物制备为鼻部、耳部或眼部的施用,例如以滴剂的形式。组合物可以呈试剂盒形式,设计成使得组合的组合物在即将施用于对象之前被重构。例如,冻干抗体可以以试剂盒形式与无菌水或无菌缓冲液一起提供。

[0288] 优选地,根据本发明,组合物中的活性成分是抗体分子、抗体片段或其变体和衍生物,特别是组合物中的活性成分是抗体、抗体片段或其变体和衍生物。这样,它可能易于在胃肠道中降解。因此,如果要通过胃肠道的途径施用组合物,则该组合物可以包含保护抗体免于降解且一旦当抗体从胃肠道吸收后便释放的试剂。

[0289] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472中提供了药学上可接受的载体的详尽讨论。

[0290] 本发明的药物组合物的pH通常为5.5至8.5,在一些实施方案中,其可以为6至8,并

且在其他实施方案中,约为7。可以通过使用缓冲液来维持pH。组合物可以是无菌的和/或无热原的。组合物对人而言可以是等渗的。在一个实施方案中,本发明的药物组合物提供于气密容器。

[0291] 在本发明范围内的是以多种施用形式存在的组合物;该形式包括但不限于适合于肠胃外施用的那些形式,例如通过注射或输注,例如通过推注或连续输注。当产品用于注射或输注时,它可以呈现为油性或水性介质中的混悬剂、溶液剂或乳剂形式,并且可以包含配制剂,例如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体分子可以是干燥形式,以便在使用之前用适当的无菌液体进行重构。通常将载体理解为适合于存储、运输和/或施用化合物例如药物活性化合物,特别是根据本发明的抗体的材料。例如,载体可以是生理上可接受的液体,其适合于存储、运输和/或施用药物活性化合物,特别是根据本发明的抗体。配制完成后,就可以将本发明的组合物直接施用于对象。在一个实施方案中,该组合物适合于施用于哺乳动物例如人类对象。

[0292] 本发明的药物组合物可以通过许多途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。无痛皮下喷射器也可用于施用本发明的药物组合物。优选地,可以将药物组合物制备为用于口服施用例如作为片剂、胶囊剂等,制备为用于局部施用,或作为注射剂例如作为液体溶液剂或混悬剂,特别优选药物组合物是可注射的。适合于在注射之前溶解或悬浮在液体载体中的固体形式也是优选的,例如药物组合物为冻干形式。

[0293] 对于注射例如静脉内、皮肤或皮下注射、或在患病部位注射,活性成分优选为肠胃外可接受的水溶液形式,其不含热原且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗载体例如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸林格注射液来制备合适的溶液。如果需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。无论是多肽、肽或核酸分子,还是要给予个体的根据本发明的其他药学上有用的化合物,施用优选是“预防有效量的”或“治疗有效量的”(视情况而定),这足以使个体受益。实际施用的量、施用的速率和时间进程将取决于所治疗的性质和严重程度。对于注射,可以例如在预填充的注射器中提供根据本发明的药物组合物。

[0294] 如上定义的本发明药物组合物也可以以任何口服可接受的剂型口服施用,包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液剂。对于口服片剂,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要口服水性混悬剂时,将活性成分,即如上定义的本发明的转运蛋白货物缀合物分子,与乳化剂和助悬剂混合。如果需要,还可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0295] 本发明的药物组合物也可以局部施用,特别是当治疗目标包括通过局部施用容易接近的区域或器官,例如包括皮肤或任何其他可接近的上皮组织的疾病时。针对这些区域或器官中的每一个容易制备合适的局部制剂。对于局部施用,可以将本发明的药物组合物配制成合适的软膏剂,该软膏剂包含本发明的药物组合物,特别地,如上定义的其组分悬浮或溶解在一种或多种载体中。局部施用的载体包括但不限于矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。替代地,可以将本发明的药物组合物配制成合适的洗剂或霜剂。在本发明的上下文中,合适的载体包括但不限于矿物油、脱水

山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、合成鲸蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二醇、苜醇和水。

[0296] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。特别地,药物组合物可以以单剂量产品的形式提供。优选地,药物组合物中的抗体的量——特别是如果以单剂量产品形式提供——不超过200mg,更优选不超过100mg,甚至更优选不超过50mg。

[0297] 例如,根据本发明的药物组合物可以每天施用,例如每天施用一次或几次,例如每天施用一次、两次、三次或四次,优选每天施用一次或两次,更优选每天施用一次,持续1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天或多于21天,例如每日施用持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月。优选地,根据本发明的药物组合物可以每周施用,例如每周施用一次或两次,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、17周、18周、19周、20周或21周或多于21周,例如每周施用持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月,或每周施用持续2年、3年、4年或5年。此外,根据本发明的药物组合物可以优选每月施用,例如,每个月施用一次,或更优选地,每隔一个月施用持续1年、2年、3年、4年或5年或多于5年。还优选在整个生命周期内连续施用。此外,还设想了一次施用,特别是对于某些适应症,例如在意外暴露的情况下预防寨卡病毒感染,例如在非免疫对象中。然而,最优选的治疗方案是暴露后预防(PEP),其中在寨卡病毒感染后尽快施用一次或多于一次单剂量。还优选预防性设置,其中施用一次或多于一次单剂量以预防寨卡感染(即,在寨卡感染之前,尤其是在非寨卡免疫的对象中)。

[0298] 特别地,对于单剂量,例如每日、每周或每月剂量,优选每周剂量,在根据本发明的药物组合物中,抗体或其抗原结合片段的量不超过1g,优选不超过500mg,更优选不超过200mg,甚至更优选不超过100mg,特别优选不超过50mg。

[0299] 药物组合物通常包含“有效”量的本发明的一种或多于一种抗体,即足以治疗、改善、减轻或预防目标疾病或病症或表现出可检测的治疗作用的量。治疗效果还包括减少或减轻致病效力或身体症状。对于任何特定对象的确切有效量将取决于他们的大小、体重和健康状况、疾病的性质和程度以及选择施用的治疗方法或治疗方法的组合。对于给定情况的有效量通过常规实验确定,并且在临床医生的判断之内。为了本发明的目的,相对于所施用个体的体重(例如,以kg计),有效剂量通常是约0.005mg/kg至约100mg/kg,优选约0.0075mg/kg至约50mg/kg,更优选约0.01mg/kg至约10mg/kg,甚至更优选约0.02mg/kg至约5mg/kg的本发明的抗体(例如,药物组合物中抗体的量)。

[0300] 此外,根据本发明的药物组合物还可以包含附加活性成分,其可以是其他抗体或不是抗体的成分。附加活性成分优选是检查点抑制剂。还优选的是,如本文所述的ZIKV中和抗体或其抗原结合片段与如本文所述的ZIKV NS1结合抗体或其抗原结合片段组合,作为附加活性成分(辅剂)。因此,除了中和ZIKV之外,还可以阻断NS1的致病作用。根据本发明的药物组合物可以包含一种或多于一种附加活性成分,例如在以下在联合疗法的上下文中描述的辅剂。

[0301] 根据本发明的抗体或抗原结合片段可以与附加活性成分存在于相同的药物组合物中,或优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段包含于第一药物组合物,并且附加活性成分包含于不同于第一药物组合物的第二药物组合物。因此,如果设想超过一种的附加活性成分,则根据本发明的每种附加活性成分和抗体或抗原结合片段优选地由不同的药物组

合物组成。可以将这些不同的药物组合物组合/同时地或在分开的时间或在分开的位置(例如身体的分开的部分)施用。

[0302] 优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段和附加活性成分提供加和的治疗效果,或优选地,提供协同的治疗效果。术语“协同”用于描述两种或多于两种活性剂的联合效果,其大于每种相应活性剂的单独效果之和。因此,在两种或多于两种试剂的联合效果导致对活性或过程的“协同抑制”的情况下,该活性或过程的抑制大于每种各自活性剂的抑制效果的总和。术语“协同治疗效果”是指用两种或多于两种治疗方法的组合观察到的治疗效果,其中治疗效果(如许多参数中的任何一个所测量的)大于用相应的单独治疗方法观察到的单独治疗效果的总和。

[0303] 优选包含根据gZKA190、gZKA64、gZKA230、gZKA185、gZKA78的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0304] 在一个实施方案中,本发明的组合物可以包含本发明的抗体,其中所述抗体可以占组合物中总蛋白的至少50重量%(例如60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%或高于99重量%)。在这样的组合物中,抗体优选为纯化形式。

[0305] 本发明还提供了一种制备药物组合物的方法,该方法包括以下步骤:(i)制备本发明的抗体;和(ii)将纯化的抗体与一种或多于一种药学上可接受的载体混合。

[0306] 在另一个实施方案中,制备药物组合物的方法包括以下步骤:将抗体与一种或多于一种药学上可接受的载体混合,其中该抗体是获自发明的转化的B细胞或培养的浆细胞的单克隆抗体。

[0307] 作为用于治疗目的递送抗体或B细胞的替代,可以将编码源自B细胞或培养的浆细胞的目的单克隆抗体(或其活性片段)的核酸(通常为DNA)递送给对象,从而使核酸可以在对象中原位表达以提供期望的治疗效果。合适的基因疗法和核酸递送载体是本领域已知的。

[0308] 特别地,如果以多剂量形式包装,则药物组合物可以包含抗微生物剂。它们可以包含表面活性剂,例如吐温(聚山梨醇酯),例如吐温80。表面活性剂通常以低水平存在,例如小于0.01%。组合物还可包含钠盐(例如氯化钠)以产生张力。例如,典型的NaCl浓度为 10 ± 2 mg/ml。

[0309] 此外,特别地,如果药物组合物要冻干或者如果药物组合物包括已经从冻干材料重构的材料,则药物组合物可以包含例如约15mg/ml至30mg/ml(例如25mg/ml)的糖醇(例如甘露醇)或二糖(例如蔗糖或海藻糖)。冻干前,可将用于冻干的组合物的pH调节至5至8、或5.5至7、或约6.1。

[0310] 本发明的组合物还可包含一种或多于一种免疫调节剂。在一个实施方案中,一种或多于一种免疫调节剂包括佐剂。

[0311] 药物治疗、试剂盒和用途

[0312] 药物治疗

[0313] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在(i)预防和/或治疗寨卡病毒感染或(ii)诊断

寨卡病毒感染中的用途。因此,使用根据本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是如上所述的其优选实施方案)或编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的根据本发明的(多个)核酸分子优选用于(i)如本文所述的预防和/或治疗寨卡病毒感染;或(ii)如本文所述诊断寨卡病毒感染的用途。

[0314] 诊断方法可以包括使抗体或抗体片段与样品接触。这种样品可以从对象中分离,例如从例如鼻腔、窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液,优选血浆或血清中提取分离组织样品。诊断方法还可以包括检测抗原/抗体复合物,特别是在抗体或抗体片段与样品接触之后。这种检测步骤通常在工作台上进行,即不与人体或动物体产生任何接触。检测方法的实例是本领域技术人员众所周知的,并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0315] 预防寨卡病毒感染特别是指预防性环境,其中未诊断出对象患有寨卡病毒感染(未进行诊断或诊断结果为阴性)和/或对象未显示出寨卡病毒感染的症状。因此,预防寨卡病毒感染包括“暴露后预防”(PEP),即在可能的寨卡病毒感染之后,例如在寨卡病毒感染地区被蚊虫叮咬后的预防性治疗。预防寨卡病毒感染在高风险对象中特别有用,例如在孕妇对象中和/或在寨卡病毒影响地区的对象中(例如住在寨卡病毒感染地区或前往寨卡病毒感染地区的对象)。

[0316] 相反,在治疗环境中,对象通常被寨卡病毒感染、被诊断为寨卡病毒感染和/或显示出寨卡病毒感染的症状。值得注意的是,术语ZIKV感染的“处理”和“治疗”包括(完全)治愈以及ZIKV感染的减轻。

[0317] 因此,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物优选用于治疗诊断出寨卡病毒感染的对象或显示出寨卡病毒感染症状的对象中的寨卡病毒感染。

[0318] 还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于预防和/或治疗无症状对象的寨卡病毒感染。那些对象可能被诊断出或未被诊断出寨卡病毒感染。

[0319] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于预防和/或治疗孕妇对象中的寨卡病毒感染,特别是用于预防先天性感染。例如,这可以以与预防HCMV先天性感染相似的方式进行,如Nigro G,Adler SP,La Torre R,Best AM,Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group:Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection;N Engl J Med 2005,353:1350-1362中所述的。

[0320] 不受任何理论的束缚,假设根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以通过与FcRn的相互作用而穿过胎盘,例如在施用于孕妇对象,例如通过静脉(i.v.)注射或本文所述的任何其他施用途径的情况下。重要地,不损害本文所述的抗体的“LALA”变体与FcRn的相互作用。认为FcRn已经在早期妊娠的胎盘中表达。

[0321] 或者,也可以将本发明的抗体或其抗原结合片段或(多个)核酸分子施用于羊膜外

间隙。

[0322] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于预防和/或治疗寨卡病毒感染,其中在(可能的)寨卡病毒感染后至多七天,优选在(可能的)寨卡病毒感染后至多五天,更优选在(可能的)寨卡病毒感染后四天,甚至更优选在(可能的)寨卡病毒感染后三天,最优选在(可能的)寨卡病毒感染后一天或两天施用该抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、多个核酸、多个载体、细胞或药物组合物。这样的治疗方案可以用于在治疗环境以及预防环境中,特别是用于暴露后预防(PEP)中。

[0323] 在PEP中,典型地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的第一次施用是在可能的ZIKV感染后,例如在ZIKV受感染区域蚊虫叮咬后尽快进行的。因此,如上所述,在PEP中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的第一次施用通常在(可能的)ZIKV感染后一天或多于一天进行。

[0324] 还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于预防和/或治疗寨卡病毒感染,其中在(可能的)寨卡病毒感染之前至多三个月,优选在(可能的)寨卡病毒感染之前至多一个月,更优选在(可能的)寨卡病毒感染前至多两周,甚至更优选在(可能的)寨卡病毒感染前至多一周,最优选在(可能的)寨卡病毒感染前至多一天施用抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、多个核酸、多个载体、细胞或药物组合物。这样的治疗方案特别是指预防性环境。

[0325] 一般而言——特别是在PEP中——在第一次施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物之后,可以随后进行一次或多于一次施用,优选每天或每隔一天施用单剂量,持续1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天。还优选的是,在第一次施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物之后,可以随后进行一次或多于一次,优选每周一次或两次施用单剂量,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或21周。还优选的是,在第一次施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物之后,可以随后进行一次或多于一次,优选每2周或4周施用单剂量,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或21周。还优选的是,在第一次施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发

明的药物组合物之后,可以随后进行一次或多于一次施用,优选每2个月或4个月施用单剂量,持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或21个月。还优选的是,在第一次施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物之后,可以随后进行一次或多于一次施用,优选每年一次或两次施用单剂量,持续1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或10年。

[0326] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物以0.005mg/kg体重至100mg/kg体重的(单)剂量施用,优选以0.0075mg/kg体重至50mg/kg体重的(单)剂量施用,更优选以0.01mg/kg体重至10mg/kg体重的(单)剂量施用,甚至更优选以0.05mg/kg体重至5mg/kg体重的(单)剂量施用,并且特别优选以0.1mg/kg体重至1mg/kg体重的(单)剂量施用。

[0327] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可以通过许多途径施用,例如口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。静脉内或皮下或肌肉内施用是优选的,静脉内或皮下施用是更优选的。

[0328] 在怀孕的对象中,还可以例如通过注射在羊膜内或羊膜外施用本发明的抗体或其抗原结合片段或(多个)核酸分子。

[0329] 因此,本发明还提供了预防和/或治疗对象的寨卡病毒感染的方法,其中该方法包括向有此需要的对象施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物。该方法的优选实施方案对应于如上所述的医疗用途的优选实施方案(以及以下关于联合治疗的实施方案)。例如,该方法中优选的对象是被诊断患有寨卡病毒感染或显示出寨卡病毒感染症状的对象。该方法中另一个优选的对象是怀孕的对象。

[0330] 联合治疗

[0331] 在根据本发明的方法和用途中施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多种载体,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可以单独进行或与辅剂(在本文中也称为“附加活性成分”)组合进行,这对于预防和/或治疗ZIKV感染是特别有用的。

[0332] 本发明包括根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的施用,其中在用于治疗和/或预防ZIKV感染的其他治疗方案或辅剂之前、同时或相继将它施用给对象。与所述辅剂同时施用的所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物可以在相同或不同的组合物中以及通过相同或不同的施用途径来施用。

[0333] 所述其他治疗方案或辅剂可以是例如检查点抑制剂。

[0334] 因此,在本发明的另一方面,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的

核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物与检查点抑制剂联合施用,以用于本文所述的(医学)用途。

[0335] 优选的检查点抑制剂针对PD-1/PD-L1和/或CTLA4的阻断,因此包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和抗CTLA4抗体。因此,根据本发明的药物组合物可以包含一种或多于一种附加活性成分。

[0336] 还优选的是,如本文所述的ZIKV中和抗体或其抗原结合片段与ZIKV NS1结合抗体或其抗原结合片段组合,作为附加活性成分(辅剂)。因此,除了中和ZIKV之外,还可以阻断NS1的致病作用。因此,例如如在整体并入本文的PCT/EP2017/067581中描述的,ZIKV NS1结合抗体或其抗原结合片段是优选的附加活性成分(辅剂)。

[0337] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体或根据本发明的细胞可以与附加活性成分(辅剂)存在于相同的药物组合物中,或优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段,根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体或根据本发明的细胞包含于第一药物组合物,并且附加活性成分(辅剂)包含于不同于第一药物组合物的第二药物组合物。因此,如果设想超过一种的附加活性成分(辅剂),则每种附加活性成分(辅剂)优选地组成不同的药物组合物。可以将这些不同的药物组合物组合/同时地或在分开的时间或在分开的位置(例如身体的分开的部分)施用。

[0338] 优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段和附加活性成分(辅剂)提供加和的治疗效果,或优选地,提供协同的治疗效果。术语“协同”用于描述两种或多于两种活性剂的联合效果,其大于每种相应活性剂的各个效果之和。因此,在两种或多于两种试剂的联合效果导致对活性或过程的“协同抑制”的情况下,该活性或过程的抑制大于每种各自活性剂的抑制效果的总和。术语“协同治疗效果”是指用观察到的两种或多于两种治疗方法的组合的治疗效果,其中治疗效果(如许多参数中的任何一个所测量的)大于用相应的单独治疗方法观察到的单独治疗效果的总和。

[0339] 其他用途和试剂盒

[0340] 在另一方面,本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物,其用于通过检查所述疫苗的抗原包含正确构象的特定表位来监测抗寨卡疫苗的质量。这种待检测的抗寨卡疫苗所包含的优选抗原包括ZIKV包膜蛋白或任何其他分子/复合物,其包含(i)如上所述的ZIKV E蛋白的结构域III(EDIII)或(ii)如上所述的四级ZIKV表位或由其组成。

[0341] 此外,本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在(体外)诊断寨卡病毒感染中的用途。

[0342] 此外,还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸分子、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在确定分离的血液样品(例如全血、血清和/或血浆)是否感染了寨卡病毒中的用途。

[0343] 如上所述,诊断方法可以包括使抗体或抗体片段与样品接触。这种样品可以从对象中分离,例如从例如鼻腔、窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液,优选血清或血浆中提取分离组织样品。诊断方法还可以包括检测抗原/抗体复合物,特别是在抗体或抗体片段与样品接触之后。这种检测步骤通常在工作台上进行,即不与人体或动物体产生任何接触。检测方法的实例是本领域技术人员众所周知的,并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0344] 在另一方面,本发明还提供了成套试剂盒,其包含至少一种根据本发明的抗体或其抗原结合片段、至少一种根据本发明的核酸、根据本发明的多个核酸、至少一种根据本发明的载体、根据本发明的多个载体、至少一种根据本发明的细胞和/或至少一种根据本发明的药物组合物。另外,试剂盒可以包括用于施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子、根据本发明的载体、根据本发明的多个核酸、根据本发明的多个载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的工具,例如注射器或器皿、说明书和/或如上所述的待施用的辅剂。

附图说明

[0345] 图1显示了源自四个ZIKV免疫供体(ZKA、ZKB、ZKC和ZKD)的抗体针对ZIKV和DENV1-4的E蛋白以及ZIKV E蛋白的EDIII结构域的反应性(ELISA)和ZIKV和DENV1中和活性;NNB——中和性非E蛋白结合抗体。

[0346] 图2显示了通过ELISA测量的ZKA190、ZKA78和ZKA64抗体与ZIKV和DENV1E以及ZIKV EDIII蛋白的结合。

[0347] 图3显示了通过ELISA测量的ZKA185和ZKA190抗体与ZIKV E、DENV1 VLP和ZIKV EDIII蛋白的结合。

[0348] 图4显示了实施例3中ZKA190、ZKA64、ZKA64-LALA、ZKA230和ZKA78抗体针对在Vero细胞上的ZIKV(H/PF/2013病毒株)和DENV1的中和活性,如通过流式细胞术测量的(感染的细胞%)。

[0349] 图5显示了实施例3中ZKA190、ZKA64、ZKA185、ZKA230和ZKA78抗体针对Vero细胞上的ZIKV(H/PF/2013病毒株)的中和活性,如通过细胞活力读取装置(wst-1, Roche)所测量的。

[0350] 图6显示了实施例4的ZKA190、ZKA64、ZKA64-LALA、ZKA185、ZKA230和ZKA78抗体针对非许可K562细胞上的ZIKV(H/PF/2013病毒株)的感染增强活性(ADE, 抗体依赖性增强),如通过流式细胞仪测量的(感染的细胞%)。

[0351] 图7显示了实施例4中四种ZIKV免疫血浆和一种DENV免疫血浆显示出相似的增强K562细胞的ZIKV感染的能力(上图)。EDIII特异性ZKA64-LALA抗体在所有五个免疫血浆中完全阻断了ADE效应(下图)。

[0352] 图8显示了自2013年以来来自亚洲谱系的39株ZIKV病毒株(包括1947年分离出的非洲谱系的原型病毒株MR766)的EDIII区的氨基酸比对。

[0353] 图9显示了实施例3的ZKA190和ZKA190-LALA抗体针对Vero细胞上的三种ZIKV病毒株(H/PF/2013, MR766和MRS_OPY_马提尼克岛_PaRi_2015)的中和活性,如通过流式细胞术测量的(感染的细胞%)。

[0354] 图10显示了实施例5的ZKA190和C8 mAb针对一组四种ZIKV病毒株测试的中和作用,如通过在存在渐增量的mAb的情况下感染的Vero细胞的百分比确定的(A)。还显示了IC50值(B)和统计数据(C)。数据代表至少两个独立实验。

[0355] 图11显示了实施例6中抗体ZKA190针对ZIKV感染的中和和增强。(A)用噬斑测定法在Vero细胞上测定ZKA190、ZKA190-LALA和对照mAb针对hNPC的ZIKV PRVABC59病毒株感染的中和作用(左图),并使用荧光团标记的抗E抗体对感染的hNPC进行间接免疫荧光测定(右图)。(B) ZKA190和ZKA190-LALA对非许可K562细胞的ZIKV感染的ADE。(C)当ZIKV与来自不同ZIKV阳性患者的血浆血清的系列稀释液预孵育时,在K562细胞中诱导的ADE(左图)。将ZKA190 LALA添加到ZIKV-血清复合物中时,ADE被抑制(右图)。(D)当ZIKV与源自DENV免疫供体的prM交叉反应mAb(DV62)的系列稀释液预孵育时,在K562细胞中诱导的ADE。当与prM反应性抗体DV62复合时,ZKA190-LALA抑制ZIKV的ADE。(E)通过指定mAb的连续稀释,经DENV2血浆(左图)或抗prM DV62 mAb(右图)的峰增强稀释诱导的对ADE的影响。

[0356] 图12显示了实施例7中ZKA190表位的鉴定及其在ZIKV病毒株中的保守性分析。(A)在不存在(黑色)或存在(红色)未标记的ZKA190 Fab的情况下,¹⁵N标记的ZIKV EDIII的[¹⁵N,¹H]-HSQC谱的叠加。差异确定了受抗体结合影响的EDIII残基。(B)与ZKV EDIII复合的ZKA190 Fab的NMR表位映射。将化学位移扰动(CSP,y轴)相对于EDIII残基数作图。受抗体结合影响的残基为红色。(C)通过NMR表位图谱鉴定的FG环中的残基部分隐藏在E蛋白模型A中,但大部分暴露在模型B和C中。E蛋白的EDIII被染成蓝色。通过NMR表位映射鉴定的残基用品红色着色,但FG环中的残基用绿色着色。相邻的E蛋白显示为灰色表面。(D)截至2016年11月24日,通过分析ZIKV资源(NCBI)数据库中发现的217种ZIKV病毒株的序列,计算得出ZKA190表位的氨基酸残基保守性水平。(E)打开的书的表示形式显示对接结果的表位和副表位之间的电荷互补性。表位和副表位的边界用绿色圈出。Fab的重链和轻链之间的边界及其在EDIII上的相应印迹显示为黄色虚线。

[0357] 图13显示了实施例7中通过NMR和对接鉴定的ZKA190表位。(A)ZIKV EDIII的12个最低能量NMR结构的卡通表示,红色表示受ZKA190结合影响的残基。该结构的N-末端的柔性是显而易见的。(B)通过NMR结果核对计算对接和分子模拟得出的ZKA190:EDIII复合物模型。NMR鉴定出的EDIII(灰色)上的表位为红色。ZKA190重链和轻链分别以深绿色和浅绿色着色。突变时影响或不影响抗体结合的EDIII残基分别显示为橙色和蓝色棒。(C)NMR鉴定的ZKA190表位(红色)可从病毒表面(白色)接近。

[0358] 图14显示了实施例7和实施例10中wt或突变的EDIII与ZKA190 IgG的结合。显示了SPR数据和结合动力学。如图所示,显示了影响(红色突出显示)或不影响结合的EDIII突变体。

[0359] 图15显示了实施例8中共聚焦显微镜实验的结果。将浓度超过ZKA190 Fab或完整IgG IC50值10000倍的ZIKV加入Vero细胞。ZIKV:抗体复合物在细胞内部(绿色)被检测到,并与内体共定位(红色、黄色叠加)。内体和酸性细胞器以溶酶体红色荧光探针标记;Alexa-488缀合的ZKA190为绿色。细胞核用DAPI(蓝色)染色。

[0360] 图16显示了实施例9的ZKA190的预防和治疗功效。(A)当对致死剂量的ZIKV病毒株MP17451攻击的小鼠((A)中的A129和(B)中的AG129)进行预防性施用, ZKA190对ZIKV感染具有强烈的防护作用。实验每组使用N=4至8只小鼠。显示了Kaplan-Meier生存曲线(A)。通

过使用Mantel-Cox对数秩检验确定显著性。图A,左上方:浓度为5mg/kg、1mg/kg和0.2mg/kg的ZKA190与对照mAb, $P=0.0031$; 0.04mg/kg的ZKA190与对照mAb为, $P=0.0116$; 浓度为5mg/kg、1mg/kg、0.2mg/kg和0.04mg/kg的ZKA190-LALA与对照mAb, $P=0.0031$ 。图A,右上方:在14天到15天的时间监控小鼠的发病率评分(使用了两种不同的评分方法;请参阅(Dowall, S.D., Graham, V.A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R.J., Bosworth, A., Bonney, L.C., Kitchen, S., 和Hewson, R. (2016). A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004658-13)。图A, 下图:小鼠的体重。图B:在ZIKV感染后的不同时间点以15mg/kg的剂量施用ZKA190或ZKA190-LALA。图B, 左上方:显示了Kaplan-Meier生存曲线。实验每组使用 $N=5$ 只小鼠。通过使用Mantel-Cox对数秩检验确定显著性。在第1天、2天、3天或4天给予ZKA190和ZKA190-LALA, 其相对于对照, $P=0.0016$ 。图B, 右上方:根据(Dowall等人, 2016)在14天期间监测的小鼠的发病率评分。在14天内监测小鼠的体重减轻(图B, 下图)。对照抗体是对RSV F蛋白具有特异性的MPE8(Corti, D., 等人 Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013))。

[0361] 图17显示了实施例9的抗ZIKV EDIII特异性mAb ZKA190对ZIKV病毒株MP1741的预防功效。(A)显示了在所有动物的血液中的第5天以PFU/ml测量的病毒血症。(B)在第5天在所有动物的血液中,并在研究结束宰杀动物时或达到人道终点时在血液和指示组织中通过qPCR以基因组拷贝/mL的形式测量病毒载量。(C)在14天期间监测小鼠的体重减轻。(D)第5天血液样品中人血清IgG浓度。通过非参数未配对Mann-Whitney U检验确定了与对照抗体治疗相比的显著性。 $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$ 。

[0362] 图18显示了实施例9的抗ZIKV EDIII特异性mAb ZKA190的治疗功效。(A)在第5天,测量所有动物血液中的病毒载量作为PFU。(B)在第5天在所有动物的血液中,并在研究结束宰杀动物时或达到人道终点时在血液和指示组织中通过qPCR以基因组拷贝的形式测量病毒载量。通过非参数未配对Mann-Whitney U检验确定了与对照抗体治疗相比的显著性。 $*p<0.05$; $**p<0.01$ 。(C)第5天血液样品中人血清IgG浓度。

[0363] 图19显示了实施例11和实施例12中ZKA190在双特异性FIT-1mAb中的工程化及其体外表征。(A)测试ZKA185和ZKA230 mAb对四种ZIKV病毒株的中和作用,如通过在存在渐增量的mAb的情况下感染的Vero细胞的百分比确定的。数据代表至少两个独立实验。(B)通过ELISA评估, ZKA185和ZKA230 IgG和Fab与重组ZIKV VLP、E和DIII抗原的结合。(C)测试了ZKA190、ZKA185和ZKA230中和H/PF/2013(wt)和MARM 1-4的能力。(D)由ZKA190结合的两个E蛋白二聚体的表面表示(绿色);源自ZKA190 NMR的表位为红色;MARM中突变的位置以黄色(E370)、蓝色(T335)、橙色(D67)和品红色(K84)表示。(E)FIT-1模型。内部和外部Fab之间的天然接头允许Fab在FIT-1抗体中灵活移动。ZKA185和ZKA190的可变区分别以蓝色和绿色突出显示。(F)通过ELISA评估的FIT-1IgG和Fab与重组ZIKV VLP、E和DIII抗原的结合。(G)测试了ZKA190、ZKA185和FIT-1 mAb对ZIKV的四种病毒株(IC₅₀值, G)和四种MARM(H)的中和作用。(I)通过ZKA185、ZKA230和FIT-1IgG和Fab对ZIKV H/PF/2013病毒株的中和,如(A)中确定的。(J)共聚焦显微镜实验,如图3G所示。(K)通过FIT-1IgG和Fab的连续稀释,经抗prMDV62 mAb或DENV2血浆的峰增强稀释诱导的对ADE的影响。

[0364] 图20显示了FIT-1的治疗功效。当在不同时间点对致死剂量的ZIKV病毒株MP17451

攻击的小鼠 (A129) 进行治疗性施用, FIT-1 对 ZIKV 感染非常有效。实验每组使用 $N=5$ 至 6 只小鼠。(A) 显示了 Kaplan-Meier 生存曲线。通过使用 Mantel-Cox 对数秩检验确定显著性。在第 1 天、第 2 天给予的 15mg/kg、5mg/kg 和 1mg/kg 的 FIT-1 与对照 mAb, $P=0.0012$; 在第 3 天给予的 15mg/kg 和 5mg/kg 的 ZKA190 与对照 mAb, $P=0.0012$; 在第 3 天给予的 1mg/kg 的 ZKA190 与对照 mAb, $P=0.0170$ 。(B) 在 21 天期间内监测的小鼠的发病率评分 (Dowall 等人, 2016)。(C) 在第 5 天, 测量所有动物血液中的病毒载量作为 PFU。(D) 在 21 天内监测小鼠的体重减轻。图 A 中的对照 mAb 是 MPE8 mAb (对 RSV F 蛋白具有特异性 (Corti, D., 等人 Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013))。 (E) 在第 5 天在所有动物的血液中, 并在研究结束宰杀动物时或达到人道终点时在血液和指示组织中通过 qPCR 以基因组拷贝的形式测量病毒载量。通过非参数未配对 Mann-Whitney U 检验确定了与对照抗体治疗相比的显著性。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ 。

