



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779168 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680080738.0

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(22)申请日 2016.12.05

代理人 江侧燕

(30)优先权数据

62/263,618 2015.12.05 US

(51)Int.Cl.

G07K 16/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/057367 2016.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/093985 EN 2017.06.08

(71)申请人 沃迪奥斯大学医院中心

地址 瑞士洛桑

申请人 生物医学研究所

(72)发明人 G·潘塔莱奥 A·兰扎韦基亚

权利要求书4页 说明书37页

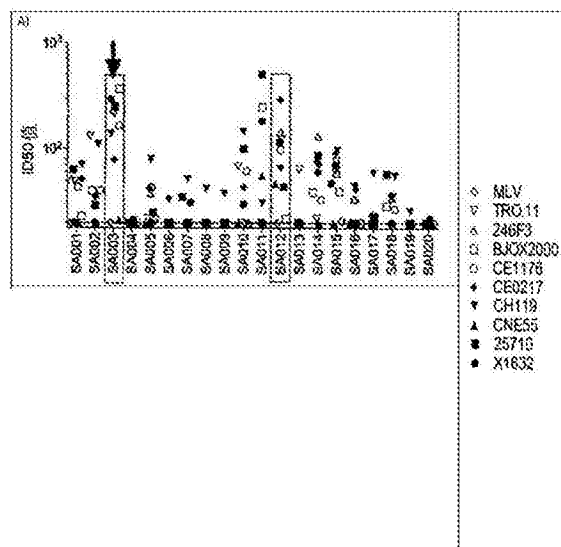
序列表27页 附图24页

(54)发明名称

HIV结合剂

(57)摘要

本公开内容涉及对HIV具有特异性的结合剂以及使用该结合剂来治疗、预防和/或减轻HIV感染和/或AIDS的方法。



1. 一种在体外HIV中和测试中中和HIV和/或在体内中和HIV的结合剂,所述结合剂至少一种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO.1-32组成的组和/或如表1所示。

2. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括至少一种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31和SEQ ID NO.32组成的组。

3. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括:

以下的至少一种:SEQ ID NO.1-6或GNT,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.1-8,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.9和10,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.11和12,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.13和14,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.15和16,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.17和18,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.19和20,或其保守取代的变体;

SEQ ID NO.21和22,或其保守取代的变体;和,

SEQ ID NO.23和24,或其保守取代的变体。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的结合剂,所述结合剂不包括:

包括SEQ ID NO.70或71的可变重链区;

对应于SEQ ID NO.70的22位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.71的23位的氨基酸为色氨酸(W);

SEQ ID NO.72-78中任意一种的CDRH3氨基酸序列;

对应于SEQ ID NO.72的8位的氨基酸为丙氨酸(A);

对应于SEQ ID NO.73的9位的氨基酸为丙氨酸(A);

对应于SEQ ID NO.74的10位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.75的11位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.76的12位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.77的14位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.78的15位的氨基酸为色氨酸(W);

包括SEQ ID NO.79或80的可变轻链区;

对应于SEQ ID NO.79的5位的氨基酸为色氨酸(W);

对应于SEQ ID NO.80的6位的氨基酸为色氨酸(W)。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂对SEQ ID NO.68的氨基酸残基L679、W680和K683和/或SEQ ID NO.69的氨基酸残基L168、W169和K172表现出结合特异性。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂对ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66) 表现出结合特异性。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂对ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66) 而非LASWVKYIQ (SEQ ID NO.65) 和/或ITKWIKYIQ (SEQ ID NO.67) 表现出结合特异性。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂在浓度为 10^2 - $10^0\mu\text{g/ml}$ 或 10^0 - $10^1\mu\text{g/ml}$ 对HIV-1假病毒BJOX (CRF07_BC)、CE1176、TRO.11 (B)、X1632 (G)、CH119 (CRF07_BC)、CNE55 (CRF01_AE)、25710 (C)、CD0217 (C)而非对照病毒SVA-MLV表现出中和性。

9. 根据权利要求8所述的结合剂,其中中和百分数为至少约50%。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂中和图4中列出的118种HIV-1假病毒的大多数, IC_{50} 小于 $25\mu\text{g/ml}$ 。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的结合剂,所述结合剂为分离的单克隆抗体。

12. 根据权利要求11所述的结合剂,其中所述单克隆抗体是人单克隆抗体。

13. 根据权利要求11或12所述的结合剂,其中抗体同种型是IgG1或IgG3。

14. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括至少一个重链CDR氨基酸序列,所述重链CDR氨基酸序列选自由SEQ ID NO.1-3组成的组。

15. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括至少一个轻链CDR氨基酸序列,所述轻链CDR氨基酸序列选自由SEQ ID NO.4-6或GNT组成的组。

16. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括至少一个重链可变氨基酸序列,所述重链可变氨基酸序列选自由SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.21和SEQ ID NO.23组成的组。

17. 根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂包括至少一个轻链可变氨基酸序列,所述轻链可变氨基酸序列选自由SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.22和SEQ ID NO.24组成的组。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的结合剂,所述结合剂包括SEQ ID NO.1-32中的任意一种或多种序列的氨基酸残基的保守取代。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的结合剂,所述结合剂源自人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体和大鼠抗体。

20. 权利要求1-19中任一项的所述的结合剂的衍生物。

21. 根据权利要求21所述的衍生物,其选自由Fab、Fab₂、Fab'单链抗体、Fv、单链、单特异性抗体、双特异性抗体、三聚体抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-小鼠嵌合抗体、包括犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化抗体、CDR-移植抗体、鲨鱼抗体、纳米抗体和骆驼抗体组成的组。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的结合剂或衍生物,其包括至少第一和第二特异性,所述第一特异性针对gp41,而所述第二特异性针对不同的抗原。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的结合剂或其衍生物,其包括可固定地连接于其上的可检测的标记物。

24. 根据权利要求23所述的结合剂,其中所述可检测的标记物选自由荧光素、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素、5-FAM、羧基胺、5-羧基胺(5-HAT)、6-羧基荧光素(6-FAM)、FITC、6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素(TET)、6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',

5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(6-JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor 568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPY荧光探针、BODIPY 492/515、BODIPY 493/503、BODIPY 500/510、BODIPY 505/515、BODIPY 530/550、BODIPY 542/563、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650-X、BODIPY 650/665-X、BODIPY 665/676、FL、FL ATP、F1-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X结合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE、罗丹明、罗丹明110、罗丹明123、罗丹明B、罗丹明B 200、罗丹明BB、罗丹明BG、碱性玫瑰精、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺、丽丝胺罗丹明B、秋酰菌胺、鬼笔碱、玫瑰红、Rhod-2、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、羧基-X-罗丹明(5-ROX)、磺酰罗丹明B can C、磺胺嘧啶、6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、四甲基罗丹明(TRITC)、罗丹明WT、德克萨斯红和/或德克萨斯红-X组成的组。

25. 根据权利要求1-22中任一项所述的结合剂或其衍生物,包括可固定地连接于其上的效应子部分。

26. 根据权利要求25所述的结合剂或衍生物,其中所述效应子部分选自由细胞毒性药物、毒素、白喉A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒素、巴豆毒素、酚霉素、新霉素和放射性化学物质组成的组。

27. 编码权利要求1-22中任一项所述的结合剂的分离的多核苷酸。

28. 根据权利要求24所述的分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包括SEQ ID NO.37-72中的至少一种核酸序列。

29. 一种表达载体,所述表达载体包括权利要求27或28的一种或多种多核苷酸。

30. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包括权利要求27或28所述的分离的多核苷酸和/或权利要求30所述的表达载体。

31. 一种组合物,所述组合物包括至少一种权利要求1-26中任一项所述的结合剂或衍生物;至少一种权利要求27或28所述的分离的多核苷酸;或至少一种权利要求29所述的表达载体;和/或至少一种权利要求30所述的宿主细胞;或其组合,以及药学上可接受的载体。

32. 一种检测细胞上的HIV的方法,所述方法包括使测试生物样品与权利要求1-26中任一项所述的结合剂或衍生物接触,并检测结合剂对所述生物样品或其组分的结合。

33. 根据权利要求32所述的方法,还包括对比与测试生物样品或其组分结合的量与对照生物样品或其组分结合的量,其中相对于对照生物样品或其组分,与测试生物样品或其组分结合的增加表明在测试生物样品中存在表达HIV的细胞。

34. 根据权利要求32或33所述的方法,其中所述测试生物样品是哺乳动物血液。

35. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述方法是体内方法。

36. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述方法是体外方法。

37. 一种用于治疗、预防和/或减轻哺乳动物中HIV感染和/或AIDS的方法,包括向所述哺乳动物施用至少一种有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包括权利要求1-26中任一项所述的结合剂或衍生物。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中向动物施用多次药剂。

39. 根据权利要求37或38所述的方法,其中所述结合剂以约1-50mg/kg的剂量施用。
40. 一种用于检测在细胞中或细胞上HIV表达的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1-26中任一项所述的结合剂或衍生物以及使用说明书。
41. 根据权利要求40所述的试剂盒,其中所述结合剂、抗体或衍生物为冻干形式。

HIV结合剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2015年12月5日提交的美国序列号62/263,618的优先权。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 具有特异性的结合剂、其制备方法以及使用其来治疗和/或预防HIV感染的方法。

背景技术

[0004] 当我们进入艾滋病流行的第四个十年时,在理解HIV发病机制以及有效的和安全的抗病毒药物的开发方面已经取得了重大进展。已经注册登记了30多种抗病毒药物,并且联合抗逆转录病毒疗法(combination antiretroviral therapy) (ART) 对发病率和死亡率的影响非常显著。然而,尽管在对ART具有最佳依从性的患者中实现了HIV复制的长期抑制,但在治疗中断后HIV总是反弹。此外,成功的治疗不诱导或允许能够在不存在ART的情况下控制HIV复制的病毒特异性免疫反应的恢复/发展。因此,绝大多数HIV感染者需要终身ART来控制HIV复制和相关的疾病。

[0005] 过去研究了许多免疫干预措施并且目前正在进行以实现HIV功能性治愈为目的的进一步开发,其中病毒复制受到抑制而无需持续的抗病毒治疗。治疗性疫苗策略一直是研究的主要干预策略,但是除CMV-基载体HIV疫苗(在NHP模型中50%的疗效)外,在实验动物模型和患者中结果显示为中等(modest)的疗效。最新的研究对抗包膜广谱中和抗体(anti-envelope broad neutralizing antibodies) (bNab) 用作HIV感染中的治疗剂的可能性已经产生了感兴趣的结果。

[0006] 本领域需要用于靶向HIV的其他试剂,尤其是中和抗体,以及其使用方法。本公开内容通过提供可用于靶向HIV和由其感染的细胞和/或组织和/或携带其的细胞和/或组织的试剂和方法满足了这些需求。

附图说明

[0007] 下面给出了附图的简要说明。附图旨在更详细地说明本发明。然而,附图并不意在以任何方式限制本发明的主题。

[0008] 图1A-D示出了来自未接受抗逆转录病毒疗法的慢性感染患者的70个血浆样品对来自HIV-1代表菌株全球组(Global Panel)的一组九(9)种HIV-1假病毒的中和结果。MLV假病毒用作阴性对照。加框的7个供体被选择用于收集淋巴结以分离有效的广谱中和抗体。用箭头突出显示供体SA003,其被选择用于分离本发明所述的广谱中和抗体。ID50值表示能够中和50%病毒感染的血浆的稀释度。

[0009] 图2示出了用于从淋巴结样品纯化记忆和生发中心IgG⁺ B细胞的设门(gating)和分选(sorting)策略。选择用于表达表面标记物CD19的B细胞,以及阴性选择用于缺乏IgA和IgM B细胞受体(BCR)表达的IgG⁺ B细胞。进一步选择生发中心B细胞用于表达CD38标记物

(其在记忆B细胞上不存在)。

[0010] 图3A-B示出了不同浓度($\mu\text{g/ml}$)的单克隆抗体LN01对来自HIV-1代表菌株全球组的一组九(9)种HIV-1假病毒(MLV作为阴性对照)的中和结果。 IC_{50} 值表示能够中和50%病毒感染的单克隆抗体的浓度。误差棒表示复份的标准偏差。

[0011] 图4示出了单克隆抗体LN01对多进化枝组的118种HIV-1假病毒的中和结果。 IC_{50} 值表示能够中和50%病毒感染的单克隆抗体的浓度。

[0012] 图5A-J示出了在图4中所描述的整组118种病毒和单独进化枝或循环重组形式的 IC_{50} 值的分布。

[0013] 图6示出了当使用T₂M-b1或表达Fc γ 受体I的T₂M-b1时,单克隆抗体LN01对来自HIV-1代表菌株全球组的一组九(9)种HIV-1假病毒的中和结果。

[0014] 图7示出了一组七(7)种HIV-2/HIV-1嵌合假病毒的中和结果,在HIV-2/HIV-1嵌合假病毒中,通过引入来自进化枝B或进化枝C(在变体7312A.C1C的情况下)HIV-1菌株的MPER共有序列的对应残基而诱变HIV-2(菌株7312A)MPER区域。

[0015] 图8A-D示出了LN01或7B2单克隆抗体与1423个15-mer肽(15-mer peptide)的阵列的结合,15-mer肽由12个氨基酸重叠,涵盖了用于进化枝A、B、C、D、组M、CRF01_AE和CRF02_AG的共有HIV-1 Env gp160序列的全长。信号低于 $2.0\text{E}+4$ 评分为负值。如预期,7B2与gp41免疫显性区域(gp41 ID)反应。

[0016] 图9A-D示出了在存在或不存在可溶性CD4(sCD4)的情况下,通过表面等离子体共振评估的LN01、PGT145、PGT151和17B单克隆抗体与切割的可溶性HIV-1 Env三聚体BG505 SOSIP.664 gp140的结合,切割的可溶性HIV-1 Env三聚体BG505 SOSIP.664 gp140表达广谱中和的多个表位。如预期的,在存在和不存在sCD4的情况下,PGT145(V1-V2聚糖特异性)和PGT151(与gp120和gp41界面处的位点结合)以高亲和力结合BG505 SOSIP.664 gp140,而17b(与CD4结合诱导的位点结合)仅在存在sCD4的情况下结合BG505 SOSIP.664 gp140。

[0017] 图10A-B示出了通过ELISA测量的LN01和10E8(MPER特异性广谱中和抗体)抗体与一组HIV-1 Env抗原和阴性对照(Ctr)抗原的结合。10E8抗体与含有MPER区域的gp41的重组外功能区(ecto-domain)反应。

[0018] 图11A-B示出了通过ELISA测量的LN01和10E8单克隆抗体与融合中间体gp41(gp41int)或作为阴性对照(PBS)的未包覆板(uncoated plate)的结合。10E8抗体与含有MPER区域的gp41反应。

[0019] 图12示出了mAb 10E8与gp41肽RRRNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRRRR(SEQ ID NO.89)的结合。

[0020] 图13A-C示出了LN01抗体点突变变体的效力。A.LN01VH和VL变体;B.LN01变体的 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$);C. IC_{50} 比率($\text{IC}_{50}\text{LN01wt}/\text{IC}_{50}\text{LN01变体}$ (“var.”))。

[0021] 图14A-K示出了平行测试LN01变体7、8和38以及亲本LN01抗体对多进化枝组的8种病毒的中和。A-I.中和百分数(%) ;J. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ;K. IC_{50} 比率($\text{IC}_{50}\text{LN01wt}/\text{IC}_{50}\text{LN01变体}$ (“var.”))。

[0022] 图15A-B示出了测试LN01变体41、42、43、44、48和50对多进化枝组的7种病毒的中和。A. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ;B. IC_{50} 比率($\text{IC}_{50}\text{LN01wt}/\text{IC}_{50}\text{LN01变体}$ (“var.”))。

[0023] 图16A-B示出了测试LN01变体49对一组7种病毒的中和。A. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ;B. IC_{50} 比