[0365] 图 21 显示了实施例 14 中与安慰剂治疗的小鼠相比, 用马来西亚的 ZIKV 攻击后用 FIT-1 治疗的雌性 AG129 小鼠免于死亡。

[0366] 图 22 显示了实施例 14 中生来用 FIT-1 治疗并用 ZIKV 攻击的雌性的幼崽的子宫内生长限制 (IUGR)。

[0367] 图 23 显示了实施例 14 中用 FIT-1 治疗并感染了 ZIKV 的雌性的幼崽在出生之日的平均体重。

[0368] 图 24 显示了实施例 14 中从用 FIT-1 治疗的雌性动物收集的 11dpi 的胎盘重量。

[0369] 图 25 显示了实施例 14 中 (A) 胎儿、(B) 胎盘、(C) 母体脾脏和 (D) 母体脑中病毒 RNA 的定量 (与 MPE8 处理相比, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$)。

[0370] 图 26 显示了实施例 15 中在病毒攻击后 24 小时或 72 小时用 FIT-1 治疗并用 ZIKV 感染的雄性 AG129 小鼠的存活率 (* $P<0.05$, 与 MPE8 阴性对照处理相比)。

[0371] 图 27 显示了实施例 15 中在用 ZIKV 攻击后的不同时间用 FIT-1 治疗的 AG129 小鼠的平均体重变化百分比。

[0372] 图 28 显示了实施例 15 中在用 ZIKV 攻击后 24 小时或 72 小时用 FIT-1 治疗的雄性 AG129 小鼠的 A) 睾丸或 B) 附睾的疾病评分。用活性抗体治疗可减少睾丸和附睾的疾病。

[0373] 图 29 显示了实施例 16 中测试的 3 组血清中的病毒载量。水平线表示 LLOQ 为 860GC/mL。

实施例

[0374] 在以下实施例中提供了本发明的示例性实施方案。下列实施例仅以举例说明的方式给出, 以帮助本领域普通技术人员使用本发明。实施例无意以任何方式限制本发明的范围。

[0375] 实施例 1: ZIKV 特异性抗体的分离和单克隆抗体的制备

[0376] 使用 CD22 微珠 (Miltenyi Biotec) 从四个 ZIKV 感染供体 (ZKA、ZKB、ZKC 和 ZKD) 的冷冻保存的外周血单核细胞 (PBMC) 中分离 IgG⁺ 记忆 B 细胞, 然后通过细胞分选清除携带 IgM、IgD 和 IgA 的细胞。如前所述 (Traggiai, E. et al., *Nat. Med.* 10, 871-875, 2004), 来自 ZIKV 感染供体的记忆 B 细胞随后在多个复制孔中用 EBV (Epstein Barr 病毒) 和 CpG (CpG 寡脱氧核苷酸, 2006) 永生化, 培养物上清液然后在初级筛选中进行测试, 同时使用基于 384 孔的微中和

试验和结合试验(ELISA)来测试它们与ZIKV NS1蛋白或ZIKV E蛋白的结合。结合测定(结合ZIKV E蛋白)的结果如图1所示。

[0377] 在Vero细胞上进行中和测定。在384孔板中,将导致感染率(m.o.i,感染复数)为0.35的ZIKV H/PF/2013与上清液在37% (5%CO₂)下孵育1小时,然后添加到预播种的5000个Vero细胞。将它们再孵育5天,然后除去上清液,并加入WST-1试剂(Roche)。收集并扩增阳性培养物。通过RT-PCR从阳性培养物中回收VH和VL序列。抗体被克隆到人IgG1和Igκ或Igλ表达载体(由Michel Nussenzweig,Rockefeller University,New York,US提供)中,基本上如Tiller T,Meffre E,Yurasov S,Tsuiji M,Nussenzweig MC,Wardemann H(2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning.J Immunol Methods 329:112-124所述。根据EBV永生化的B细胞或通过293 Freestyle细胞(Invitrogen)的瞬时转染制备单克隆抗体。收集来自B细胞或转染细胞的上清液,并通过蛋白A或蛋白G色谱法(GE Healthcare)亲和纯化IgG,并用PBS脱盐。

[0378] 图1提供了所选ZIKV中和抗体的概况(参见表1和表2中它们的CDR和重链/轻链可变区的氨基酸序列)。图1的最后两列提供ZIKV和DENV1(如果经过测试)的中和活性(IC₅₀)。其他列提供抗体与ZIKV E蛋白(ZIKV E)、DENV1 E蛋白(DENV1 E)、DENV2 E蛋白(DENV2 E)、DENV3 E蛋白(DENV3 E)、DENV4 E蛋白(DENV4 E)、DENV1病毒样颗粒(DENV1 VLP)、DENV2病毒样颗粒(DENV2 VLP)、DENV3病毒样颗粒(DENV3 VLP)、DENV4病毒样颗粒(DENV4 VLP)的结合活性(EC₅₀),以及与ZIKV E蛋白的EDIII结构域(DIII ZKA)的结合活性(EC₅₀)。

[0379] 实施例2:ZKA190、ZKA185、ZKA230、ZKA64和ZKA78抗体的表征

[0380] 在实施例1中,鉴定了大量的ZIKV中和抗体,并表征了它们针对ZIKV的特异性,特别是针对ZIKV E蛋白和ZIKV EDIII的特异性、以及针对DENV的交叉反应性。然后选择实施例1中所述的抗体ZKA190(SEQ ID NO:1至18)、ZKA185(SEQ ID NO:19至36)、ZKA230(SEQ ID NO:37至54)、ZKA64(SEQ ID NO:73至90)和ZKA 78(SEQ ID NO:55至72)并针对ZIKV E蛋白(“ZIKV”)、ZIKV EDIII(“DIII ZI”)进一步进行测试,并且还通过ELISA对DENV E蛋白(DENV,血清型1)进行测试。为此,使用标准ELISA。简而言之,用1μg/ml或3μg/ml的ZIKV E蛋白包被ELISA板,用10%FCS的PBS封闭,与血清或人抗体孵育并洗涤。通过与缀合有AP的山羊抗人IgG(Southern Biotech)孵育检测结合的抗体。然后洗涤板,加入底物(p-NPP,Sigma),并在405nm下读取板。通过测量在饱和时达到50%最大结合所需的抗体浓度(EC₅₀)来确定单克隆抗体结合的相对亲和力。

[0381] 结果如图3和图4所示。值得注意的是,ZKA64和ZKA190以低EC₅₀值结合至ZIKV E和ZIKV EDIII(“DIII ZI”),从而表明ZKA64和ZKA190与ZIKV E蛋白(EDIII)的结构域III结合。ZKA78结合ZIKV E,但不结合ZIKV EDIII,表明ZKA78结合ZIKV E,但不靶向EDIII区。尽管它们具有相当大的ZIKV中和活性(参见图1),但抗体ZKA185和ZKA230并未显示出与ZIKV E和ZIKV EDIII的任何可检测结合(图3)。因此,ZKA185和ZKA230被称为“中和非E结合”(NNB)抗体。假定那些NNB抗体识别ZIKV感染性病毒粒子上展示的四级表位,但不显示在可溶性蛋白上。

[0382] 此外,ZKA190、ZKA185、ZKA230和ZKA64均未显示与DENV E蛋白的任何可检测结合(图1,DENV1-4血清型,以及图3和图4),表明ZKA190、ZKA185、ZKA230和ZKA64对ZIKV具有特

异性而且对登革热病毒没有交叉反应。相比之下,假定与ZIKV EDI/II结合,但不与ZIKV EDII结合的ZKA78(参见图2)与DENV E蛋白结合(图1和图3),这表明ZKA78是一种与ZIKV和DENV都结合的交叉反应性抗体。

[0383] 为了进一步证实这些结果,还对ZIKV E蛋白结合抗体ZKA190、ZKA64和ZKA78进行了抗登革热病毒E蛋白(DENV,血清型1至4)的测试。ZKA64和ZKA190不与DENV1-4 E蛋白结合,从而确认ZKA64和ZKA190对ZIKV具有特异性。相反,ZKA78与DENV 1至4 E结合,证实ZKA78是与ZIKV和DENV的E蛋白结合的交叉反应抗体(参见图1)。

[0384] 实施例3:分离的抗体有效中和ZIKV感染

[0385] 测试了分离的抗体ZKA190、ZKA185、ZKA230、ZKA64和ZKA78在体外中和ZIKV和DENV1感染的能力。

[0386] 使用微中和流式细胞术的测定法测量抗体对DENV和ZIKV感染的中和。将不同稀释度的抗体与ZIKV(MOI为0.35)或减毒DENV1(均为0.04的MOI)在37℃下混合1小时,并在96孔平底平板中添加到5000个Vero细胞/孔。ZIKV处理四天,DENV处理五天后,将细胞用2%甲醛固定,在PBS 1%FCS 0.5%皂苷中透化,并用小鼠mAb 4G2染色。将细胞与缀合至Alexa Fluor488的山羊抗小鼠IgG(Jackson Immuno-Research,115485164)一起孵育并通过流式细胞术进行分析。在其他情况下,还可以使用WST-1试剂(Roche)测定细胞活力来确定ZIKV中和数据。中和效价(50%抑制浓度[IC₅₀])表示为与仅细胞对照孔相比可将感染减少50%的抗体浓度。

[0387] 结果如图4、图5和图9所示。EDIII特异性mAb ZKA64和ZKA190以及NNB mAb ZKA230在ZIKV中和方面非常有效(病毒株H/PF/2013),其中IC₅₀值分别为93ng/ml、9ng/ml和10ng/ml(图4,上图)。相反,交叉反应性抗体ZKA78仅部分中和ZIKV感染性并交叉中和DENV1感染性(图4,下图)。通过测量用WST-1试剂所测量的ZIKV诱导的细胞病变效应来获得相似的数据(图5)。在此第二次测定中,NNB抗体ZKA185也包括在测试抗体组中,并显示出与最有效的抗体ZKA190(EDIII特异性)和ZKA230(NNB)相似的IC₅₀。

[0388] 重要的是要注意,超强力的ZKA64和ZKA190抗体除了具有中和ZIKV H/PH/2013病毒株的能力(本实施例)外,还分别与源自ZIKV病毒株MR766和SPH2015的E蛋白和EDIII结合(图1和图2)。还证实ZKA190和ZKA190-LALA能有效中和另外两种ZIKV病毒株(MR766和MRS_OPY_马提尼克岛_PaRi_2015)(图9)。综上所述,结果表明超强力的ZKA64和ZKA190抗体与属于不同基因型和起源(来自乌干达、法属玻里尼西亚、马提尼克和巴西的东非人和亚洲人)的多种ZIKV病毒株交叉反应。

[0389] 实施例4:“LALA”突变抑制血清抗体对ZIKV感染的抗体依赖性增强

[0390] 还测试了中和抗体增强非许可K562细胞中ZIKV感染的能力(抗体依赖性增强测定,ADE测定)。ADE通过使用K562细胞的基于流式细胞术的测定进行测量。将抗体和ZIKV H/PF/2013(MOI 0.175)在37℃下混合1小时,并添加到5000个K562细胞/孔。四天后,将细胞固定,透化并用m4G2染色。通过流式细胞术确定感染细胞的数目。

[0391] 结果示于图6。所有抗体均在很宽的浓度范围内增强了非许可K562细胞中ZIKV的感染,包括那些完全中和了Vero细胞上ZIKV感染的抗体(图6)。值得注意的是,虽然EDIII特异性抗体ZKA64和ZKA190完全中和了1μg/ml以上的K562细胞的ZIKV感染,但NNB抗体ZKA230未能做到这一点,该结果可能是由于游离病毒与Fc-γ受体内化病毒中和的不同机制而产生。

生的。相反,仅部分中和ZIKV感染性的交叉反应ZKA78有效增强了K562细胞的ZIKV感染。这些结果表明,由ZIKV或DENV感染引起的交叉反应性抗体可以介导异源ADE。

[0392] 鉴于此,研究了是否也可以由免疫血清诱导ADE,以及其是否可以被作为“LALA变体”递送的中和抗体所阻断。为了获得LALA变体,通过使用定点诱变用丙氨酸代替天然亮氨酸,在CH2结构域的氨基酸4位和5位突变每个重链。如上所述,(人IgG1抗体的)LALA变体不与Fc- γ 受体和补体结合。

[0393] 为了研究ZKA64-LALA抗体在ZIKV ADE中的作用,使用了ADE分析的抑制作用。由于使用ZIKV或DENV免疫血浆观察到ZIKV的ADE,因此将ZIKV (MOI 0.175) 与来自原ZIKV或DENV感染的供体的血浆在37℃下混合30分钟。加入浓度为50 μ g/ml的ZKA64-LALA抗体,与5000个K562细胞/孔混合并孵育三天。然后将细胞用4G2染色并通过流式细胞仪进行分析。

[0394] 结果示于图7。在同源情况下,从恢复期患者中收集的四种ZIKV免疫血浆和一种DENV免疫血浆显示出相似的增强K562细胞ZIKV感染的能力(图7,上图),并且EDIII特异性ZKA64-LALA抗体完全阻断了ADE效应(图7,下图)。

[0395] 值得注意的是,EDIII特异性ZKA64-LALA抗体完全阻断了ZIKV和DENV免疫血浆的ADE效应。单个EDIII特异性LALA抗体的ADE阻断能力不仅与其竞争血清增强抗体的能力有关,还与病毒一旦内化至内体后的中和能力有关。

[0396] 这些结果表明,以“LALA”形式开发的有效中和抗体例如ZKA190、ZKA230、ZKA185或ZKA64,有很大潜力用于预防或治疗环境,以预防先天性ZIKV感染,例如孕妇和/或生活在高风险地区的人。LALA形式的使用避免了ZIKV ADE的风险,并且如上所述,还可以阻断预先存在的交叉反应抗体的ADE,例如对于已经对DENV免疫的患者。

[0397] 实施例5:ZKA190比现有技术的抗体EDE1 mAb C8更有效地中和ZIKV

[0398] 为了将分离的中和抗体与现有技术的高度中和的抗ZIKV抗体进行比较,将ZKA190的中和性能与现有技术的高度中和mAb EDE1 C8的中和性能进行了比较(Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, Rey FA. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. Nature. 2016 Aug 4; 536 (7614): 48-53)。针对一组四种不同的ZIKV病毒株(H/PF/2013; MR766、MRS-OPY和PV10552)测试了两种抗体的中和作用。

[0399] 简而言之,使用基于微中和流式细胞术的测定法测量了mAb对ZIKV感染的中和。将不同稀释度的mAb与ZIKV (MOI为0.35) 在37℃下混合1小时,然后在96孔平底平板中添加至5000个Vero细胞/孔。ZIKV处理四天后,将细胞用2%甲醛固定,在含1%胎牛血清(Hyclone)和0.5%皂苷的PBS中透化,并用小鼠mAb 4G2染色。将细胞与缀合至Alexa Fluor488的山羊抗小鼠IgG (Jackson Immuno-Research, 115485164) 一起孵育并通过流式细胞术进行分析。中和效价(50%抑制浓度[IC50])表示为与仅病毒对照孔相比可将感染减少50%的抗体浓度。

[0400] 结果示于图10。ZKA190 mAb能有效中和非洲、亚洲和美国病毒株,IC50范围为0.6ng/ml至8ng/ml。相比之下,现有技术的抗体C8的效力低至为约24分之一。

[0401] 实施例6:抗体ZKA190的其他表征

[0402] 在体外和体内进一步研究了抗体ZKA190的效力。为此,以IgG1野生型(wt)形式和

IgG1 Fc-LALA形式合成mAb。简而言之,将VH和VL序列克隆到人Ig γ 1、Ig κ 和Ig λ 表达载体(由Michel Nussenzweig,Rockefeller University,New York,NY,USA提供)中,基本上如(Tiller T,Meffre E,Yurasov S,Tsuiji M,Nussenzweig MC,Wardemann H:Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning.J Immunol Methods 2008,329:112-124)所述。通过EXPI293细胞(Invitrogen)的瞬时转染产生重组mAb,通过蛋白A色谱(GE Healthcare)纯化并用PBS脱盐。为了获得LALA变体,通过使用定点诱变用丙氨酸代替天然亮氨酸,在CH2结构域的氨基酸4位和5位突变每个重链。如上所述,(人IgG1抗体的)LALA变体不与Fc- γ 受体和补体结合。

[0403] 如图10A所示和实施例5中所述,针对一组四种ZIKV病毒株测试ZKA190。ZKA190 mAb强力中和了非洲、亚洲和美国病毒株,IC₅₀为0.004nM至0.05nM(图10A;0.6ng/ml至8ng/ml)。

[0404] 由于ZIKV已显示感染人神经祖细胞(hNPC),从而导致细胞毒性增强、细胞周期失调和细胞生长减少,因此在hNPC中测试了ZKA190和ZKA190-LALA。为此,使用CytoTune-iPS 2.0 Sendai试剂盒(Life Technologies)对从运动障碍生物库(Movement Disorders Bio-Bank)(神经学研究所“Carlo Besta”的神经遗传学部门,米兰)获得的成年男性成纤维细胞进行了重新编程。hiPSC在mTeSR1(Stem Cell Technologies)中保持非饲养条件。为了生成胚状体(EB),将解离的hiPSCs接种在补充有N2(0.5 $\times$)(ThermoFisher Scientific)、人类头蛋白(0.5mg/ml,R&D System)、SB431542(5 μ M,Sigma)、Y27632(10 μ M,Miltenyi Biotec)和青霉素/链霉素(1%,Sigma)的mTeSR1中(例如Marchetto MCN,Carroneu C,Acab A,Yu D,Yeo GW,Mu Y,Chen G,Gage FH,Muotri AR:A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells.Cell 2010,143:527-539中所述的)。为了获得玫瑰花结,将EB在10天后涂覆在含有N2(1:100)、非必需氨基酸(1%,ThermoFisher Scientific)和青霉素/链霉素的DMEM/F12(Sigma)中的基质胶包覆的板(1:100,基质胶生长因子降低的,Corning)上。10天后,用Accutase(Sigma)传代细胞,并将其接种在含有DMEM/F12、N2(0.25%)、B27(0.5%,ThermoFisher Scientific)、青霉素/链霉素和FGF2(20ng/ml,ThermoFisher Scientific)的NPC培养基中的基质胶包覆的烧瓶上。在感染PRVABC59病毒株之前3天,将hNPC(3 $\times$ 10⁴)接种在24孔板的盖玻片上。将病毒原液与mAb孵育1h,然后再添加到hNPC中,得到的MOI为0.5。病毒吸附4小时后,除去培养上清液,并重新加入含有mAb的新鲜培养基。感染后96小时收集上清液,通过在Vero细胞上进行噬斑测定来测定病毒滴度。将细胞固定在4%多聚甲醛(PFA,Sigma)的磷酸盐缓冲液(PBS,Euroclone)溶液中30分钟以进行间接免疫荧光。固定的细胞在含有0.2% Triton X-100(Sigma)和10%驴血清(Sigma)的封闭溶液中透化30分钟(min),并在4 $^{\circ}$ C下与封闭溶液中的一抗一起孵育过夜。使用以下抗体进行检测:抗包膜(1:200,Millipore,MAB10216)。然后,将细胞用PBS洗涤,并与Hoechst和抗小鼠Alexa Fluor-488二抗(在封闭溶液中为1:1000,ThermoFisher Scientific)一起孵育1h。PBS洗涤后,再次洗涤细胞并固定。结果显示在图11A中。ZKA190和ZKA190-LALA都完全消除了hNPC中ZIKV的感染和复制。

[0405] 接下来,如实施例4所述,在K562细胞系中测试了ZKA190和ZKA190-LALA引起ADE的能力。简而言之,通过使用K562细胞的基于流式细胞术的测定测量ADE。简而言之,对于

ZKA190,将ZKA190和ZIKV H/PF/2013 (MOI 0.175) 在37℃下混合1小时,并添加到5000个K562细胞/孔。四天后,将细胞固定,透化并用mAb m4G2染色。通过流式细胞术确定感染细胞的数目。对于ZKA190-LALA,将ZIKV (MOI 0.175) 与来自原发ZIKV感染的供体的血浆在37℃下混合30分钟。以50μg/ml添加ZKA190-LALA,与5000个K562细胞/孔混合并孵育三天。然后将细胞用4G2染色并通过流式细胞仪进行分析。结果显示在图11B中。ZKA190支持0.0001nM至1nM的ADE;不出所料,ZKA190-LALA没有显示任何ADE活性。还测试了ZKA190-LALA抑制K562细胞中来自四种ZIKV免疫供体的血浆诱导的ADE的能力。结果显示在图11C中。发现ZKA190-LALA完全抑制了血浆抗体诱导的ADE (图11C)。

[0406] 抗prM抗体构成了人类针对黄病毒的免疫应答过程中引发的主要抗体的一部分,并已显示出体外增强病毒感染的能力 (Dejnirattisai,W.,Jumnainsong,A.,Onsirisakul,N.,Fitton,P.,Vasanawathana,S.,Limpitikul,W.,Puttikhunt,C.,Edwards,C.,Duangchinda,T.,Supasa,S.,等人 (2010) .Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans.Science 328,745-748)。用源自DENV免疫供体的prM交叉反应抗体DV62的系列稀释液预孵育K562细胞 (Beltramello,M.,Williams,K.L.,Simmons,C.P.,Macagno,A.,Simonelli,L.,Quyen,N.T.H.,Sukupolvi-Petty,S.,Navarro-Sanchez,E.,Young,P.R.,de Silva,A.M.,等人 (2010) .The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity.Cell Host Microbe 8,271-283)。结果显示在图11D中。DV62与ZIKV prM蛋白发生交叉反应,并在很宽的浓度范围内引起ADE (图11D)。ZKA190-LALA可以完全阻断抗PRM DV62 mAb诱导的未成熟或部分未成熟ZIKV颗粒的ADE (图11D)。

[0407] 最后,测试了不同浓度的ZKA190、ZKA190-LALA和ZKA190 Fab在增强浓度的人抗DENV2血浆或DV62存在下引起或阻断ZIKV ADE的能力。结果显示在图11E中。低浓度的ZKA190增加了prM DV62介导的ZIKV感染的ADE,与其促进未成熟和成熟病毒体进入的能力一致,而浓度高于1.3nM (即200ng/ml) 的ZKA190阻断了DENV血浆和mAb DV62两者诱导的ADE。ZKA190-LALA及其Fab片段在高于0.06nM的浓度下会降低ADE,表明两者均在附着后步骤例如融合中抑制了病毒感染。

[0408] 实施例7:ZKA190与EDIII的保守且高度可及性区域结合

[0409] 为了确定残基水平的ZKA190表位,如Bardelli,M.,Livoti,E.,Simonelli,L.,Pedotti,M.,Moraes,A.,Valente,A.P.,and Varani,L. (2015) .Epitope mapping by solution NMR spectroscopy.J.Mol.Recognit.28,393-400;Simonelli,L.,Beltramello,M.,Yudina,Z.,Macagno,A.,Calzolari,L.,and Varani,L. (2010) .Rapid structural characterization of human antibody-antigen complexes through experimentally validated computational docking.J Mol Biol 396,1491-1507;和Simonelli,L.,Pedotti,M.,Beltramello,M.,Livoti,E.,Calzolari,L.,Sallusto,F.,Lanzavecchia,A.,和Varani,L. (2013) .Rational Engineering of a Human Anti-Dengue Antibody through Experimentally Validated Computational Docking.PLoS ONE 8,e55561中所述,使用溶液核磁共振波谱法。

[0410] 简要地说,谱图是在300K的Bruker Avance 700MHz NMR谱仪上记录的。对于骨架

共振的分配,使用标准的三重共振实验((HNC0、HN(CA)CO、HN(CO)CACB、HNCACB),同时侧链使用HCCH-TOCSY和HBHA(CO)NH的NH实验进行注释。使用Topspin 2.1(Bruker Biospin)处理所有NMR实验,并用CARA分析。根据手动分配的化学位移,使用CYANA“noeassign”宏自动归属NOESY交叠峰。CYANA中使用标准模拟退火方案进行结构计算时使用的上距离约束是从70ms¹⁵N和¹³C分辨的NOESY谱得出的。ZIKV EDIII的骨架动力学是从600MHz和700MHz谱仪上记录的¹⁵N弛豫测量得到的。使用了质子检测版本的CPMG(R2)、反转恢复(R1)和¹⁵N{¹H}-稳态NOE。T2系列的延迟设置在0秒到0.25秒,而T1系列的延迟设置在0.02秒到2秒。¹⁵N{¹H}-NOE实验使用了5s的弛豫延迟。R1和R2弛豫率是使用自制脚本由相应指数函数与测量数据的最小二乘拟合得出的。使用软件包DYNAMICS以无模型的方式分析了弛豫数据。程序ROTDIF用于根据弛豫数据(8.5ns)计算总体相关时间。如先前所述进行NMR表位映射(Bardelli等人,2015;Simonelli等人,2010;2013)。简而言之,与ZKA190 Fab游离或结合的标记EDIII的¹⁵NHSQC谱的叠加允许鉴定其NMR信号在复合物形成后发生变化的EDIII残基,表明了它们受到ZKA190结合的影响。通过手动检查和化学位移扰动(CSP)识别变化, $CSP = ((\Delta \delta H)^2 + (\Delta \delta_N/10)^2)^{1/2}$ 。NMR样品通常为在20mM磷酸钠、50mM NaCl, pH 6.0中的800μM的[¹⁵N, ¹³C]标记的EDIII。将全氘化(名义上为70%)的²H, ¹⁵N EDIII样品用于NMR表位映射,其中EDIII:ZKA190 Fab比为1:1.1;EDIII浓度通常为0.4mM。

[0411] 由于NMR信号强烈依赖于局部化学环境,因此复合物形成的变化可直接或通过变构效应识别受抗体结合影响的抗原残基。通过比较游离和结合的EDIII的NMR谱(图12A),受ZKA190影响的残基被映射到EDIII的LR,特别是BC、DE和FG环以及EDI-EDIII铰链的一部分(图13A)。这些残基在217种已知的ZIKV病毒株中几乎相同,除了在乌干达1947年分离株中V341I和E393D处的取代(图12D)。这些突变也存在于被ZKA190有效中和的MR766病毒株中(图10A)。对未复合的ZIKV结构上的ZKA190表位的分析表明,除了5-折叠顶点的FG环(图13B和12C,分子A)外,该表位是高度可及的。

[0412] 计算对接然后进行分子动力学模拟,并由NMR衍生的表位信息以及EDIII诱变指导和验证,表明ZKA190通过以形状和电荷互补性为特征的界面来结合(图13B和12E)。对接表明ZKA190与EDIII上的FG环之间没有直接接触,表明抗体结合后其NMR信号的变化来自变构作用。重组EDIII中而不是其他表位区域中的FG环残基的突变不影响ZKA190对EDIII的结合亲和力,这一事实支持了该观点(图13B和图14)。

[0413] 实施例8:ZKA190中和的机制

[0414] ZKA190有效中和病毒的能力可能涉及细胞附着或膜融合的抑制。进一步的机制可能涉及通过病毒颗粒的交联使病毒灭活。

[0415] ZKA190 Fab可以中和ZIKV,尽管效率不如相应的IgG。通过与EDI-EDIII接头结合,ZKA190(Fab和IgG两者)可能抑制病毒融合至宿主细胞膜所需的DIII的约70度旋转(Bressanelli,S.,Stiasny,K.,Allison,S.L.,Stura,E.A.,Duquerroy,S.,Lescar,J.,Heinz,F.X.,和Rey,F.A.(2004).Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation.Embo J 23,728-738;Modis,Y.,Ogata,S.,Clements,D.,和Harrison,S.C.(2004).Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.Nature 427,313-319)。或者,ZKA190可能会阻止ZIKV附着于靶细胞。

[0416] ZKA190抑制膜融合的能力得到共聚焦显微镜分析的支持。为此,将Vero细胞以7500个细胞/孔接种在24孔板中的12mm直径盖玻片上,并孵育过夜。在存在或不存在中和浓度的Alexa-488缀合mAb (0.7 μ M) 的情况下,在37 $^{\circ}$ C下用ZIKV H/PF/2013 (MOI为100) 感染细胞3小时,用PBS洗涤并在室温下用在PBS中的2%多聚甲醛固定30分钟。在固定前的最后30分钟,通过向细胞中添加染料 (50nM),用溶酶体红色荧光探针 (Invitrogen) 鉴定酸化的内体。固定后,在PBS和50mM甘氨酸中进行大量洗涤,最后制备盖玻片以用于使用用于荧光的含DAPI的Vectashield封固剂 (Vector Laboratories) 的显微镜分析。使用具有63 $\times$ /1.4 N.A.物镜的Leica TCS SP5显微镜通过共聚焦显微镜分析样品。用FIJI软件进行图像分析和处理。

[0417] 结果示于图15。共聚焦显微镜分析显示,ZKA190 (Fab或IgG) 仅在与ZIKV复合后才能进入Vero细胞,中和浓度超过IC₅₀ 10000倍 (图15)。

[0418] 实施例9:EDIII特异性mAb ZKA190的体内表征

[0419] 为了评估其预防和治疗特性,在用致死剂量的ZIKV病毒株MP1751 (非洲系谱) 攻击的A129小鼠中测试了ZKA190和ZKA190-LALA。为了测试其预防效力,在进行病毒攻击的前一天施用ZKA190和ZKA190-LALA。

[0420] 通过腹膜内 (i.p.) 途径以体积为500 μ l的不同剂量向5周龄至8周龄的雌性A129小鼠 (IFN- α / β 受体-/-) 和野生型129Sv/Ev小鼠施用稀释于PBS中的mAb (ZKA190、ZKA190-LALA和对照抗体MPE8 (Corti,D.,等人Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody.Nature 501,439-443 (2013))。在病毒攻击前1天或病毒攻击后1天、2天、3天或4天施用mAb。用102pfu的ZIKV (病毒株MP1751) 皮下攻击动物,并随后持续14天。每天监测体重和温度,每天至少记录两次临床观察。攻击后第5天,从每只动物中收集50 μ l血液到RNA保护管 (Qiagen,UK) 中,并于-80 $^{\circ}$ C冷冻。在研究结束时 (攻击后14天) 或当动物达到人道终点时,进行尸检,并收集血液和脑、脾、肝、肾和卵巢的切片进行病毒学分析。

[0421] 称重来自A129小鼠的组织样品,并使用陶瓷珠和自动匀浆器 (Precellys,UK) 在PBS中,使用6500rpm的六个5秒循环,间隔30秒将它均化。将两百 μ l组织匀浆或血液溶液转移到600 μ lRLT缓冲液 (Qiagen,UK) 中,使用RNeasy Mini提取试剂盒 (Qiagen,UK) 进行RNA提取;作为初始步骤,将样品通过QIAshredder (Qiagen,UK)。ZIKV特异性实时RT-PCR测定法用于检测对象动物的病毒RNA。引物和探针序列取自Quick等人,2017 (Quick,J,Grubaugh ND, Pullan ST,Claro IM,Smith AD,Gangavarapu K,Oliveira G,Robles-Sikisaka R,Rogers TF,Beutler NA,等人:Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples.Nat Protoc 2017, 12:1261-1276),并进行了内部优化和验证,以提供最佳的PCR预混物 (mastermix) 和循环条件。使用SuperScript III Platinum单步qRT-PCR试剂盒 (Life Technologies,UK) 进行实时RT-PCR。最终的PCR预混物 (15 μ l) 由10 μ l的2 $\times$ 反应混合物、1.2 μ l的PCR级水、0.2 μ l的50mM MgSO₄、1 μ l每种引物组成 (ZIKV 1086和ZIKV 1162c工作浓度均为18 μ M)、0.8 μ l的探针 (ZIKV 1107-FAM工作浓度为25 μ M) 和0.8 μ l的SSIII酶混合物。将5 μ l模板RNA添加到PCR预混物中,最终反应体积为20 μ l。所使用的循环条件为50 $^{\circ}$ C持续10分钟,95 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后95 $^{\circ}$ C持续10秒和60 $^{\circ}$ C持续40秒的45个循环,再加上40 $^{\circ}$ C持续30秒的最终冷却步骤。在每个60 $^{\circ}$ C的步骤结束时使用荧光进行定量分析。使用7500软件版本2.0.6在7500 Fast平台 (Life

Technologies, UK) 上运行反应并分析反应。使用一系列稀释的定量RNA寡核苷酸(Integrated DNA Technologies)对样品中的病毒载量进行定量。基于GenBank登录号AY632535.2,该寡核苷酸包含该测定靶向的ZIKV RNA的77个碱基,并通过HPLC纯化合成至250nmol的规模。

[0422] 结果如图16、图17和图18所示。已显示ZKA190和ZKA190-LALA在5mg/kg、1mg/kg或0.2mg/kg的浓度下可保护小鼠免于死亡和发病(图16A至图16B)。与0.04mg/kg的对照组相比,ZKA190-LALA延迟了发病和死亡,ZKA190在较小程度上延迟了发病和死亡。与对照抗体治疗的动物相比,即使在血清抗体水平低于1 μ g/ml的情况下,血液和器官中的病毒滴度也显著降低(图17A至图17D)。

[0423] 为了评估ZKA190的治疗潜力,我们在ZIKV感染后的不同时间点施用了ZKA190和ZKA190-LALA。剂量为15mg/kg时,存活率达到80%至100%,即使在感染后四天进行处理,发病率也大大降低(图16E至图16G)。与用对照抗体处理的动物相比,在所有感染后时间点进行的ZKA190和ZKA190-LALA处理均导致病毒滴度显著降低,其中明显的趋势为较早的治疗具有更大的减少(图18A至图18C)。值得注意的是,在感染后四天给予mAb时,与ZKA190相比,ZKA190-LALA在第5天血液中的抗病毒活性显著降低,其结果可能与LALA变体促进包覆的病毒体快速清除的能力受损有关。

[0424] 在这16只经处理的小鼠中,分离出了一个体内逃逸突变体(单克隆抗体抗性突变体1, MARM1),该突变体在DIII中具有氨基酸取代(在表位中央的T335R),而来自其他经处理的小鼠的病毒则不包含任何E突变。如SPR所确定的,将T335R突变引入重组DIII表明其废除了ZKA190结合(图14;参考实施例7的实验方法)。

[0425] 实施例10:ZIKV逃逸突变体的体外选择

[0426] 抗体治疗剂的使用可能导致逃逸突变体的选择。为了评估ZKA190在体外选择抗性突变体(MARM)的能力,在存在亚中和浓度的ZKA190的情况下对ZIKV(H/PF/2013)进行传代。

[0427] 简而言之,将500 μ l中的两千个TCID₅₀的H/PF/2013ZIKV与250 μ l含不同浓度的mAb(8种不同浓度,从200 μ g/ml的终浓度开始,以1:4连续稀释)一起孵育。将混合物在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后添加250 μ l的Vero细胞悬浮液(3.2×10^6 个细胞),并在24孔板中于37 $^{\circ}$ C孵育三至四天,以使病毒繁殖。在每个选择步骤之后,从三种条件中选择500 μ l上清液:观察到单层完全保护的最低mAb浓度,观测部分CPE对细胞单层的作用的一种浓度,观测ZIKV CPE破坏了100%细胞单层的一种浓度。将试管以1000 $\times$ g离心5分钟,等分并保存在-80 $^{\circ}$ C。再次将一半的体积与不同浓度的mAb预混合,以重复选择和繁殖过程。剩余的上清液用于微中和测定和随后的病毒测序。

[0428] 为了鉴定所选MARM病毒的逃逸突变,先进行基因组RNA提取,然后进行一步式PCR以扩增ZIKV E蛋白扩增子并进行测序。使用QIAamp Viral RNA mini试剂盒(Qiagen)将来自MARM选择的细胞上清液(140 μ l)用于RNA提取。使用SuperScript III一步式RT-PCR和Platinum Taq(Invitrogen)一起进行cDNA合成和PCR扩增。对于一个反应,需要25 μ l反应混合物、8 μ l无菌水、2 μ M每种引物、1 μ l的RNA酶抑制剂(RNase out)(Life Technologies)、2 μ l的Superscript III RT/Platinum TaqMix和12 μ l的RNA,最终反应体积为50 μ l。对于E蛋白的N端部分,使用引物对Zika-E-F1 5'-TGCAAACGCGTCGCAAACCTGGTTG-3'(SEQ ID NO:266)和ZIKV-E-R1 5'-CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG-3'(SEQ ID NO:267),对于C端部分,引

物对ZIKV-Ef1530 5'-AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA-3' (SEQ ID NO:268) 和ZIKV-E-R2769 5'-TTACAGATCCCAACGACCGTCAG-3' (SEQ ID NO:269)。循环条件为:54℃持续40分钟,94℃持续2分钟;然后进行45个循环如下步骤:94℃持续45秒,50℃持续45秒和68℃持续1.5分钟;最终延伸步骤为68℃保持5分钟,最后冷却步骤为4℃。分析PCR产物,并从1.5%琼脂糖凝胶中提取,并用GFX PCR DNA和凝胶带纯化试剂盒(GE Healthcare)进一步纯化。对于测序反应,将8μl纯化的PCR产物与2μM引物混合,最终体积为10μl,并送去测序(Microsynth)。E蛋白N末端产物用ZIKV-E-F2 5'-ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC-3' (SEQ ID NO:270) 和ZIKV-E-R2 5'-TCGGTTCACAATCAAGTCCTAGGCT-3' (SEQ ID NO:271) 进行测序,C末端PCR产物用ZIKV-E-f2058 5'-GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA-3' (SEQ ID NO:272) 和ZIKV-E-r2248 5'-AAGACTGCCATTCTCTTGGCACCTC-3' (SEQ ID NO:273) 进行测序。使用CLC Main Workbench软件(CLC Bio,版本5)装配序列和分析序列。

[0429] 经过三轮选择后,分离出抗性突变体MARM2,其E蛋白在DIII中显示E370K突变。尽管抗体可以结合突变的DIII,但该突变消除了ZKA190的中和作用(图14)。体内(T335R)和体外(E370K)MARMS中的突变分别位于DIII的BC和DE环上,并与NMR鉴定的表位一致。

[0430] 实施例11:开发根据本发明的双特异性抗体

[0431] 病毒逃逸突变体会极大地阻碍治疗性抗体的功效。为了克服该问题,本发明人推测当组合两种高度中和的抗体时,病毒逃逸的可能性将极大地降低。鉴于此,产生了一系列双特异性抗体,其将ZKA190与针对E蛋白上不同位点的其他有效中和的mAb结合。因此,其集中于高度中和且不与ZKA190竞争的两种mAb,ZKA185和ZKA230。

[0432] 首先,如上所述,分析了它们交叉中和四种ZIKV病毒株的能力。ZKA185和较小程度的ZKA230有效中和了非洲、亚洲和美国病毒株,其中IC50范围为0.02nM至0.62nM(图19A)。ZKA185以高亲和力结合重组ZIKV E蛋白和寨卡病毒样颗粒(VLP),但不结合分离的DIII(图19B)。相反,ZKA230与ZIKV VLP结合,但不与重组E或DIII结合,表明其识别仅显示在病毒表面的四级表位(图19B)。通过ELISA显示出ZKA185 IgG和Fab以相似的高亲和力结合E和VLP抗原。

[0433] 为了鉴定ZKA185和ZKA230表位以及它们产生逃逸突变体的倾向,如上所述,在存在亚中和抗体的情况下,通过对病毒进行传代来分离针对ZKA185(MARM3)和ZKA230(MARM4)的MARM。MARM3在K84E和D67H处都包含取代,其均位于DII上(图19D)。MARM4显示了在84位的不同氨基酸取代(从K至G、E或R)的混合物,这在多次测序实验中得到了证实。最后,针对ZKA190、ZKA185和ZKA230对MARM 1至4进行了测试。ZKA190中和了ZKA185和ZKA230 MARM以及亲本病毒(图19C)。ZKA185中和了ZKA190和ZKA230 MARM。ZKA230仅中和了ZKA190 MARM2,而没有中和ZKA190 MARM1或ZKA185 MARM3。

[0434] 为了深入进行能够逃逸多种抗体压力的MARM的开发,在ZKA185或ZKA230的存在下对ZKA190 MARM2(E370K)进行连续传代。因此,发现在传代3次至4次之后出现了双重MARM。ZKA230引入了额外的K84E突变,而ZKA185引入了D76G突变。这些发现表明,当以逐步方式进行选择时,ZIKV能够逃逸针对不同位点的多种抗体的中和作用,并且证实了ZIKV E蛋白的高可塑性。

[0435] 总而言之,选择ZKA185与ZKA190一起用于开发双特异性抗体,因为其可以有效地交叉中和ZIKV病毒株,与替代位点结合,且不与ZKA190竞争。双特异性抗体以称为串联Fab-

Ig (FIT-Ig) 的四价对称形式制备。FIT-Ig在例如WO 2015/103072 A1和Gong S, Ren F, Wu D, Wu X, Wu C: Fab-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets. MAbs 2017中有详细描述。

[0436] FIT-Ig可以使用三种多肽来制备。多肽1通常包含与内部Fab重链的N-末端区域融合的外部Fab的轻链, 优选不具有接头。多肽2通常包含外部Fab的重链可变区和CH1区域, 且多肽3通常包含内部Fab的轻链。因此, FIT-Ig形式的抗体通常包含“内部Fab”和“外部Fab”。ZKA190 Fab在外部或内部位置生成了两种类型的FIT-Ig。简而言之, 对编码FIT-Ig的三个基因进行密码子优化, 其由Genscript合成并克隆如下: i) 外部Fab的VL, 然后是完整的恒定区(λ 或 κ), 与内部Fab的VH融合并克隆至Ig γ 1表达载体(经修饰以编码LALA突变)中。所得的多肽1是由外部Fab的VL和CL、内部Fab的VH与IgG1 CH1-铰链-CH2-CH3结构域融合而形成的; ii) 将外部Fab的VH基因(编码由外部Fab的VH和CH1形成的多肽2)克隆至Fab表达载体(Ig γ 1表达载体, 其中在编码CH1半胱氨酸残基220的密码子之后引入了终止密码子)中; iii) 将内部Fab的VL基因克隆至Ig κ 或Ig λ 表达载体(编码由内部Fab的VL和CL形成的多肽3)中。通过使用摩尔比为1:3:3的上述三种构建体的EXPI293细胞(Invitrogen)进行瞬时转染来制备重组FIT-Ig mAb(如WO 2015/103072 A1中所述), 并通过蛋白A色谱法(GE Healthcare)纯化并针对PBS脱盐。通过在还原和非还原条件下的SDS-PAGE分析蛋白质, 并通过BCA(Pierce, Rockford, IL)测定其浓度。在非还原条件下, FIT-Ig作为约250KDa的主要单条带迁移。在还原条件下, 每种FIT-Ig蛋白产生两个条带, 一个较高的MW条带是约75KDa的多肽1, 而一个较低的MW条带对应于在约25KDa处重叠的多肽2和3。为了进一步研究溶液中FIT-Ig的物理性质, 使用分子排阻层析(SEC)分析每种蛋白质。将在PBS中的纯化的FIT-Ig施加到Superdex 200 Increase 5/150GL上。使用280nm和214nm处的UV检测确定所有蛋白质。FIT-Ig蛋白表现出单一的主要峰, 这表明其与单体蛋白的物理同质性。

[0437] 实施例12: 根据本发明的抗体(FIT-1)的体外表征

[0438] 选择FIT-Ig双特异性抗体(在此称为FIT-1), 其在外部Fab位置具有ZKA190, 在内部Fab位置具有ZKA185(图19E), 并对其进行进一步表征。ELISA显示FIT-1与DIII、E和VLP结合(图19F)。FIT-1保留了针对ZIKV病毒株的高中和效力, IC₅₀值与亲本ZKA190和ZKA185抗体的IC₅₀值基本相似(图19G)。使用LALA形式的骨架IgG1抗体制备FIT-1, 从而消除了引起ADE的任何可能性。几种证据表明, FIT-1形式的ZKA190和ZKA185部分均处于活化状态。首先, FIT-1与E蛋白的亲合力高于亲本ZKA190和ZKA185抗体任何一个(KD值: ZKA185是1.8nM、ZKA190是9.3nM和FIT-1 KD < 1pM, 这可能是由于解离速率较慢而引起的, 可能通过亲合力效应)。其次, 与单个mAb相比, FIT-1有效地中和了所有ZKA190、ZKA185和ZKA230 MARM(图19H)。FIT-1(各自包含一个ZKA190和一个ZKA185)的Fab片段的中和活性仅降低了约6倍(图19I, 右图)。

[0439] 接下来, 测试了FIT-1选择MARM的能力(如上所述)。但是, 尽管连续进行了八次传代, 仍无法分离出任何MARM。相比之下, 使用单个mAb时, 传代3次到4次后会出现MARM。这些结果表明, 将FIT-1用作治疗剂更为安全, 因为DIII和DII均同时突变不太可能发生。

[0440] 使用Vero细胞的共聚焦显微镜研究还显示, 作为ZKA190的FIT-1可能会在附着后步骤抑制病毒感染, 以及可能的融合(图19J)。

[0441] 最后, FIT-1及其Fab片段分别以高于0.1nM和10nM的浓度阻断了人抗DENV2血浆或

DV62的ADE (图19K), 这表明FIT-1不会引起ADE并且通过中和性差的交叉反应抗体阻断单核细胞的ADE。

[0442] 实施例13:FIT-1的体内治疗潜力

[0443] 为了评估FIT-1的治疗潜力, 在ZIKV感染后, 在三个不同的时间点对雌性A129小鼠施用三种不同的剂量 (15mg/kg、5mg/kg和1mg/kg)。简而言之, 将雌性A129小鼠分为10个不同的组 (对照组和三种不同剂量, 针对每种剂量有三个不同的施用时间点)。用102pfu的ZIKV (病毒株MP1751) 皮下攻击所有动物, 随后持续14天。在ZIKV病毒攻击后的第1天、第2天或第3天, 通过腹膜内 (i.p.) 途径用稀释在PBS中的15mg/kg、5mg/kg或1mg/kg的双特异性抗体FIT-1以500 μ l的体积施用于9个治疗组的小鼠。每天监测所有动物的体重和温度, 每天至少记录两次临床观察。攻击后第5天, 从每只动物中收集50 μ l血液到RNA保护管 (Qiagen, UK) 中, 并于-80 $^{\circ}$ C冷冻。在研究结束时 (攻击后14天) 或当动物达到人道终点时, 进行尸检, 并收集血液, 以及脑和卵巢的切片进行病毒学分析。

[0444] 结果示于图20。数据显示, 在剂量为15mg/kg时, 即使在感染后三天进行处理, 存活率仍为100%, 且无发病迹象 (图20A); 消除病毒滴度, 未检测到逃逸突变体, 这表明体内效力高。5mg/kg的施用可使存活率达到70%至100%, 在感染后第5天也未检测到逃逸突变体。在感染后的第1天或第2天 (而非第3天) 施用, 所测试的最低剂量 (即1mg/kg) 起到保护作用。

[0445] 实施例14:FIT-1对AG129小鼠先天性感染模型疾病的影响

[0446] 在ZIKV先天性感染小鼠模型中评估了用FIT-1治疗感染的母鼠对先天感染的幼崽和治疗母鼠的影响, 该模型在先天性接触ZIKV后产生活的后代。在此模型中, 使用了缺乏IFN受体的AG129小鼠, 这会导致胎盘中的病毒复制、病毒向胎儿的传播以及潜在的长期影响, 例如子宫内生长受限和听力障碍。

[0447] 测试了FIT-1治疗对子宫内感染的各种参数的影响。为此, 在性交后7天 (dpc) 用ZIKV感染小鼠, 并在病毒攻击后1天或3天用FIT-1治疗 (参见实施例13)。评估了各种疾病结果, 例如胎儿和胎盘中的病毒滴度和子宫内生长受限, 以确定FIT-1治疗的效果。

[0448] 材料和方法:

[0449] 动物: 使用了42只雌性AG129小鼠。将动物组随机分为实验组, 并分别用耳标进行标记。激素治疗用于诱发雌性发情。将雌性个体与雄性个体放置在一起, 并在性交后0.5天 (dpc) 检查阴道塞。

[0450] 病毒: 使用马来西亚寨卡病毒 (P6-740)。通过0.1ml的皮下注射施用合适的攻击剂量。

[0451] 测试试剂: FIT-1的剂量为45mg/kg。将非特异性对照抗体MPE8-LALA Ctr IgG1用作同种型对照安慰剂治疗。

[0452] 病毒的定量: 使用定量RT-PCR测定法定量各种组织的病毒滴度。使用TRIzol (ThermoFisher Scientific, Cat#15596018) 从组织样品中提取总RNA。用2 μ l的RNA制备物进行扩增。将跨越扩增区域的合成RNA的系列稀释液用作阳性对照; 未稀释的合成ZIKV RNA具有 $10^{8.0}$ 拷贝/ μ l。在50 $^{\circ}$ C下30分钟和95 $^{\circ}$ C下10分钟的初始单次循环之后, 使样品进行以下的步骤40个循环: 在95 $^{\circ}$ C下持续15秒与60 $^{\circ}$ C持续60秒。未知数量的样品通过使用合成ZIKV RNA的连续稀释生成的曲线外推C (t) 值进行定量。

[0453] 实验设计:在性交后第7天(dpc)攻击母鼠,并在病毒攻击后24小时或72小时用FIT-1进行治疗。病毒攻击后11天,对每组2只母鼠进行尸检。收集胎盘、胎儿组织、脑组织和脾组织,以通过QRT-PCR测定病毒滴度。随后每组有2名雌性分娩。用数字卡尺记录幼崽的头部的枕额肌直径(OF)和幼崽的冠臀长度(CRL),并通过以下公式确定幼崽的大小来确定子宫内的生长限制: $CRL \times OF$ 。在不同时间测量幼崽和母鼠的重量。

[0454] 统计分析:使用Wilcoxon对数秩生存分析(Prism 5, GraphPad Software, Inc)分析生存数据。

[0455] 结果和讨论:

[0456] 在先天性感染和ZIKV感染相关疾病的小鼠模型中评估用FIT-1进行的治疗。用FIT-1进行的治疗对怀孕的雌性具有保护作用,无论何时进行治疗,大多数接受治疗的雌性都不会死亡(图21)。用非特异性阴性对照抗体治疗的雌性的死亡率与以前的研究中观察到的死亡率接近。

[0457] 平均幼崽大小的趋势改善。来自用FIT-1治疗的母鼠的幼崽的平均大小高于对照MPE8的幼崽,并且与假手术感染的动物相似(图22)。就胎儿体重而言,这种差异不太明显,因为所有组的平均值均相似(图23)。用FIT-1治疗的母鼠有胎盘重量增加的趋势(图24)。

[0458] 各种组织的病毒滴度如图25所示。观察到用FIT-1治疗的母鼠的胎儿和胎盘中的病毒RNA显著减少(分别为图25A和图25B)。该减少在胎盘组织中尤为明显,ZIKV RNA水平降低了约 $5 - \log_{10}$ 。与MPE8相比,经FIT-1治疗的动物的母体脾脏和脑的病毒RNA也显著降低,其水平降低了几个 $\log_{10}$ (分别为图25C和图25D)。

[0459] 结论:

[0460] 总体而言,这些数据支持FIT-1在预防或治疗先天暴露于ZIKV的胎儿疾病中的保护作用。观察到胎儿和胎盘大小参数有改善的趋势,同时各种母体和胎儿组织中的病毒滴度大大降低。

[0461] 实施例15:FIT-1对AG129小鼠睾丸感染模型疾病的影响

[0462] 在感染ZIKV的男性中已记录了男性生殖道的性传播和持续感染(D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. N Engl J Med 2016;374:2195-8)。在AG129小鼠品系中,通常在病毒攻击后约2周观察到严重疾病,包括病毒在小鼠睾丸中大量复制(Julander JG, Siddharthan V, Evans J, 等人 Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. Antiviral Res 2016;137:14-22)。雄性AG129小鼠生殖道中病毒复制的关键位点包括附睾和睾丸以及各种附属性腺。

[0463] 在本研究中,在睾丸感染模型中评估了FIT-1对ZIKV感染的雄性小鼠的影响。为此,使雄性AG129小鼠感染ZIKV,并在ZIKV感染和FIT-1治疗后评估雄性生殖道的病理。

[0464] 材料和方法:

[0465] 动物:使用雄性AG129小鼠。将动物组随机分为实验组,并分别用耳标进行标记。

[0466] 病毒:寨卡病毒(Puerto Rican病毒株, PRVABC-59)。通过腹股沟褶内的0.1ml体积的皮下注射施用 10^2 CCID₅₀攻击剂量。该攻击剂量通常在未经治疗的AG129小鼠中具有致死性,死亡发生在攻击后2周左右。

[0467] 测试试剂:FIT-1的剂量为15mg/kg。将非特异性对照抗体MPE8-LALA Ctr IgG1用

作同种型对照安慰剂治疗。

[0468] 组织病理学:收集组织,并在中性福尔马林缓冲液中孵育24小时。适当固定后,修整所有收集的组织并将其在70%乙醇中固定,直到进行常规处理、石蜡包埋和切片为止。所有组织均由兽医解剖病理学住院医师和委员会认证的兽医解剖病理学家进行盲法独立分析。开发了评分系统以对生殖道中炎症的严重程度进行分级。

[0469] 实验设计:用ZIKV感染小鼠,并在病毒攻击后28天进行存活和体重变化监测。病毒攻击后24小时或72小时,用15mg/kg FIT-1进行治疗。以0.1ml体积的腹膜内注射施用单次治疗。如上所述施用同种型匹配的对照抗体MPE8-LALA对照IgG1,并在病毒攻击后24小时进行治疗。将一组模拟感染的、经FIT-1治疗的小鼠用作毒性对照,且一组正常对照也包括在内。分别在0天和在7-21dpi中每隔一天进行一次权重计算。每天观察小鼠的疾病体征,包括结膜炎、驼背和四肢无力或麻痹,并记录疾病体征的初始发作。在6dpi对3只动物的组群进行尸检,并收集组织样品用于组织病理学分析。

[0470] 统计分析:使用Wilcoxon对数秩生存分析(Prism 5,GraphPad Software,Inc)分析生存数据。

[0471] 结果和讨论:

[0472] 寨卡病毒(ZIKV)可以在男性生殖组织中延续长达六个月的时间,这是抗病毒治疗的明确目标。为了确定双特异性抗ZIKV Ab在预防或减少雄性生殖道病理中的功效,用波多黎各人的ZIKV分离株病毒攻击后24h或72h治疗小鼠的组。使用生存率、体重变化和组织病理学来确定mAb治疗的疗效。将同种型对照mAb,MPE8-LALA Ctr IgG1用作安慰剂治疗。

[0473] 与安慰剂mAb治疗相比,观察到存活率显著($P < 0.05$)提高(图26)。在用FIT-1攻击后24小时治疗的小鼠中观察到完全存活,而在病毒接种后72小时治疗小鼠的结果是一只动物死于病毒感染。在病毒攻击后24天对这只动物实施安乐死,这比用安慰剂治疗的动物晚得多(图26)。由于ZIKV感染AG129小鼠会导致致死性,这比用这种病毒感染的典型自然感染严重得多,所以用FIT-1观察到的高水平保护是非常有希望的。

[0474] 用FIT-1治疗小鼠的平均体重变化与假手术感染的治疗对照组相似,而用MPE8处理小鼠的平均体重在7dpi后迅速下降,这进一步证明了小鼠免于患病的有效保护(图27)。

[0475] 由于本研究的主要目的是评估治疗方法对男性生殖道的影响,并且在以前的研究中,睾丸和附睾在感染后受到的影响最为严重,因此要特别注意这些组织的组织病理学。在24小时治疗组中,除一只动物外,在用FIT-1治疗小鼠的睾丸或附睾中未观察到疾病(图28),进一步证明了FIT-1治疗的功效。当病毒攻击后72小时开始治疗时,FIT-1还可以保护小鼠免受疾病侵害,此时接受治疗小鼠均未在睾丸或附睾中观察到疾病(图28)。安慰剂治疗组中的大多数小鼠睾丸(2/3)和附睾(3/3)有炎症(图28),尽管该研究中的疾病严重程度较轻。

[0476] 结论:

[0477] 用FIT-1治疗可有效减少所有评估的疾病参数。病毒攻击后长达72小时的治疗处理非常有效。

[0478] 实施例16:FIT-1在ZIKV攻击的恒河猴中的预防和治疗功效

[0479] 这项研究评估了针对寨卡病毒(ZIKV)的双特异性抗体在用ZIKV病毒株PRVABC59

攻击的印度恒河猴 (IRM) 中的预防和治疗效果。十六 (16) 只IRM被随机分为三个治疗组。一组在攻击前一天接受FIT-1 (5mg/kg), 另一组在攻击后一天接受治疗 (15mg/kg)。第三组在攻击前一天用同种型对照 (FIT-3, 5mg/kg) 治疗。在第0天, 通过皮下 (SC) 注射递送的 1×10^5 PFU的ZIKV病毒株PRVABC59攻击所有IRM。在预定的时间点收集血清、尿液和唾液, 并通过定量RT-PCR测量ZIKV负荷。

[0480] 方法:

[0481] 在研究第0天之前, 使用Provantis软件根据性别/体重将十六 (16) 只IRM随机分为相应的组。在第-1天或第1天, 动物接受以下表4中列出的剂量进行静脉内递送的FIT-1或同种型对照FIT-3。在第0天, 麻醉所有恒河猴, 并通过皮下注射用0.5mL野生型ZIKV病毒株PRVABC59攻击, 每只动物的目标攻击剂量为 1.0×10^5 PFU。如表5所示, 在预定的时间点收集血液、尿液和唾液样本, 以通过RT-qPCR评估病毒载量。

[0482] 表4: 动物分组

组	治疗	治疗天数	途径, 剂量	攻击 ¹
1 (3M/3F)	FIT-1	Day -1	静脉注射, 5 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)
2 (3M/3F)	FIT-1	Day +1	静脉注射, 15 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)
3 (2M/2F)	FIT-3	Day -1	静脉注射, 5 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)

[0483] ¹在第0天用0.5mL野生型ZIKV进行皮下攻击

[0484] 表5: 关键行为

研究天数	-1	0	1	5	10	15	20	25	30
治疗	✓		✓						
ZIKV攻击(皮下注射)		✓							
日常观察方式		每天观察所有动物两次							
体重		每天				✓	✓	✓	✓
体温		每天				✓	✓	✓	✓
血液收集 ¹		每天				✓	✓	✓	✓
尿/唾液收集		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
病毒载量: RT-qPCR		每天				✓	✓	✓	✓
血液体积(mL)		2				2	2	2	20
安乐死									✓

[0485] ¹在攻击和治疗之前收集第0天和第1天的血液

[0486] 在研究第-1天 (第1组和第3组) 和第1天 (第2组), 通过向右大隐静脉或头静脉的静脉内注射对麻醉动物施用FIT-1 (原液浓度: 3.67mg/mL) 或FIT-3 (原液浓度: 3.79mg/mL)。

[0487] ZIKV病毒株PRVABC59; 人/2015/Puerto Rico (美国分离株) 是本研究中使用的攻击材料。病毒接种物的制备是在BSL-2条件下在II级生物安全柜中进行的。将病毒原液在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中融化、涡旋, 并用VP-SFM稀释, 以产生 2×10^5 PFU/mL适当浓度的接种物。每个注射器装有0.5mL病毒接种物, 并保持在冰上, 直到转移到动物设施中进行施用。在研究的第0天, 所有动物都被麻醉, 夹住注射部位, 用酒精擦拭, 并用不可擦除的标记物进行标记。用

0.5mL ZIKV分离株在动物的左前臂前表面SC接种动物,剂量见表4。

[0490] 在整个检疫和研究期间,每天两次观察所有恒河猴的发病率和死亡率。每天两次(至少以8小时为间隔)观察动物的反应能力和临床体征,包括皮疹、红斑、结膜炎、眼分泌物和肿胀。对于所有动物,在表5所示的时间点采集血液,以用于通过RT-qPCR病毒载量进行体外测试。在第30天的最终抽血期间,每只动物的收集量不超过20mL。对于所有动物,在表5所示的时间点收集尿液,以用于通过RT-qPCR进行体外测试以监测病毒脱落。在研究的尿液收集期间将动物单独饲养。尿液直接从笼盘中收集,收集后放在湿冰上,分成等分试样,并储存在-70℃或低于-70℃的温度下,直到准备进行测定测试为止。将麻醉动物的唾液(口水)直接收集到试管中(至多约0.5mL)。收集后将样品保存在湿冰上,并保存在-70℃或低于-70℃的温度下,直到准备进行测定测试为止。

[0491] 使用RT-qPCR方法测量病毒载量,以检测在表5所示时间点收集的血清、尿液和唾液样本中的ZIKV基因组。使用设计用于检测ZIKV病毒株PRVABC59的引物和探针测试从病毒感染动物中回收的样品。已经发表了有关PCR方法的描述,包括引物和探针序列(Goebel等人,2016,A Sensitive virus yield assay for evaluation of antivirals against Zika virus.J.Virol.Methods)。使用QIAmp Viral RNA mini试剂盒(Qiagen,52906)从生物体液中分离出病毒RNA。用无菌RNA酶和不含DNA酶的H₂O洗脱病毒RNA,并保存在-70℃或低于-70℃。该测定的定量的下限(LL0Q)确定为每个反应10拷贝。

[0492] 通过在Vero细胞上通过标准噬斑测定来反滴定攻击病毒接种物的等分试样,以确认实际递送的剂量。攻击接种物的十倍系列稀释液用于感染前一天接种的6孔板中Vero细胞的汇合单层。在添加含有0.5%琼脂糖的叠加培养基之前,将板在37℃和5%CO₂下孵育1小时。将板孵育3天,直到形成可识别的噬斑,然后将其固定,用结晶紫染色并计数。

[0493] 结果:

[0494] 在研究期间,每天两次监测恒河猴的死亡率和发病率。所有动物都存活到预定的终止时间。在表5所示的时间点测量所有动物的体重和温度。在研究过程中没有明显的体重减轻。在整个研究过程中,所有动物的体温均维持在正常范围内。临床观察仅限于少数动物在攻击部位出现轻度发红。

[0495] 使用RT-qPCR方法测量病毒载量,以检测在表5所示时间点收集的血清、尿液和唾液样本中的ZIKV基因组。血清中的病毒载量见图29。

[0496] 攻击后第二天,用同种型对照治疗的组3的动物的血清中病毒载量是可检测到的。在第2天或第3天,四只动物中三只的病毒载量峰值达到 1×10^5 基因组拷贝/mL(GC/mL)以上。该组的平均血清病毒载量在第3天达到 1.15×10^5 GC/mL的峰值。到第四天,一只动物的病毒载量下降到测定的LL0Q(860GC/mL)以下,而其余三只动物的病毒载量在第五天下降到该量。

[0497] 攻击后第二天用15mg/kg FIT-1治疗的组2动物在治疗前的平均病毒载量为 3.99×10^3 GC/mL。在第2天,平均血清病毒载量降至仅为96.5GC/mL。尽管在第1天后偶尔检测到低水平的病毒RNA,但在治疗后的任何时间点,在组2动物中检测到的病毒载量都没有达到或高于RT-qPCR测定的LL0Q。

[0498] 与组3相比,用5mg/kg的FIT-1进行预处理可使第1天的平均血清病毒载量降低超过50倍。在攻击后的任何时间点,均未检测到在测定的LL0Q或以上的病毒载量,并且到第2