率($IC_{50}LN01wt/IC_{50}LN01$ 变体(“var.”))。

[0024] 图17示出了测试LN01变体82(IC_{50} ($\mu g/ml$))。

发明内容

[0025] 本公开内容涉及对人类免疫缺陷病毒(HIV)具有特异性的结合剂,制备这种结合剂的方法以及使用这种结合剂治疗、预防和/或减轻HIV感染的方法。

具体实施方式

[0026] 本公开内容涉及对人类免疫缺陷病毒(HIV)具有结合亲和力的结合剂。在一些实施例中,结合剂在体外和/或体内可以结合病毒颗粒本身上或细胞表面上的HIV抗原。通常在体外,结合剂也可以结合分离的HIV抗原和/或其片段和/或衍生物。还提供了使用这种结合剂来诊断、治疗、预防和/或减轻一种或多种与HIV相关的疾病的方法。例如,结合剂可以是抗体(例如单克隆抗体),该抗体可以与HIV的表位或其多肽反应和/或结合。结合剂对治疗由HIV引起的疾病是有用的,例如获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。在一些实施例中,本文所述的结合剂可以选择性地靶向和/或消除HIV和/或HIV感染的细胞(HIV感染的细胞含有HIV(例如,有复制能力的HIV))和/或其表达蛋白。在一些实施例中,这种细胞可以是有复制能力的HIV的储存器。在一些实施例中,具有例如不同的特异性(例如,识别不同的表位)的结合剂可以与HIV活性(例如感染、复制和/或扩散至其他细胞)结合。在一些实施例中,本文所述的结合剂还可以选择性地消除和/或抑制HIV或HIV表达细胞。在一些实施例中,本文所述的结合剂可以用于抑制和/或消除HIV和/或HIV表达细胞以治疗例如HIV感染和/或AIDS。以下描述其他实施例、用途等。

[0027] 结合剂可以是抗体,例如单克隆抗体。如本文的实例所示,以下讨论的技术已经用于鉴定命名为“LN01”的全人mAb,其具有本文所述和实例所示的特定特征。分离了LN01抗体并确定了所述抗体的可变重链(V_H)和轻链(V_L)结构域的氨基酸序列。可以通过参考对应于其变异性和/或互补决定区域(complementarity determining regions) (“CDR”)的氨基酸和/或核酸序列来鉴定结合剂(例如LN01)。CDR包括可变区内的氨基酸残基,根据Kabat、Chothia的定义、Kabat和Chothia的积累、AbM、接触和/或构象定义(conformational definition)或任何本领域已知的CDR测定方法鉴定。抗体建模软件(现在为Accelrys®)或基于观察的抗体接触的CDR的“接触定义(contact definition)”由MacCallum等人(1996, J.Mol.Biol., 262:732-745)描述。在CDR的“构象定义”中,CDR的位置可以鉴定为对抗原结合产生焓(enthalpic)贡献的残基(Makabe等人,2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166)。其他的CDR分界定义可以不严格遵循上述方法之一,但是可以与至少一部分Kabat CDR重叠,尽管鉴于预测或实验发现特定残基或残基组或甚至整个CDR不明显影响抗原结合,它们可缩短或延长。本文所用的CDR可以指通过本领域已知的任何方法(包括这些方法的组合)定义的CDR。本文使用的方法可以利用根据任何这些方法定义的CDR。对于任何给定的包括多于一个CDR的实施例,CDR可以根据Kabat、Chothia、延伸(extended)、AbM、接触和/或构象定义来定义。

[0028] 下表1中示出了LN01及其某些示例性变体的重链CDR(CDRH1、CDRH2、CDRH3)、轻链CDR(CDRL1、CDRL2(和CDRL2长)、CDRL3)、 V_H 和 V_L 结构域的氨基酸序列。

[0029] 表1

LN01区域	SEQ ID NO.	氨基酸序列 (单字母代码)
LN01 CDRH1	1	GDSVSNDNYY
LN01 CDRH2	2	IYYSGTT
LN01 CDRH3	3	VRMP SHGFWSTSFSYWFYDL
LN01 CDRL1	4	QSVTKY
LN01 CDRL2	-	GTY
LN01 CDRL2 (长)	5	LIYGTYTLL
LN01 CDRL3	6	QQAHSPTWT
LN01可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	7	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNDN YYWAWIRQTPGRELOVIGTIYYSGTTYYNPSLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFSYWFYDLWGRGHFVAVSW
LN01可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGOAPRILYGTYTLLSGVSPRFSGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQGT HVAAN
LN01变体7 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	9	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNDN NYYWAWIRQTPGRELOVIGTIYYSGTTYYNPSLR NRVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCVRM PSHGFWSTSFSYWFYDLWGRGHFVAVSW
LN01变体7 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2 (和 CDRL3带下划线)	10	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGOAPRILYGTYTLLSGVSPRFSGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQGT HVAAN
LN01变体8 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	11	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSND WYYWAWIRQTPGRELOVIGTIYYSGTTYYNPSLR NRVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCVRM PSHGFWSTSFSYWFYDLWGRGHFVAVSW
LN01变体8 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	12	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGOAPRILYGTYTLLSGVSPRFSGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQGT HVAAN
LN01变体38 可变重链 (V _H)	13	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNDN YYWAWIRQTPGRELOVIGTIYYSGTTYYNPSLRN

[0031]

(CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)		<u>RVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRMP</u> <u>SHGFWSTSFSYWYFDLWGRGHFVAVSW</u>
LN01变体38 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和CDRL3带下划线)	14	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGWG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGGGT HVAAN
LN01变体41 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)	15	EVQLVESGPGVLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNFN YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYNP SLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFSYWYFDLWGRGHFVAVSW
LN01变体41 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和CDRL3带下划线)	16	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGGGT HVAAN
LN01变体42 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)	17	EVQLVESGPGVLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNYN YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYNP SLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFSYWYFDLWGRGHFVAVSW
LN01变体42 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和CDRL3带下划线)	18	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGGGT HVAAN
LN01变体48 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)	19	QLQLQESGPGVLVQPKSETLSLTCTVSGDSVSNWN YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYNP SLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFSYWYFDLWGRGTLTVSS
LN01变体48 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和CDRL3带下划线)	20	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGGGT HVAAN
LN01变体49 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)	21	EVQLVESGPGVLVQPWGTLSTLCRVSGDSVSNW WYYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYNP SLR NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRM PSHGFWSTSFSYWYFDLWGRGHFVAVSW
LN01变体49 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和CDRL3带下划线)	22	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGSG SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGGGT HVAAN
LN01变体82 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和CDRH3带下划线)	23	QVQLEESGPGVLVQPWGTLSTLCRVSGGSISSSS YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYNP SLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGVSVAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFSYWYFDLWGRGHFVAVSW
LN01变体82 可变轻链 (V _L)	24	DIQMTQSPSSLSASVGDGVITITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRIIYGTITLLSGVSPRFGAGSG

[0032]

(CDRL1, CDRL2和 CDRL3带下划线)		SLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSIPWTFGQGT HVAAN
LN01变体7和48 可变重链 (V _H) CDRH1	25	GDSVSNWNY
LN01变体8 可变重链 (V _H) CDRH1	26	GDSVSNWY
LN01变体41 可变重链 (V _H) CDRH1	27	GDSVSNFNYY
LN01变体42 可变重链 (V _H) CDRH1	28	GDSVSNYNY
LN01变体43 可变重链 (V _H) CDRH1	29	GDSVSNLNY
LN01变体44 可变重链 (V _H) CDRH1	30	GDSVSNINY
LN01变体49 可变重链 (V _H) CDRH1	31	GDSVSNWWY
LN01变体82 可变重链 (V _H) CDRH1	32	GSISSSSY

[0033] 本公开内容的结合剂可以包括,例如表1中所示的任意一种或多种氨基酸序列(即,SEQ ID NO.1-32或GTY(LN01 CDRL2)中的任意一种或多种)。也公开了其片段和/或衍生物(例如包括取代的氨基酸,如保守取代)。例如, LN01抗体(IgG3抗体)的示例性衍生物命名为“IgG1 LN01”,其中LN01可变区被克隆到IgG1骨架中。然后,在一些实施例中,本公开内容的结合剂可以包括SEQ ID NO.1-32中的一种或多种(即,1、2、3、4、5、6或7种)。在一些实施例中,优选地,结合剂包括SEQ ID NO.1-6和或GTY(LN01 CDRL2)中的每一种。在一些实施例中,这种结合剂可以包括SEQ ID NO.7和/或SEQ ID NO.8;SEQ NO.9和/或10;SEQ NO.11和/或12;SEQ NO.13和/或14;SEQ NO.15和/或16;SEQ NO.17和/或18;SEQ NO.19和/或20;SEQ NO.21和/或22;或SEQ NO.23和/或24;或其保守取代的变体。在优选的实施例中,结合剂包括SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8;SEQ NO.9和10;SEQ NO.11和12;SEQ NO.13和14;SEQ NO.15和16;SEQ NO.17和18;SEQ NO.19和20;SEQ NO.21和22;或SEQ NO.23和24;或其保守取代的变体。在一些实施例中,结合剂可以包括SEQ ID NO.1-32中的任意一种,所述SEQ ID NO.1-32包括一个或多个氨基酸取代,特别是保守取代(参见例如表2)。SEQ ID NO.:1(LN01 CDR H1)的示例性变体包括,例如SEQ ID NO.25-32中的任意一种。在一些实施例中,结合剂可以是单克隆抗体或其片段或衍生物。在一些实施例中,结合剂可以是这种单克隆抗体的HIV结合片段。这样的实施例通常包括SEQ ID NO.1-32中的至少一种或多种,并且优选地包括SEQ ID NO.1-6(或GTY(LN01 CDRL2)中的每一种,例如SEQ ID NO.7-8、SEQ ID NO.25(LN01变体7和48CDR H1)、SEQ ID NO.26(LN01变体8CDR H1)、SEQ ID NO.27(LN01变体41 CDR H1)、SEQ ID NO.28(LN01变体42 CDR H1)、SEQ ID NO.29(LN01变体43 CDR H1)、SEQ ID NO.30(LN01变体44CDR H1)、SEQ ID NO.31(LN01变体49, LN01变体7 CDR H1和LN01变体8 CDR H1的组合)或SEQ ID NO.32(LN01变体82 CDR H1)。在一些实施例中,有益的是避免变体包括可变重链区,该变重链区包括SEQ ID NO.70或71(分别是LN01变体13和14)、对应

于SEQ ID NO.70 (LN01变体13) 22位的氨基酸为色氨酸(W)、对应于SEQ ID NO.71 (LN01变体14) 23位的氨基酸为色氨酸(W)、SEQ ID NO.72-78 (分别为LN01变体18-24) 任意一种的CDRH3氨基酸序列、对应于SEQ ID NO.72 (LN01变体18) 8位的氨基酸为丙氨酸(A)、对应于SEQ ID NO.73 (LN01变体19) 9位的氨基酸为丙氨酸(A)、对应于SEQ ID NO.74 (LN01变体20) 10位的氨基酸为色氨酸(W)、对应于SEQ ID NO.75 (LN01变体21) 11位的氨基酸为色氨酸(W)、对应于SEQ ID NO.76 (LN01变体22) 12位的氨基酸是色氨酸(W)、对应于SEQ ID NO.77 (LN01变体23) 14位的氨基酸是色氨酸(W)、对应于SEQ ID NO.78 (LN01变体24) 15位的氨基酸是色氨酸(W);避免变体包括可变轻链区,该可变轻链区包括SEQ ID NO.79或80 (分别为LN01变体32和33)、对应于SEQ ID NO.79 (LN01变体32) 5位的氨基酸为色氨酸(W)和/或对应于SEQ ID NO.80 (LN01变体33) 6位的氨基酸为色氨酸(W),因为这些可能不会提供合适的HIV中和活性。因此,在一些实施例中,结合剂可以包括SEQ ID NO.1-32中的任意一种,但不包括SEQ ID NO.70-80中的一种或多种。本领域技术人员根据本公开内容可以得出其他合适的实施例。

[0034] 优选地,结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)包括一个或多个与SEQ ID NO.1-32(即,表1所示的CDR序列、VH序列和/或VL序列)中的至少一种具有至少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。在一些实施例中,该同一性百分数是相对于至少3个氨基酸(例如,如在LN01 CDRL2的GTY中)、6个氨基酸(例如,在LN01 CDRL1 (SEQ ID NO.:4)中)、7个氨基酸(例如,在LN01 CDRH2 (SEQ ID NO.:2)中)、9个氨基酸(例如,在LN01 CDRL2 (长)、(SEQ ID NO.:5)、LN01 CDRL3 (SEQ ID NO.:6)、LN01变体82 CDRH1 (SEQ ID NO.32)中)、10个氨基酸(例如,在LN01 CDRH1 (SEQ ID NO.:1)或SEQ ID NO.25-31中的任意一种中)或20个氨基酸(例如,在LN01 CDRH3 (SEQ ID NO.:3)中)的氨基酸序列。如下文所讨论的,小于100%的同一性可能是由于其他氨基酸天然或合成取代一个或多个氨基酸造成的,如在保守取代中(参见例如表2)。SEQ ID NO.1-32的各种组合可能是有用的,本领域技术人员可以使用本文所述的技术或本领域技术人员可以利用的其他方式来确定。在优选的实施例中,结合剂结合HIV和/或被HIV感染和/或表达HIV蛋白的细胞。在一些特别优选的实施例中,如本文所述,结合剂中和HIV。在优选的实施例中,结合剂结合HIV和/或被HIV感染和/或表达HIV蛋白的细胞并中和HIV。

[0035] 可以将可变区和/或CDR序列(例如表1中的)与本领域技术人员可以利用的一种或多种其他可变区/CDR氨基酸序列组合使用。这种可变区/CDR氨基酸序列可以可选地和/或也可以与抗体分子的一种或多种类型的恒定区多肽邻接。例如,表1中所示的CDR氨基酸序列可以与相同或不同物种(例如人、山羊、大鼠、绵羊、鸡)的任何抗体分子的恒定区和/或该CDR氨基酸序列所来源的抗体亚型的恒定区邻接或结合。例如,示例性结合剂可以是或可以来自于这样的结合剂,该结合剂与另一结合剂具有大致相同的中和活性和/或结合相同或相似的表位和/或表现出大致相同的亲和力,所述另一结合剂包括表1中所示的一种或多种氨基酸序列(例如LN01和IgG1 LN01)。结合剂可以包括抗体重链和/或轻链,抗体重链和/或轻链各自包括一个或多个恒定和/或可变区。本文所述的任何氨基酸序列(例如,如表1中的)和/或其任何片段和/或衍生物也可以与任何其他可变区和/或CDR以任何顺序和/或组合来组合以形成新的结合剂,例如杂交和/或融合结合剂,和/或使用标准技术插入到其他

重链和/或轻链可变区中。

[0036] 本公开内容还提供了这种结合剂用于分离、鉴定和/或靶向HIV和/或携带HIV的细胞和/或被HIV感染和/或表达HIV抗原的细胞。在一些实施例中,这种结合剂对HIV抗原(例如在细胞表面上表达的蛋白质)具有反应性。在一些实施例中,结合剂是抗体。术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”是指未纯化或部分纯化形式(例如杂交瘤上清液、腹水、多克隆抗血清)或纯化形式的完整或片段化抗体。抗体可以有任何合适的来源或形式,包括例如鼠(例如由鼠杂交瘤细胞产生),或表达为人源化抗体、嵌合抗体、人抗体等。例如,抗体可以完全地或部分地来源于人(例如IgG(IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1和IgA2)、IgD和IgE)、犬(例如IgGA、IgGB、IgGC、IgGD)、鸡(例如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY)、山羊(例如IgG)、小鼠(例如IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、猪(例如IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)和/或大鼠(例如IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)抗体。制备、使用和储存各种类型的抗体的方法是本领域技术人员已知的,并且适用于实施本发明(参见,例如Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow等人, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No.1, 1998; Kohler和Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992); Verhoeyen等人, (*Science*, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom等人, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); Marks等人, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995) 以及美国专利号4,816,567、5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016)。在某些应用中,抗体可以包含在杂交瘤上清液或腹水中,并且可以就这样直接使用或使用标准技术浓缩后使用。在其他应用中,可以使用例如盐析(salt fractionation)和离子交换色谱或亲和色谱(使用蛋白A、蛋白G、蛋白A/G和/或蛋白L配体共价偶联至固体支撑物,例如琼脂糖珠)或这些技术的组合来进一步纯化抗体。抗体可以以任何合适的形式储存,包括以冷冻制剂(例如-20℃或-70℃)、冻干形式或在常规冷藏条件下(例如4℃)。例如,当以液体形式储存时,优选地使用合适的缓冲液,例如Tris-缓冲盐水(TBS)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些实施例中,结合剂可以制备成注射制剂,例如悬浮于无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中。可以使用合适的媒介和溶剂,包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、TBS和/或PBS等等。这样的制剂可以适于体外或体内使用,可以通过本领域已知的方法制备并且准确的剂型可取决于具体应用。

[0037] 然而,本文所述的结合剂不以任何方式限于抗体(即,完整的抗体)。例如,结合剂可以是与另一结合剂表现出相似的结合特性的任何化合物(例如模拟物)。例如,示例性结合剂可以是结合HIV和/或能够与对HIV具有特异性的另一结合剂(例如单克隆抗体,如LN01)竞争的结合剂。在一些实施例中,在结合性试验(binding assay)中,模拟物可以表现出与其所比较的结合剂(例如单克隆抗体)基本相同的亲和力。可以通过任何合适的试验来测量特定结合剂的亲和力,包括但不限于细胞表面HIV抗原(例如多肽)的FACS染色。可以说

一种结合剂与另一种结合剂具有“基本相同的亲和力”，其中测量值(例如nm)在彼此的约1-20、1-5、5-10、10-15或15-20%中的任何一个之内。示例性模拟物可以包括，例如特异性结合HIV的有机化合物，或affibody(Nygren等人,FEBS J.275(11):2668-76(2008))、affilin(Ebersbach等人,J.Mol.Biol.372(1):172-85(2007))、affitin(Krehenbrink等人,J.Mol.Biol.383(5):1058-68(2008))、anticalin(Skerra,A.FEBS J.275(11):2677-83(2008))、avimer(Silverman等人,Nat.Biotechnol.23(12):1556-61(2005))、DARPin(Stumpp等人,Drug Discov.Today 13(15-16):695-701(2008))、Fynomer(Grabulovski等人,J.Biol.Chem.282(5):3196-3204(2007))、Kunitz结构域肽(Nixon等人,Curr.Opin.Drug Discov.Devel.9(2):261-8(2006))和/或单体(monobody)(Koide等人,Methods Mol.Biol.352:95-109(2007))。其他模拟物可以包括，例如抗体的衍生物，例如Fab、Fab₂、Fab'单链抗体、Fv、单结构域抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-小鼠嵌合抗体、包含犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化的CDR移植抗体(即，包括表1所示的SEQ ID NO.1-32的任意一种)、鲨鱼抗体、纳米抗体、骆驼(camelid)抗体、微体和/或内体，或其衍生物。本文还提供了本领域技术人员理解的其他结合剂。

[0038] 可以使用本领域技术人员已知的任何方法来产生对HIV具有(例如结合)特异性的结合剂。例如，为了产生和分离单克隆抗体，对动物(例如小鼠)施用(例如免疫)一种或多种HIV蛋白。然后可以选择对活化的人T淋巴细胞上表达的HIV表现出血清反应性的动物(例如通过流式细胞术和/或显微镜检测)以产生抗-HIV杂交瘤细胞系。这可重复多轮。筛选还可以包括，例如亲和力结合和/或功能表征，以将结合剂鉴定为对HIV具有特异性。在一些实施例中，例如在本文的实例中，可以筛选人来表达抗-HIV抗体。在一些实施例中，可以筛选被HIV感染的人的血浆样品以鉴定表达抗-HIV抗体(尤其是中和抗体)的人。然后可以分离这些人的中和抗体产生细胞，随后分离和表征由此产生的抗体(例如，如在本文的实例中)。中和抗体可以是表现出中和或抑制HIV对细胞的感染的能力的抗体。通常，中和测试通常通过病毒与特异性抗体的反应来测量病毒的感染性的丧失。通常，通过结合抗体干扰任何病毒复制步骤(包括但不限于结合靶细胞、进入和/或病毒释放)导致感染性丧失。在预定的时间(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12或14天)后，使用本领域技术人员可利用的任何系统(例如，基于荧光素酶的系统)测量靶细胞的感染来检测未中和的病毒的存在。中和测试的非限制性实例可以包括，将给定量的病毒或假病毒(参见下文)与不同浓度的测试或对照(通常分别测试阳性和阴性对照)抗体在适当的条件下(例如，在室温下1小时)混合，然后接种到合适的靶细胞培养物(例如TZM-b1细胞)中。例如，在埃-巴二氏病毒(Epstein-BarrVirus)(EBV)(其也刺激多克隆记忆B细胞)、生长因子的混合物(例如，TLR9激动剂CpG-2006、IL-2(1000IU/ml)、IL-6(10ng/ml)、IL-21(10ng/ml))和抗-B细胞受体(BCR)山羊抗体(触发BCR)存在下，通过将结合剂产生细胞(例如产生抗体的B细胞)以单细胞微培养物接种到分开的板上的人饲养细胞上来测试结合剂产生细胞产生的HIV-1中和抗体。在适当的时间(例如14天)后，可以在基于初级荧光素酶筛选系统中，使用高效感染这些细胞的两种或多种代表性HIV-1病毒或假病毒来测试这样的培养物的上清液。可以将假病毒与B细胞培养物上清液孵育适当的时间和温度(例如，在37%(5%CO₂)下进行1小时)，然后加入宿主细胞(例如，3000TZM-b1细胞)。孵育适当的时间(例如72小时)后，移出上清液并加入SteadyLight试剂

(Perkin Elmer) (例如15 μ l)。然后可以在Synergy微孔板光度计(Synergy microplate luminometer) (BioTek) 上测定荧光素酶活性(例如5分钟后)。相对于阴性对照,荧光素酶活性降低通常表明病毒中和。中和测试,例如适用于分析本公开内容的结合剂的这些测试,是本领域已知的(参见例如Montefiori, D.C., Curr. Protocol. Immunol. 第12章, 第12.11单元(2005); Edmonds等人, Virology, 408 (1): 1-13 (2010); Seaman等人, J. Virol. 84 (3): 1439-1452 (2010); Pace等人, PNAS USA, 110 (33): 13540-13545 (2013))。在一些实施例中,可以筛选测试样品中是否存在能够中和一组HIV假病毒(例如,来自HIV-1代表菌株全球组的9种HIV-1假病毒,如本文实例中所进行的(那些假病毒是BJOX (CRF007_BC)、CE1176 (C)、TR0.11 (B)、X1632 (G)、CH119 (CRF07_BC)、CNE55 (CRF01_AE)、25710 (C)、246F3 (AC)、CE0217 (C)); DeCamp, A.等人, Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. J Virol 88, 2489-2507 (2014))的抗体。也可以测试更大组的假病毒的中和作用,例如, de Camp等人描述了一组12种假病毒(也称为HIV-1 Env代表菌株): 398F1、25710、CNE8、TR011、X2278、BJOX2000、X1632、CE1176、246F3、CH119、CE0217和CNE55。在一些实施例中,可以测试一组10种HIV分离物,并且BNA可以被鉴定为中和一组9种假病毒的6个、7个、8个、9个成员;或一组12种假病毒中的6、7、8、9、10、11或12个成员。也可以对更大组这样的假病毒进行筛选(例如,本文实例中的一组118种假病毒)。示例性一组118种假病毒,其在实例中可检测测试样品的中和抗体,可以包括例如图4中所示的那些(包括进化枝A、进化枝B、进化枝C、进化枝D、进化枝G,循环重组形式CRF10_CD、CRF01_AE、CRF02_AG和CRF07_BC,以及非循环重组AC和ACD菌株)。在一些实施例中,测试能够中和约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的病毒感染的单克隆抗体的浓度(例如, μ g/ml)来确定中和性(“IC₅₀”值)。在一些实施例中,如果结合剂能够以例如约 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、 10^0 、 10^1 、 10^2 或 10^3 μ g/ml的浓度中和50%的病毒感染,则认为结合剂是中和性的(图3所示的IC₅₀值)。在一些实施例中,如在本文的实例中,优选地IC₅₀值低于25 μ g/ml,甚至更优选地低于约15、10、5、2、1、0.5、0.25、0.1、0.05或0.01 μ g/ml。在优选的实施例中,对于本文所述的LN01抗体,IC₅₀值可以小于0.011(例如图7)。在一些实施例中,中和抗体中和病毒感染的能力也可以表示为中和百分比(例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%(例如图3所示))。本领域技术人员可以确定同样适合的其他的中和测试。

[0039] 在一些实施例中,本文所述的结合剂可以是从小HIV感染者获得的生物样品(例如血浆)中鉴定的广谱中和抗体(BNA)。如上所述并且如本文的实例所示,可以通过测试HIV慢性感染患者(优选那些未接受抗逆转录病毒疗法的患者)的血浆样品来鉴定这些BNA中和多进化枝HIV分离物的能力(例如,最初使用9或12个成员组然后是更大组(例如,118个成员)的假病毒)。在一些实施例中,样品可以来源于已知为“精英控制者(Elite Controllers)”的患者,其病毒血(viremia) < 50 HIV RNA拷贝/ml血浆。筛选步骤(例如这些)可以鉴定可以作为淋巴结供体的患者,用于随后分离和鉴定产生BNA的B细胞。在进行这种筛选测试时,通常将中和活性与阴性对照(例如鼠白血病病毒(murine leukemia virus) (MLV) 假病毒)进行比较。

[0040] 在一些实施例中,表达中和性结合剂(例如,抗体)的患者的生发中心和记忆IgG B细胞可被分离并进一步研究。在一些实施例中,可以根据IgG(例如,IgA和IgM阴性细胞)、

CD19和CD38表达(生发中心B细胞是CD38阳性)(参见例如图2)将细胞分别分类并查询(interrogate)HIV-1中和抗体的产生。例如,在埃-巴二氏病毒(EBV)(其也刺激多克隆记忆B细胞)和生长因子的混合物等(例如,由TLR9激动剂CpG-2006、IL-2(1000IU/ml)、IL-6(10ng/ml)、IL-21(10ng/ml)和抗-BCR山羊抗体(触发B细胞受体(BCR))等存在下,高纯度的IgG记忆B细胞和IgG生发细胞可以以单细胞微培养物接种到分开的板上的人饲养细胞上。然后可以在初次筛选中(例如,使用基于384-孔的HIV-1假病毒中和测试,平行使用两种菌株CE1176和BJOX2000,代表进化枝C和CRF07,如本文的实例所示)测试这种培养物的上清液(例如第14天的培养物)。可以使用任何合适的宿主细胞(例如T2M-b1细胞(Seaman等人, J.Virol.84(3):1439-52(2010);NIH AIDS Reagent Program Catalog Number 8129))进行中和测试。导致显著输出相对光单位(RLU)(例如 $50-100 \times 10^4$ RLU)(即,表明细胞大量感染)的HIV-1假病毒接着与B细胞培养物上清液一起孵育适当的时间和温度(例如,在37%(5%CO₂)进行1小时)),然后加入宿主细胞(例如3000T2M-b1细胞)。通常孵育适当的时间(例如72小时)后,移出上清液并加入SteadyLight试剂(Perkin Elmer)(例如15μl)。然后可以在Synergy微孔板光度计(BioTek)上测定荧光素酶活性(例如5分钟后)。荧光素酶活性降低表明细胞释放的病毒量较少以及表明病毒中和。例如,如果特定假病毒的基础RLU是 $50-100 \times 10^4$ RLU,可以测得中和抗体将假病毒的RLU降低至 $25-50 \times 10^4$ RLU(即,减少50%)或更少。使用这样的系统,可以鉴定能够交叉中和菌株的上清液,进一步获得这样的上清液并测试它们中和和其它假病毒的能力。

[0041] 然后通过确定抗体可变区和互补决定区(CDR)区的氨基酸和核苷酸序列来进一步表征衍生自这种含中和抗体的培养物的抗体。使用这些技术,命名为“LN01”的HIV中和结合剂被鉴定为IgG3-型全人单克隆抗体,具有表1所示的CDR、VH和VL序列(SEQ ID NO.1-7和/或GTY)。确定LN01衍生自IGHV4-39*07和IGKV1-39*01种系基因,并且与生殖系相比在重链(28%)和κ轻链(27%)的可变基因中高度体细胞突变。还发现LN01具有由20个氨基酸组成的长重链互补决定3区(“CDR H3”)环。在一些实施例中,然后可以将结合剂的的可变重链(VH)和可变轻链(VL)基因克隆到相同或不同同种型的IgG表达载体中。如实例所示,例如,将编码LN01 CDR的核酸(表3)克隆到IgG1骨架中,并且通过转染合适的宿主细胞(例如Expi293F细胞)产生重组IgG1-基抗体(IgG1 LN01)。然后可以使用标准技术纯化抗体全长IgG1-基抗体(例如,可以使用重组蛋白-A柱(GE-Healthcare)纯化全长IgG1-基抗体)。然后可以在适当的宿主细胞(例如T2M-b1细胞)上测试重组产生的IgG1抗体对任何一组假病毒的抗性,例如本文所述的任何假病毒(例如实例中使用的九(9)种HIV-1代表假病毒全球组)。在优选的实施例中,结合剂表现出中和大多数(即,至少约50%或更多)假病毒组成员(例如包括9、12或118个成员)而不中和阴性对照病毒(例如,MLV假病毒)的能力。优选地,结合剂表现出中和大多数这些病毒的能力(例如中和大于约50%,例如约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%),IC₅₀值被认为是中和性的(参见下文)。例如,在一些实施例中,在约10⁰μg/ml或更低的浓度,本公开内容的结合剂表现出中和HIV-1假病毒BJOX(CRF07_BC)、CE1176、TR0.11(B)、X1632(G)、CH119(CRF07_BC)、CNE55(CRF01_AE)、25710(C)、CD0217(C)而不中和对照病毒SVA-MLV(图3)。在一些实施例中,当抗体浓度为10²-10⁰μg/ml或10⁰-10¹μg/ml时,可以观察到HIV-1假病毒病毒的中和(图3)。在一些这样的实施例中,结合剂的中和百分数为至少约50%(图3)。在一些实施例中,当IC₅₀小于25μg/ml时,认为结合剂(例如,抗