天,在任何组1动物的血清中均未检测到病毒RNA。

[0499] 在任何动物的尿液或唾液中仅偶尔检测到低水平的ZIKV RNA。在任何时间点,在任何动物的尿液或唾液中,均未检测到LLOQ或以上的病毒载量。

[0500] 通过在Vero细胞上通过标准噬斑测定来反滴定攻击病毒接种物的等分试样,以确认实际递送的剂量。噬菌斑测定产生的滴度为 1.7×10^5 PFU/mL。

[0501] 总结和结论:

[0502] 这项研究评估了FIT-1在用ZIKV攻击的IRM中的预防和治疗功效。在整个研究过程中没有出现死亡,并且临床观察仅限于在少数动物的攻击部位出现轻度发红。在攻击后收集的血清中通过RT-qPCR检测的病毒载量是该研究的主要终点。在用同种型对照治疗的所有动物的血清中都容易检测到病毒RNA,病毒载量在第2天或第3天达到峰值,并维持在LLOQ的860GC/mL以上的水平,直到第4天或第5天。第3天的平均峰值载量为 1.15×10^5 GC/mL。相反,在ZIKV感染的IRM中,用5mg/kg的FIT-1进行预防性治疗可有效降低病毒峰值载量和清除病毒的时间。在第1天,从该组的所有六只动物中检测到低水平的病毒RNA,但到第2天,在任何动物中均未检测到病毒RNA。在该组任何动物的血清中,在任何时间点均未检测到高于860GC/mL的LLOQ的ZIKV RNA。同样,与同型对照治疗的动物相比,攻击后第二天用15mg/kg的FIT-1进行的治疗减少了峰值病毒载量和从血清中清除病毒的时间。组2的恒河猴在第1天的平均峰值病毒载量为 3.99×10^3 GC/mL,但在第1天治疗后,该组血清在第2天的平均病毒载量降至仅为96.5GC/mL。在观察期的剩余时间内,该组中没有动物的病毒载量高于860GC/mL的LLOQ。

[0503] 序列表和SEQ ID编号

[0504]

ZKA190	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	1	GFTFSKYG
CDRH2	2	ISYEGSNK
CDRH3	3	AKSGTQYYDTTGYYEYRGLEYFGY
CDRL1	4	QSVSSSY
CDRL2	5	DAS
CDRL2 长	6	LIYDASSRA
CDRL3	7	QQYGRSRWT
VH	8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKSGTQYYDTTGYYEYRGLEYFGYWGQGT LTVVSS
VL	9	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKRGQAPR LLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GRSRWTFGQGTKVEIK

[0505]

ZKA190	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	10	ggattcaccttcagtaaatatggc
CDRH2	11	atatcatatgaggggaagtaataaa
CDRH3	12	gogaaatcggggacccaatactatgatactactggttatg agtatagggggtttggaatactttggctac
CDRL1	13	cagagtgttagtagcagttac
CDRL2	14	gatgcatcc
CDRL2 长	15	ctcatctat gatgcatcc agcagggcc
CDRL3	16	cagcagtatggtaggtcaaggtggaca
VH	17	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctct ggatt caccttcagtaaatatggc atgcactgggtccgccaggct ccaggcaaggggctggagtgggtggcagtt tatatcatatg aggggaagtaataa atattatgcagactccgtgaagggccg attcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcagtg attactgt gogaaatcggggacccaatactatgatactac tggttatgagtatagggg ttt ggaatactttggctactgg ggccaggg aaccctggtcaccgtctcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcacccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtc ca gagtgttagtagcagttact tagcctggtaccagcagaaa cgtggccaggctcccaggctcctcatctat gatgcatcca gcagggcc actggcatcccagacaggttcagtggcagtg gtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagactggag cctgaagattttgcagtgattactgt cagcagtatggta ggtcaaggtggacatt cggccaagggaaccaaggtggaaat caaac

[0506]

ZKA185	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	19	GYSFTSYW
CDRH2	20	FDPSDSQT
CDRH3	21	ARRYCSSSSCYVDN
CDRL1	22	ALPNKF
CDRL2	23	EDN
CDRL2 长	24	VIY EDN KRP
CDRL3	25	YSTDSSSNPLGV
VH	26	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG GYSFTSYW ITWVRQMPGKGLE WMAK FDPSDSQT NYSPSFQGHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYC ARRYCSSSSCYVDN WGQGTTLVTIFS
VL	27	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGD ALPNKF AYWYRQKSGQAPVLV IY EDN KRPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYHC YSTD SSNPLGV FGGGTKLTVL

[0507]

ZKA185	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	28	ggatatagttttaccagttactgg
CDRH2	29	tttgatcctagtgaactctcaaacc
CDRH3	30	gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaa t
CDRL1	31	gcattgccaaataaaattt
CDRL2	32	gaggacaac
CDRL2 长	33	gtcatctatgaggacaacaaacgaccc
CDRL3	34	tactcaacagacagcagttotaatcccctgggagta
VH	35	gaagtgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaaaagcc cggggagtctctgaggatctcctgtaagggttctggatata gttttaccagttactggatcacctgggtgcgccagatgcc gggaaaggcctggagtggatggcgaagtttgatcctagtga ctctcaaaccaactacagcccgctcttccaaggccacgtca ccatctcagttgacaagtccatcagcactgcctacttgag tgagcagcctgaaggcctcggacacgccatgtattactg tgcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggaca attggggccagggaaccctggtcaccatcttctcag
VL	36	tcctatgagctgacacagccacccctcggtgtcagtggtccc aggacaaacggccaggatcacctgctctggagatgcattgc caaataaaatttgcttattggtaccggcagaagtcaggccag gcccctgttctggtcatctatgaggacaacaaacgaccctc cgggatccctgagagattctctggctccagctcagggacaa tgccaccttgactatcagtggggcccagggtggaggatgaa gctgactaccactgttactcaacagacagcagttctaatcc cctgggagtatcggcggagggaaccaagctgacgcgtcctag

[0508]

ZKA230	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	37	GGSISSDY
CDRH2	38	IYYSGST
CDRH3	39	ARRRKYDSLWGSFAFDI
CDRL1	40	SSNIGGNY
CDRL2	41	IND
CDRL2 长	42	LIC IND HRP
CDRL3	43	ATWDDSLGGLV
VH	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSG GGSISSDY WSWIRQPPGKGLE WIGY IYYSGST NYNPSLKSRTISVDTSKNHFSKLNSVTAADTAV YYC ARRRKYDSLWGSFAFDI WGQGTMTVTVSS
VL	45	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS SNIGGNY VYVYQQLPGTAPK LLIC IND HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC ATW DDSLGGLV FGGGTKLTVL

[0509]

ZKA230	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	46	ggtggctccatcagtagtgactac
CDRH2	47	atctattacagtgggagcacc
CDRH3	48	gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagtttgc ttttgatatc
CDRL1	49	agctccaacatcggaggtaattat
CDRL2	50	attaatgat
CDRL2 长	51	ctcatctgt attaatgat caccggccc
CDRL3	52	gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta
VH	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctgggtgaagcc ttcggagaccctgtccctcacctgcgcagtcctct ggtggct ccatcagtagtgactact ggagctggatccggcagcccca gggaagggactggagtggattgggtatat ctattacagtgg gagcacc aactacaacccctccctcaagagtcgagtcacca tatcagtagacacgtccaagaaccacttctccctgaagctg aactctgtgacgctgcggaacacggccgtgtattactgt gc gaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgctt ttgat atctggggccaagggaacaatggtcaccgtctcttca g
VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccc cgggcagaggggcaccatctcttgttctggaag cagctcca acatcggaggtaattat gtatactggtaccagcagctcca ggaacggccccaaactcctcatctgt attaatgat caccg gccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctg gcacctcagcctccctggccatcagtgggctccagtcgag gatgaggctgattattactgt gcaacatgggatgacagcct gggtggccttgta ttcggcggagggaaccaagctgaccgtcc tag

[0510]

ZKA78	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	55	GFTFSNYA
CDRH2	56	IGRNGDSI
CDRH3	57	VKDLAIPESYRIEADY
CDRL1	58	QSVLYRSNNKNY
CDRL2	59	WAS
CDRL2 长	60	LIYWASTRE
CDRL3	61	QQYYSSPRT
VH	62	EVQLAESGGGLVQPGGSLTLSCSGSG GFTFSNYA AMVWARQAPGKGLE YVSGIGRNGDSIYYTDSVKGRFTISRDNKSMVYLQMSSLRTEDTA VYYCVKDLAIPESYRIEADYWGQGLVIVSA
VL	63	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYRSNNKNY LSWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPLQAEDVAVY YC QQYYSSPRT FGQGTKVEIK

[0511]

ZKA78	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	64	ggcttcacttttagtaactatgca
CDRH2	65	atcgggcgcaacggggactctatc
CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat
CDRL1	67	cagtcctgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac
CDRL2	68	tgggcttca
CDRL2 长	69	ctgatctatt tgggcttca acccgggaa
CDRL3	70	cagcagtactattctagtcctogaact
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcagggcggggactgggtccagc ctggcggcagcctgacactgtcttgagtgatcag gctt cacttttagtaactatgca atgggtgtgggcaaggcaggct cctgggaagggactggagtatgtctctggc atcgggcgca acggggactctatct actatactgatagtgtgaaggccg gttcaccatcagcagagacaatagcaaattccatgggtgtac ctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtg actattgc gtgaaagatctggccatccccgagtcctacag aattgaagctgattatt ggggacagggcaccctggtcac gtgagcgccg
VL	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtc gtctgggggagagggccactattaactgcaagagctcc ca gtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac ctgtct tggtatcagcagaagcccgacagccccctaaactgctga tctatt tgggcttca acccgggaaagcggcgtcccagacag attctcaggcagcgggtccggaacagacttcaccctgaca attagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactatt gt cagcagtactattctagtcctogaact ttcggccaggg gaccaaggtggaaatcaaac

[0512]

ZKA64	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	73	GYTFTGYH
CDRH2	74	INPNSGGT
CDRH3	75	AKMSSSIWGFDH
CDRL1	76	QSVLIN
CDRL2	77	GAS
CDRL2 长	78	LIY GASSRA
CDRL3	79	QQYNDWPPIT
VH	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYH IDWVRQARGGGLE WMGR INPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMQLSRLRSDDSA VYYC ARMSSSIWGFDH WGQGLVTVSS
VL	81	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVLIN LAWYQQKPGQAPRL LIY GASSR ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYN DWPPIT FGQGRLEIK

[0513]

ZKA64	SEQ ID NO.	核酸序列
CDRH1	82	ggctacaccttcacagggatcac
CDRH2	83	attaaccctaattctggcgggacc
CDRH3	84	gctcggatgagctcctctatTTGGGGcttcgatcat
CDRL1	85	cagtctgtgctgattaac
CDRL2	86	ggagcatcc
CDRL2 长	87	ctgatctat ggagcatc ctccagggct
CDRL3	88	cagcagtacaatgattggccccctatcaca
VH	89	cagggtgcagctgggtccagagcggagcagaggtgaagaaacc cggcgccctcagtgaaggctcagctgcaaagcttcc ggctaca ccttcacagggatcac atcgactgggtgaggcaggcaaga ggacagggactggaatggatgggacgg attaaccctaattc tggcgggacca actacgcccagaagtttcagggccgagtga ctatgaccagagacaccagcatctccacagcttatatgcag ctgtcccggctgagatctgacgatagtgccgtctactattg tgctcggatgagctcctctatTTGGGGcttcgatcattggg ggcaggg aacactgggtgactgtcagttcag
VL	90	gagatcgtgatgactcagctccagccaccctgtcagtcag cccaggagaacgggcaaccctgtcttgagagcctcc agtc ctgtgctgattaac ctggcttggtaccagcagaagccaggc caggcaccgccgactgctgatctat ggagcatc ctccagggc taccggcattcctgcacgcttcagtgatcaggaagcggaa cagagtttaccctgacaatctctagtctgcagtcogaagac ttcgtgtctactattgt oagcag tacaatgatt ggcccc tatcaca tttggccaggggactagactggagatcaagc

[0514]

恒定区	SEQ ID NO.	序列
IgG1 CH1-CH2-CH3 aa	91	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA aa	92	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG CK aa	93	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgG CL aa	94	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
IgG1 CH1-CH2-CH3 核酸	95	gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaacctgtgacggctctcgaggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcggtctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatctgtgacaaaactcacatgccccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggacccctgagggtcatgctggtgggtggacgtgagccacgaAgaCctgagggtcaagttcaactgtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggcagcgtcctaccgtcctgcaccaggact

[0515]

		ggctgaatggcaaggagta caagtgaaggctccaacaaagccctccagc ccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccac aggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcag cctgacctgacctgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtgga ctccgacggctccttctctctatagcaagctaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
IgG1 CH1-CH2- CH3 LALA 核酸	96	gcgtcgaccaaggcccatcggtcttccccctggcacccctctccaagagcac ctctgggggacagcggccctgggctgctgtgtaaggactacttcccgaac ctgtgacggctctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcc cggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtagcctgtc cctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc agcaacaccaagggtggacaagagagttgagccaaatctgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgcccagcacctgaaGCCGCGggggggaccgtcagtc ttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctccggacccctgag gtcacatgctgtgtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaac tggtagctggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgaggagg agcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgtagcgtctcaccgtcctgcaccag gactggctgaatggcaaggagta caagtgaaggctccaacaaagccctccc agcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggcagccccgagaac cacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggt cagcctgacctgctgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgt ggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca ccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
IgG CK 核酸	97	cgTAcGgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttga aatctggaactgcctctgtgtgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggcc aaagtacagtggaaagggtgataacgcctccaatcgggtaactccaggagag tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacct gacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtc acctatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagt gt
IgG CL 核酸	98	ggtcagccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctctctgaggag cttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgaacttaccggga gccgtgacagtggcttgaaagcagatagcagccccgtcaaggcgggagtg agaccaccacacctccaaacaaagcaacaagaatcgcgccagcagc tatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctcca ggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtggtggccctacagaatgtt ca

[0516]

ZKA3	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	99	GFIFSNYA
CDRH2	100	IGGKGDSI
CDRH3	101	VKDLAVLESDRLEVDQ
VH	102	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCSGSG GFIFSNYAMVWARQAP GKGLEYYVSG IGGKGDSI YHIDSVKGRFTISRDN SKRTVYLQ MSRLRTEDTAVYYC VKDLAVLESDRLEVDQ WGQGTLVIVSA
ZKA4	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	103	GFTFSSYV
CDRH2	104	TSYDGSNK
CDRH3	105	ARGPVPYWSGESYSGAYFDF
VH	106	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYVMHWVRQAP GKGLEWVTV TSYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRGEDTAIYYC ARGPVPYWSGESYSGAYFDF WGQGILV TVSS
ZKA5	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	107	GFTFSNYY
CDRH2	108	MSSSETIK
CDRH3	109	ARSGIETVAGSIDYYGMDV
VH	110	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAGS GFTFSNYYMTWIRQAP GKGLELVSY MSSSETIK YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRADDTARYYCA ARSGIETVAGSIDYYGMDV WGHGTPVT VSS
ZKA6	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	111	DFTVSNYA
CDRH2	112	VSYDGSNK
CDRH3	113	ATGVTMFQGAQTNAEYLHY
VH	114	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCEAS DFTVSNYAMHWVRQAP GKGLEWVAV VSYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTALYYCA ATGVTMFQGAQTNAEYLHY WGQGSIVT ISS
ZKA7	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	115	GFTFSRYG
CDRH2	116	VSGDGSST
CDRH3	117	VKDFWSGDQSLESDF

[0517]

VH	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS GFTFSRY GMVWARQAP GKGLEYLSG VSGDGSST YYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLH MSRLRDEDTAMYYC VKDFWSGDQSLESD FWGQALVTVSS
ZKA8	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	119	GFTFSAHA
CDRH2	120	ISRNEDYT
CDRH3	121	VKDFGTSPQTF
VH	122	DERLVESGGGLVQPGGSLRLVCSAS GFTFSAH AMHWVRQPP GKGLEYVST ISRNEDY TYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQ MRRLRPEDTAIYYC VKDFGTSPQTF FWGQGLTVAVSS
ZKA76	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	123	GFTFSTYF
CDRH2	124	ISSTGSYK
CDRH3	125	ARPFHSEYTYGLDAFDI
VH	126	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSTYF MHWVRQAP GKGLEWVAS ISSTGSYK FYADSVKGRFTISRDN TKNSLFLO MNSLRAEDTAVFYC ARPFHSEYTYGLDAFDI WGQGTMLTVS S
ZKA117	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	127	GGSI RRTNSY
CDRH2	128	ISYSGST
CDRH3	129	ARLNDGSTVTTSSYFDY
VH	130	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV GGSI RRTNSY WGWIRQ TTGKGLQWIG SIYSGST FYNPSLKS RVTISLDTSKDHFSL ELSSVTAADTAIYYC ARLNDGSTVTTSSYFDY WGQGTMLTV SS
ZKB27	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	131	GYSFTSSW
CDRH2	132	IDPSDSYT
CDRH3	133	ARHDYSVSENGMDV
VH	134	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS GYSFTSSW INWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSYT TYNPSFQGHVTISVDK SIGTAYLQ WNSLRASDTAMYYC ARHDYSVSENGMDV WGQGTITVTVSS

[0518]

ZKB29	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	135	GFTFSSYT
CDRH2	136	ISYDGSBK
CDRH3	137	ARRSYSISCFDY
VH	138	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAAS GFTFSSYTMHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSBK FYADSVKGRFTISRDNKDTLYLQ MNSLRAEDTALYYC ARRSYSISCFDY WGQGTLLVTVSS
ZKB34	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	139	GFTFSRSG
CDRH2	140	VSYDGSNK
CDRH3	141	AKDLTMVRGVHYIIIVMDV
VH	142	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAAS GFTFSRSGMHWVRQAP GKGLEWVAV VSYDGSNK YYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRVEDTAVYYC AKDLTMVRGVHYIIIVMDV WGQGTITV VSS
ZKB39	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	143	GYTFDDYY
CDRH2	144	INPHRGGT
CDRH3	145	VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGM DV
VH	146	QVQLVQSGAEVKKPGASLVKSCKAS GYTFDDYY IHWVRQAP GQGLEWLGR INPHRGGT NYAQKFQGRVIMTLDMSISTTYME LRRITSDDAVYYC VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGM DV WGQG TTVTVSS
ZKB46	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	147	GYSFTSYW
CDRH2	148	IDPSDSYT
CDRH3	149	ARREYSSSSGQEDWFDP
VH	150	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKG GYSFTSYW ISWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYC ARREYSSSSGQEDWFDP WGQGTLLTVS S
ZKB53	SEQ ID NO.	氨基酸序列

[0519]

CDRH1	151	GFTFSSYA
CDRH2	152	ISYDGSNR
CDRH3	153	ARHVEQLPSSGYFQH
VH	154	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSY AMHWVRQTP GKGLEWVTV ISYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRSED TAVYYC ARHVEQLPSSGYFQH WGQGT LVTVSS
ZKC26	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	155	GFIFSDFY
CDRH2	156	IGHDGSYI
CDRH3	157	ARAHGGFRH
VH	158	QVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFIFSDFY MSWMRQAP GKGLEWVAY IGHDGSYI LYADSVKGRFTISRDN AKNSLFLR MNSLRVED TAVYYC ARAHGGFRH WGQGT VVAVSP
ZKD5	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	159	GFTFTSYG
CDRH2	160	ISYDGSNK
CDRH3	161	ARDRDHYDLWNAYTFDY
VH	162	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFTSYG MHWVRQTP GKGLDWVAV ISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQ MNSLRAAD TALYYC ARDRDHYDLWNAYTFDY WGQGT LVTVS S
ZKD7	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	163	GFTFSNYA
CDRH2	164	ISYDVSDK
CDRH3	165	AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH
VH	166	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSNYA MHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDVSDK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQ MNSLRAED TAAYYC AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH WGQGT LV TVSS
ZKD8	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	167	GFTFINYA

[0520]

CDRH2	168	ISYDGSNK
CDRH3	169	ATDADAYGDSGANFHY
VH	170	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAAS GFTFINYA IHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSNK FYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRADDTAVYYC ATDADAYGDSGANFHY WGQGLTVTVSS
ZKD15	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	171	DASISSGGFS
CDRH2	172	IYSSGDT
CDRH3	173	ARAHTPTSKFYYYYAMDV
VH	174	QLQLQESGSLVKPSQTLSTCTVSD DASISSGGFS WSWIRO PLGKLEWLGY IYSSGDT FYNPSLQGRVTMSVDIFRSQFSL KLTSVTAADTAMYYC ARAHTPTSKFYYYYAMDV WGQGT TVT VSS
ZKD16	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	175	GFTFSDHF
CDRH2	176	SRNKPNSYTT
CDRH3	177	AKVGGCYGGDCHVENDY
VH	178	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVAS GFTFSDHF MDWVRQAP GKGLEWVGR SRNKPNSYTT TEYAASVKGRFSISRDDSKKALY LQMNSLQTEDTAVYYC AKVGGCYGGDCHVENDY WGQGLTVT VSS
ZKD17	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	179	GFIFSDYA
CDRH2	180	ISYDGSSR
CDRH3	181	ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP
VH	182	QVQMVESGGGVVQPGTSLRLSCATSG GFIFSDY AMHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSSR LYADSVKGRFTVSRDN SKNTLYLQ MHS LRAGDTAVYYC ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP WGQGLT LA TISS
ZKD20	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	183	GFTFSDHF
CDRH2	184	SRNKPNSYTT

[0521]

CDRH3	185	ARVGGCNGGDCHVENDY
VH	186	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GFTFSDHFMDWVRQAP GKGLEWVGR SRNKPNSYTT EYAASVKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLQTEDTAVYYC CARVGGCNGGDCHVENDY WGQGTlVT VSS
ZKA134	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	187	GGTFSAYA
CDRH2	188	IIPFFGTA
CDRH3	189	ARSDIVSTTRGYHHYGMDV
VH	190	QVHLVQSGAEVKKPGSSVNVSCKAS GGTFSAYA ISWVRQAP GQGLEWMGG IIPFFGTAYYA QKFGRVTVTADKSTSTVYME MTSLRSED TAVYYC CARSDIVSTTRGYHHYGMDV WGQGTlVT VSS
ZKA246	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	191	GYTFSDYY
CDRH2	192	INPYSGGT
CDRH3	193	ARGFTMISDREFDP
VH	194	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS GYTFSDYYMH WVRQAP GQGLEWMGR INPYSGGTNYA QKFHGRVTVTRDTSISTVYME LRGLRSDDTAVYYC CARGFTMISDREFDP WGQGTlVT VSS
ZKA256	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	195	GFTFSTYW
CDRH2	196	IKQDGSEK
CDRH3	197	ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI
VH	198	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYWM TWVRQAP GKGLEWVAN IKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDN TKNSLYLQ VNSLRAEDTAIYY CARDPGYDDFWSGSYSGSFDI WGQGTlMV TVSS
ZKB42	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	199	GFTFNNG
CDRH2	200	ISYDGNKK
CDRH3	201	VKYGERINGYSDFPDH

[0522]

VH	202	QVQVVESGGGVVQPGRSRLRFCAAS GYTFNNY GMHWVRQAP GKGLEWVALI SYDGNKK YYADSVKGRFSISRDN SKNTLYLQ MNRLRSGDTAVYHC VKYGERINGYSDPFDE WQGGLTVTVSS
ZKB85	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	203	GYTFTTYA
CDRH2	204	INTNTGNP
CDRH3	205	ARVIVPYAFDI
VH	206	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTFTTYAMN WVRQAP GQGPEWVGW INTNTGNPT YAQGFTGRFVLSLDTSVSTAFLO ISLKAEDTAVYY CARVIVPYAFDI WGQGTMTVTVSS
ZKB47	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	207	GYTFNYY
CDRH2	208	INPSGGPT
CDRH3	209	ARDQYGGYARYGMDV
VH	210	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC QASGYTFNYYMH WVRQAP GQGLEWMGI INPSGGPT SYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYY CARDQYGGYARYGMDV WGQGTMTVTVSS
ZKC6	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	211	GYFTGY
CDRH2	212	INPNSGGT
CDRH3	213	ARVSDWGFADI
VH	214	QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSC KASGYFTGYMH WVRQAP GQGLEWMGR INPNSGGT NYAQKFQGRVTMTTRDTISISTAYME LSGLRSDDTAVYY CARVSDWGFADI WGQGTMTVTVSQ
ZKA160	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	215	GGSITSYS
CDRH2	216	IFYSGST
CDRH3	217	ARDQTMPVWVGMDV
VH	218	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGSITSYS SWSWIRQPP GKGLEWIGY IFYSGST DYNPSLKSRVTISVDTSKDQFSLRL RSVTAADTAVYY CARDQTMPVWVGMDV WGQGTMTVTVSS
ZKA172	SEQ ID NO.	氨基酸序列

[0523]

CDRH1	219	GYIFTRYW
CDRH2	220	IDPSDSYT
CDRH3	221	ARQETAREDGMV
VH	222	EVQLVQSGAEVKKPGKSLRISCKGSGYIFTRYWISWVRQMP GKGLEWMGRIDPSDSYTNYSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARQETAREDGMVWGQGTITVTVSS
ZKA174	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	223	GGSMSNSYYH
CDRH2	224	IYYSGST
CDRH3	225	ARNPVFNPLTLTHDAFDI
VH	226	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSMSNSYYHWGWRQ PPGKLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLNSVTAADTAVYYCARNPVFNPLTLTHDAFDIWGQGTMTV VSS
ZKA189	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	227	GFTFSSYA
CDRH2	228	ISGSGDNT
CDRH3	229	AKWPYYDFWGSSESYPDP
VH	230	GVQLLESAGALVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYALTWVRQAP GKGLQWVSAISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRADTAVYYCAKWPYYDFWGSSESYPDPWGQGTITVTV SS
ZKA195	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	231	GYNFPSYW
CDRH2	232	IDPSDSYT
CDRH3	233	ARADCRSTSCYLVFE
VH	234	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKDSGYNFPSYWIHWVRQMP GKGLEWMGTIDPSDSYTNYSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARADCRSTSCYLVFEGQGTITVTVSS
ZKA215	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	235	GYTFTSYW

[0524]

CDRH2	236	IDPSDSHT
CDRH3	237	ARHALPNYFDS
VH	238	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY TFTSYW ISWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSHT DYSPSFQGHVTISADKSISAAYLQ WSSLKASDTAMYY CARHALPNYFDS WGQGTTLTVSS
ZKA218	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	239	GFPFSSYW
CDRH2	240	INSDGRNT
CDRH3	241	ARGGYDYDSSGCFDY
VH	242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFPFSSYWMH WVRQAP GKGLVWVSR INSDGRNT NYADSVKGRFTISRDN AENTVY LQ MNSLRAEDTAVYY CARGGYDYDSSGCFDY WGQGTTLTVSS
ZKB75	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	243	GFTFSNYA
CDRH2	244	ISGTGGST
CDRH3	245	AKDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY
VH	246	EVQVLESGGGLLQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYAM SWVRQAP GKGLEWVST ISGTGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQ MNSLRAEDTAVYY CAKDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY WG QGTTLTVSS
ZKB83	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	247	GYSFTNYW
CDRH2	248	IDPSDSYT
CDRH3	249	ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP
VH	250	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY SFTNYW ITWVRQMP GKGLEWMGS IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADWS INTAY LQ WSSLKASDTAKYY CARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP WGQGTTLTVSS
ZKC3	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	251	GGSITSYY
CDRH2	252	IYYSGST

[0525]

CDRH3	253	ARVGGAPYYYYGMDV
VH	254	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSYYWSWIRQPP GKGLEWIGY IYYSGST NYNPSLKSRTTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYC ARVGGAPYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
ZKC18	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	255	GFTFGDYA
CDRH2	256	IRSKAYGGTT
CDRH3	257	SRDHTGTTYAFDI
VH	258	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTAS GFTFGDYA MSWFRQAP GKGLEWVG FIRSKAYGGTT EYAASVKGRFTISRDDSKSIAY LQMNSLKTEDTAVYYC SRDHTGTTYAFDI WGQGTMTVTSQ
ZKD1	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	259	GFTFSSYG
CDRH2	260	IWYDGSNK
CDRH3	261	ARDRRGYGDYVGYYYYGMDV
VH	262	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYG MHWVRQAP GKGLEWVAV IWYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC ARDRRGYGDYVGYYYYGMDV WGQGTTVT VSS

[0526]

名称	SEQ ID NO.	氨基酸序列
ZIKV EDIII 通用	263	TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCCKXPXQMAV DXQTLTPVGRILITANPVITEXTENSKMMLELDPPFGDSYIVI GXGXKKITHHWHRS
ZIKV H/PF/2013 EDIII	264	TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCCKVPAQMAVD MQTLTPVGRILITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIG VGEKKITHHWHRS
ZIKV EDIII 通用	265	X ₁ GX ₂ X ₃ YSLCTAAFTFTKX ₄ PAEX ₅ X ₆ HGTVTVEX ₇ QYX ₈ GX ₉ D GPCCKX ₁₀ PX ₁₁ QMAVDX ₁₂ QTLTPVGRILITANPVITEX ₁₃ TX ₁₄ N SKMMLELDPPFGDSYIVIGX ₁₅ GX ₁₆ X ₁₇ KITHHWHRS 其中 X1可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选K、A或E; X2可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V、F、或L;

[0527]

		X3可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选S或F; X4可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选I或V; X5可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选T或V; X6可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选L或D; X7可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或G; X8可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选A或G; X9可以是除R以外的任何(天然存在的)氨基酸, 优选T或A; X10可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或I; X11可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选A或V; X12可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选M或T; X13可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选S或G; X14可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选E或K; X15可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或I; X16可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选E、A、K、或D; 和 X17可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选E、A、 或K, 更优选K或A
Zika-E-F1 引物	266	TGCAAACGCGGTCGCAAACCTGGTTG
ZIKV-E-R1 引物	267	CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG
ZIKV-Ef1530 引物	268	AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA
ZIKV-E- R2769 引物	269	TTACAGATCCCACAACGACCGTCAG
ZIKV-E-F2	270	ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC
ZIKV-E-R2	271	TCGGTTCAACAATCAAGTCCTAGGCT
ZIKV-E-f2058	272	GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA
ZIKV-E-r2248	273	AAGACTGCCATTCTCTTGGCACCTC

[0528] *以粗体突出显示的序列是CDR区(核苷酸或aa),带下划线的残基是与“生殖系”序列相比突变的残基。

序列表

<110> 胡默波斯生物医学公司
<120> 特异性结合至寨卡病毒表位的多特异性抗体及其用途
<130> HB01P034W01
<160> 273
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> ZKA190 CDRH1
<400> 1

[0001] Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Gly
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> ZKA190 CDRH2
<400> 2

Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> ZKA190 CDRH3

<400> 3

Ala Lys Ser Gly Thr Gln Tyr Tyr Asp Thr Thr Gly Tyr Glu Tyr Arg
1 5 10 15

Gly Leu Glu Tyr Phe Gly Tyr
20

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA190 CDRL1

<400> 4

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

[0002]

<210> 5

<400> 5

000

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA190 CDRL2 long

<400> 6

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA190 CDRL3

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Arg Trp Thr
1 5

<210> 8

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA190 VH

<400> 8

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

[0003]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Gly Thr Gln Tyr Tyr Asp Thr Thr Gly Tyr Glu Tyr Arg
100 105 110

Gly Leu Glu Tyr Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115

120

125

Ser Ser
130

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA190 VL

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

[0004]

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Arg
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 24
<212> DNA

- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> ZKA190 CDRH1
- <400> 10
ggattcacct tcagtaaata tggc
24
- <210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> ZKA190 CDRH2
- <400> 11
atatcatatg agggaagtaa taaa
24
- [0005] <210> 12
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> ZKA190 CDRH3
- <400> 12
gcgaaatcgg ggaccaata ctatgatact actggttatg agtatagggg tttggaatac
60
tttggctac
69
- <210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
<223> ZKA190 CDRL1
- <400> 13

cagagtgtta gtagcagtta c
21

<210> 14

<400> 14
000

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA190 CDRL2 long

<400> 15
ctcatctatg atgcatccag cagggcc
27

[0006] <210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA190 CDRL3

<400> 16
cagcagtatg gtaggtcaag gtggaca
27

<210> 17
<211> 391
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA190 VH

<400> 17
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aaatatggca tgcactgggt ccgccaggct

120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg agggaagtaa taaatattat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcagtgt attactgtgc gaaatcgggg
300

acccaatact atgatactac tggttatgag tataggggtt tggaatactt tggctactgg
360

ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca g
391

<210> 18

<211> 325

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0007] <220>

<223> ZKA190 VL

<400> 18

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcagttact tagcctggta ccagcagaaa
120

cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta ggtcaagggtg gacattcggc
300

caagggacca aggtggaaat caaac
325

<210> 19

<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRH1

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRH2

<400> 20

[0008] Phe Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRH3

<400> 21

Ala Arg Arg Tyr Cys Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Val Asp Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRL1

<400> 22

Ala Leu Pro Asn Lys Phe
1 5

<210> 23

<400> 23
000

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 CDRL2 long

<400> 24

Val Ile Tyr Glu Asp Asn Lys Arg Pro
1 5

[0009]

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 CDRL3

<400> 25

Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Ser Asn Pro Leu Gly Val
1 5 10

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 VH

<400> 26

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Ala Lys Phe Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0010]

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Ile Phe Ser
115 120

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 VL

<400> 27

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Asn Lys Phe Ala

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

[0011] <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA185 CDRH1
 <400> 28
 ggatatagtt ttaccagtta ctgg
 24

<210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA185 CDRH2
 <400> 29
 tttgatccta gtgactctca aacc
 24

<210> 30
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRH3

<400> 30
gcgagaagat attgtagtag tagtagttgt tatgtggaca at
42

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRL1

[0012] <400> 31
gcattgccaa ataaattt
18

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA185 CDRL2 long

<400> 33
gtcatctatg aggacaacaa acgaccc
27

<210> 34
<211> 36
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 CDRL3

<400> 34

tactcaacag acagcagttc taatcccctg ggagta
36

<210> 35

<211> 364

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 VH

<400> 35

gaagtgcagc tggatgcagtc cggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaggatc
60

tcctgtaagg gttctggata tagttttacc agttactgga tcacctgggt gcgccagatg
120

[0013]

cccgggaaag gcctggagtg gatggcgaag tttgataccta gtgactctca aaccaactac
180

agccccgtcct tccaaggcca cgtcaccatc tcagttgaca agtccatcag cactgcctac
240

ttgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagaagatat
300

tgtagtagta gtagttgtta tgtggacaat tggggccagg gaaccctggt caccatcttc
360

tcag
364

<210> 36

<211> 328

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA185 VL

<400> 36
 tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc
 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaataaa ttgcttatt ggtaccggca gaagtcaggc
 120
 caggcccctg ttctgggtcat ctatgaggac aacaaacgac cctccgggat ccctgagaga
 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag
 240
 gatgaagctg actaccactg ttactcaaca gacagcagtt ctaatcccct gggagtattc
 300
 ggcgaggaggga ccaagctgac cgtcctag
 328

[0014] <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA230 CDRH1

<400> 37
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA230 CDRH2

<400> 38
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRH3

<400> 39

Ala Arg Arg Arg Lys Tyr Asp Ser Leu Trp Gly Ser Phe Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0015]

<220>
<223> ZKA230 CDRL1

<400> 40

Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Tyr
1 5

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRL2 long

<400> 42

Leu Ile Cys Ile Asn Asp His Arg Pro
1 5

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRL3

<400> 43

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Gly Gly Leu Val
1 5 10

<210> 44
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0016]

<220>
<223> ZKA230 VH

<400> 44

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Arg Lys Tyr Asp Ser Leu Trp Gly Ser Phe Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA230 VL

<400> 45

[0017] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
20 25 30

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

Ile Cys Ile Asn Asp His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Gly Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRH1

<400> 46
ggtggctcca tcagtagtga ctac
24

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRH2

[0018] <400> 47
atctattaca gtgggagcac c
21

<210> 48
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRH3

<400> 48
gcgaggagga ggaagtatga ttccctttgg gggagttttg cttttgatat c
51

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRL1

<400> 49
agctccaaca tcggaggtaa ttat
24

<210> 50

<400> 50
000

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRL2 long

<400> 51
ctcatctgta ttaatgatca ccggccc
27

[0019] <210> 52
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 CDRL3

<400> 52
gcaacatggg atgacagcct ggggtggcctt gta
33

<210> 53
<211> 370
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA230 VH

<400> 53
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaggc ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

acctgcgcag tctctgggtg ctccatcagt agtgactact ggagctggat ccggcagccc
120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac
180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg
240

aagctgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gaggaggaag
300

tatgattccc ttggggggag ttttgctttt gatctctggg gccaaaggac aatggtcacc
360

gtctcttcag
370

<210> 54

<211> 331

<212> DNA

[0020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA230 VL

<400> 54

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc
60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggtaattatg tatactggta ccagcagctc
120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctgt attaatgata accggccctc aggggtccct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag
240

tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctggg tggccttgta
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g
331

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 CDRH1

<400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 CDRH2

<400> 56

[0021] Ile Gly Arg Asn Gly Asp Ser Ile
1 5

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 CDRH3

<400> 57

Val Lys Asp Leu Ala Ile Pro Glu Ser Tyr Arg Ile Glu Ala Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRL1

<400> 58

Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 59

<400> 59
000

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRL2 long

<400> 60

[0022] Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRL3

<400> 61

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 62

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 VH

<400> 62

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Gly Arg Asn Gly Asp Ser Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

[0023] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Asp Leu Ala Ile Pro Glu Ser Tyr Arg Ile Glu Ala Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ala
115 120

<210> 63

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 VL

<400> 63

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

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

[0024]

Lys

<210> 64
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA78 CDRH1

<400> 64
 ggcttcactt ttagtaacta tgca
 24

<210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRH2

<400> 65

atcgggcgca acggggactc tatc
24

<210> 66

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRH3

<400> 66

gtgaaagatc tggccatccc cgagtcctac agaattgaag ctgattat
48

<210> 67

<211> 36

<212> DNA

[0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRL1

<400> 67

cagtccgtgc tgtaccgctc taacaacaag aattac
36

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA78 CDRL2 long

<400> 69

ctgatctatt gggcttcaac ccgggaa

27

<210> 70
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 CDRL3

<400> 70
cagcagtact attctagtcc tcgaact
27

<210> 71
<211> 370
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 VH

[0026]

<400> 71
gaggtgcagc tggcagaatc aggcggggga ctggtccagc ctggcggcag cctgacactg
60
tcttgcagtg gatcaggctt cacttttagt aactatgcaa tgggtgtgggc aaggcaggct
120
cctgggaagg gactggagta tgtctctggc atcgggcgca acggggactc tatctactat
180
actgatagtg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca atagcaaatc catggtgtac
240
ctgcagatga gctccctgcg aaccgaagac acagcagtgt actattgcgt gaaagatctg
300
gccatccccg agtcctacag aattgaagct gattattggg gacagggcac cctggtcac
360
gtgagcgccg
370

<210> 72

<211> 340
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA78 VL

<400> 72
gacatcgtga tgacacagtc tccagatagt ctggcagtca gtctggggga gagggccact
60

attaactgca agagctccca gtccgtgctg taccgctcta acaacaagaa ttacctgtct
120

tggtatcagc agaagcccgg acagccccct aaactgctga tctattgggc ttcaaccggg
180

gaaagcggcg tcccagacag attctcaggc agcgggtccg gaacagactt caccctgaca
240

attagcccc tgcaggcaga ggacgtggct gtctactatt gtcagcagta ctattctagt
300

[0027] cctcgaaactt tcggccaggg gaccaagggtg gaaatcaaac
340

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA64 CDRH1

<400> 73

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr His
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA64 CDRH2

<400> 74

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRH3

<400> 75

Ala Arg Met Ser Ser Ser Ile Trp Gly Phe Asp His
1 5 10

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

[0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL1

<400> 76

Gln Ser Val Leu Ile Asn
1 5

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL2 long

<400> 78

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL3

<400> 79

Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

[0029] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 VH

<400> 80

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

His Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Met Ser Ser Ser Ile Trp Gly Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 VL

<400> 81

[0030]

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu Ile Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 82
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA64 CDRH1

<400> 82
 ggctacacct tcacagggtac tcac
 24

<210> 83
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0031] <220>
 <223> ZKA64 CDRH2

<400> 83
 attaaccccta attctggcgg gacc
 24

<210> 84
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA64 CDRH3

<400> 84
 gctcggatga gctcctctat ttggggcttc gatcat
 36

<210> 85
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL1

<400> 85

cagtctgtgc tgattaac

18

<210> 86

<400> 86

000

<210> 87

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL2 long

<400> 87

ctgatctatg gagcatcctc cagggt

27

[0032]

<210> 88

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 CDRL3

<400> 88

cagcagtaca atgattggcc ccctatcaca

30

<210> 89

<211> 358

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA64 VH

<400> 89

caggtgcagc tgggtccagag cggagcagag gtgaagaaac ccggcgcctc agtgaaggtc
60

agctgcaaag ctccggcta caccttcaca gggatcacaca tcgactgggt gaggcaggca
120

agaggacagg gactggaatg gatgggacgg attaacccta attctggcgg gaccaactac
180

gcccagaagt ttcagggccg agtgactatg accagagaca ccagcatctc cacagcttat
240

atgcagctgt cccggctgag atctgacgat agtgccgtct actattgtgc tcggatgagc
300

tcctctatctt ggggcttcga tcattggggg caggaacac tggtgactgt cagttcag
358

<210> 90

<211> 325

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0033]

<220>

<223> ZKA64 VL

<400> 90

gagatcgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtcagtc gcccaggaga acgggcaacc
60

ctgtcttgca gagcctccca gtctgtgctg attaacctgg cttggtacca gcagaagcca
120

ggccaggcac cccgactgct gatctatgga gcacccctca gggctaccgg cattcctgca
180

cgcttcagtg gatcaggaag cggaacagag tttaccctga caatctctag tctgcagtc
240

gaagacttcg ctgtctacta ttgtcagcag tacaatgatt ggccccctat cacatttggc
300

caggggacta gactggagat caagc
325

<210> 91

<211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> IgG1 CH1-CH2-CH3 aa

<400> 91

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

[0034]

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

[0035]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 92
<211> 330
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA aa

<400> 92

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

[0036] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

	165	170	175
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190		
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205		
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220		
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225 230 235 240		
	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
[0037]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325 330		
	<210> 93		
	<211> 107		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

<220>

<223> IgG CK aa

<400> 93

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

[0038]

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 94

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgG CL aa

<400> 94

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

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

[0039]

<210> 95
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> IgG1 CH1-CH2-CH3核酸

<400> 95
 gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaacctgt gacgggtctcg
 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca
 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc
 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga

360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct
420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg
480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag
600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
660

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag
720

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
780

[0040] gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
840

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg
900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
960

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa
990

<210> 96

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA核酸

<400> 96

gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg
60

[0041]

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaacctgt gacgggtctcg
120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca
180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc
300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgcgggggga
360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct
420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg
480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag
600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc
660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag
720

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
840

ctggactccg acggctcctt cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg
900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
960

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa
990

<210> 97
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgG CK核酸

<400> 97
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct
60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
120

tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag
240

aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag
300

[0042]

agcttcaaca ggggagagtg t
321

<210> 98
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgG CL核酸

<400> 98
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa
60

gccaacaagg ccacactggg gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg
120

gcttggaag cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa
180

caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag

240

tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg
300

gcccctacag aatgttca
318

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA3 CDRH1

<400> 99

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

[0043]

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA3 CDRH2

<400> 100

Ile Gly Gly Lys Gly Asp Ser Ile
1 5

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA3 CDRH3

<400> 101

Val Lys Asp Leu Ala Val Leu Glu Ser Asp Arg Leu Glu Val Asp Gln

1	5	10	15
<210> 102			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> ZKA3 VH			
<400> 102			
Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Ala Met Val Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val			
	35	40	45
[0044]			
Ser Gly Ile Gly Gly Lys Gly Asp Ser Ile Tyr His Ile Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Val Lys Asp Leu Ala Val Leu Glu Ser Asp Arg Leu Glu Val Asp Gln			
	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ala			
115	120		
<210> 103			
<211> 8			
<212> PRT			

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA4 CDRH1

<400> 103

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA4 CDRH2

<400> 104

Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

[0045]

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA4 CDRH3

<400> 105

Ala Arg Gly Pro Val Pro Tyr Trp Ser Gly Glu Ser Tyr Ser Gly Ala
1 5 10 15

Tyr Phe Asp Phe
20

<210> 106

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA4 VH

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Thr Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0046]

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

Ala Arg Gly Pro Val Pro Tyr Trp Ser Gly Glu Ser Tyr Ser Gly Ala
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA5 CDRH1

<400> 107

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA5 CDRH2

<400> 108

Met Ser Ser Ser Glu Thr Ile Lys
 1 5

<210> 109
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0047] <220>
 <223> ZKA5 CDRH3

<400> 109

Ala Arg Ser Gly Ile Glu Thr Val Ala Gly Ser Ile Asp Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 110
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA5 VH

<400> 110

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

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

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

Ser Tyr Met Ser Ser Ser Glu Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Ile Glu Thr Val Ala Gly Ser Ile Asp Tyr Tyr Gly
100 105 110

[0048]

Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA6 CDRH1

<400> 111

Asp Phe Thr Val Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA6 CDRH2

<400> 112

Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 113

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA6 CDRH3

<400> 113

Ala Thr Gly Val Thr Met Phe Gln Gly Ala Gln Thr Asn Ala Glu Tyr
1 5 10 15

[0049] Leu His Tyr

<210> 114

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA6 VH

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Asp Phe Thr Val Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Val Thr Met Phe Gln Gly Ala Gln Thr Asn Ala Glu Tyr
100 105 110

Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120 125

[0050] <210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA7 CDRH1

<400> 115

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA7 CDRH2

<400> 116

Val Ser Gly Asp Gly Ser Ser Thr
1 5

<210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA7 CDRH3

<400> 117

Val	Lys	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Asp	Gln	Ser	Leu	Glu	Ser	Asp	Phe
1				5					10					15

<210> 118
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA7 VH

[0051] <400> 118

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
			20					25					30		

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

Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val
	50					55					60				

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

Leu	His	Met	Ser	Arg	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Val Lys Asp Phe Trp Ser Gly Asp Gln Ser Leu Glu Ser Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA8 CDRH1

<400> 119

Gly Phe Thr Phe Ser Ala His Ala
1 5

[0052] <210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA8 CDRH2

<400> 120

Ile Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Thr
1 5

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA8 CDRH3

<400> 121

Val Lys Asp Phe Gly Thr Ser Pro Gln Thr Asp Phe

1 5 10

<210> 122
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA8 VH

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Val Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala His
 20 25 30

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

[0053]

Ser Thr Ile Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Val Lys Asp Phe Gly Thr Ser Pro Gln Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Ala Val Ser Ser
 115

<210> 123
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA76 CDRH1

<400> 123

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Phe
1 5

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA76 CDRH2

<400> 124

Ile Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Lys
1 5

[0054]

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA76 CDRH3

<400> 125

Ala Arg Pro Phe His Ser Glu Tyr Thr Tyr Gly Leu Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 126

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA76 VH

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

[0055]

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

Ala Arg Pro Phe His Ser Glu Tyr Thr Tyr Gly Leu Asp Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA117 CDRH1

<400> 127

Gly Gly Ser Ile Arg Arg Thr Asn Ser Tyr

1 5 10

<210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA117 CDRH2

<400> 128

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0056] <220>
 <223> ZKA117 CDRH3

<400> 129

Ala Arg Leu Asn Asp Gly Ser Thr Val Thr Thr Ser Ser Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 130
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA117 VH

<400> 130

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Arg Thr
20 25 30

Asn Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Gln
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Leu Asn Asp Gly Ser Thr Val Thr Thr Ser Ser Tyr Phe
100 105 110

[0057]

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB27 CDRH1

<400> 131

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser Trp
1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB27 CDRH2

<400> 132

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 133

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB27 CDRH3

<400> 133

Ala Arg His Asp Tyr Ser Val Ser Glu Asn Gly Met Asp Val
1 5 10

[0058]

<210> 134

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB27 VH

<400> 134

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asp Tyr Ser Val Ser Glu Asn Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB29 CDRH1

[0059]

<400> 135

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB29 CDRH2

<400> 136

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys
1 5

<210> 137
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB29 CDRH3

<400> 137

Ala Arg Arg Ser Tyr Ser Ile Ser Cys Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 138

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB29 VH

<400> 138

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

[0060]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115

<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB34 CDRH1

<400> 139

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Gly
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0061] <220>
<223> ZKB34 CDRH2

<400> 140

Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 141
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB34 CDRH3

<400> 141

Ala Lys Asp Leu Thr Met Val Arg Gly Val His Tyr Tyr Tyr Tyr Val
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 142
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB34 VH

<400> 142

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

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

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

[0062] Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Leu Thr Met Val Arg Gly Val His Tyr Tyr Tyr Tyr Val
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 143
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB39 CDRH1

<400> 143

Gly Tyr Thr Phe Asp Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB39 CDRH2

<400> 144

Ile Asn Pro His Arg Gly Gly Thr
1 5

[0063]

<210> 145

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB39 CDRH3

<400> 145

Val Arg Asp Gln Tyr Cys Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Gly Ile His Gln
1 5 10 15

Pro His Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 146

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB39 VH

<400> 146

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro His Arg Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Ile Met Thr Leu Asp Met Ser Ile Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

[0064]

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

Val Arg Asp Gln Tyr Cys Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Gly Ile His Gln
100 105 110

Pro His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB46 CDRH1

<400> 147

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB46 CDRH2

<400> 148

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 149

<211> 17

<212> PRT

[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB46 CDRH3

<400> 149

Ala Arg Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Gln Glu Asp Trp Phe Asp
1 5 10 15

Pro

<210> 150

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB46 VH

<400> 150

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0066]

Ala Arg Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Gln Glu Asp Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB53 CDRH1

<400> 151

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 152

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB53 CDRH2

<400> 152

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg
 1 5

<210> 153
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB53 CDRH3

<400> 153

[0067] Ala Arg His Val Glu Gln Leu Pro Ser Ser Gly Tyr Phe Gln His
 1 5 10 15

<210> 154
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB53 VH

<400> 154

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Val Glu Gln Leu Pro Ser Ser Gly Tyr Phe Gln His Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0068] <210> 155
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKC26 CDRH1

<400> 155

Gly Phe Ile Phe Ser Asp Phe Tyr
1 5

<210> 156
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKC26 CDRH2

<400> 156

Ile Gly His Asp Gly Ser Tyr Ile
1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKC26 CDRH3

<400> 157

Ala Arg Ala His Gly Gly Phe Arg His
1 5

<210> 158
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKC26 VH

[0069] <400> 158

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Gly His Asp Gly Ser Tyr Ile Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala His Gly Gly Phe Arg His Trp Gly Gln Gly Thr Val Val
100 105 110

Ala Val Ser Pro
115

<210> 159
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD5 CDRH1

<400> 159

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

[0070] <210> 160
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD5 CDRH2

<400> 160

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 161
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD5 CDRH3

<400> 161

Ala Arg Asp Arg Asp His Tyr Asp Leu Trp Asn Ala Tyr Thr Phe Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr

<210> 162
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD5 VH

<400> 162

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

[0071]

Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Asp	Trp	Val
		35					40					45			

Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

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

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

Ala	Arg	Asp	Arg	Asp	His	Tyr	Asp	Leu	Trp	Asn	Ala	Tyr	Thr	Phe	Asp
			100					105					110		

Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120				

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD7 CDRH1

<400> 163

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD7 CDRH2

<400> 164

[0072]

Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asp Lys
1 5

<210> 165
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD7 CDRH3

<400> 165

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

His Phe His His
20

<210> 166

<211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD7 VH

<400> 166

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

[0073]

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

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

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

His Phe His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 167
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD8 CDRH1

<400> 167

Gly Phe Thr Phe Ile Asn Tyr Ala
1 5

<210> 168

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD8 CDRH2

<400> 168

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 169

<211> 16

<212> PRT

[0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD8 CDRH3

<400> 169

Ala Thr Asp Ala Asp Ala Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Asn Phe His Tyr
1 5 10 15

<210> 170

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD8 VH

<400> 170

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

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Asp Ala Asp Ala Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Asn Phe His Tyr
100 105 110

[0075]

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD15 CDRH1

<400> 171

Asp Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ser
1 5 10

<210> 172

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD15 CDRH2

<400> 172

Ile	Tyr	Ser	Ser	Gly	Asp	Thr
1				5		

<210> 173

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD15 CDRH3

<400> 173

Ala	Arg	Ala	His	Thr	Pro	Thr	Ser	Lys	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met
1				5					10					15	

[0076] Asp Val

<210> 174

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD15 VH

<400> 174

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly
			20					25					30		

Gly	Phe	Ser	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp Leu Gly Tyr Ile Tyr Ser Ser Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Ala His Thr Pro Thr Ser Lys Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Ala
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

[0077] <210> 175
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD16 CDRH1

<400> 175

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Phe
1 5

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD16 CDRH2

<400> 176

Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 177
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD16 CDRH3

<400> 177

Ala Lys Val Gly Gly Cys Tyr Gly Gly Asp Cys His Val Glu Asn Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 178
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0078]

<220>
 <223> ZKD16 VH

<400> 178

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

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

Phe Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Lys Val Gly Gly Cys Tyr Gly Gly Asp Cys His Val Glu
100 105 110

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 179
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD17 CDRH1

<400> 179

[0079] Gly Phe Ile Phe Ser Asp Tyr Ala
1 5

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD17 CDRH2

<400> 180

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Arg
1 5

<210> 181
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD17 CDRH3

<400> 181

Ala	Arg	Gly	Tyr	Cys	Ser	Ser	Gly	Thr	Cys	Phe	Ser	Thr	Asn	Ala	Glu
1				5					10					15	

Tyr	Phe	His	Pro
			20

<210> 182

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKD17 VH

<400> 182

Gln	Val	Gln	Met	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Thr
1				5					10					15	

[0080]

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

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

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

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

Leu	Gln	Met	His	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Tyr	Cys	Ser	Ser	Gly	Thr	Cys	Phe	Ser	Thr	Asn	Ala	Glu
			100					105					110		

Tyr Phe His Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ala Thr Ile Ser Ser
 115 120 125

<210> 183
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD20 CDRH1

<400> 183

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Phe
 1 5

<210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0081] <220>
 <223> ZKD20 CDRH2

<400> 184

Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD20 CDRH3

<400> 185

Ala Arg Val Gly Gly Cys Asn Gly Gly Asp Cys His Val Glu Asn Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 186
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD20 VH

<400> 186

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

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

Phe Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0082] Gly Arg Ser Arg Asn Lys Pro Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Val Gly Gly Cys Asn Gly Gly Asp Cys His Val Glu
 100 105 110

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 187
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA134 CDRH1

<400> 187

Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
1 5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA134 CDRH2

<400> 188

Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala
1 5

[0083]

<210> 189

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA134 CDRH3

<400> 189

Ala Arg Ser Asp Ile Val Ser Thr Thr Arg Gly Tyr His His Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 190

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA134 VH

<400> 190

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

Ser Val Asn Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

[0084]

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

Ala Arg Ser Asp Ile Val Ser Thr Thr Arg Gly Tyr His His Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 191

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA246 CDRH1

<400> 191

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 192
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA246 CDRH2

<400> 192

Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 193
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0085] <220>
 <223> ZKA246 CDRH3

<400> 193

Ala Arg Gly Phe Thr Met Ile Ser Asp Arg Glu Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 194
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA246 VH

<400> 194

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

His Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Phe Thr Met Ile Ser Asp Arg Glu Phe Asp Pro Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0086]

<210> 195
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA256 CDRH1

<400> 195

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
 1 5

<210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA256 CDRH2

<400> 196

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 197
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA256 CDRH3

<400> 197

Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Asp Asp Phe Trp Ser Gly Ser Tyr Ser Gly
1 5 10 15

Ser Phe Asp Ile
20

[0087] <210> 198
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA256 VH

<400> 198

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Asp Asp Phe Trp Ser Gly Ser Tyr Ser Gly
100 105 110

Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 199
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB42 CDRH1

[0088]

<400> 199

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly
1 5

<210> 200
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB42 CDRH2

<400> 200

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys
1 5

<210> 201
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB42 CDRH3

<400> 201

Val Lys Tyr Gly Glu Arg Ile Asn Gly Tyr Ser Asp Pro Phe Asp His
1 5 10 15

<210> 202

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB42 VH

<400> 202

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

[0089]

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

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

Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95

Val Lys Tyr Gly Glu Arg Ile Asn Gly Tyr Ser Asp Pro Phe Asp His
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB85 CDRH1

<400> 203

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
1 5

<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0090] <220>
<223> ZKB85 CDRH2

<400> 204

Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
1 5

<210> 205
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB85 CDRH3

<400> 205

Ala Arg Val Ile Val Pro Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 206

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB85 VH

<400> 206

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

[0091]

Thr Gly Arg Phe Val Leu Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Ile Val Pro Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 207
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB47 CDRH1

<400> 207

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr
1 5

<210> 208

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB47 CDRH2

<400> 208

Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr
1 5

<210> 209

<211> 15

<212> PRT

[0092]

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB47 CDRH3

<400> 209

Ala Arg Asp Gln Tyr Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 210

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB47 VH

<400> 210

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Tyr Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

[0093]

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 211

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC6 CDRH1

<400> 211

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC6 CDRH2

<400> 212

Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr
1				5			

<210> 213

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC6 CDRH3

<400> 213

Ala	Arg	Val	Ser	Asp	Trp	Gly	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5					10		

[0094]

<210> 214

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC6 VH

<400> 214

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25					30		

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Asp Trp Gly Phe Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Gln
115

<210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA160 CDRH1

[0095]

<400> 215

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Ser
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA160 CDRH2

<400> 216

Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 217
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA160 CDRH3

<400> 217

Ala	Arg	Asp	Gln	Thr	Met	Pro	Val	Trp	Val	Gly	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 218

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA160 VH

<400> 218

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

[0096]

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

Ser	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

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

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

Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg	Asp	Gln	Thr	Met	Pro	Val	Trp	Val	Gly	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 219
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA172 CDRH1

<400> 219

Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr Trp
1 5

<210> 220
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0097] <220>
<223> ZKA172 CDRH2

<400> 220

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 221
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA172 CDRH3

<400> 221

Ala Arg Gln Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Met Ala Val
1 5 10

<210> 222

<211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA172 VH

<400> 222

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

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

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

[0098]

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Met Ala Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 223
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA174 CDRH1

<400> 223

Gly Gly Ser Met Ser Asn Ser Tyr Tyr His
1 5 10

<210> 224

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA174 CDRH2

<400> 224

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 225

<211> 18

<212> PRT

[0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA174 CDRH3

<400> 225

Ala Arg Asn Pro Val Phe Asn Pro Leu Thr Leu Thr His Asp Ala Phe
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 226

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA174 VH

<400> 226

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Asn Ser
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

[0100]

Cys Ala Arg Asn Pro Val Phe Asn Pro Leu Thr Leu Thr His Asp Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 227

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA189 CDRH1

<400> 227

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 228

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA189 CDRH2

<400> 228

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
 1 5

<210> 229
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA189 CDRH3

<400> 229

[0101] Ala Lys Trp Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Glu Ser Tyr Phe
 1 5 10 15

Asp Pro

<210> 230
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKA189 VH

<400> 230

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Trp Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Glu Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

[0102]

<210> 231
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA195 CDRH1

<400> 231

Gly Tyr Asn Phe Pro Ser Tyr Trp
1 5

<210> 232
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA195 CDRH2

<400> 232

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 233
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA195 CDRH3

<400> 233

Ala Arg Ala Asp Cys Arg Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Val Phe Glu
1 5 10 15

<210> 234
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0103]

<220>
<223> ZKA195 VH

<400> 234

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Asp Ser Gly Tyr Asn Phe Pro Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Asp Cys Arg Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Val Phe Glu Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 235

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA215 CDRH1

<400> 235

[0104] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 236

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA215 CDRH2

<400> 236

Ile Asp Pro Ser Asp Ser His Thr
1 5

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA215 CDRH3

<400> 237

Ala	Arg	His	Ala	Leu	Pro	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10	

<210> 238

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA215 VH

<400> 238

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

Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

[0105]

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

Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	His	Thr	Asp	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
50						55					60				

Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Ala	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	His	Ala	Leu	Pro	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
					115

<210> 239
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA218 CDRH1

<400> 239

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Trp
1 5

<210> 240
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA218 CDRH2

[0106] <400> 240

Ile Asn Ser Asp Gly Arg Asn Thr
1 5

<210> 241
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKA218 CDRH3

<400> 241

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Gly Cys Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 242
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKA218 VH

<400> 242

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

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

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

[0107]

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKB75 CDRH1

<400> 243

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB75 CDRH2

<400> 244

Ile Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 245
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0108] <220>
 <223> ZKB75 CDRH3

<400> 245

Ala Lys Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Val Cys
 1 5 10 15

Tyr Leu Asn Pro Gly His His Asp Tyr
 20 25

<210> 246
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB75 VH

<400> 246

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Gly Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Val Cys
100 105 110

[0109]

Tyr Leu Asn Pro Gly His His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 247
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKB83 CDRH1

<400> 247

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 248

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB83 CDRH2

<400> 248

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 249
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB83 CDRH3

<400> 249

[0110] Ala Arg Leu Arg Gly Ser Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Tyr Ser
 1 5 10 15

Val Pro Gly Glu Thr Pro Asn Trp Phe Asp Pro
 20 25

<210> 250
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKB83 VH

<400> 250

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ser Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Trp Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Arg Gly Ser Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Tyr Ser
100 105 110

Val Pro Gly Glu Thr Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

[0111]

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 251
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKC3 CDRH1

<400> 251

Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 252
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC3 CDRH2

<400> 252

Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr
1				5		

<210> 253

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC3 CDRH3

<400> 253

Ala	Arg	Val	Gly	Gly	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10					15

[0112]

<210> 254

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC3 VH

<400> 254

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

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

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Gly Gly Ala Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 255
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKC18 CDRH1

[0113]

<400> 255

Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala
1 5

<210> 256
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKC18 CDRH2

<400> 256

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

<210> 257
<211> 13
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC18 CDRH3

<400> 257

Ser Arg Asp His Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 258

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZKC18 VH

<400> 258

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

[0114]

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ser Arg Asp His Thr Gly Thr Thr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Gln
115 120

<210> 259
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD1 CDRH1

<400> 259

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0115] <220>
<223> ZKD1 CDRH2

<400> 260

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 261
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZKD1 CDRH3

<400> 261

Ala Arg Asp Arg Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 262
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> ZKD1 VH

<400> 262

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

[0116] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 263
 <211> 95
 <212> PRT

<213> 寨卡病毒

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0117] <220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (83).. (83)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (85).. (85)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 263

Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Xaa Pro Ala Glu Xaa Xaa His Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Val Glu Xaa Gln Tyr Xaa Gly Xaa Asp Gly Pro Cys Lys
 20 25 30

Xaa Pro Xaa Gln Met Ala Val Asp Xaa Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly
 35 40 45

[0118] Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Xaa Thr Glu Asn Ser
 50 55 60

Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Ile Gly Xaa Gly Xaa Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser
 85 90 95

<210> 264
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 寨卡病毒

<400> 264

Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys

20

25

30

Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly
 35 40 45

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser
 50 55 60

Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser
 85 90 95

<210> 265
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0119]

<220>
 <223> ZIKV EDIII通用

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选K、A或E

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V、F或L

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选S或F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选I或V

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选T或V

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选L或D

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选A或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> X可以是除R以外的任何(天然存在的)氨基酸, 优选T或A

[0120]
<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或I

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选A或V

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选M或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选S或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(70)

<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选E或K

<220>

<221> misc_feature

<222> (91)..(91)