体)中和一种HIV-1分离物的感染,如果这种分离物的至少一种分离物的感染被中和的 IC_{50} 小于 $25\mu\text{g/ml}$ 。在一些实施例中,当图4中列出的118种HIV-1假病毒的大多数病毒被中和的 IC_{50} 小于 $25\mu\text{g/ml}$,例如约 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $9\mu\text{g/ml}$ 、 $8\mu\text{g/ml}$ 、 $7\mu\text{g/ml}$ 、 $6\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $4\mu\text{g/ml}$ 、 $3\mu\text{g/ml}$ 、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $0.9\mu\text{g/ml}$ 、 $0.8\mu\text{g/ml}$ 、 $0.7\mu\text{g/ml}$ 、 $0.6\mu\text{g/ml}$ 、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 、 $0.4\mu\text{g/ml}$ 、 $0.3\mu\text{g/ml}$ 、 $0.2\mu\text{g/ml}$ 、 $0.1\mu\text{g/ml}$ 、 $0.09\mu\text{g/ml}$ 、 $0.08\mu\text{g/ml}$ 、 $0.07\mu\text{g/ml}$ 、 $0.06\mu\text{g/ml}$ 、 $0.05\mu\text{g/ml}$ 、 $0.04\mu\text{g/ml}$ 、 $0.03\mu\text{g/ml}$ 、 $0.02\mu\text{g/ml}$ 或 $0.01\mu\text{g/ml}$ 时,认为结合剂是中和性的。在优选的实施例中,结合剂可以中和ID 6535.3、QH0692.42、SC422661.8、PV0.4、TR0.11、PEJ04541.67、WIT04160.33、1006_11_C3_1601、1054_07_TC4_1499、1056_TA11_1826、1012_11_TC21_3257、6244_13_B5_4576、SC05_8C11_2344、Du156.12、Du172.17、Du422.1、ZM197M.PB7、ZM214M.PL15、ZM233M.PB6、ZM249M.PL1、ZM109F.PB4、ZM135M.PL10a、HIV-0013095-2.11、HIV-16055-2.3、HIV-16845-2.22、Ce1086_B2、Ce1176_A3、Ce0682_E4、Ce1172_H1、ZM247v1 (Rev-)、3016.v5.c45、A07412M1.vrc12、231966.c02、CNE20、CNE21、CNE17、CNE30、CNE53、CNE58、9004SS_A3_4、928-28、263-8、T255-34、211-9、235-47、CNE8、C1080.c03、R2184.c04、R1166.c01、C2101.c01、C3347.c11、BJOX015000.11.5、BJOX010000.06.2、BJOX025000.01.1、BJOX028000.10.3、X1193_c1、X2131_C1_B5、P1981_C5_3、6952.v1.c20和0815.v3.c3的HIV-1假病毒株, IC_{50} 小于或约为 $1\mu\text{g/ml}$ (图4)。在一些优选的实施例中,结合剂可以中和ID QH0692.42、SC422661.8、PV0.4、TR0.11、PEJ04541.67、WIT04160.33、1006_11_C3_1601、1054_07_TC4_1499、1056_TA11_1826、6244_13_B5_4576、SC05_8C11_2344、Du156.12、Du172.17、ZM197M.PB7、HIV-0013095-2.11、HIV-16055-2.3、HIV-16845-2.22、Ce1086_B2、Ce1172_H1、ZM247v1 (Rev-)、3016.v5.c45、A07412M1.vrc12、CNE20、CNE21、CNE53、CNE58、9004SS_A3_4、928-28、263-8、T255-34、CNE8、C1080.c03、BJOX015000.11.5、BJOX010000.06.2、BJOX025000.01.1、BJOX028000.10.3、X2131_C1_B5、P1981_C5_3、6952.v1.c20和0815.v3.c3的HIV-1假病毒株, IC_{50} 小于或约为 $0.5\mu\text{g/ml}$ (图4)。在一些优选的实施例中,结合剂可中和ID 1054_07_TC4_1499、1056_TA11_1826、6244_13_B5_4576、Du172.17、HIV-0013095-2.11、HIV-16845-2.22、Ce1172_H1、CNE20、CNE21、928-28、CNE8、P1981_C5_3的HIV-1假病毒株, IC_{50} 小于或约为 $0.1\mu\text{g/ml}$ (图4)。进一步优选地,结合剂不表现出进化枝依赖性。例如,在一些实施例中,结合剂可表现出中和HIV-1进化枝B、B(T/F)、C、C(T/F)、D、D(T/F)、BC、A、A(T/F)、CRF02_AG、CRF01_Ae、CRF01_AE(T/F)、G、CD、AC和ACD的假病毒的能力(图4)。在一些优选的实施例中,结合剂可以中和进化枝B、B(T/F)、C、C(T/F)、D、BC、A、A(T/F)、CRF02_AG、CRF01_Ae、CRF01_AE(T/F)、G、CD和ACD中的每种进化枝的至少一种假病毒, IC_{50} 小于或约为 $1\mu\text{g/ml}$ (图4)。在一些优选的实施例中,结合剂可以中和每种进化枝B、B(T/F)、C、C(T/F)、D、BC、A、A(T/F)、CRF02_AG、CRF01_Ae、CRF01_AE(T/F)、G、CD和ACD中的至少一种假病毒, IC_{50} 小于或约为 $0.5\mu\text{g/ml}$ (图4)。在一些优选的实施例中,结合剂可以中和每种进化枝B(T/F)、C、C(T/F)、BC、A(T/F)、CRF02_AG、CRF01_AE、CRF01_AE(T/F)、G和CD中的至少一种假病毒, IC_{50} 小于或约为 $0.1\mu\text{g/ml}$ (图4)。在一些实施例中,结合剂包括这些性质中的任何一种或多种以及SEQ ID NO.1-32中的一种或多种,优选SEQ ID NO.1-7和/或SEQ ID NO.8-9和/或其片段和/或衍生物中的每种。这些是LN01-型结合剂(例如IgG1 LN01)的特征,如图4所示。

[0042] 在一些实施例中,可以使用表达或不表达一种或多种类型的Fc受体的细胞(例如,

实例中的亲本T₂M-b1细胞和表达Fc- γ 受体I (CD64)的T₂M-b1细胞;参见,例如Perez等人, 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 83,7397-7410 (2009); NIH AIDS Reagent Program Catalog No.11798)来测试结合剂对HIV代表假病毒(例如,上述九(9)种HIV-1代表假病毒全球组)的中和能力。表达Fc受体的细胞中增强的中和活性可以为抗体提供病毒抑制的动力学优势。这种动力学优势对抗体来说可能是独有的,抗体的表位被认为难以接近或在融合的早期阶段在Env蛋白的中间构象上仅暴露短时间。Fc- γ 受体还可以潜在地促进HIV-1中和和吞噬作用,从而增加抗体的中和能力。到目前为止,已知构建T₂M-b1细胞系的HeLa细胞表现出非专职吞噬细胞的特性。因此,通过在T₂M-b1细胞的表面引入Fc- γ 受体,T₂M-b1细胞可以转化为专职吞噬细胞。对HIV-1中和抗体的任何Fc- γ -受体介导的抗病毒作用,无论是通过进入抑制还是吞噬作用,在HIV治疗和疫苗方案中可以是有益的。Fc- γ 受体极少在CD4+淋巴细胞上表达,但一些其他HIV-1易感细胞类型表达多种Fc- γ 受体并参与性传播以及长期存活的病毒库的早期建立。特别地,巨噬细胞是粘膜暴露后病毒遇到的首批易感细胞之一,并被认为是慢性感染中长期存活的病毒库。已知巨噬细胞以及单核细胞和树突细胞的某些亚群表达多种Fc- γ 受体。需要重点提到的是,通过促进抗原摄取、抗原呈递、细胞活化和B细胞耐受,Fc- γ 受体在调节适应性免疫和外周耐受(peripheral tolerance)中发挥作用。因此,在一些实施例中,本文所述的结合剂可以与诱导和/或增强Fc受体表达的试剂结合使用,包括引入编码一种或多种Fc受体的核酸或与本文所述的结合剂的治疗相结合。

[0043] 本文所述的结合剂的特异性可以使用本领域技术人员可以利用的许多技术中的任何一种来确定。例如,如本文的实例所示,可以使用一组嵌合假病毒(例如,HIV-2/HIV-1嵌合体,其包括进入亲本HIV-2/7312A的HIV-1 MPER的不同片段)确定结合剂(例如,IgG1 LN01抗体)对特定表位的特异性,以测试中和能力。例如,本文的实例证明,IgG1 LN01抗体不中和亲本HIV-2 7312A菌株。然而,发现IgG1 LN01抗体有效地中和嵌合病毒7312A.C4,在嵌合病毒7312A.C4中HIV-2 MPER(LASWVKYIQ (SEQ ID NO.65))的六(6)个残基被HIV-1 MPER区域的残基替换(ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66))。还发现IgG1 LN01抗体不中和嵌合病毒7312A.C6,在嵌合病毒7312A.C6中在相同区域中仅有三(3)个残基被替换(ITSWIKYIQ (SEQ ID NO.67)) (参见例如图7)。嵌合病毒7312A.C1C获得了类似的发现,嵌合病毒7312A.C1C中对7312A.C4作相同的六(6)个变化与N-端区域中另外的七(7)个突变组合。这些结果表明,在gp41 MPER C-端区域的氨基酸残基L679、W680和K683参与IgG1 LN01抗体结合。因此,在一些实施例中,结合剂表现出结合和/或中和表达gp41的HIV的能力,gp41包括氨基酸残基L679、W680和K683,如在GenBank登录号K03455 (NCBI GenPept登录号AAB50262)的HIV-1包膜氨基酸序列中发现的,例如SEQ ID NO.68 (L679、W680和K683带下划线):

[0044]

```

1      MPVKEKYQHL WRWGWRWGTM ILGLMICSA TEKLVTVVYY GVPVWKEATT TLFCDSDAKA
61     YDTEVHNWMA THACVETDPN PQEVVLVNYT ENFDMWKNOM VEQMHEDIIS LWDQSLKPCV
121    KLTFLCVSLK CTDLKNDTNT NSSSGPMIME KGEIKNCSPN ISTSIRGKVQ KEYAFFYKLD
181    IIPIDNDFTS YKLTSCHTSV ITQACENVSF EPIPIHYCAP AGSAILKCNN KTFNGTGPCF
241    NVSTVQCTHG IRFVSTQLL LNGSLAESEV VIRSVNFTDN ANTIIVQLNT SVEINCTRFN
301    NNTKKRIRIQ PGPGPAFYTI GKIGNMRQAH CNISPAWNN TLKQIASELR EQFGNKTII
361    FKQSSGCDPE IVTHSFNCGG EFFYCNSTQL FNSTWPNSTW STEGNNTEG SDTITLFCRI
421    KQILNMQQNV GKAMYAPPIS GQIBCSSNIT GLLITRDGGN SNNESEIFRP GGGIMRDNWR
481    SELYKXKVK IEPLGVAPTK AKRSVVGREK RAVGIGALFL GFLGAAGSTM GAASMTLTVQ
541    ANQLLSGIVQ QQNLLPAIE AQQHLLQLTV WGLKQLQARI LAVERYLKDQ QLLGIWGCSSG
601    KLICTTAVFW NASWSNESLE QIWNHTTWE WDREINNYTS LINSLIEESQ NQQEKNEQEL
661    LELDKWASLW NWFNITNWLW YIKLFMIVG GLVGLRIVFA VLSIVNRVRQ GYSPLSPQTH
721    LPTFRGPDPR EGIEEGGER DRDSINLVN GSLALIWDDL RSLCLFSYER LRDLLLIVTR

781    IVELLGRGW EALKYWNLL QYWSQELKNS AVSLNATAI AVAESTDRVI EVVQGACRAI
841    RHIFRNIRQG LEPILL (SEQ ID NO. 68),

```

[0045] 或本领域技术人员所理解的其等同物。示例性gp41多肽如下所示：

[0046]

```

AVGIGALFLGLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTV
WGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNNTWM
EWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNNWFNITNWLWYIKLFIMI
VGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQG (SEQ ID NO. 69).

```

[0047] 另一种示例性gp41多肽具有GenBank登录号1103299B(Meusing等人,Nature 313 (6002),450-458(1985))。氨基酸残基L679、W680和K683的示例性等同物是SEQ ID NO.14 (以及GenBank登录号1103299B) 带下划线的氨基酸残基L168、W169和K172。在一些实施例中,结合剂表现出结合和/或中和表达氨基酸序列ITKWLWYIK(SEQ ID NO.66)的HIV的能力。在一些实施例中,结合剂表现出结合和/或中和表达氨基酸序列ITKWLWYIK(SEQ ID NO.66)而非LASWVKYIQ(SEQ ID NO.65)和/或ITKWIKYIQ(SEQ ID NO.67)的HIV的能力。在一些实施例中,结合剂结合的表位(即,具有特异性)包括HIV env(例如,SEQ ID NO.68)的氨基酸残基L679、W680和K683或其等同物。关于gp41,在优选的实施例中,结合剂结合的表位(即,具有特异性)包括SEQ ID NO.69的氨基酸残基L168、W169和K172或其等同物。在一些实施例中,本公开内容的结合剂可以包括这些结合特异性以及如上所述的中和特性(即,以浓度 10^2 - $10^0\mu\text{g/ml}$ 或 10^0 - $10^1\mu\text{g/ml}$ 将HIV-1假病毒BJOX(CRF07_BC)、CE1176、TRO.11(B)、X1632(G)、CH119(CRF07_BC)、CNE55(CRF01_AE)、25710(C)、CD0217(C)中和至至少约50%,而不中和对照病毒SVA-MLV(图3),以及中和图4中列出的118种HIV-1假病毒的大多数, IC_{50} 小于 $25\mu\text{g/ml}$)。

[0048] 可选地和/或也可以使用肽微阵列(peptide microarray)来确定本文所述的结合剂的结合特异性。可以设计一个或多个肽微阵列,使得重叠肽涵盖HIV多肽的完整氨基酸序列。例如,如本文的实例所示,使用1423个重叠(通过12个氨基酸)的15-mer肽形成的肽微阵列来测试结合剂IgG1 LN01的特异性,覆盖了用于进化枝A、B、C、D、组M、CRF01_AE和CRF02_AG的共有HIV-1 Env gp160序列。在本文的实例中,将肽印刷到3D-环氧树脂载玻片上,并用GenePix 4000B扫描仪分析(Tomaras,G.D.等人,Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals.J Virol 85,11502-11519(2011)),但是可以使用本领域技术人员可利用的任何合适的系统。

结合剂可以与对照结合剂一起测试(例如,在本文的实例中,平行测试20 μ g/ml的IgG01 LN01以及称为7B2的对照抗体,7B2对gp41的免疫显性区域具有特异性)。结合剂与微阵列中的肽的结合可以通过任何合适的方法检测,包括如本文实例中的与DyLight 649-标记的山羊抗-人IgG一起孵育。可以通过任何合适的系统测量荧光强度,如本文实例中的GenePix 4000B扫描仪/GenePix软件(参见例如图8)。如本文的实例所示,IgG1 LN01抗体不与该文库中的任何肽明显反应,而对照抗体(7B2)与跨越gp41免疫显性区域的190-195肽强烈反应,表明IgG1 LN01抗体不识别HIV-1 Env中的线性表位。对本文考虑的任何结合剂也可以进行类似的测试。

[0049] 也可以测试结合剂结合代表HIV蛋白的可溶性三聚体(例如,可溶性、切割的SOSIP.664gp140三聚体,其基于本发明实例中使用的亚型A传播/起始菌株BG505)的特异性。优选的三聚体(例如本文实例中使用的那些)是通过负染色电镜(negative stain electron microscopy) (EM) 观察时高度稳定、同质且非常类似于天然病毒刺突(native virus spike)的那些(Sanders,R.W.等人,A next-generation cleaved,soluble HIV-1 Env trimer,BG505 SOSIP.664 gp140,expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies.PLoS Pathog.9,e1003618 (2013))。通常,针对HIV-1 Env上的多个中和表位的广谱中和抗体对这些三聚体(例如,BG505 SOSIP.664 gp140三聚体,包括四元表位抗体(CH01、PG9、PG16和PGT145))是高反应性的。相反,CD4-结合位点、CD4-诱导的表位或gp41外功能区的非中和抗体(NAb)不(并且在实例中没有)与三聚体反应,即使它们的表位以Env的较简单形式(例如,gp120单体或解离的gp41亚基)存在。实例还包括测试,该测试可以用于测试本文所述的任何结合剂,其中MPER也被删除以改善三聚体溶解性并减少聚集体形成。还可以在存在或不存在可溶性CD4(sCD4)的情况下测试结合剂对这些三聚体的结合。本文的实例描述了在存在或不存在sCD4的情况下,测试IgG1 LN01、PGT145(V1-V2聚糖特异性)、PGT151(结合gp120和gp41之间的界面处的位点)和17b(结合CD4结合诱导位点)抗体对BG505 SOSIP.664 gp140三聚体的结合(通过表面等离子体共振(SPR)测量)。如其中所示,PGT145和PGT151抗体在存在和不存在sCD4的情况下与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体强烈反应;17b仅在sCD4存在的情况下与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体反应;而IgG1 LN01在存在或不存在sCD4的情况下都不与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体反应(参见例如图9)。对本文考虑的任何结合剂也可以进行类似的测试。

[0050] 也可以使用其他测试系统(例如ELISA)来测试本文考虑的结合剂。例如,如实例所示,通过ELISA平行测试IgG1 LN01抗体与MPER-特异性10E8抗体(Huang,J.等人,Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody.Nature 491, 406-412(2012))对一组HIV-1抗原(ConsB,共有进化枝B gp140、426c、进化枝C gp140、426c-NLGS、426c gp140(其中去除N-联糖基化位点)、426c核、gp140(其中去除V环)、UG37gp140、进化枝A和gp41、gp41的重组外功能区、来自HxB2菌株的氨基酸541-682、Vybion)的抗性。没有一种测试的抗原通过ELISA被IgG1 LN01抗体识别(参见例如图10)。相反,10E8抗体与gp41的重组外功能区反应。因此,实例中的结果表明,IgG1 LN01抗体可能识别gp41的MPER中的表位,不同于10E8。本文的实例还证明了使用ELISA测试IgG1 LN01抗体对融合中间体gp41和未包覆板(PBS)(称为gp41int)的抗性(Lai,R.P.J.等人,A fusion

intermediate gp41 immunogen elicits neutralizing antibodies to HIV-1. *J Biol Chem* 289,29912-29926 (2014)). MPER抗体4E10、2F5和10E8以高亲和力识别gp41int抗原。虽然10E8通过ELISA与gp41int反应,但IgG1 LN01抗体不与gp41int反应(参见例如图11)。这些结果表明IgG1 LN01抗体识别可能在MPER区域中的保守表位,该保守表位不容易在任何测试的抗原中显现。对本文考虑的任何结合剂可以进行类似的测试。

[0051] 术语“结合亲和力(binding affinity)”和/或 K_D 是指特定的抗体-抗原相互作用的解离速率。 K_D 是解离速率(“解离-速率(k_d)”)与缔合速率(“结合-速率(k_a)”)的比。因此, K_D 等于 k_d/k_a 并且以摩尔浓度(M)表示。因此, K_D 越小,结合的亲和力越强。例如,1mM的 K_D 与1nM的 K_D 相比表示较弱的结合。可以使用本领域已经建立的方法确定对抗体的 K_D 值,例如使用Biacore®系统。在一些实施例中,参照各自的 K_D 值,可以将本文所述的结合剂与另一种结合剂进行比较。这些性质可以与其他特征(例如中和能力和/或表位特异性)组合以相互比较结合剂。因此,具有与本文所述的结合剂相似的 K_D 的结合剂,可能也具有本文所述的中和能力和表位特异性(例如,如LN01所表现的),也被认为是本公开的一部分。

[0052] 表1的任何氨基酸序列(和/或其任何一种或多种片段和/或其衍生物)也可以被本领域技术人员所需的任何其他氨基酸取代。例如,本领域技术人员可以用下表2中所示的其他氨基酸替换特定的氨基酸来进行保守取代。选择的特定氨基酸取代可能取决于所选择的位点的位置。氨基酸取代可以称为“对应(correspond to)”,其中当本领域技术人员能够确定被取代氨基酸周围的氨基酸序列之间相似性的显著量。例如,特定的氨基酸序列可对应于另一个氨基酸序列,其中被取代的氨基酸周围的2个、3个、4个或更多个N-端和C-端氨基酸与被比较的多肽中的相同或相似(例如,如表2中所述)。保守氨基酸取代可以包括用非天然残基取代天然氨基酸残基,使得对该位置处的氨基酸残基的大小、极性、电荷、疏水性或亲水性几乎没有影响或无影响,特别是不会导致例如降低的HIV中和能力和/或不同的表位特异性。

[0053] 表2

[0054]

原始的氨基酸残基	原始的氨基酸残基的示例性保守取代	原始的氨基酸残基优选的保守取代
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0055] 在某些实施例中,编码本文所述的一种或多种结合剂的核酸分子可以插入到一个或多个表达载体中,如下面更详细讨论的。在这样的实施例中,结合剂可以由与氨基酸序列对应的核苷酸编码。编码各种氨基酸(AA)的核苷酸(密码子)的特定组合是本领域已知的,如在本领域技术人员使用的各种参考文献中所述(例如,Lewin,B.Genes V,牛津大学出版社(Oxford University Press),1994)。例如,参照表3可以确定编码所述结合剂的氨基酸的核苷酸序列。核酸变体可以使用编码结合剂的核苷酸的任何组合。

[0056] 表3

[0057] 编码氨基酸(AA)的密码子

[0058]

AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu (L)	TTA		TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp (W)	TGG
	CTT	Pro (P)	CCT	His (H)	CAT	Arg (R)	CGT
	CTC		CCC		CAC		CGC
	CTA		CCA	Gln (Q)	CAA		CGA
	CTG		CCG		CAG		CGG
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA
Met (M)	ATG		ACG		AAG		AGG
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT
	GTC		GCC		GAC		GGC
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

[0059] 本领域技术人员理解,编码特定氨基酸序列的核苷酸序列可以容易地从SEQ ID NO.1-7中的任意一种氨基酸序列以及表4呈现的信息获得。例如,可以从氨基酸序列GDSVSNDNYY (SEQ ID NO.:1) 以及表4中呈现的信息推导出氨基酸序列可以由核苷酸序列GGTGACTCAGTCAGTAATGATAATTATTAT (SEQ ID NO.:33) 编码。本领域技术人员理解,编码SEQ ID NO.2-32和34-36的核苷酸序列可以以相同的方式推导,并且这些核苷酸序列是本文考虑的。表4提供了编码表1所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO.1-32) 的示例性核酸序列:

[0060] 表4

LN01 区域	氨基酸序列	示例性核苷酸序列
LN01 CDRH1	GDSVSNDNYY (SEQ ID NO. 1)	GGTGACTCAGTCAGTAATGATAATTATTAT (SEQ ID NO. 33)
LN01 CDRH2	IYYS GTT (SEQ ID NO. 2)	ATCTATTACAGCGGCACAACC (SEQ ID NO. 34)
LN01 CDRH3	VRMP SHGFWSTSF SYWYF DL (SEQ ID NO. 3)	GTT CGCATGCC CAGTCACGGAT TTTGGAGTACTTCTTTCTCTTAC TGGTATTTTCGATCTC (SEQ ID NO. 35)
LN01 CDRL1	QSVTKY (SEQ ID NO. 4)	CAGAGTGTCACCAAATAT (SEQ ID NO. 36)

[0062]

LN01 CDRL2	GTG	GGGACTTAT
LN01 CDRL2 (长)	LIYGTITLL (SEQ ID NO. 5)	CTCATCTATGGGACTTATACTT TACTC (SEQ ID NO. 37)
LN01 CDR3	QQAHSPTWT (SEQ ID NO. 6)	CAACAGGCTCACAGTACTCCC TGGACC (SEQ ID NO. 38)
LN01 可变重链 (VH)	EVQLVESGPGLVQPWGTLSL TCRVSGDSVSNWNYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTTY YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFYWFYDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO. 7)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCC GGCCAGGACTGGTGCAGCCC TGGGGGACCCTGTCCCTCACCT GTCGTGTCTCTGGTGAAGTCA CAGTAATGATAATTATTATTGGG CCTGGATTCCGACAGACCCCGG GAGGGAAGTGCAGGTCAACGGA ACTATCTATTACAGCGGCACAA CTACTACAATCCGTGCTCAGG AATCGAGTCAGATCTCATTGG ACAAGTCCGTCAATGTGGTCTC CCTGAGATTGGGGTCTGTGAGT GCCGCGGACACGGCCCAATATT ATTGCGTTCCGATGCCAGTCA CGGATTTTGGAGTACTTCTTTCT CTTACTGGTATTTGATCTCTGG GGCCGTGGTCAATTCGTGCTG TCTCCTGG (SEQ ID NO. 39)
LN01 可变轻链 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDQVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRIYGTITLLSGVSPR FSGAGSGSLYLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN (SEQ ID NO. 8)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTCAAGTGGCGCCGATC TGGTTCACTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO. 40)
LN01 变体7 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGLVQPWGTLSL TCRVSGDSVSNWNYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTTY YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFYWFYDLWG RGHFVAVSW (SEQ ID NO. 9)	GAAGTGCAGCTGGTGGAACTCTG GCCCTGGCCTGGTGCAGCCTTG GGGCACACTGAGCCTGACCTGT AGAGTGTCCGGCGACAGCGTGT CCAACTGGAAGTACTACTGGGC CTGGATCCGGCAGACCCCGG CAGAGAACTGCAAGTGATCGGC ACCATCTACTACAGCGGCACAA CCTACTACAACCCAGCCTGCG GAACAGAGTGACCATCAGCCTG GACAAGAGCGTGAACGTGGTGT CCCTGAGACTGGGCTCTGTGTC TGCCGCCGATACCGCCAGTAC

[0063]

		TACTGCGTGCGGATGCCAGCC ACGGCTTCTGGTCTACCAGCTT CAGCTACTGGTACTTCGACCTG TGGGGCAGAGGCCACTTCGTG GCCGTGTCTTGG (SEQ ID NO. 41)
LN01变体7 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRILIYGTITLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGGG THVAAN (SEQ ID NO.: 10)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTC CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTCAAGTGGCGCCGGATC TGGTTCACCTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO. 42)
LN01变体8 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGLVQPWGTLST TCRVSGDSVSNWYWWAWI RQTPGRELQVIGTIYYSGTTY YNPSLRNRVTISLDSKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFYWFYFDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO.: 11)	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTG GCCCTGGCCTGGTGCAGCCTTG GGGCACACTGAGCCTGACCTGT AGAGTGTCCGGCGACAGCGTGT CCAACGACTGGTACTACTGGGC CTGGATCCGGCAGACCCCCGG CAGAGAACTGCAAGTGATCGGC ACCATCTACTACAGCGGCACAA CCTACTACAACCCAGCCTGCG GAACAGAGTGACCATCAGCCTG GACAAGAGCGTGAACGTGGTGT CCCTGAGACTGGGCTCTGTGTC TGCCGCGGATACCGCCAGTAC TACTGCGTGCGGATGCCAGCC ACGGCTTCTGGTCTACCAGCTT CAGCTACTGGTACTTCGACCTG TGGGGCAGAGGCCACTTCGTG GCCGTGTCTTGG (SEQ ID NO. 43)
LN01变体8 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRILIYGTITLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGGG THVAAN (SEQ ID NO.: 12)	GACATCCAGATGACCCAGAGCC CCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAAAGTGACCATCACC TGTCGGGCCAGCCAGAGCGTG ACCAAGTACCTGAAGTGGTATC AGTTTAAGACCGGCCAGGCCCC CAGAATCCTGATCTACGGCACC TACACCCTGCTGAGCGGCGTGT CCCCTAGATTCTCTGGCGCCGG AAGCGGCAGCCTGTACACCCTG ACAATCACCACATCCAGCCCG

[0064]

		AGGACTTCGCCACCTACTACTG CCAGCAGGCCACAGCACCCCT TGGACATTTGGCCAGGGAACAC ACGTGGCCGCCAAC (SEQ ID NO. 44)
LN01变体38 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSNNDNYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTIT YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCYRMP SHGFWSTSFYWFYFDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO.: 13)	AAGTGCAGCTGGTGGAACTCTGG CCCTGGCCTGGTGCAGCCTTGG GGCAGACTGAGCCTGACCTGTA GAGTGTCCGGCGACAGCGTGTC CAACGACAATACTACTTGGGCC TGGATCCGGCAGACCCCGGC AGAGAACTGCAAGTGATCGGCA CCATCTACTACAGCGGCACAAC CTACTACAACCCAGCCTGCGG AACAGAGTGACCATCAGCCTGG ACAAGAGCGTGAACGTGGTGTC CCTGAGACTGGGCTCTGTGTCT GCCGCCGATACCGCCAGTACT ACTGCGTGCGGATGCCAGCCA CGGCTTCTGGTCTACCAGCTTC AGCTACTGGTACTTCGACCTGT GGGGCAGAGGCCACTTCGTGG CCGTGTCTTGG (SEQ ID NO. 45)
LN01变体38 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRIIYGTITLLSGVSPR FSGAGWGSlyTLITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN (SEQ ID NO.: 14)	ACATCCAGATGACCCAGAGCCC CAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTG GGCGACAAAGTGACCATCACCT GTCGGGCCAGCCAGAGCGTGA CCAAGTACCTGAACTGGTATCA GTTTAAGACCGGCCAGGCCCCC AGAATCCTGATCTACGGCACCT ACACCCCTGCTGAGCGGCGTGTC CCCTAGATTCTCTGGCGCCGGA TGGGGCAGCCTGTACACCCTGA CAATCACCAACATCCAGCCCGA GGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGCCACAGCACCCCTT GGACATTTGGCCAGGGAACACA CGTGGCCGCCAAC (SEQ ID NO. 46)
LN01变体41 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSNFNYYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTIT YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCYRMP SHGFWSTSFYWFYFDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO.: 15)	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGC CGGGTGAGCGGGGACAGCGTC TCCAACCTTAATTACTATTGGGC TTGGATCAGGCAGACACCAGGG CGCGAGCTGCAGGTCATCGGG ACTATCTACTATTCCGGAACAC ATACTATAACCCCTCTCTGCGGA ATAGAGTGACCATTTCTCTGGAC AAGAGTGCAACGTGGTCAGTC TGCGACTGGGATCTGTGAGTGC

[0065]

		CGCTGATACCGCACAGTACTAT TGCCTGCGGATGCCCTCTCACG GCTTCTGGTCAACAAGCTTTTCC TACTGGTATTTTCGATCTGTGGG GACGGGGCCATTTTCGTGGCCGT CTCCTGG (SEQ ID NO. 47)
LN01变体41 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GOAPRILIYGYTLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGGG THVAAN (SEQ ID NO.: 16)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTTCAGTGGCGCCGGATC TGGTTCACTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO. 48)
LN01变体42 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGLVQPWGTLST TCRVSGDSVSNYYWAWI RQTPGRELVIGTIYSGTTY YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFYWFYFDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO.: 17)	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGC CGGGTGAGCGGGGACAGCGTC TCCAACACAATTACTATTGGGC TTGGATCAGGCAGACACCAGGG CGCGAGCTGCAGGTCTATCGGG ACTATCTACTATTCCGGAACCAC ATACTATAACCCCTCTCTGCGGA ATAGAGTGACCATTCTCTGGAC AAGAGTGTCAACGTGGTCAGTC TGCGACTGGGATCTGTGAGTGC CGCTGATACCGCACAGTACTAT TGCCTGCGGATGCCCTCTCACG GCTTCTGGTCAACAAGCTTTTCC TACTGGTATTTTCGATCTGTGGG GACGGGGCCATTTTGTGGCCGT CTCCTGG (SEQ ID NO. 49)
LN01变体42 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GOAPRILIYGYTLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGGG THVAAN (SEQ ID NO.: 18)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTTCAGTGGCGCCGGATC TGGTTCACTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC

[0066]

LN01变体48 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	QLQLOESGPGVLKPSSETLSL TCTVSGDSVSNWNYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTTY YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP <u>SHGFWSTSFSYWF</u> DLWGR GTLVTVSS (SEQ ID NO.:19)	AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO. 50) CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGTG GACCTGGACTGGTGAAGCCTTC AGAAACACTGAGCCTGACTTGC ACCGTGTCGCGGCACTCTGTCA GTAAGTGAATTACTATTGGGCA TGGATTAGACAGACACCAGGAA GAGAGCTGCAGGTCATCGGGAC AATCTACTATAGTGAACCACAT ACTATAACCCCTCACTGCGGAA TAGAGTGACCATTTCCCTGGAC AAATCTGTCAACGTGGTCTCTCT GCGACTGGGCTCAGTGAGCGC CGCTGATACTGCCAGTACTATT GCGTGCGGATGCCAGCCACG GCTTCTGGTCCACCTCTTTTAGT TACTGGTATTTGATCTGTGGG GACGGGGCACACTGGTGACTGT CAGCTCC (SEQ ID NO. 51)
LN01变体48 可变轻链 (V _L) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRILYGTITLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIOPE FATYYCQQAHSPTWTFGGG THVAAN (SEQ ID NO.: 20)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGCGCTCTCGC CTCGGTTCACTGCGCGCGGATC TGGTTCACTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO. 52)
LN01变体49 可变重链 (V _H) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	EVQLVESGPGVLQPWGTLST TCRVSGDSVSNWYWAWI RQTPGRELQVIGTIYSGTTY YNPSLRNRVTISLDKSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP <u>SHGFWSTSFSYWF</u> DLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO.:21)	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGC CGGGTGAGCGGGGACAGCGTC TCCAAGTGGTACTATTGGG CTTGGATCAGGCAGACACCAGG GCGCGAGCTGCAGGTCATCGG GACTATCTACTATTCCGGAACCA CATACTATAACCCCTCTCTGCG GAATAGAGTGACCATTTCTCTG GACAAGAGTGTCAATGTGGTCA GTCTGCGACTGGGATCTGTGAG TGCCGCTGATACCGCACAGTAC TATTGCGTGCGGATGCCCTCTC ACGGCTTCTGGTCAACAAGCTT