<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选V或I

<220>

<221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选为E、A、K或D

<220>

<221> misc_feature

<222> (94)..(94)

<223> X可以是任何(天然存在的)氨基酸, 优选为E、A或K, 更优选K或A

<400> 265

Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys
1				5					10					15	

[0121]

Xaa	Pro	Ala	Glu	Xaa	Xaa	His	Gly	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Xaa	Gln	Tyr
			20					25					30		

Xaa	Gly	Xaa	Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Xaa	Pro	Xaa	Gln	Met	Ala	Val	Asp
		35					40					45			

Xaa	Gln	Thr	Leu	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Val
	50					55					60				

Ile	Thr	Glu	Xaa	Thr	Xaa	Asn	Ser	Lys	Met	Met	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro
65					70					75					80

Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Val	Ile	Gly	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Lys	Ile
				85					90					95	

Thr	His	His	Trp	His	Arg	Ser	Gly
			100				

<210> 266

<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Zika-E-F1引物

<400> 266
tgcaaacgcg gtcgcaaacc tggttg
26

<210> 267
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-E-R1引物

<400> 267
cgtgcccaagg taatggaatg tcgtg
25

[0122]

<210> 268
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-Ef1530引物

<400> 268
agcctaggac ttgattgtga accga
25

<210> 269
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-E-R2769引物

<400> 269
ttacagatcc cacaacgacc gtcag

25

<210> 270
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-E-F2

<400> 270
acttgggtcat gatactgctg attgc
25

<210> 271
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-E-R2

[0123]

<400> 271
tcggttcaca atcaagtcct aggct
25

<210> 272
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ZIKV-E-f2058

<400> 272
gctaaccgccg taatcactga aagca
25

<210> 273
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> ZIKV-E-r2248

[0124] <400> 273
aagactgcca ttctcttggc acctc
25

	结合 (EC50, ng/ml)										中和 (IC50, ng/ml)	
	ZIKV E	DENV1 E	DENV2 E	DENV3 E	DENV4 E	DENV1 VLP	DENV2 VLP	DENV3 VLP	DENV4 VLP	DIII ZKA	ZIKV中和	DENV1中和
ZKA3	172	510	108	17	134	12	28	10	7	-	411	346
ZKA4	172	135	23	9	22	9	11	10	8	-	961	592
ZKA5	243	877	133	22	123	37	32	25	31	-	1978	-
ZKA6	79	355	28	13	58	13	14	9	10	-	1661	-
ZKA7	112	329	74	11	95	9	18	8	7	-	646	513
ZKA8	70	136	31	8	28	8	11	7	11	-	1336	102
ZKA76	408	-	-	-	-	-	-	-	-	3756	62	nd
ZKA78	2759	1407	982	33	385	158	83	131	136	-	2863	266
ZKA117	376	1780	341	49	391	142	86	35	158	-	1945	83
ZKB27	225	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	257	nd
ZKB29	285	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB30	1560	2011	2320	344	459	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB32	1668	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	545	nd
ZKB34	122	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB39	136	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	667	nd
ZKB41	241	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB45	125	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	1461	nd
ZKB46	3238	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB51	645	220	115	66	62	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB52	3398	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB53	59	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB84	4373	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC21	2069	4201	3659	877	1252	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC22	161	347	133	330	75	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC23	87	2162	97	37	21	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC24	92	177	71	240	55	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKC26	52	150	81	21	28	nd	nd	nd	nd	-	420	nd
ZKD4	20	80	24	8	11	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD5	42	254	103	17	41	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD6	115	585	600	31	96	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD7	33	474	147	12	44	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD8	24	169	62	12	25	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD15	581	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD16	62	692	475	10	27	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD17	14	93	32	7	12	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD20	565	-	-	50	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKD21	53	63	189	13	17	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKA64	65	-	-	-	-	-	-	-	-	161	155	-
ZKA134	168	-	-	-	-	-	-	-	-	626	432	nd
ZKA190	113	-	-	-	-	-	-	-	-	444	12	nd
ZKA246	473	-	-	-	-	-	-	-	-	5974	243	nd
ZKA256	115	-	-	-	-	-	-	-	-	214	224	nd
ZKB31	73	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	18	-	nd
ZKB42	5561	7073	6485	12065	6884	nd	nd	nd	nd	5158	-	nd
ZKB50	653	10000	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd
ZKB85	953	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	2400	2387	nd
ZKB47	13	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	574	-	nd
ZKC6	8575	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	5533	32	nd
ZKC25	162	144	147	150	158	nd	nd	nd	nd	200	-	nd
ZKD18	17	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	12	-	nd
ZKA81	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	243	nd
ZKA144	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	48	nd
ZKA146	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	45	nd
ZKA155	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	99	nd
ZKA160	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	38	26
ZKA167	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	121	nd
ZKA169	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	321	nd
ZKA171	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	47	nd
ZKA172	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	9	nd
ZKA174	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	55	-
ZKA183	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	34	nd
ZKA185	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	13	-
ZKA189	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	273	nd
ZKA191	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	52	nd
ZKA195	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	33	-
ZKA207	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	43	nd
ZKA215	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	26	nd
ZKA218	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	14	nd
ZKA228	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	36	nd
ZKA230	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	10	nd
ZKB75	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	190	nd
ZKB79	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	391	nd
ZKB83	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	59	nd
ZKC3	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	170	nd
ZKC8	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	762	nd
ZKC15	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	15	nd
ZKC18	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	662	nd
ZKD1	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	1141	nd

EDII/II

EDIII

NNB

图1

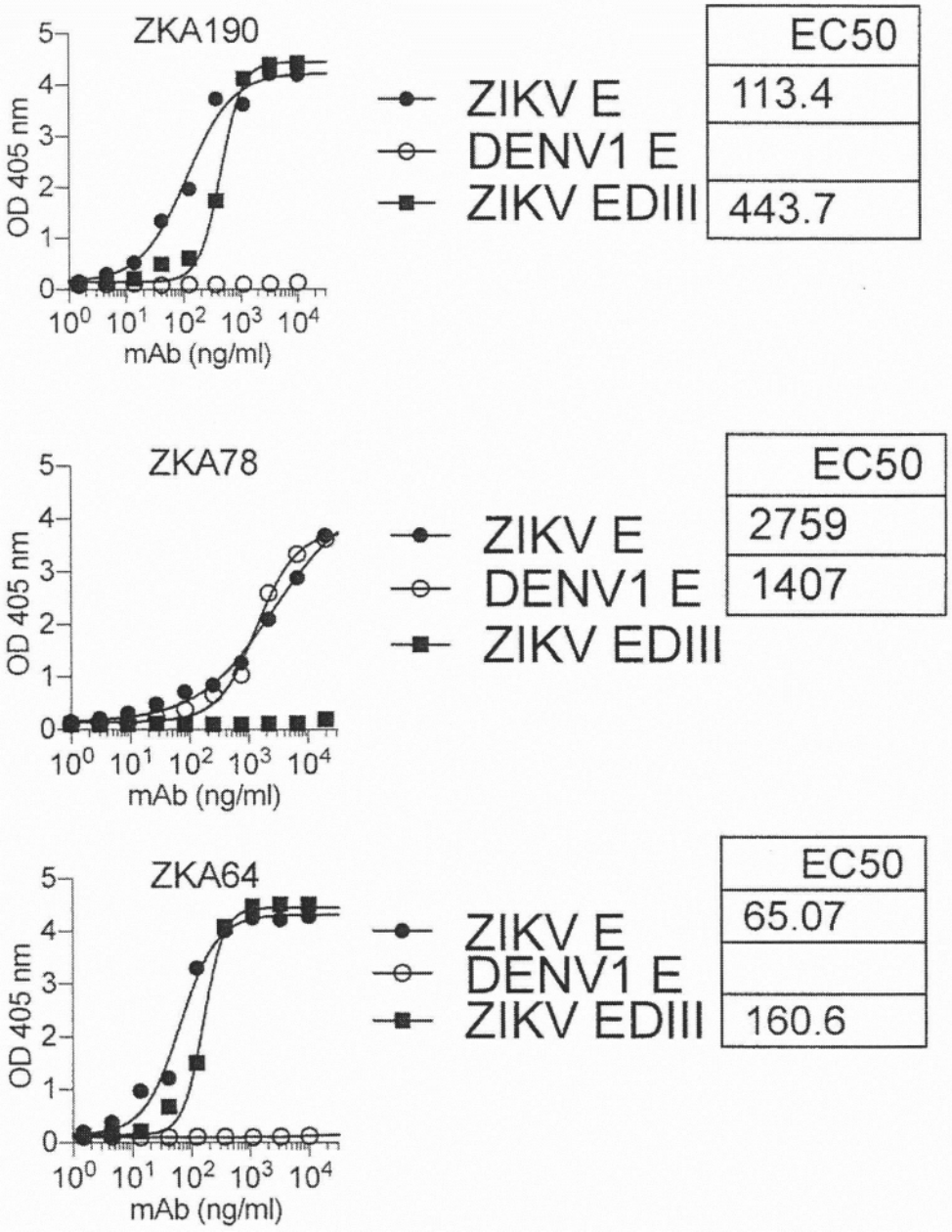


图2

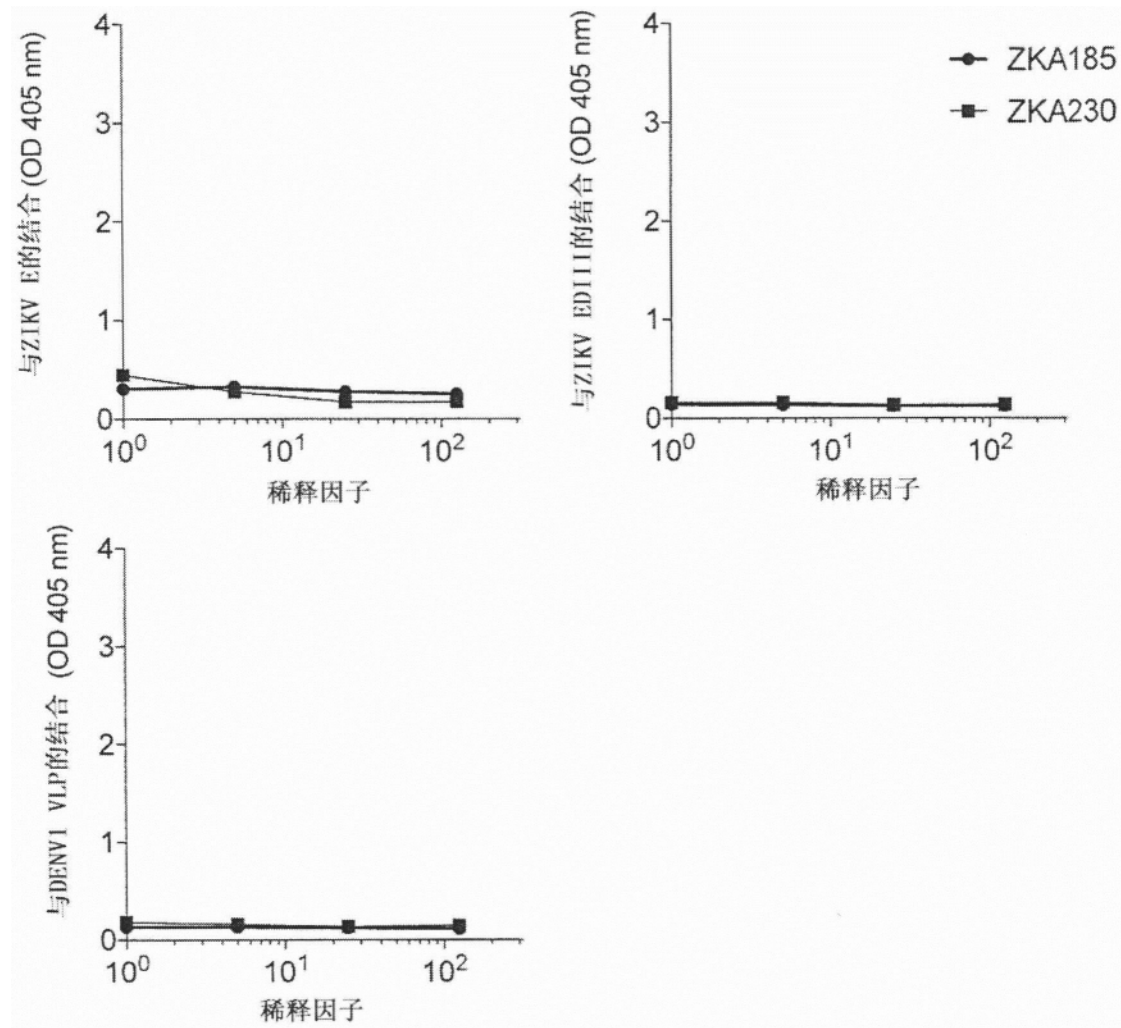


图3

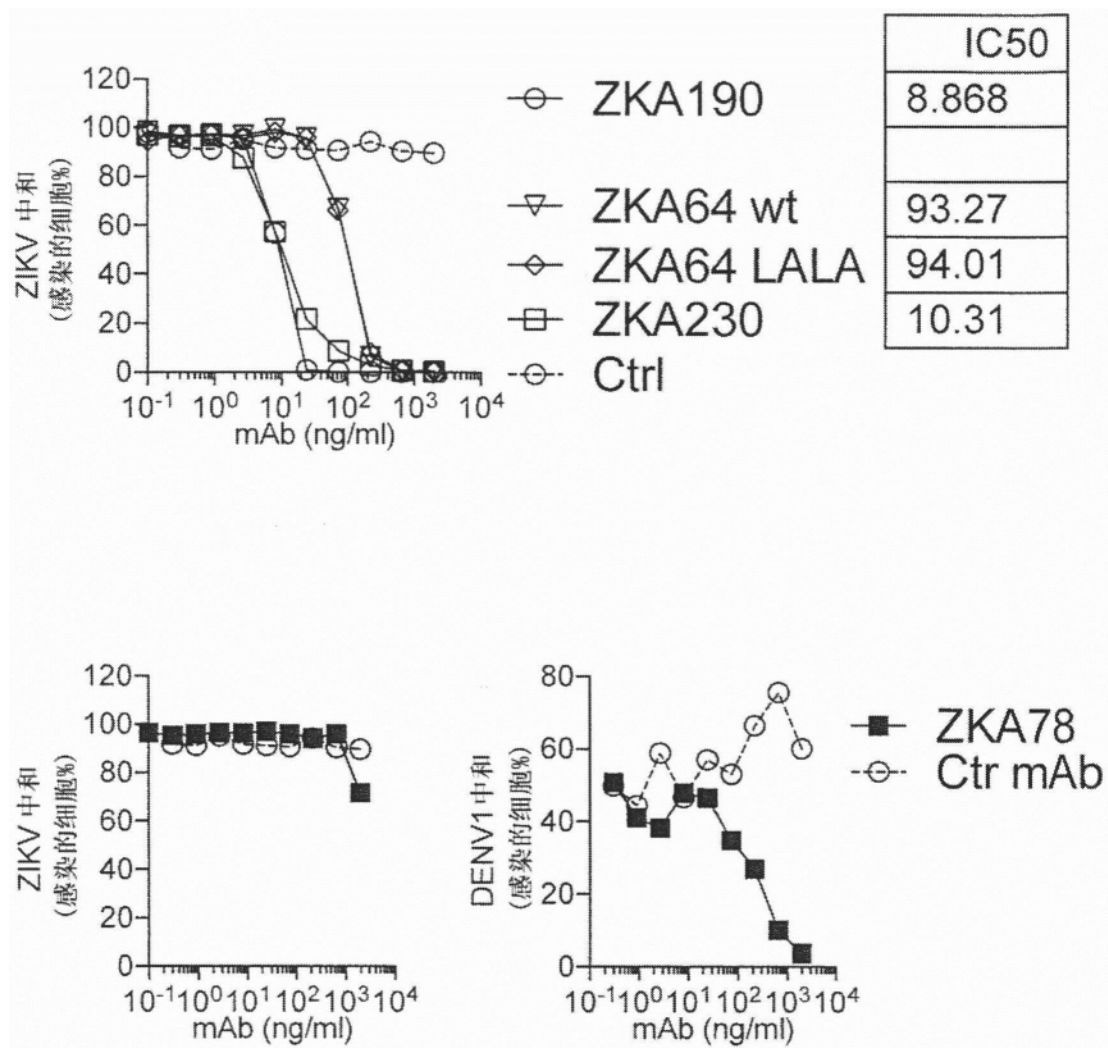


图4

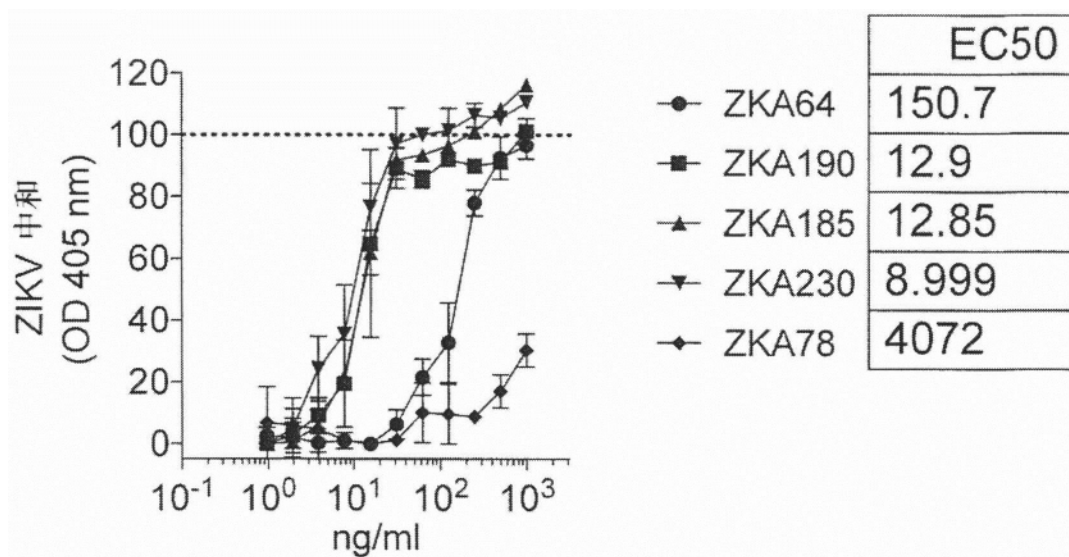


图5

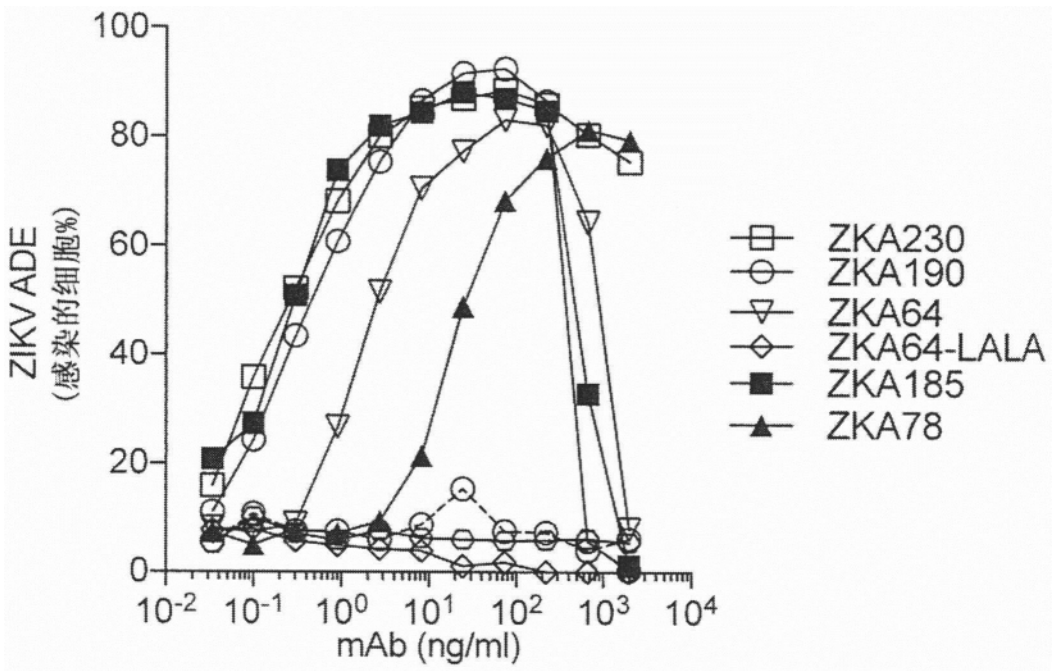


图6

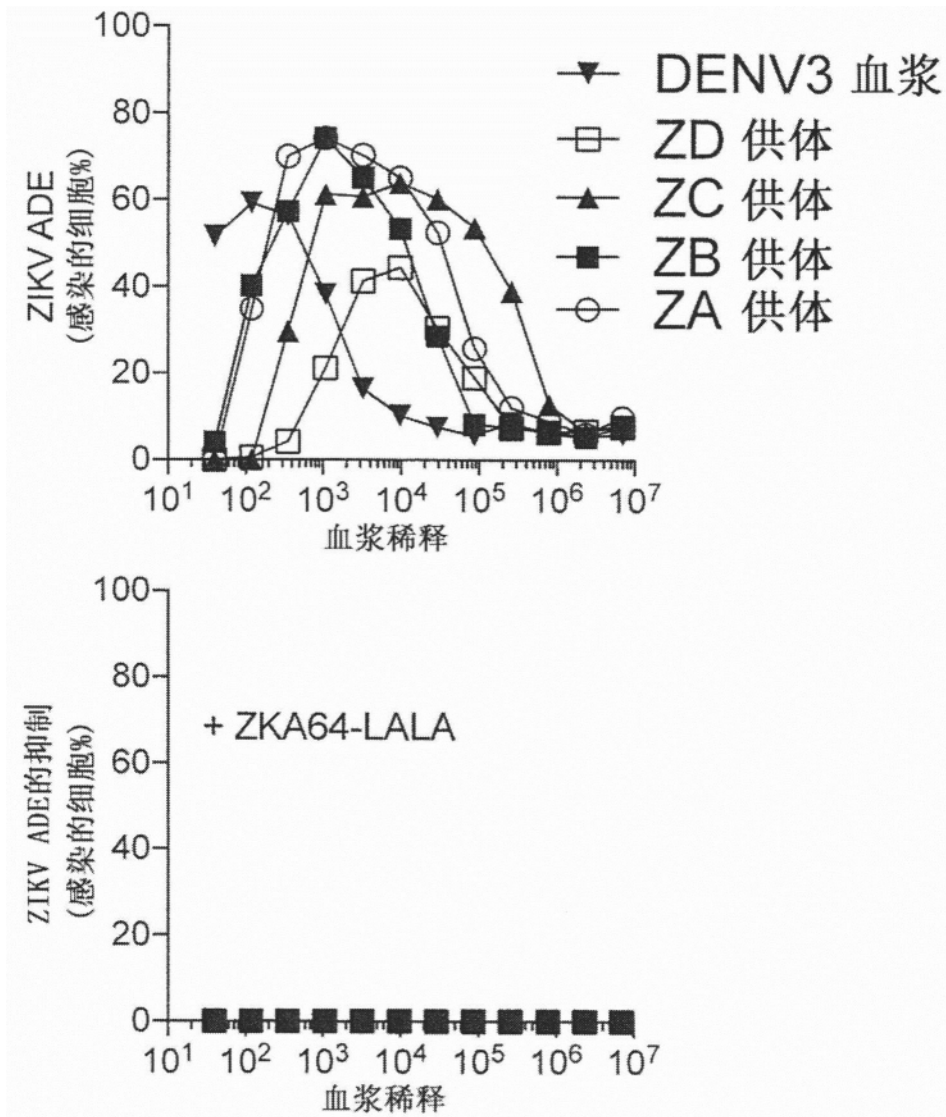


图7

HPF/2013 (KU776791)	taaf t t k i p a e t i n g t v i v e q y a g t d g p c k v p a q m a v d m q t i t p v g r i l t	50	60	95
SPH2015 (KU321639)				
寨卡病毒株MRS_OPV_马提尼克岛_PaRI_2015 (KU647676)			anp v l i e s t e n s k m m l e i d p p f g d s y i v i g v g e k k i i h h w h r s	95
MRT66 (AY632535)				95
KU926309 巴西 14-Jan-2016				95
KU870645 美国 02-Feb-2016				95
KU940228 巴西 01-Jul-2015				95
KU365779 巴西 2015				95
KU365778 巴西 2015				95
KU312312 苏里南 2-Oct-15				95
KU853013 意大利 1-Feb-16				95
KU940224 巴西 01-Aug-2015				95
KU820898 中国 14-Feb-16				95
KU761594 中国 12-Feb-16				95
KU728216 巴西 2015				95
KU728217 巴西 2015				95
KU922923 墨西哥 25-Feb-16				95
KU365780 巴西 2015				95
KU501216 危地马拉 1-Dec-15				95
KU740184 中国 16-Feb				95
KU827058 巴西 2015				95
KU955590 中国 26-Feb-2016				95
KU707826 巴西 1-Jul-15				95
KU922950 墨西哥 25-Feb-16				95
KU866423 中国 2016				95
KU501215 波多黎各 1-Dec-15				95
KJ776791 法国波多黎各 28-Nov-13				95
KU501217 危地马拉 1-Nov-15				95
KU497555 巴西 30-Nov-15				95
KU820897 哥伦比亚 15-Dec				95
KF993878 加拿大 19-Feb-13				95
KU509998 美国 12-Dec-14				95
KU820899 中国 17-Feb-16				95
KU365777 巴西 2015				95
KU955589 中国 16-Feb-2016				95
KU853012 意大利 1-Feb-16				95
KU861081 泰国 9-Jul-14				95
KU928310 巴西 23-Jan-2016				95
KU744693 中国 6-Feb-16				95