[0067]

		TTCCTACTGGTATTTTCGATCTGT GGGGACGGGGCCATTTTGTGG CCGTCTCCTGG (SEQ ID NO.:53)
LN01变体49 可变轻链 (VL) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRILYGTYTLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN (SEQ ID NO.:22)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTTCAGTGGCGCCGGATC TGGTTCACCTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO.: 54)
LN01变体82 可变重链 (VH) (CDRH1、CDRH2和 CDRH3带下划线)	QVQLEESGPGLVQPWGTL LTCRVSGGSISSSSYYWAWI RQTPGRELQVIGTIYYSGITY YNPSLRNRVTISLDSVNVVS LRLGSVSAADTAQYYCVRMP SHGFWSTSFYWFYFDLWGR GHFVAVSW (SEQ ID NO. 23)	CAGGTGCAGCTGGAGBAATCTG GACCTGGACTGGTCCAGCCTTG GGGACTCTGAGCCTGACCTGC CGGGTGTGAGGCGGGAGCATC AGCTCCTCTAGTTACTATTGGGC TTGGATTAGGCAGACACCAGGC CGCGAGCTGCAGGTCATCGGCA CTATCTACTATAGTGGGACCACA TACTATAACCCCTCACTGCGGA ATAGAGTGACCATCTCCCTGGA CAAGTCTGTCAACGTGGTCTCT CTGCGACTGGGATCAGTGAGCG CCGCTGATACCGCACAGTACTA TTGCGTGCGGATGCCAGCCAC GGCTTCTGGTCCACATCTTTAG TTACTGGTATTTTCGACCTGTGG GGGCGGGGACATTTTGTGGCC GTCAGTTGG (SEQ ID NO.:55)
LN01变体82 可变轻链 (VL) (CDRL1、CDRL2和 CDRL3带下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTI TCRASQSVTKYLNWYQFKT GQAPRILYGTYTLLSGVSPR FSGAGSGSLYTLTITNIQPED FATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN (SEQ ID NO.:24)	GACATCCAGATGACCCAGTCTC CGTCCTCCCTGTCTGCCTCTGT TGGAGACAAAGTCACCATCACC TGCCGGGCCAGTCAGAGTGTCA CCAAATATTTAAATTGGTATCAG TTTAAGACCGGCCAAGCCCCAA GAATCCTCATCTATGGGACTTAT ACTTTACTCAGTGGCGTCTCGC CTCGGTTTCAGTGGCGCCGGATC TGGTTCACCTCTACACTCTGACCA TCACCAATATACAGCCTGAAGA CTTCGCCACCTATTATTGTCAAC AGGCTCACAGTACTCCCTGGAC CTTCGGCCAAGGAACCCACGTG GCGGCCAAC (SEQ ID NO.:56)

[0068]

LN01变体7和48 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNWNY (SEQ ID NO.25)	GGCGACAGCGTGTCCAACCTGGA ACTACTAC (SEQ ID NO. 57)
LN01变体8 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNWY (SEQ ID NO.26)	GGCGACAGCGTGTCCAACGACT GGTACTAC (SEQ ID NO. 58)
LN01变体41 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNFNYY (SEQ ID NO.27)	GGGGACAGCGTCTCCAACCTTA ATTACTAT (SEQ ID NO. 59)
LN01变体42 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNYNY (SEQ ID NO.28)	GGGGACAGCGTCTCCAACCTACA ATTACTAT (SEQ ID NO. 60)
LN01变体43 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNLNY (SEQ ID NO.29)	GGGGACAGCGTCTCCAACCTAA ATTACTAT (SEQ ID NO. 61)
LN01变体44 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNINY (SEQ ID NO.30)	GGGGACAGCGTCTCCAACATTA ATTACTAT (SEQ ID NO. 62)
LN01变体49 可变重链 (V _H) CDRH1	GDSVSNWY (SEQ ID NO.31)	GGGGACAGCGTCTCCAACCTGGT GGTACTAT (SEQ ID NO. 63)
LN01变体82 可变重链 (V _H) CDRH1 (种系序列)	GSISSSSY (SEQ ID NO.32)	GGGAGCATCAGCTCCTCTAGTT ACTAT (SEQ ID NO. 64)

[0069] 因此,编码本公开内容的结合剂的核酸可以包括SEQ ID NO.33-64或GGGACTTAT中的一种或多种,或其编码SEQ ID NO.1-32或GTY (LN01 CDRL2) 的任意一种和/或其衍生物(例如,表2所述的SEQ ID NO.1-32中的任意一种的保守取代,由使用标准技术确定的核苷酸序列编码,例如表3所述,包括但不限于表4中所述的那些)的衍生物。本公开内容也考虑包括这些核酸序列的表达载体。当结合剂是抗体时,编码其可变区的核苷酸序列也可以从噬菌体和/或杂交瘤细胞分离,所述噬菌体和/或杂交瘤细胞表达克隆到表达载体中的相同序列。生产这种制剂的方法是本领域已知的。

[0070] 编码一种或多种HIV结合剂的核酸分子可以包含在病毒和/或非病毒载体内。在一个实施例中,利用DNA载体将编码一种或多种HIV结合剂的核酸递送给患者。在这种情况下,可以利用各种策略来提高这种机制的效率,包括,例如使用自复制型病毒复制子(Caley等人,1999.Vaccine,17:3124-2135;Dubensky等人,2000.Mol.Med.6:723-732;Leitner等人,2000.Cancer Res.60:51-55)、密码子优化(Liu等人,2000.Mol.Ther.,1:497-500;Dubensky,同上;Huang等人,2001.J.Virol.75:4947-4951)、体内电穿孔(Widera等人,2000.J.Immunol.164:4635-3640)、掺入编码共刺激分子(co-stimulatory molecule)、细胞因子和/或趋化因子的核酸(Xiang等人,1995.Immunity,2:129-135;Kim等人,1998.Eur.J.Immunol.,28:1089-1103;Iwasaki等人,1997.J.Immunol.158:4591-3201;Sheerlinck等人,2001.Vaccine,19:2647-2656)、掺入刺激性基序(例如CpG)(Gurunathan,同上;Leitner,同上);靶向内吞作用或泛素-加工途径的序列(Thomson等人,1998.J.Virol.72:2246-2252;Velders等人,2001.J.Immunol.166:5366-5373)、免疫-加强方案(Gurunathan,同上;Sullivan等人,2000.Nature,408:605-609;Hanke等人,1998.Vaccine,16:439-445;Amara等人,2001.Science,292:69-74)、蛋白酶体-敏感切割位点,以及使用粘膜递送载体,例如沙门氏菌(Darji等人,1997.Cell,91:765-775;Woo等人,2001.Vaccine,19:2945-2954)。其他方法在本领域中是已知的,其中一些方法在下文描述。

已经成功使用各种病毒载体将核酸引入宿主中,包括逆转录病毒、腺病毒、腺病毒伴随病毒(AAV)、疱疹病毒和痘病毒等。可以使用本领域技术人员广泛利用的标准重组技术构建载体。这些技术可以在普通分子生物学参考文献中找到,例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook等人,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology (Methods in Enzymology,第185卷,D.Goeddel编辑,1991.Academic Press,San Diego,CA)和PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人,1990.Academic Press,San Diego,ca)。在某些实施例中,“非病毒”质粒载体也可能是合适的。优选的质粒载体与细菌、昆虫和/或哺乳动物宿主细胞相容。这种载体包括,例如PCR-ii、PCR3和pcDNA3.1 (Invitrogen,San Diego,CA)、pBSii (Stratagene,La Jolla,CA)、pet15 (Novagen,Madison,WI)、pGEX (Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)、pEGFp-n2 (Clontech,Palo Alto,CA)、pETI (Bluebacii,Invitrogen)、pDSR- α (PCT公开号W0 90/14363)和pFASTBACdual (Gibco-BRL,Grand island,NY)以及Bluescript[®]质粒衍生物(高拷贝数量COLe1-基噬菌粒,Stratagene Cloning Systems,La Jolla,CA)、设计用于克隆TAQ-扩增PCR产物的PCR克隆质粒(例如,TOPO[™] TA克隆[®]试剂盒,PCR2.1[®]质粒衍生物,Invitrogen,Carlsbad,CA)。也可以使用细菌载体。这些载体包括,例如志贺菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、乳酸杆菌、卡介苗(BCG)和链球菌(参见例如W0 88/6626、W0 90/0594、W0 91/13157、W0 92/1796和W0 92/21376)。许多其他非病毒质粒表达载体和系统在本领域中是已知的并且可以使用。其他递送技术也可以满足需求,包括例如DNA-配体复合物、腺病毒-配体-DNA复合物、直接注射DNA、CaPO₄沉淀、基因枪技术、电穿孔和胶体分散体系。胶体分散体系包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠以及脂质基体系,脂质基体系包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。优选的胶体体系是脂质体,其是人造膜囊泡,在体外和体内用作递送载体。可以将RNA、DNA和完整病毒颗粒包封在水性内部中并以生物活性形式递送至细胞(Fraley,R.等人,1981,Trends Biochem.Sci.,6:77)。脂质体的组成通常是磷脂的组合,特别是高相变温度磷脂,通常与类固醇组合,尤其是胆固醇。也可以使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特性取决于pH值、离子强度和二价阳离子的存在。用于生产脂质体的脂质的实例包括磷脂酰化合物,例如磷脂酰甘油、卵磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。特别有用的是二酰基磷脂酰甘油(diacylphosphatidylglycerol),其中脂质部分含有14-18个碳原子,特别是16-18个碳原子,并且是饱和的。说明性的磷脂包括卵磷脂酰胆碱(egg phosphatidylcholine)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearoylphosphatidylcholine)。

[0071] 还提供了包含载体的培养细胞。培养细胞可以用载体转染的培养细胞或表达免疫原性多肽的细胞的后代。合适的细胞系是本领域技术人员已知的并且可以购买得到,例如通过美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC)。转染的细胞可以用于生产免疫原性多肽的方法中。该方法包括在允许免疫原性多肽表达的条件下(任选地在表达序列的控制下)培养包含载体的细胞。可以使用标准蛋白质纯化方法从细胞或培养基中分离免疫原性多肽。在一些实施例中,本文所述的结合剂可以与活性剂偶联以靶向并抑制表达HIV多肽和/或携带HIV(和/或在具有多种特异性的结合剂的情况下的另一种抗

原)的细胞群的功能和/或消除该细胞群。例如,使用结合剂/药物偶联物(例如抗体-药物偶联物(ADC))可以靶向并消除包含复制能力的HIV的CD4⁺ T细胞群。单-和/或双-特异性候选结合剂可以与一种或多种类型的药物(例如,破坏DNA、靶向微管的药物)偶联。本文所述的结合剂和/或其衍生物还可以与功能剂邻接和/或偶联用于体外和/或体内使用。例如,结合剂可以与功能部分(例如细胞毒性药物或毒素,和/或其活性片段,例如白喉A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒素、巴豆毒素、酚霉素、新霉素(enomycin)等)邻接和/或偶联。合适的功能部分还可以包括放射性化学物质。可以使用本领域的标准技术将结合剂(例如抗体)与一种或多种功能剂邻接和/或偶联。

[0072] 在一些实施例中,本公开内容提供了具有多特异性的结合剂,使得表位被LN01(例如ITKWLWYIK(SEQ ID NO.72)而非LASWVKYIQ(SEQ ID NO.71)和/或ITKWIKYIQ(SEQ ID NO.73))结合,以及至少一种其他次级抗原(例如,细胞表面蛋白)可以被单一的结合剂结合。在一些实施例中,次级抗原可以是由感染因子感染的细胞表达的抗原。例如,示例性的次级抗原可以是除gp41之外的HIV Env抗原。这样的结合剂可以结合次级抗原和/或可以用来中和感染因子,如可以使用本文所述的测试来确定。本文还涵盖了结合剂的组合,例如本文所述的一种或多种结合剂与本领域技术人员能够利用的另一种结合剂组合。例如,在一些实施例中,可以鉴定组合以提供与仅使用一种或多种结合剂而无其他结合剂时获得的结果(例如中和测试)相比的统计学显著差异。例如,在一些实施例中,组合表现出协同中和HIV。在一些实施例中,组合可以包括第一结合剂(具有LN01(例如,如IgG1 LN01)特征和/或包括SEQ ID NO.1-32(和/或表1所述)中的任意一种或多种,和/或其衍生物)以及在以下一个或多个文献中描述的任意一种或多种抗体:美国专利号5,087,557、美国专利号5,298,419、美国专利号5,459,060、美国专利号5,693,752、美国专利号5,731,189、美国专利号5,753,503、美国专利号5,756,674、美国专利号5,777,074、美国专利号5,804,440、美国专利号5,831,034、美国专利号6,008,044、美国专利号7,774,887B2、美国专利公开号2003/0118985A1、2007/0292390A1或2014/0205612A1、WO 2002/032452A1(例如,结合gp41表位ELDKWA、ELEKWA、ELNKWA、ELDEWA)、EP0335134B1、US 176077(例如,其中描述的小鼠mAb的人源化形式)、DE3932461A1(针对表位Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Leu-Lys-Try-Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys-Ser的mAb)、Evans等人,J.Immunol.140(3):941-3(1988)、Gorney等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:1624-28(1989)、Teeuwssen等人(1990)、AIDS Res.Hum.Retroviruses 6,381-392、Earl等人,J.Virol.71(4):2674-2684(1997)、Jiang等人,J.Virol.72(12):10213-17(1998)、Zwick等人,J.Virol.75(22):10892-10905(2001)、Eckert等人,PNAS USA,98(20):11187-11192(2001);Louis等人,J.Biol.Chem.278(22):20278-20285(2003)和/或Pietzsch等人,J.Virol.84(10):5032-42(2010);所有文献的全部内容并入本文。例如,本文所述的任何结合剂可以与通常已知为2F5、4E10和/或Z13e1的抗体和/或其衍生物等的一种或多种进行组合(即,作为单一组合物,和/或偶联使用)。这种组合物结合剂可以是不同的实体,例如两种或多种不同的单克隆抗体或其衍生物,或者可以在相同的实体上发现,例如双-功能抗体(包含多结合特异性的单一抗体或其衍生物)。本文所述的这种组合还可以与一种或多种可能影响免疫细胞功能的其它试剂组合,例如抗CTLA-4的抗体等。本领域的技术人员将认识到,许多这样的组合可以适用于本文所述的用途。