图8

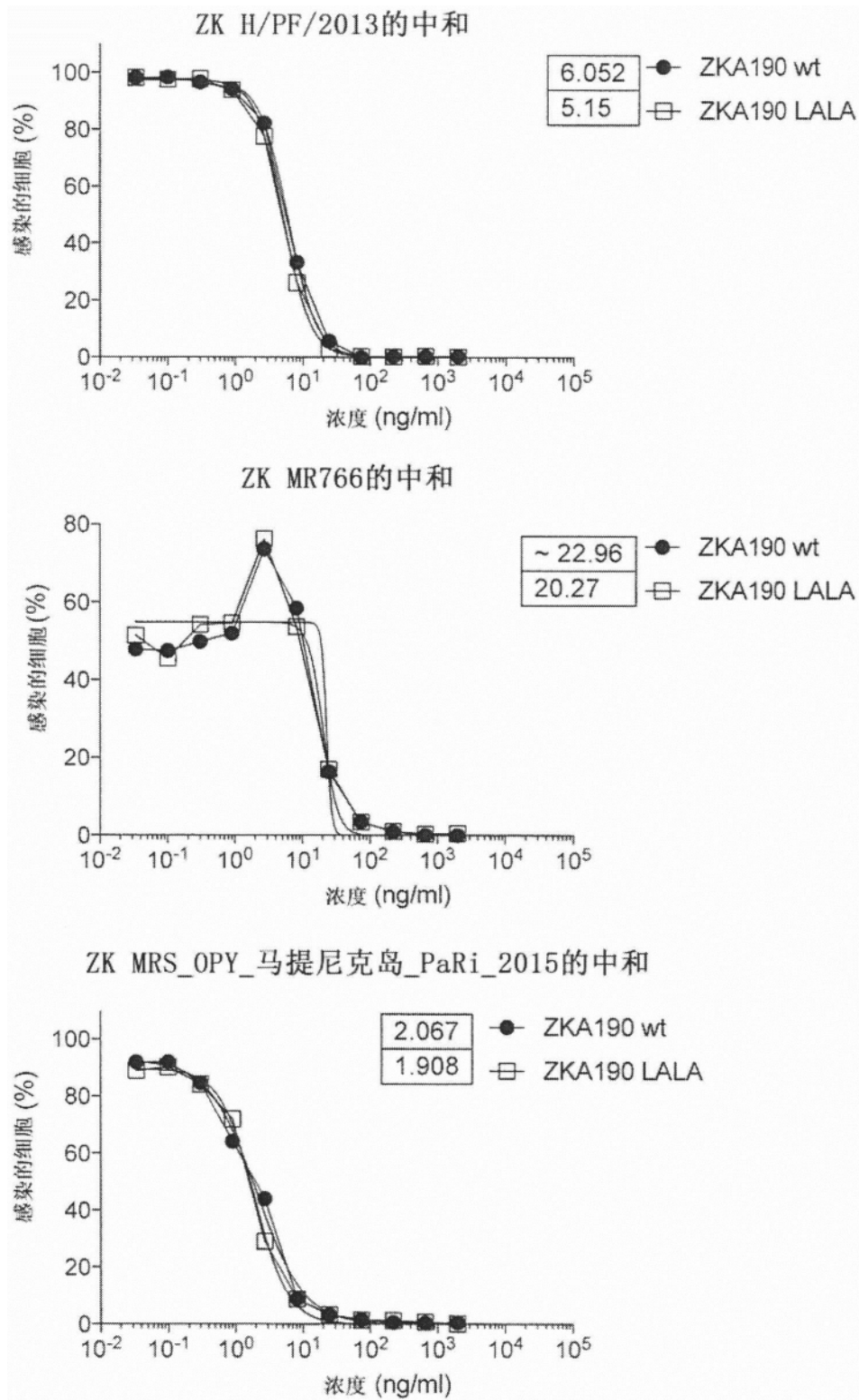


图9

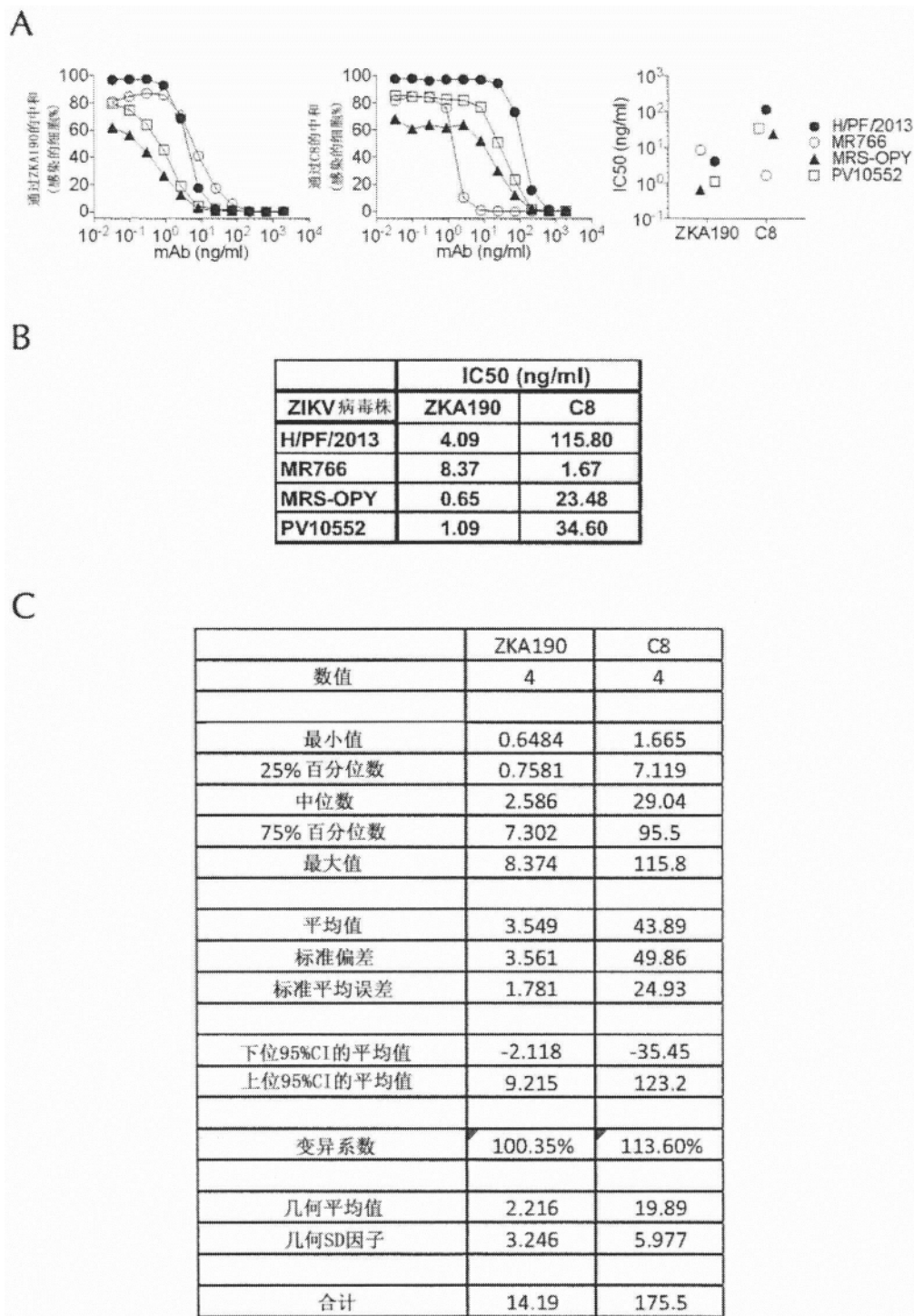


图10

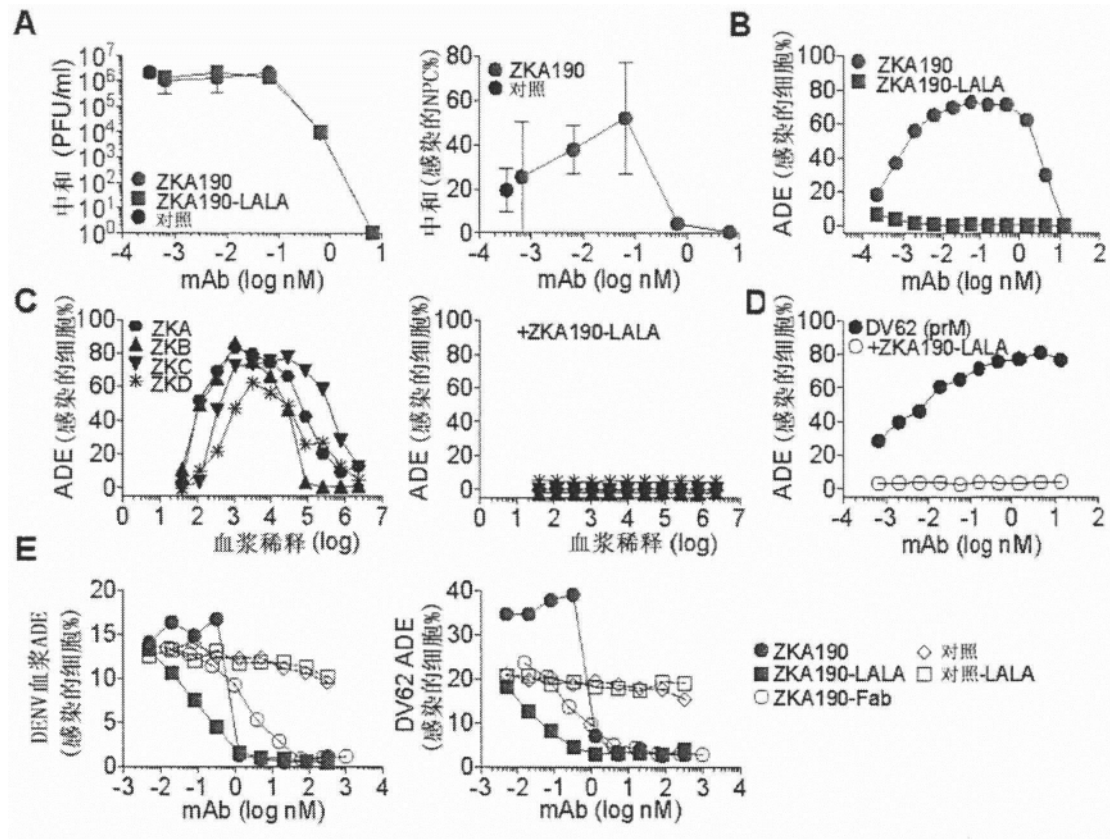


图11

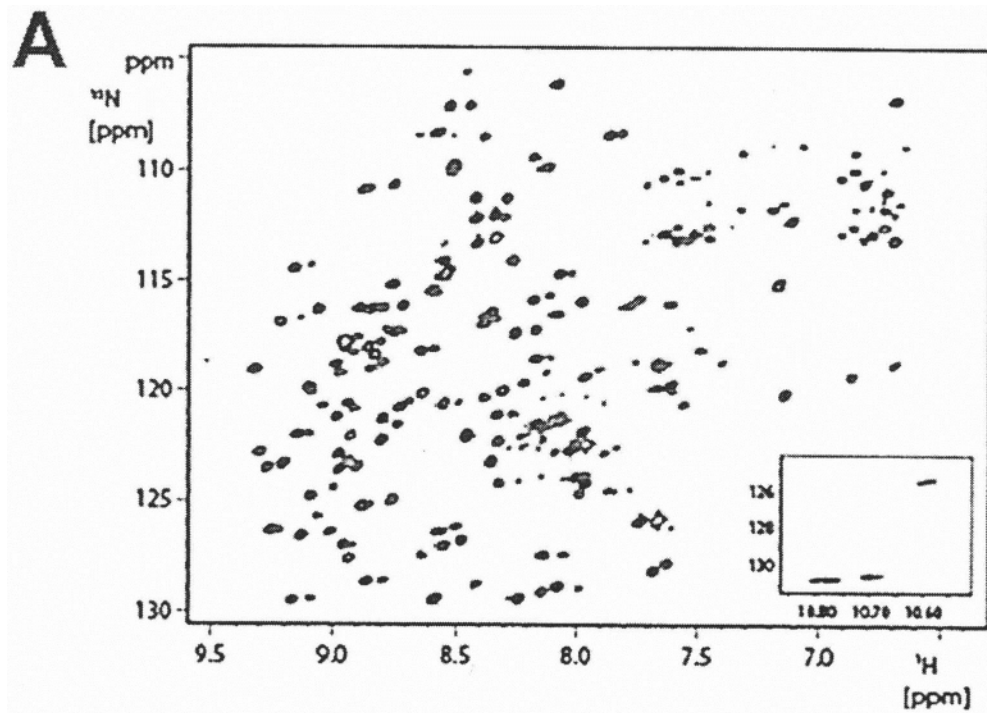


图12

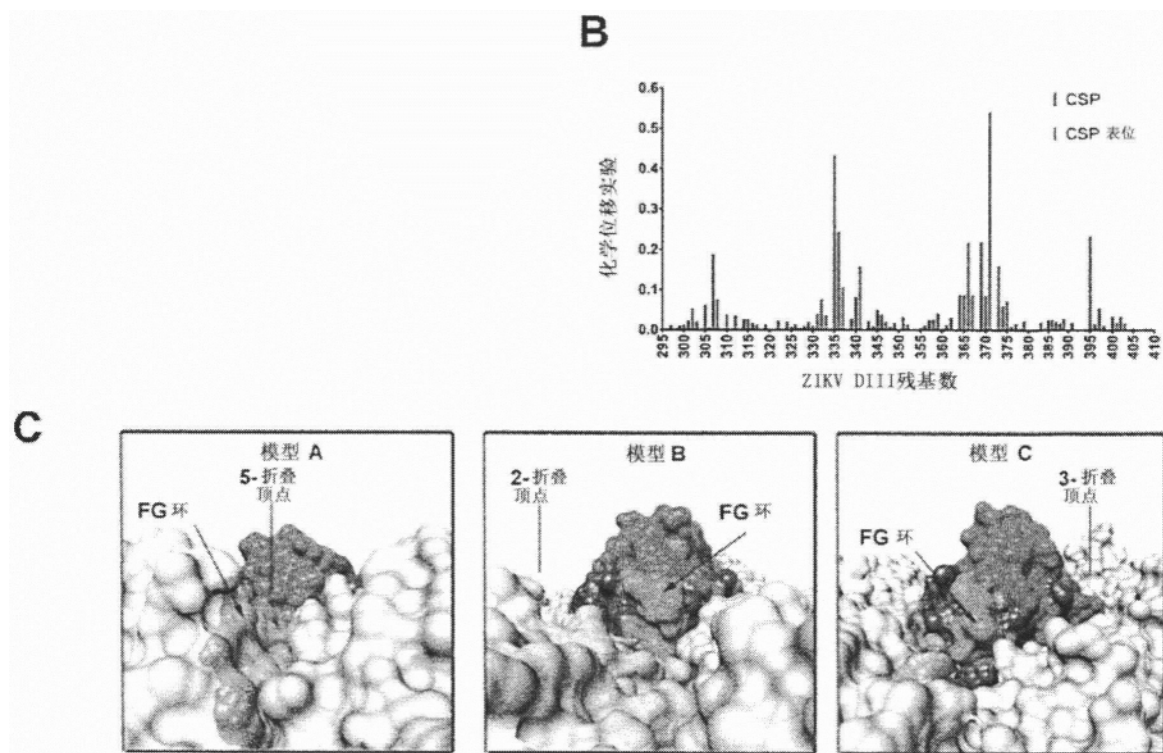


图12(续)

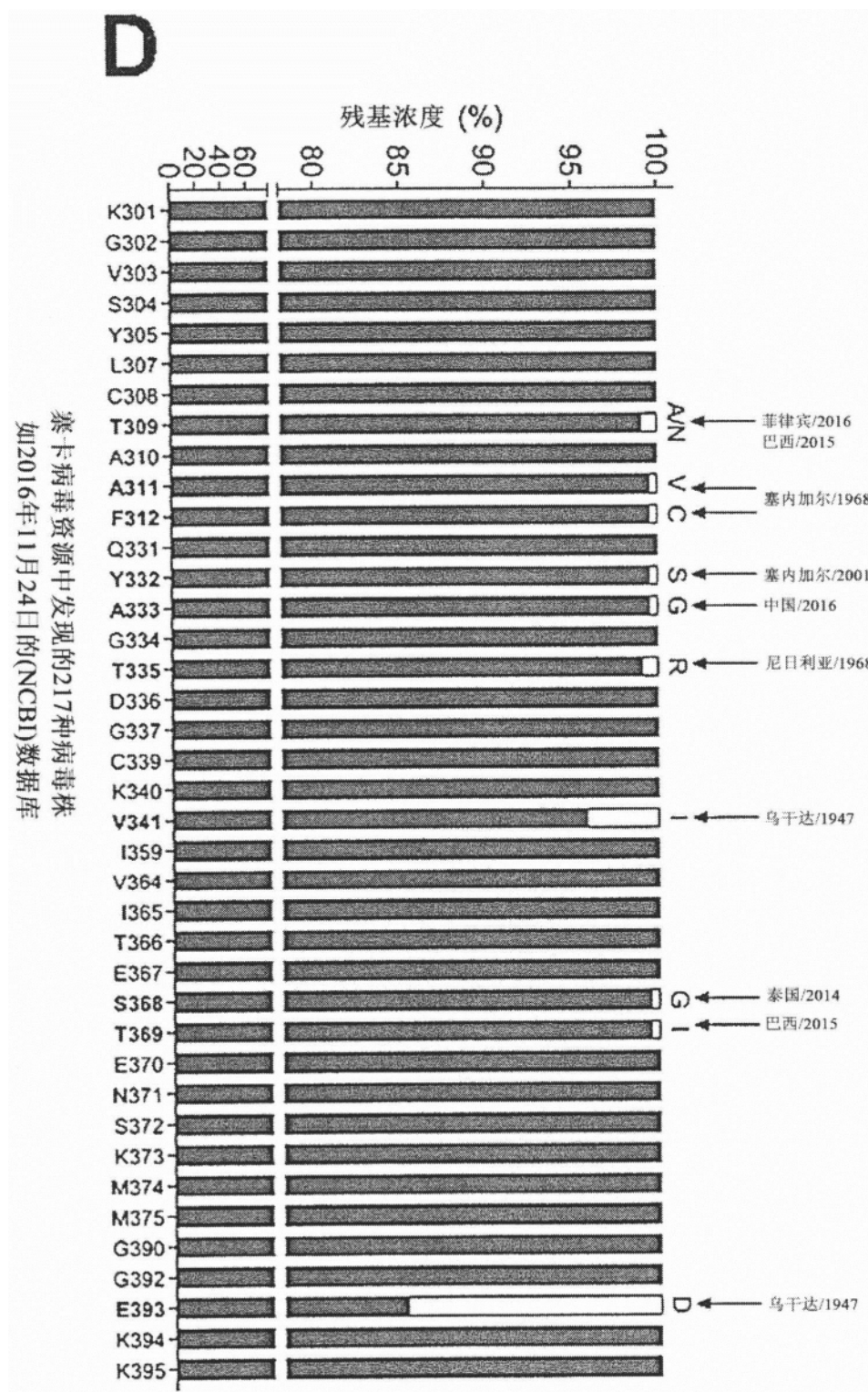


图12(续)

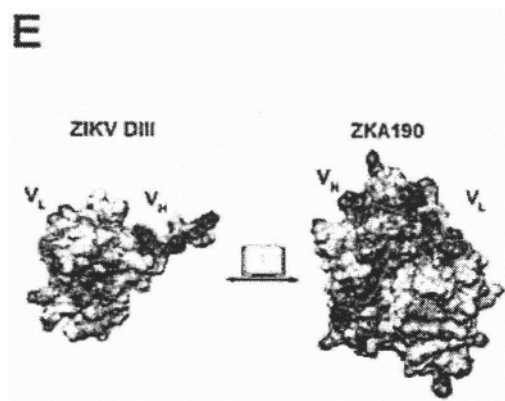


图12(续)

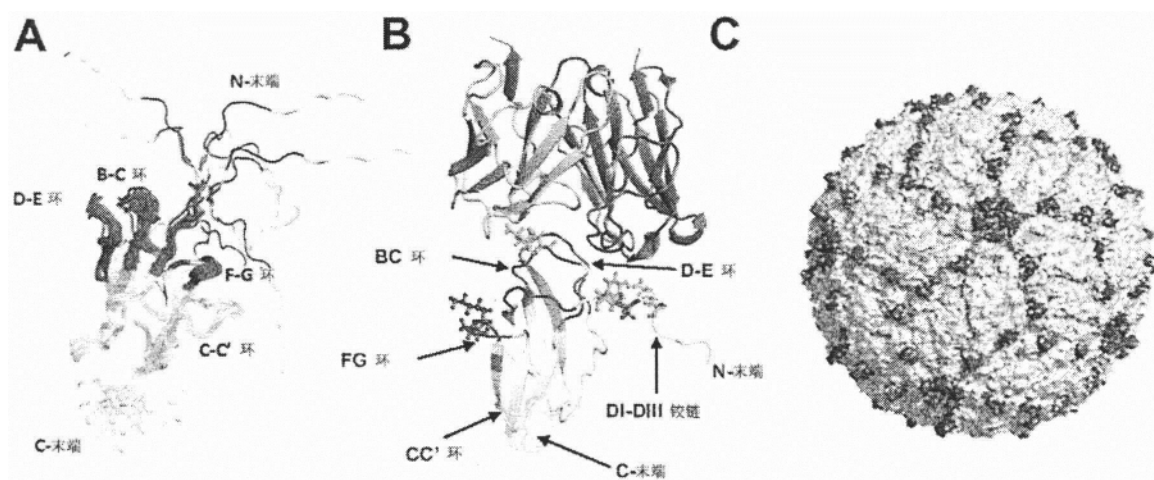


图13

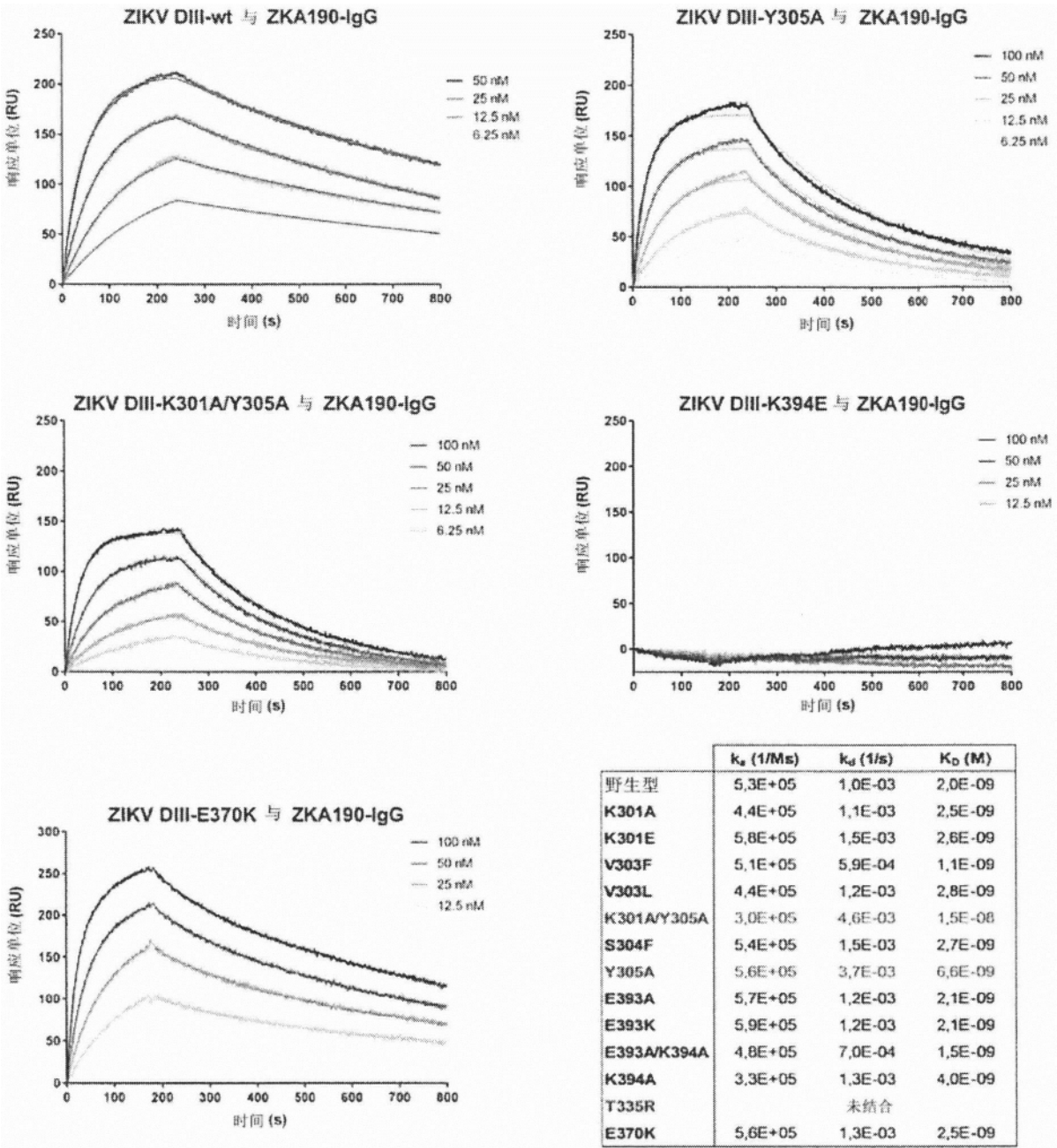


图14

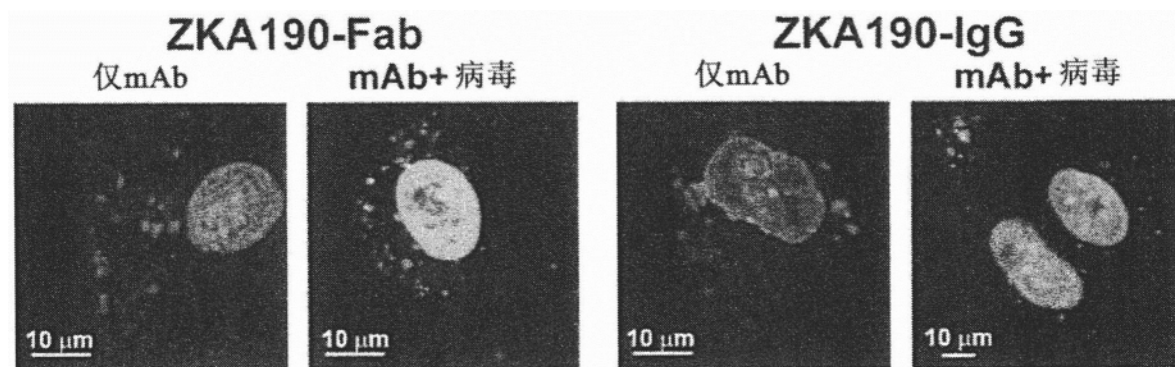


图15

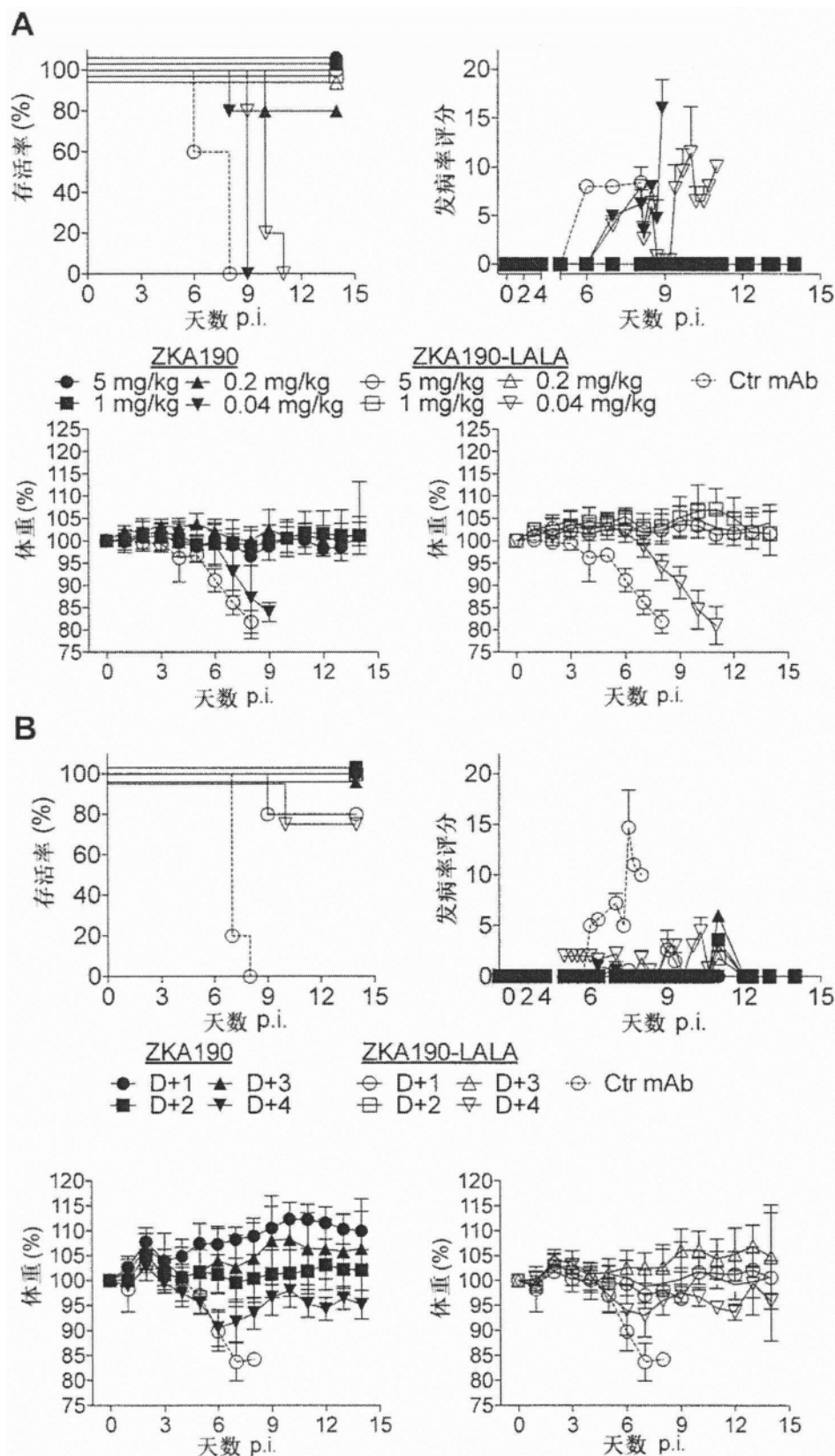


图16

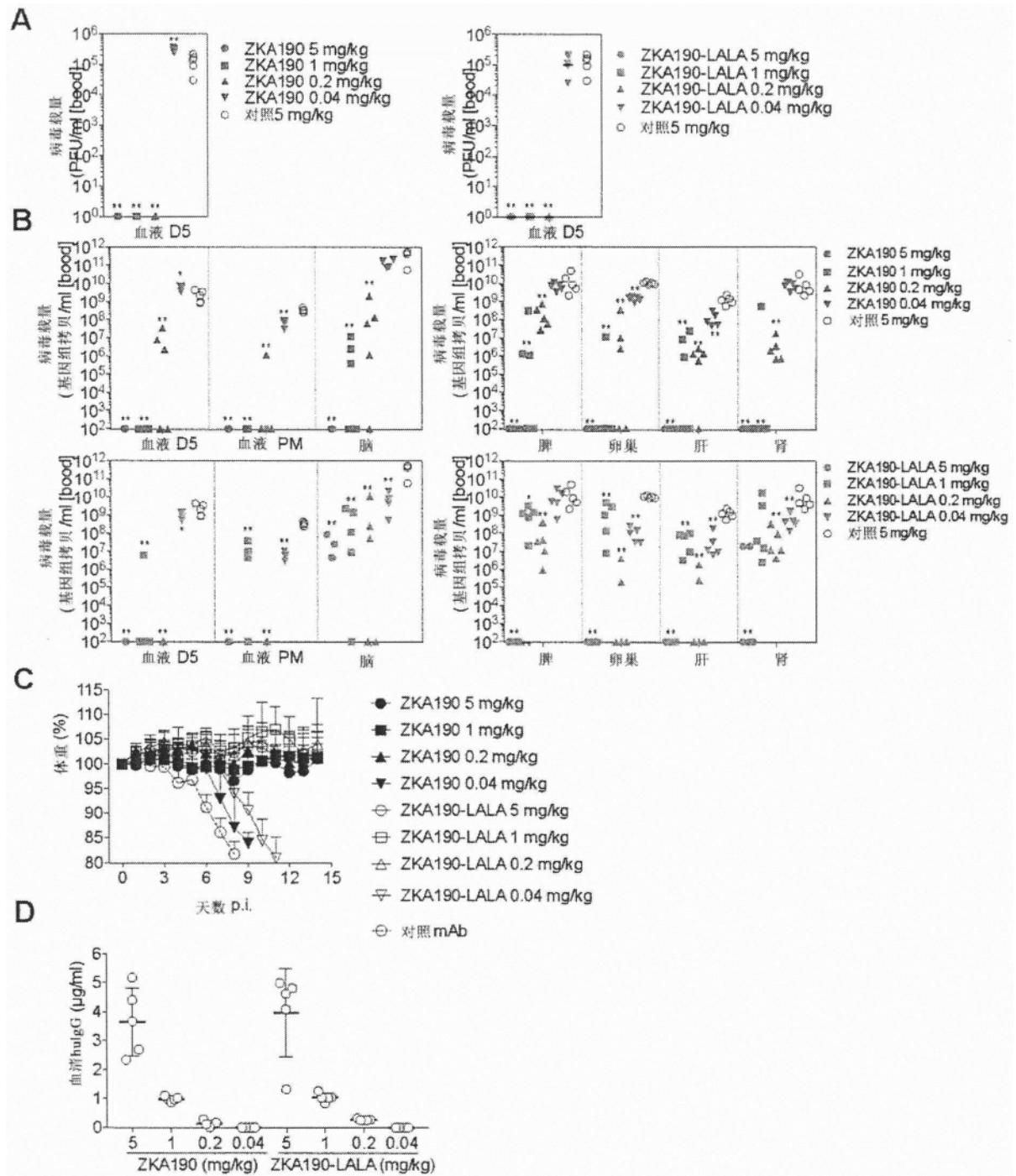


图17

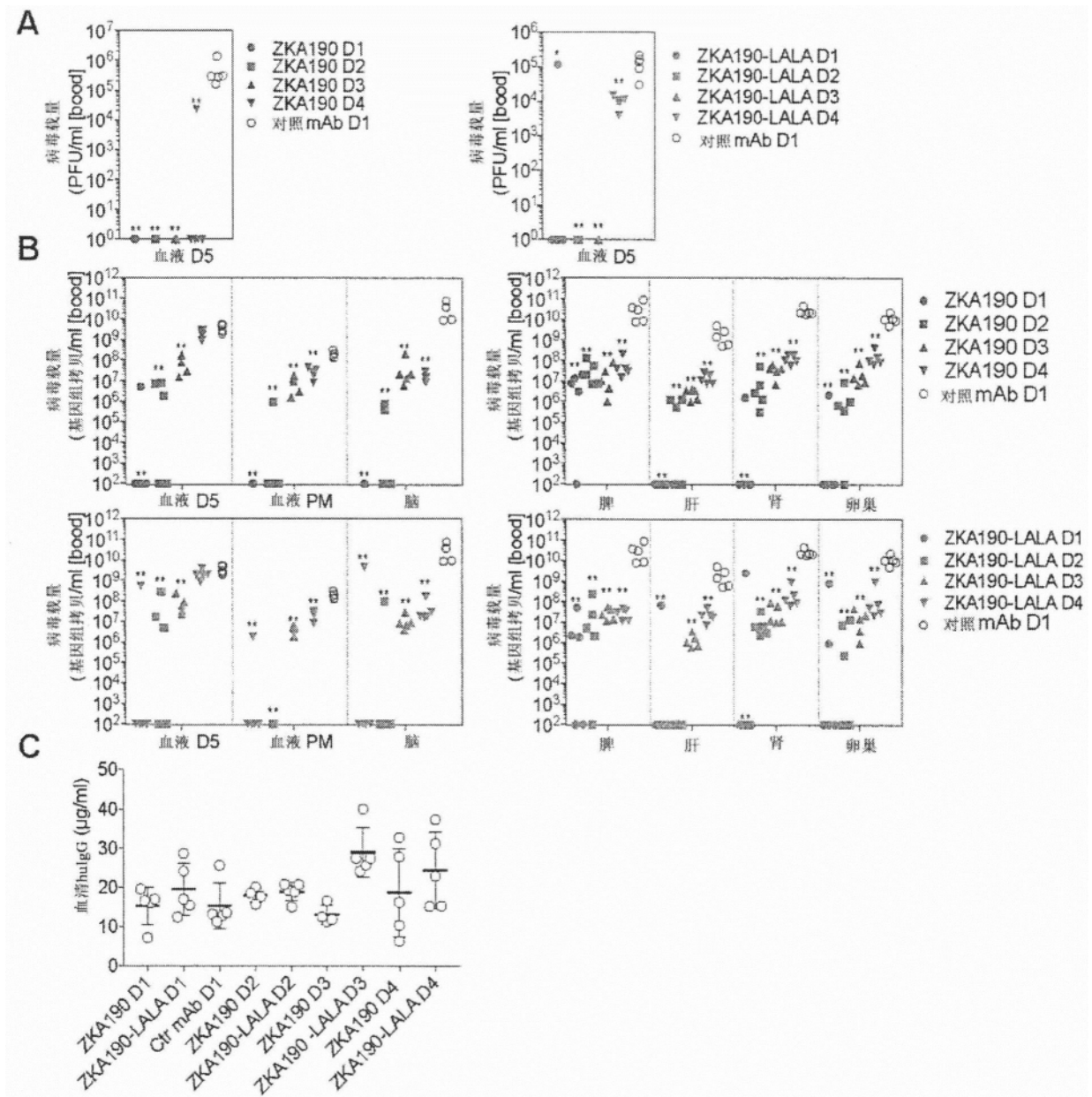


图18

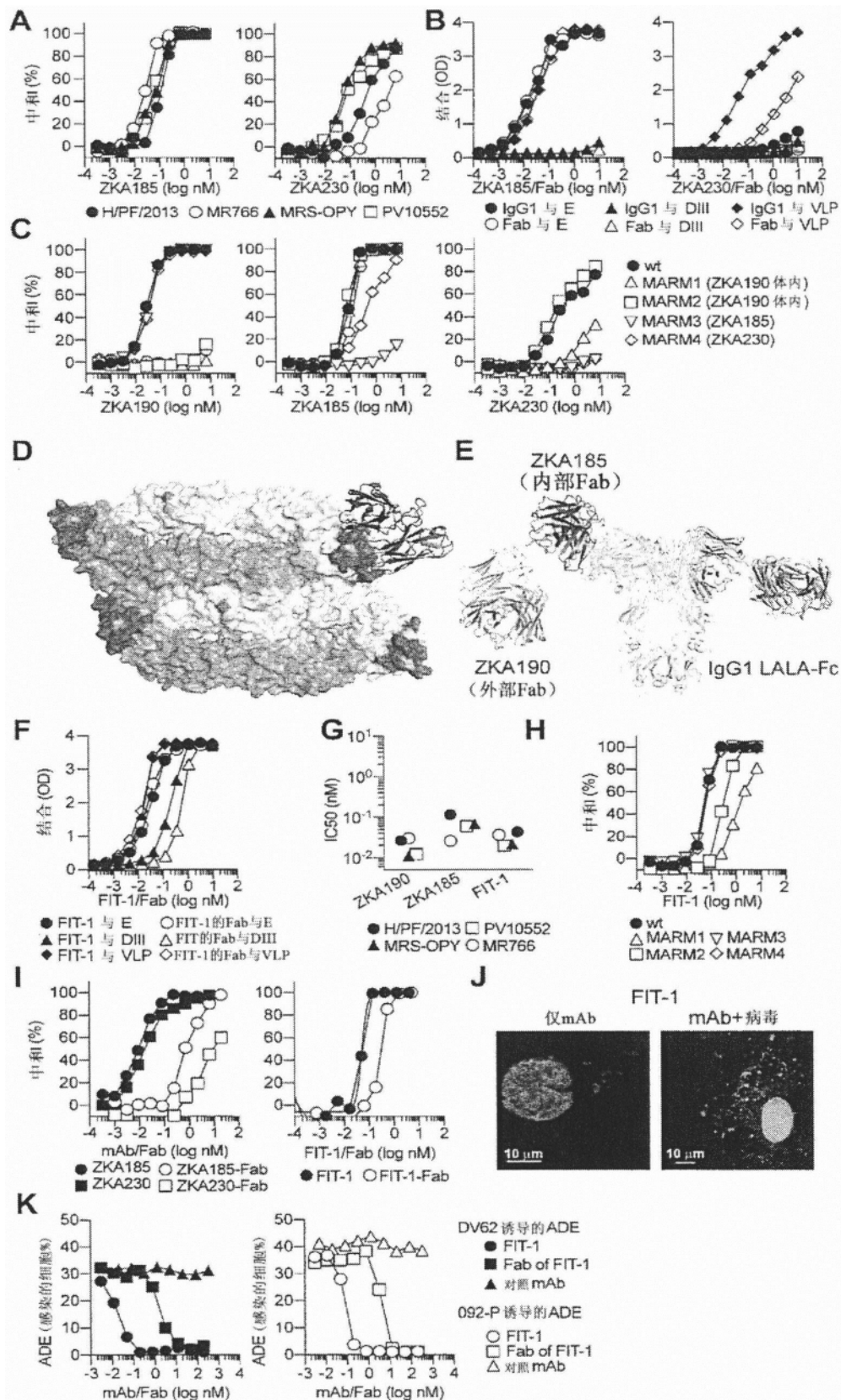


图19

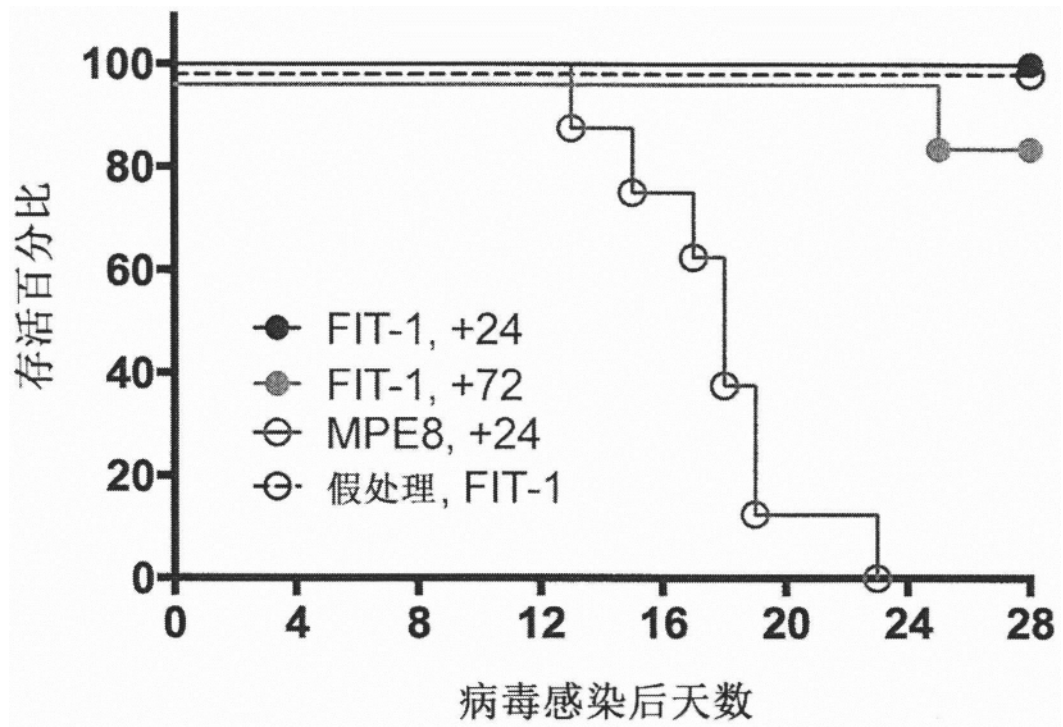


图21

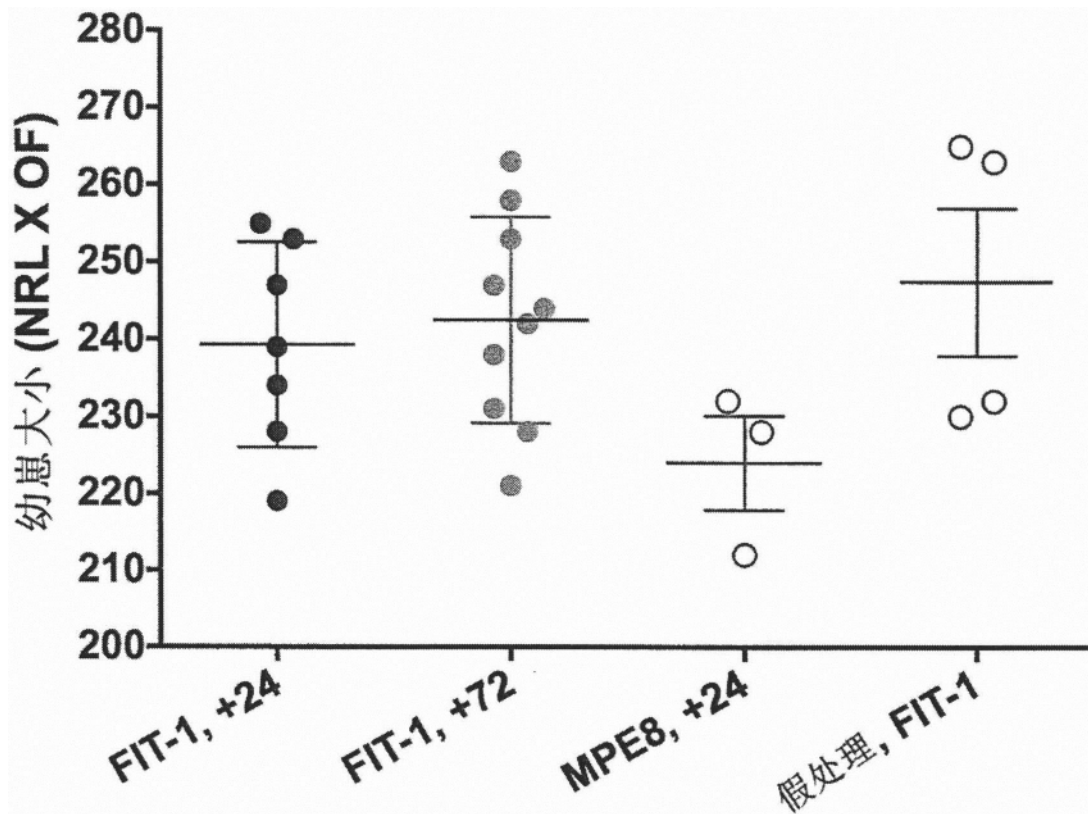


图22

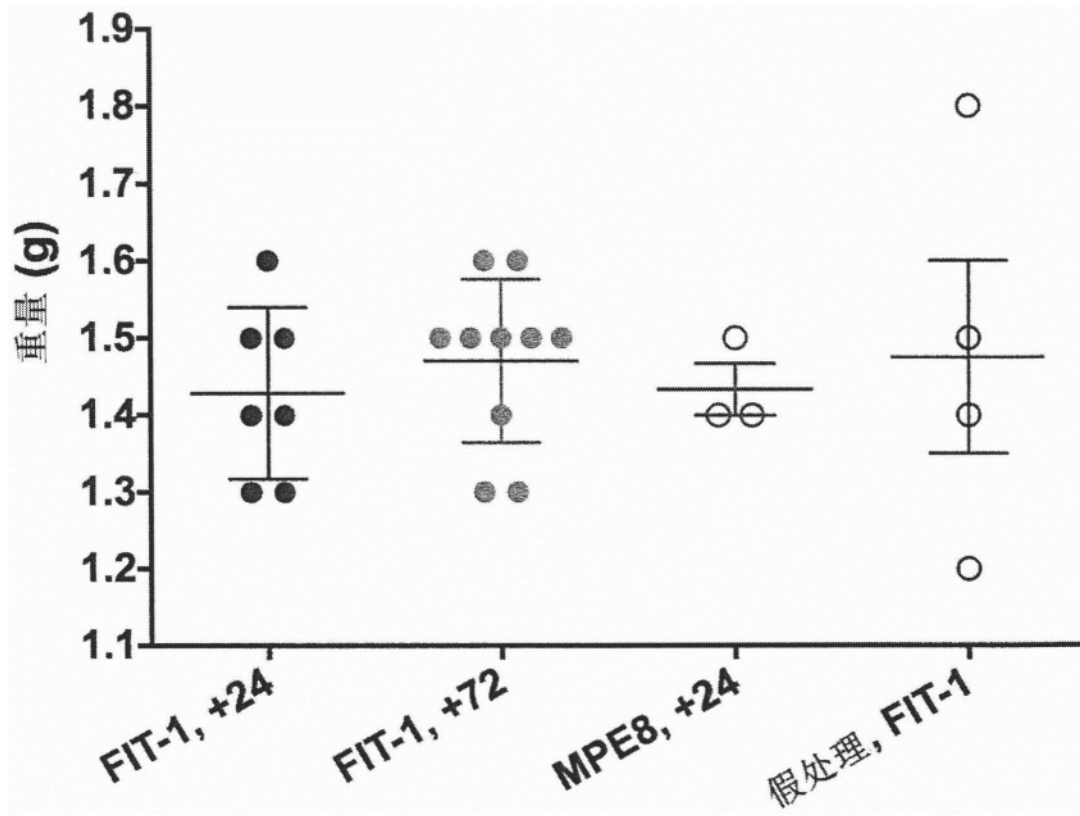


图23

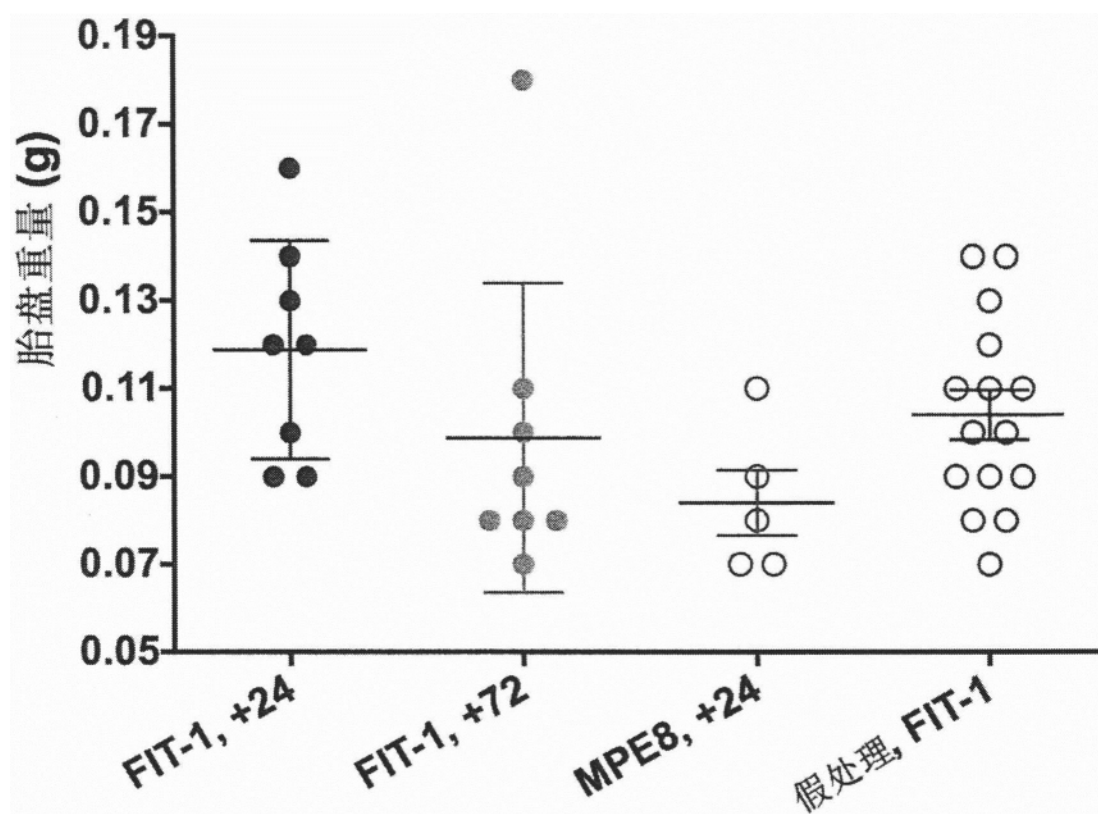


图24

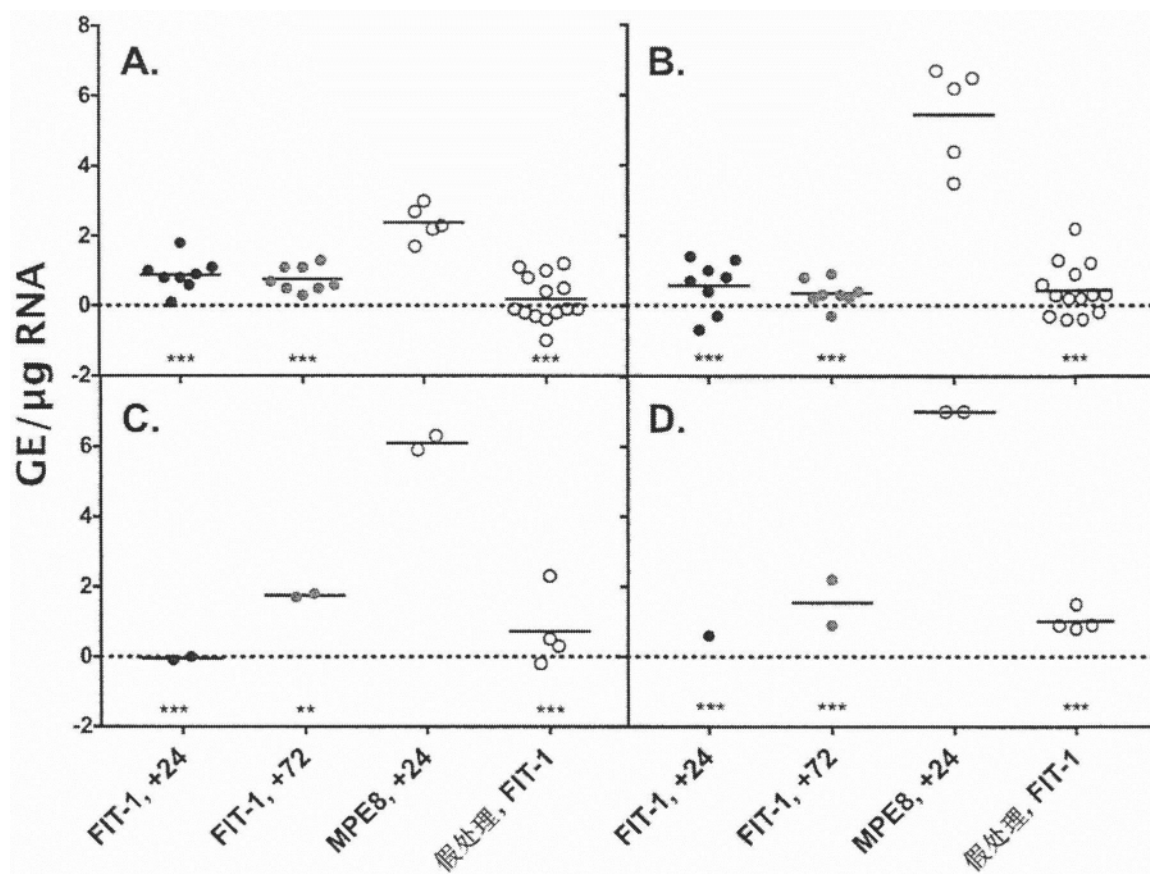


图25

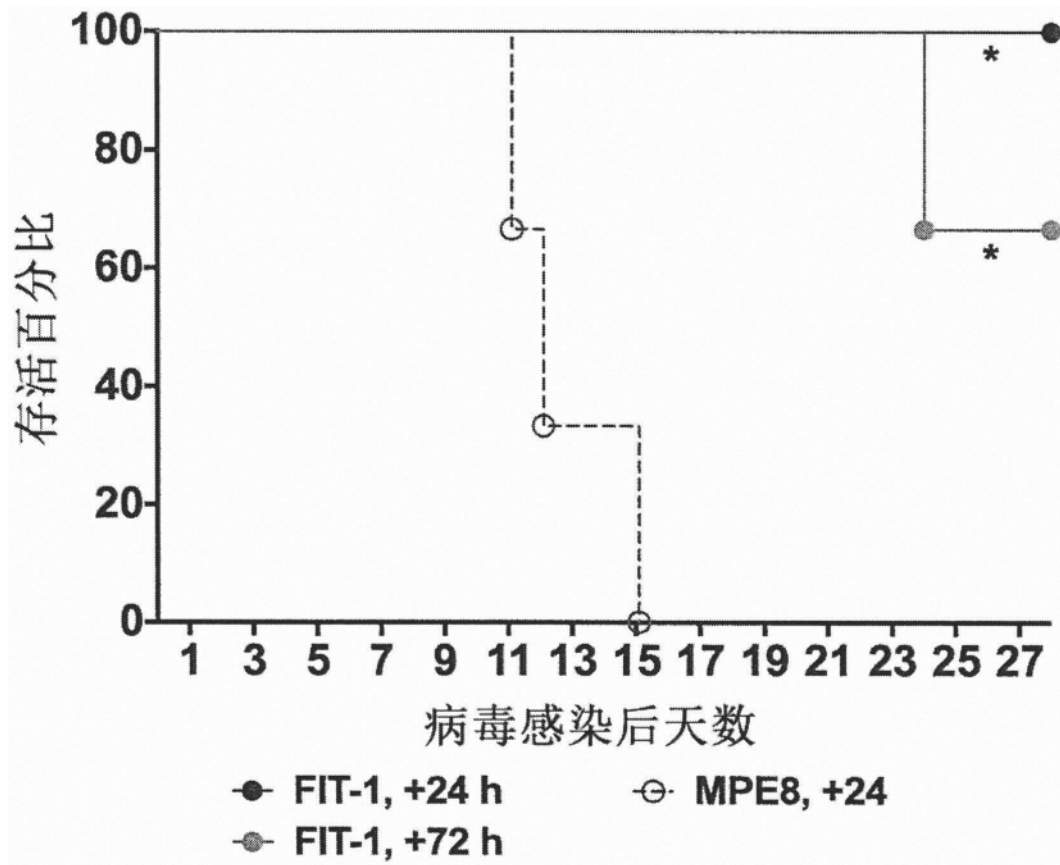


图26

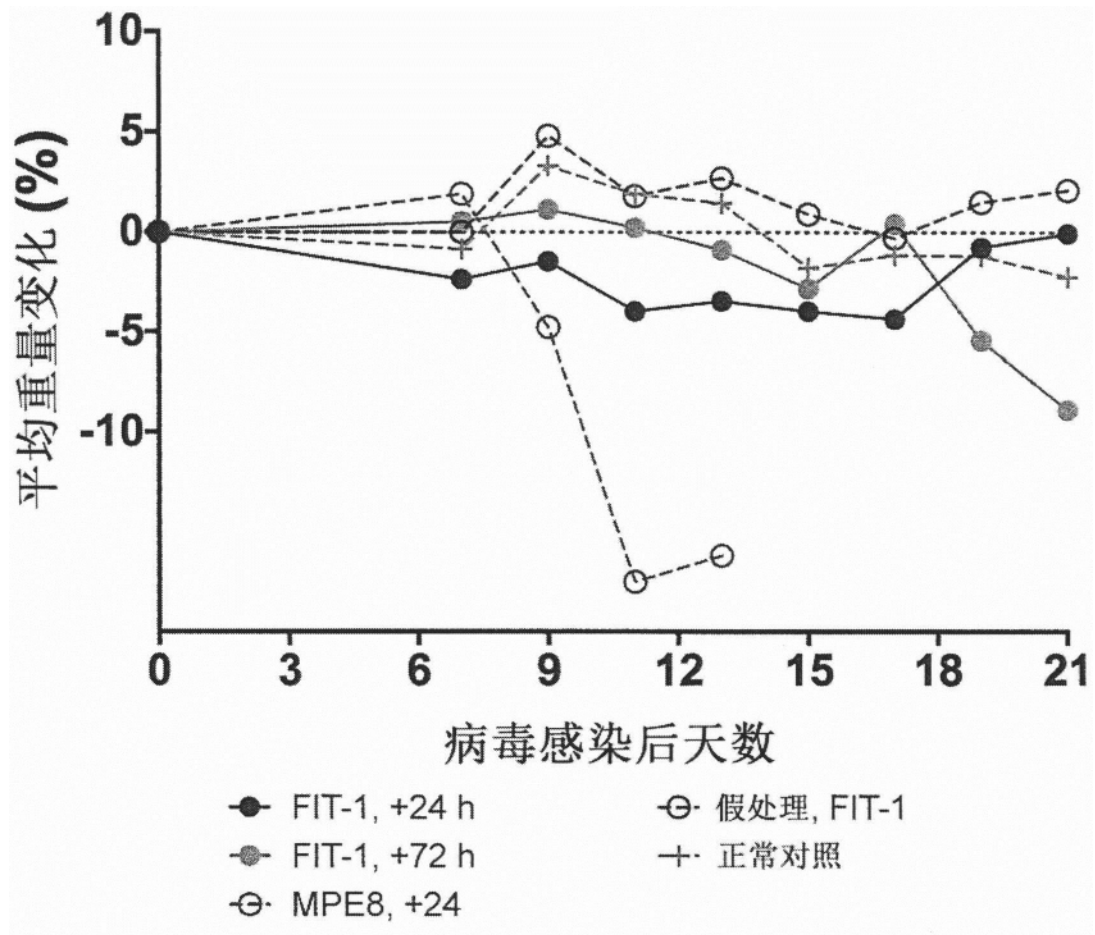


图27

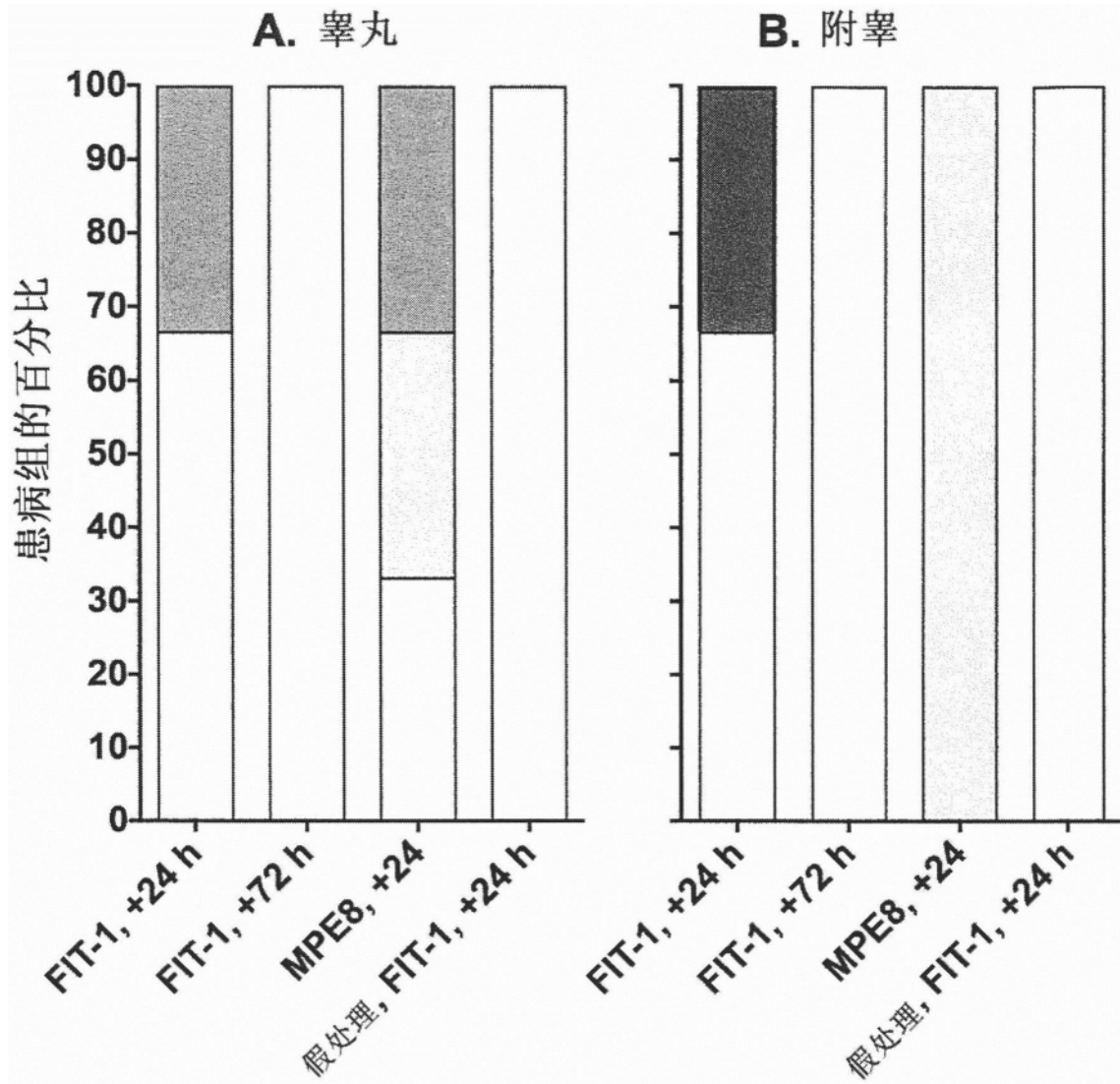


图28

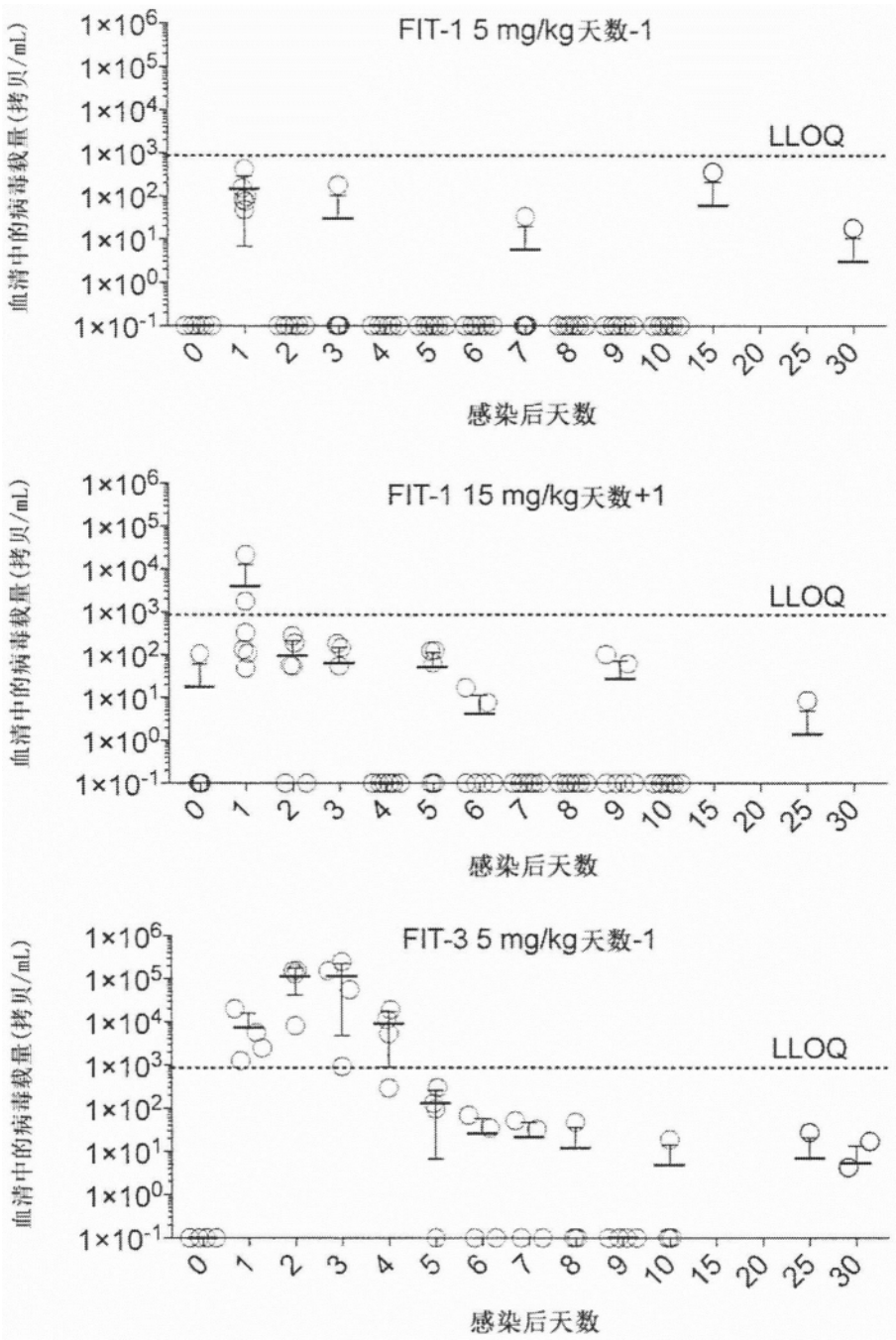


图29