[0073] 如上所述,本文所述的HIV结合剂可以用于治疗和/或预防和/或减轻HIV感染的症状。如本领域众所周知的,HIV分离株现在分类为不连续的遗传亚型。已知HIV-1包括至少10种亚型(A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、F1、F2、G、H、J和K)(Taylor等人,NEJM,359(18):1965-1966(2008))。已知HIV-2包括至少五种亚型(A、B、C、D和E)。亚型B与全球男同性恋和静脉吸毒者的HIV流行有关。大多数HIV-1免疫原、实验室适应分离株、试剂和作图表位(mapped epitope)属于亚型B。在撒哈拉以南的非洲、印度和中国,这些地区新发HIV感染率很高,HIV-1亚型B只占感染的一小部分,而亚型HIV-1 C似乎是最常见的感染亚型。使用本文所述的结合剂可以解决任何这些类型的分离株。一种或多种结合剂还可以与用于预防、治疗和/或减轻HIV的一种或多种药剂(例如蛋白酶抑制剂、HIV进入抑制剂、逆转录酶抑制剂和/或抗逆转录病毒核苷类似物)联合或结合施用。可以使用合适的化合物,包括例如安普那韦(Agenerase)(安瑞那韦(amprenavir))、双汰芝(Combivir)(立妥威/拉米夫定(Retrovir/Epivir))、Crixivan(印地那韦(indinavir))、Emtriva(恩曲他滨(emtricitabine))、拉米夫定(Epivir)(3-硫胞苷/拉米夫定(3tc/lamivudine))、Epzicom、沙奎那韦软胶囊(Fortovase)/沙奎那韦硬胶囊(Invirase)(沙奎那韦(saquinavir))、注射用恩夫韦肽(Fuzeon)(恩夫韦肽(enfuvirtide))、扎西他宾(Hivid)(ddc/扎西他宾(ddc/zalcitabine))、克力芝(Kaletra)(洛匹那韦(lopinavir))、福沙(Lexiva)(福沙那韦(Fosamprenavir))、诺韦(Norvir)(利托那韦(ritonavir))、甲磺酸地拉韦啉包衣片(Rescriptor)(地拉夫定(delavirdine))、立妥威/AZT(齐多夫定(zidovudine))、锐艾妥(Reyatax)(阿扎那韦(atazanavir),BMS-232632)、Sustiva(依法韦仑(efavirenz))、Trizivir(阿巴卡韦/齐多夫定/拉米夫定(abacavir/zidovudine/lamivudine))、特鲁瓦达(Truvada)(恩曲他滨/替诺福韦DF(Emtricitabine/Tenofovir DF))、Videx(ddl/地达诺新(didanosine))、Videx EC(ddl,地达诺新)、奈非那韦(Viracept)(奈韦拉平(nevirapine))、韦瑞德(Viread)(富马酸替诺福韦二吡呋酯(tenofovir disoproxil fumarate))、泽瑞特(Zerit)(d4T/司他夫定(d4T/stavudine))和阿巴卡韦硫酸盐(Ziagen)(阿巴卡韦(abacavir))。其他合适的试剂是本领域技术人员已知的并且可以适合于本文所述的用途。这样的试剂可以在施用结合剂和/或使用本文所述的方法之前、期间或之后使用。

[0074] 本领域技术人员具有许多合适的技术使用本文所述的结合剂(例如,抗体)来鉴定生物样品,所述生物样品含有与结合剂结合的蛋白质。例如,可以使用抗体来分离HIV或含有HIV和/或表达HIV抗原的细胞,例如使用免疫沉淀或其他捕获型分析。通过将抗体连接在固体支撑物或色谱材料(例如,蛋白A、蛋白G和/或蛋白L包被的珠)上来进行这种已知的技术。然后将结合的抗体引入溶液中,所述溶液含有或认为含有HIV抗原(例如HIV感染的细胞)。然后HIV抗原与抗体结合,并且在HIV抗原与抗体保持结合的条件下洗除非结合材料。然后将结合的蛋白与抗体分离并需要进行分析。使用抗体分离蛋白的类似方法在本领域中是已知的。结合剂(例如抗体)也可用于检测生物样品中的HIV或HIV抗原。例如,抗体可用于分析检测中,例如流式细胞术分析、ELISA、免疫印迹(例如蛋白质免疫印迹)、原位检测、免疫细胞化学和/或免疫组织化学。进行这些分析检测的方法在本领域中是已知的。在一些实施例中,结合剂可以与一个或多个可检测的标记物邻接和/或结合。例如,合适的可检测的标记物可以包括,例如荧光素(例如DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、

HiLyte Fluor 647、5-羧基-2,7-二氯荧光素、5-羧基荧光素 (5-FAM)、5-HAT (羟色胺)、5-羟色胺 (HAT)、6-JOE、6-羧基荧光素 (6-FAM)、FITC、6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素 (TET)、6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四氯荧光素 (HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素 (JOE)、Alexa fluor (例如,350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750)、BODIPY荧光探针 (例如,492/515、493/503、500/510、505/515、530/550、542/563、558/568、564/570、576/589、581/591、630/650-X、650/665-X、665/676、FL、FL ATP、F1-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X结合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE)、罗丹明 (例如110、123、B、B 200、BB、BG、碱性玫瑰精 (B extra)、5-羧基四甲基罗丹明 (5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺 (Lissamine),丽丝胺罗丹明B、秋酞菌胺 (Phalloicidine)、鬼笔碱 (Phalloidine)、玫瑰红 (Red)、Rhod-2、ROX (6-羧基-X-罗丹明)、5-ROX (羧基-X-罗丹明)、磺酰罗丹明B can C、磺胺嘧啶 (Sulforhodamine G Extra)、TAMRA (6-羧基四甲基罗丹明)、四甲基罗丹明 (TRITC)、WT)、德克萨斯红和/或德克萨斯红-X。本领域已知的其他可检测的标记物也适合使用。可以使用本领域的标准技术将结合剂 (例如抗体) 与一种或多种可检测的标记物邻接和/或偶联。

[0075] 本文所述的结合剂也可以用于确定患者存在的病状、预测预后或确定化疗或其他治疗方案的有效性。例如,表达谱分析 (expression profile assay),如本文所述进行或如本领域其他方式进行,可用于确定HIV在细胞中的相对表达水平。然后可以将表达水平与基础 (例如对照) 水平相关联以确定患者是否存在特定的疾病、患者的预后或特定的治疗方案是否有效。例如,如果患者正在接受特定的抗感染治疗方案,患者组织 (例如血浆) 中HIV表达水平的升高或降低可以表明方案正在恶化或改善宿主中HIV的负载。表达的升高或降低可以表明该方案具有或不具有期望的效果,从而可以选择另一种治疗方式。

[0076] 将本文所述的结合剂用作药物筛选分析中的试剂以测试例如新候选药物也是可能的。该试剂可以用于确定候选药物对细胞系或患者细胞或组织中免疫原性靶标表达的影响。表达谱技术可以与高通量筛选技术结合以允许快速鉴定有用的化合物并监测用候选药物治疗的有效性 (参见例如Zlokarnik等人,Science 279,84-8 (1998))。候选药物可以是化学化合物、核酸、蛋白质、抗体或其衍生物,无论是天然存在的还是合成来源的。除了其他用途,如此鉴定的候选药物可以用作药物组合物,用于施用于患者或用于进一步的筛选分析。

[0077] 在一些实施例中,结合剂是纯化的形式。“纯化的”结合剂 (例如抗体) 可以从至少约50%的蛋白质和/或最初发现结合剂的其它组分 (例如,在单克隆抗体的情况下是杂交瘤上清液或腹水制备物的一部分) 中分离。纯化的结合剂 (例如抗体) 可以从至少约50%、60%、75%、90%或95%的蛋白质和/或最初发现结合剂的其它组分中分离。

[0078] 在施用于宿主之前,本文所述的多肽和核酸也可以与一种或多种药学上可接受的载体组合。药学上可接受的载体不是生物学或其他方面所不希望的材料,例如,材料可以施用于受试者而不引起任何不希望的生物学效应或不会以有害的方式与包含该材料的药物组合物中的任何其他组分相互作用。如本领域技术人员已知的,自然地选择载体以最小化活性成分的任何降解并最小化受试者中的任何不利的副作用。合适的药物载体及其制剂描述于,例如Remington's: The Science and Practice of Pharmacy,第21版,David B.Troy编辑,Lippicott Williams&Wilkins (2005)。通常,在制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的实例包括但不限于无菌水、盐水、缓冲溶液 (如林格

氏溶液)和葡萄糖溶液。溶液的pH通常为约5至约8,或约7至约7.5。其他载体包括缓释制剂,例如含有多肽或其片段的固体疏水性聚合物的半透性基质。基质可以是成形的制品形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说显而易见的是,取决于例如给药途径和待施用的组合物的浓度,某些载体可能是更优选的。载体是适合于将多肽和/或其片段施用于人或其他受试者的载体。除了免疫原性多肽之外,药物组合物还可以包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、佐剂、免疫刺激剂。药物组合物还可以包括一种或多种活性成分,例如抗菌剂、抗炎剂和麻醉剂。药物组合物可以以剂量单位剂型口服施用、肠胃外施用、通过吸入喷雾剂施用、直肠施用、结内施用或局部施用,所述剂量单位剂型包括常规的药学上可接受的载体、佐剂和媒介。本文所用的术语“药学上可接受的载体”或“生理学上可接受的载体”是指一种或多种剂型材料,其适于实现或增强作为药物组合物的核酸、多肽或肽的递送。“药物组合物”是包括治疗有效量的核酸或多肽的组合物。术语“有效量”和“治疗有效量”每个是指用于观察到所需的治疗效果(例如消除HIV)的结合剂、核酸等的量。

[0079] 还提供了用于治疗哺乳动物宿主中的一种或多种病症(例如,HIV或癌症)的方法,包括向哺乳动物施用至少一种或多种有效剂量的本文所述的一种或多种结合剂(和/或其衍生物)。在一些实施例中,结合剂是单克隆抗体或其片段或衍生物,其包括SEQ ID NO.1-32和/或如表1中所示的一种或多种。一种或多种结合剂可以以约1至约50mg/kg、约1至约30mg/kg,或约5至约30mg/kg(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40mg/kg)的剂量施用。在某些实施例中,所述一种或多种结合剂可以以约10mg/kg的剂量一次或多次施用于哺乳动物(例如,皮内施用、静脉内施用、口服施用、直肠施用)。当施用多剂时,每剂中剂量可以包括约相同或不同量的结合剂。(多)剂给药也可以按照相同或不同的间隔在时间上彼此分开。例如,药剂可以分开6、12、24、36、48、60、72、84或96小时、1周、2周、3周、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、1.5年、2年、3年、4年、5年或任何这些时间段之前、之后和/或之间的任何时间段。在一些实施例中,结合剂可以与其他试剂(例如抗感染剂和/或化疗剂)联合施用。这些其他药剂可以与结合剂约同时施用,或以不同的时间和/或频率施用。这些方法的其他实施例也可以是合适的,本领域技术人员可以容易地确定。

[0080] 为了帮助本领域技术人员使用本文所述的结合剂(例如抗体),可以以试剂盒形式提供结合剂。还提供了包括一种或多种这样的结合剂和任选地其他组分的试剂盒来检测表达HIV的细胞,所述其他组分对于结合剂的使用是必须的。试剂盒的结合剂可以以任何合适的形式提供,包括冷冻、冻干形式,或在药学上可接受的缓冲液(例如TBS或PBS)中。试剂盒还可以包括体外或体内利用结合剂时所需的其他试剂,例如缓冲液(例如TBS、PBS)、封闭剂(溶液包括脱脂奶粉、正常血清、Tween-20洗涤剂、BSA或酪蛋白)和/或检测试剂(例如山羊抗-小鼠IgG生物素、链霉亲和素-HRP结合物、别藻蓝蛋白、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、过氧化物酶、可检测的标记物和其他标记物和/或染色试剂盒(例如ABC染色试剂盒(ABC Staining Kit),Pierce))。试剂盒还可以包括其他试剂和/或说明书,用于在上述通常使用的测试(例如流式细胞术分析、ELISA、免疫印迹(例如蛋白质免疫印迹)、原位检测、免疫细胞化学、免疫组织化学)中使用抗体。在一个实施例中,试剂盒提供纯化形式的结合剂。在另一个实施例中,结合剂可以以生物素化的形式单独提供或与抗生物素蛋白结合的检测试剂(例如抗

体)一起提供。在另一个实施例中,试剂盒包括结合剂,所述结合剂包括一种或多种用于直接检测HIV的可检测的标记物。使用任何这些系统时所需的缓冲液等是本领域已知的,和/或可以由最终用户制备或作为试剂盒的组分提供。试剂盒还可以包括固体支撑物,固体支撑物包括阳性和阴性对照蛋白质和/或组织样品。例如,用于进行点样或蛋白质印迹分析的试剂盒可以包括对照细胞或组织裂解物,用在含有预先固定的对照样品的SDS-PAGE或尼龙或其他膜并为实验样品留出额外的空间。用于可视化载玻片上细胞中的HIV的试剂盒可以包括预先安排的载玻片,该载玻片包括对照细胞或组织样品并为实验样品留出额外的空间。本领域技术人员理解,试剂盒的其他实施例也在本文中考虑。

[0081] 因此,本公开内容提供了对HIV具有特异性的结合剂,例如LN01抗体。在一些实施例中,结合剂是包括至少一种氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO.1-32和/或表1中所示的序列组成的组。在一些实施例中,结合剂是包括SEQ ID NO.1-32的一种或多种组合的多肽。在一些实施例中,结合剂是抗体。在一些实施例中,结合剂是多肽,例如包括重链CDR氨基酸序列的抗体,所述重链CDR氨基酸序列选自由SEQ ID NO.1-3组成的组。在一些实施例中,结合剂是多肽,例如包括轻链CDR氨基酸序列的抗体,所述轻链CDR氨基酸序列选自由SEQ ID NO.4-7组成的组。在一些实施例中,结合剂是多肽,例如包括V_H氨基酸序列SEQ ID NO.7 (LN01)、SEQ ID NO.9 (LN01变体7)、SEQ ID NO.11 (LN01变体8)、SEQ ID NO.13 (LN01变体38)、SEQ ID NO.15 (LN01变体41)、SEQ ID NO.17 (LN01变体42)、SEQ ID NO.19 (LN01变体48)、SEQ ID NO.21 (LN01变体49)或SEQ ID NO.23 (LN01变体82)的抗体。在一些实施例中,结合剂是多肽,例如包括V_L氨基酸序列SEQ ID NO.8 (LN01)、SEQ ID NO.10 (LN01变体7)、SEQ ID NO.12 (LN01变体8)、SEQ ID NO.14 (LN01变体38)、SEQ ID NO.16 (LN01变体41)、SEQ ID NO.18 (LN01变体42)、SEQ ID NO.20 (LN01变体48)、SEQ ID NO.22 (LN01变体49)或SEQ ID NO.28 (LN01变体24)的抗体。在一些实施例中,结合剂包括CDR (SEQ ID NO.1-6或GNT (LN01CDRL1)) 和/或表1所示的可变区 (SEQ ID NO.7和8、SEQ NO.9和10、SEQ NO.11和12、SEQ NO.13和14、SEQ NO.15和16、SEQ NO.17和18、SEQ NO.19和20、SEQ NO.21和22,或SEQ NO.23和24,或其保守取代的变体)的组合。

[0082] 在一些实施例中,结合剂对表位具有特异性,该表位包括SEQ ID NO.68的氨基酸残基L679、W680和K683和/或SEQ ID NO.69的氨基酸残基L168、W169和K172。在一些实施例中,结合剂表现出结合和/或中和表达氨基酸序列ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66)的HIV的能力。在一些实施例中,结合剂表现出结合和/或中和表达氨基酸序列ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66)而非LASWKYIQ (SEQ ID NO.65)和/或ITKWIKYIQ (SEQ ID NO.67)的HIV的能力。在一些实施例中,本公开内容的结合剂可以包括这些结合特异性中的任何一种或多种以及上述的中和特性(即,以浓度 10^2 - 10^0 μg/ml或 10^0 - 10^1 μg/ml将HIV-1假病毒BJOX (CRF07_BC)、CE1176、TRO.11 (B)、X1632 (G)、CH119 (CRF07_BC)、CNE55 (CRF01_AE)、25710 (C)、CD0217 (C)中和至少约50%,而不中和对照病毒SVA-MLV,和/或中和图4中列出的118种HIV-1假病毒中的大多数的能力,IC₅₀小于25)。在一些实施例中,编码这些结合剂的核酸也提供在表4中。

[0083] 在一些实施例中,结合剂源自或涉及(例如通过序列或衍生)人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体和/或大鼠抗体,和/或其衍生物。在

一些实施例中,衍生物可以选自由F_{ab}、F_{ab2}、F_{ab}'单链抗体、F_v、单链、单特异性抗体、双特异性抗体、三聚体抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-小鼠嵌合抗体、包含犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬源化抗体、CDR-移植抗体、鲨鱼抗体、纳米抗体和/或骆驼(camelid)抗体组成的组。在一些实施例中,结合剂包括至少第一和第二特异性,第一特异性抗HIV gp41而第二特异性抗不同的抗原(例如,感染剂例如HIV的抗原(例如env)和/或肿瘤抗原)。在一些实施例中,结合剂和/或其衍生物可以包括固定地连接于其上的可检测的标记物。在一些实施例中,任何一种结合剂和/或其衍生物包括固定地连接于其上的效应子部分(effector moiety)(例如,细胞毒性药物、毒素、白喉A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、麻风树毒素、巴豆毒素、酚霉素、新霉素(enomycin)和放射性化学物质)。在一些实施例中,还提供了编码一种或多种结合剂的多核苷酸(例如,表达载体)。还提供了包括和/或表达这种多核苷酸的多肽产物的宿主细胞。在一些实施例中,还提供了组合物,该组合物包括至少一种结合剂或衍生物、至少一种分离的多核苷酸、至少一种表达载体和/或至少一种宿主细胞,或其组合,以及药学上可接受的载体。

[0084] 本公开内容还提供了用于检测细胞上HIV的方法,该方法包括使测试生物样品与本文所述的结合剂或衍生物接触,并检测与生物样品或其组分结合的结合剂。这种方法可以是体内方法或体外方法。在一些实施例中,该方法可以包括对比与测试生物样品或其组分结合的量与对照生物样品或其组分结合的量,其中相对于对照生物样品或其组分的结合,与测试生物样品或其组分的结合的增加表明在测试生物样品(例如哺乳动物血液)中存在表达HIV多肽的细胞。在一些实施例中,试剂盒用于检测细胞内或细胞上HIV的表达,该试剂盒包括结合剂或其衍生物以及使用说明书。在一些实施例中,结合剂和/或其衍生物为冻干形式。在一些实施例中,本公开内容提供了用于治疗、预防和/或减轻哺乳动物中的传染性疾病、癌症和/或自身免疫性疾病的方法,包括向哺乳动物施用至少一种有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包括结合剂或其衍生物。在一些实施例中,传染性疾病是人类免疫缺陷病毒(HIV)。在一些实施例中,向动物施用多次药剂。在一些实施例中,可以约1-50mg/kg的剂量施用结合剂和/或其衍生物。

[0085] 在数值列表或范围之前的术语“约”、“大致地”等独立地指列表或范围中的每个单独值,就好像这些术语在列表或范围中的每个单独值之前。这些术语意味着相同参照恰好为该值、接近该值或与该值相似。

[0086] 本文所用的受试者或宿主是指个体。受试者可以包括驯养动物(例如猫和狗)、家畜(例如牛、马、猪、绵羊和山羊)、实验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)和鸟类。在一个方面,受试者是哺乳动物,如灵长类动物或人。

[0087] 任选或任选地是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生,并且是指描述包括事件或情况发生的情况以及事件或情况不发生的情况。例如,短语“任选地组合物可以包括组合”是指组合物可以包括不同分子的组合或者可以不包括组合,使得描述包括组合和不存在组合(即,组合中的各个成员)。

[0088] 本文中范围可以表达为从约一个特定值和/或至约另一个特定值。当表达这样的范围时,另一方面包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当数值表示为近似值时,通过使用先行词约或大致,将理解特定值形成另一方面。应当进一步理解,每个范围的端点对于其他端点是重要的,并且独立于其他端点。范围(例如90-100%)是指包括范围本

身以及范围内的每个独立值,就好像单独列出每个值。

[0089] 术语“组合的(combined)”或“组合(combination)”或“联合(conjunction)”可以指一起施用的试剂的物理组合或在方案中使用两种或更多种试剂(例如在物理或时间方面分开地施用)用于治疗、预防和/或减轻特定的疾病。

[0090] 当术语“治疗、预防和/或减轻”或其衍生词与用于给定病症(例如预防HIV造成的癌症感染)的给定治疗在本文中结合使用时,意在表达待治疗的患者根本不会形成临床上可观察到的病症水平,或病症以比他/她缺少该治疗时更慢和/或更小的程度发展。这些术语并不仅限于患者不受任何病症影响的情况。例如,如果在患者暴露于刺激时给予治疗,该刺激预期产生该疾病的特定表现,并且导致患者经历比预期更少和/或更温和症状,则可以说治疗预防了疾病。例如,治疗可以通过导致患者仅显现轻微的明显感染症状来“预防”感染;这并不意味着感染微生物一定不会渗透任何细胞。

[0091] 类似地,降低(reduce)、降低(reducing)和降低(reduction)与通过特定的治疗预防、治疗和/或减轻给定病症在本文中结合使用通常是指,与不存在治疗(例如,施用一种或多种HIV结合剂)的情况下发展感染的对照或基础水平相比,受试者发展感染更缓慢或程度更低。感染风险降低可以导致患者仅显现轻微的明显感染症状或延迟的感染症状;这并不意味着感染微生物一定不会渗透任何细胞。

[0092] 本公开内容中引用的所有参考文献的全部内容通过引用并入本文。在以下实例中进一步描述了一些实施例。这些实施例仅作为实例提供,并不意图以任何方式限制权利要求的范围。

[0093] 实例

[0094] 实例1

[0095] 淋巴结供体

[0096] 选择HIV-1淋巴结供体用于分离广谱中和抗体。为了分离能够广谱中和多进化枝HIV-1分离株的广谱中和抗体,筛选来自慢性感染患者(患者未接受抗逆转录病毒治疗)的70个血浆样品中存在的高滴度抗体,该高滴度抗体能够中和HIV-1代表菌株全球组的一组九(9)种HIV-1假病毒(DeCamp,A等人,Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies.J Virol 88,2489-2507 (2014))。该分析将七(7)名患者(图1)鉴定为淋巴结供体,用于随后分离和表征有效的广谱中和抗体。特别是,由于发现存在的高水平的抗体中和了九(9)种测试分离株中的八(8)种(并且由于不存在针对阴性对照MLV假病毒的背景活性)而选择了供体SA003。值得注意的是,SA003供体是精英控制者(Elite Controller),病毒血<50HIV RNA拷贝/ml血浆(用进化枝B HIV-1感染)。

[0097] 实例2

[0098] 分离和表征有效的HIV-1广谱中和抗体

[0099] 根据IgG(即,IgA和IgM阴性细胞)、CD19和CD38表达(生发中心B细胞是CD38阳性),对来自供体SA003的生发中心和记忆IgG B细胞分别进行分选(图2)并查询HIV-1中和抗体的产生。特别地,在埃-巴二氏病毒(EBV)(其也刺激多克隆记忆B细胞)和混合物(由TLR9激动剂CpG-2006、IL-2(1000IU/ml)、IL-6(10ng/ml)、IL-21(10ng/ml)和抗-BCR山羊抗体(触发BCR)组成)存在下,将高纯度的IgG记忆B细胞和IgG生发细胞以单细胞微培养物接种到分

开的板上的人饲养细胞上。然后在初步筛选中使用384孔-基HIV-1假病毒中和测试(平行使用两种菌株CE1176和BJOX2000,代表进化枝C和CRF07)来测试第14天培养物的上清液。在TZM-b1细胞上进行中和测试。在384孔板中,将导致输出 $50-100 \times 10^4$ 个相对光单位(RLU)的HIV-1假病毒与B细胞培养物上清液在37% (5% CO₂) 孵育1小时,然后加入3000 TZM-b1细胞。将其再孵育72小时,然后移出上清液并加入15 μ l Steadylite试剂(Perkin Elmer)。5分钟后通过在Synergy微孔板光度计(BioTek)上读板来检测荧光素酶活性。发现来自两种生发中心B细胞培养物的上清液能够交叉中和CE1176和BJOX2000菌株。进一步获得来自这两种培养物的上清液并测试它们中和四(4)种假病毒(CE1176、BJOX2000、X1632和25710)的能力。值得注意的是,两种上清液中的一种中和全部4种假病毒。通过确定其可变区(表1和5)的氨基酸和核苷酸序列以及其中的互补决定区(CDR)来表征来自中和培养物的抗体,并将其命名为“LN01”。因此,命名为“LN01”的结合剂是IgG3型全人单克隆抗体,其具有上表1和2所示的CDR、VH和VL序列。该抗体衍生自IGHV4-39*07和IGKV1-39*01种系基因,并且与生殖系相比,在重链(28%)和 κ 轻链(27%)的可变基因中高度体细胞突变。LN01抗体还具有由20个氨基酸组成的长重链互补决定3区(CDR H3)环。将LN01 VH和VL基因克隆到IgG1表达载体中,并通过转染Expi293F细胞产生重组IgG1 LN01抗体。然后使用重组蛋白质-A柱(GE-Healthcare)纯化全长IgG1 LN01抗体。

[0100] 然后测试重组产生的IgG1 LN01抗体对TZM-b1细胞上的九(9)种HIV-1代表假病毒样本组的抗性。引人注目的是,IgG1 LN01抗体中和九(9)种HIV-1假病毒中的八(8)种,IC₅₀值为0.03-1.6 μ g/ml(图3),而未中和阴性对照MLV假病毒。随后测试IgG1 LN01抗体对扩展组的118种HIV-1假病毒的抗性,所述118种HIV-1假病毒包括进化枝A、进化枝B、进化枝C、进化枝D、进化枝G、循环重组形式CRF10_CD、CRF01_AE、CRF02_AG和CRF07_BC以及非循环重组AC和ACD菌株。IgG1 LN01抗体广谱中和118种病毒中的109种,IC₅₀低于25 μ g/ml,即中和92%的测试病毒并具有中等的IC₅₀值1.1 μ g/ml(图4和5)。被中和的病毒的分析表明LN01中和活性不是进化枝依赖性的。

[0101] 实例3

[0102] Fc受体对LN01中和活性的影响

[0103] 测试IgG1 LN01抗体对亲本TZM-b1细胞和表达Fc- γ 受体I(CD64)的TZM-b1细胞上的九(9)种HIV-1代表假病毒全球组的抗性(Perez,L.G.,Costa,M.R.,Todd,C.A.,Haynes,B.F.&Montefiori,D.C.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 83,7397-7410(2009))。值得注意的是,在表达Fc- γ 受体I的TZM-b1细胞中,IgG1 LN01抗体的中和活性提高了100倍(图6)。另外,使用表达Fc- γ 受体I的TZM-b1细胞,IgG1 LN01抗体对菌株CE0217显示出有效(potent)的中和性,而IgG1LN01抗体不中和TZM-b1细胞上的菌株CE0217(IC₅₀>25 μ g/ml)。这些结果表明,通过在细胞表面预定位IgG1 LN01抗体,Fc- γ 受体可以使Ab具有病毒抑制的动力学优势。这种动力学优势对抗体来说可能是独特的,因为抗体的表位被认为难以接近(access)或在融合的早期阶段在Env蛋白的中间构象上仅暴露短时间。Fc- γ 受体可能潜在地有助于HIV-1中和的另一种机制是吞噬作用。已知构建TZM-b1细胞系的HeLa细胞表现出非专职吞噬细胞的特性。因此,通过在TZM-b1细胞的表面引入Fc- γ 受体,TZM-b1细胞可能

转化为专职吞噬细胞。对HIV-1中和抗体的任何Fc- γ -受体介导的抗病毒作用,无论是通过进入抑制还是吞噬作用,可能对疫苗设置 (vaccine setting) 中的几种细胞类型是有益的。Fc- γ 受体极少在CD4+淋巴细胞上表达,而一些其他HIV-1易感细胞类型表达多种Fc- γ 受体并参与性传播以及长期存活的病毒库的早期建立。特别地,巨噬细胞是粘膜暴露后病毒遇到的首批易感细胞之一,并被认为是慢性感染中长期存活的病毒库。已知巨噬细胞以及单核细胞和树突细胞的某些亚群表达多种Fc- γ 受体。需要重点提到的是,通过促进抗原摄取、抗原呈递、细胞活化和B细胞耐受, Fc- γ 受体在调节适应性免疫和外周耐受 (peripheral tolerance) 中发挥作用。

[0104] 实例4

[0105] LN01特异性

[0106] 为了更好地定义IgG1 LN01抗体的特异性,我们使用了一组HIV-2/HIV-1嵌合假病毒,其包括纳入亲本HIV-2/7312A中的HIV-1 MPER的各种片段。IgG1 LN01抗体不中和亲本HIV-2 7312A菌株。值得注意的是,发现IgG1 LN01抗体有效地中和嵌合病毒7312A.C4,在嵌合病毒7312A.C4中HIV-2 MPER区域中仅有6个来自HIV-1的残基被替换 (LASWVKYIQ (SEQ ID NO.65) 被替换成ITKWLWYIK (SEQ ID NO.66)), 而不中和嵌合病毒7312A.C6,在7312A.C6中相同区域中仅有3个残基被替换 (LASWVKYIQ (SEQ ID NO.65) 被替换成ITKWKYIQ (SEQ ID NO.67)) (图7)。使用嵌合病毒7312A.C1C得到了类似的发现,在嵌合病毒7312A.C1C中7312A.C4相同的6个突变与N-端区域中的另外7个突变组合。这些结果表明gp41 MPER C-端区域中的残基 (L679、W680和K683) 参与IgG1 LN01抗体结合。

[0107] 为了更好地定义LN01的特异性,我们使用由1423个15-mer肽形成的肽微阵列,由12个氨基酸重叠,涵盖了用于进化枝A、B、C、D、组M、CRF01_AE和CRF02_AG的共有HIV-1 Env gp160序列的全长。将肽打印在3D-环氧树脂载玻片上,并用GenePix 4000B扫描仪 (Tomaras, G.D. 等人, Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. J Virol 85, 11502-11519 (2011)) 分析。平行测试20 μ g/ml LN01和称为7B2 (对gp41的免疫显性区域是特异性的) 的对照抗体与肽微阵列的结合。通过与DyLight 649-标记的山羊抗-人IgG孵育来检测LN01和7B2的结合。使用GenePix 4000B扫描仪测量荧光强度并用GenePix软件分析 (图8)。值得注意的是, IgG1 LN01抗体不与该文库中的任何肽明显反应,而7B2与跨越gp41免疫显性区域的190-195肽强烈反应。这些结果表明IgG1 LN01抗体不识别HIV-1 Env中的线性表位。

[0108] 还测试了IgG1 LN01抗体对可溶性、切割的SOSIP.664 gp140三聚体的结合, SOSIP.664gp140三聚体基于亚型A传播/起始菌株BG505。当通过负染色电子显微镜 (EM) 可视化时,这些三聚体是高度稳定、同质并且非常类似于天然病毒刺突 (Sanders, R.W. 等人, A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog. 9, e1003618 (2013))。针对HIV-1 Env上的多个中和表位的所有广谱中和抗体与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体高度反应,包括四元表位抗体 (CH01、PG9、PG16和PGT145)。相反,对CD4-结合位点、CD-4诱导的表位或gp41外功能区的非NAbs不与三聚体反应,即使它们的表位以Env的较简单形式 (例如, gp120单体或解离的gp41亚基) 存在。MPER也被删除以改善三聚体溶解性并减少聚集体形成。在存在或不存在可溶性CD4 (sCD4)

的情况下,通过表面等离子体共振 (SPR) 测试IgG1 LN01抗体、PGT145 (V1-V2聚糖特异性)、PGT151 (与gp120和gp41之间的界面处的位点结合) 和17b (与CD4结合诱导的位点结合) 抗体对BG505 SOSIP.664gp140三聚体的结合。在存在和不存在sCD4的情况下,PGT145和PGT151抗体与BG505SOSIP.664 gp140三聚体强烈反应;17b仅在存在sCD4的情况下与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体反应。在存在或不存在sCD4的情况下,LN01不与BG505 SOSIP.664 gp140三聚体反应(图9)。

[0109] 还通过ELISA平行测试了IgG1 LN01抗体和MPER-特异性10E8抗体(Huang,J.等人, Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491,406-412 (2012)) 对一组HIV抗原 (ConsB,共有进化枝B gp140、426c、进化枝C gp140、426c-NLGS、426c gp140 (其中去除N-联糖基化位点)、426c核、gp140 (其中去除V环)、UG37 gp140、进化枝A和gp41、gp41的重组外功能区、来自HxB2菌株的氨基酸541-682、Vybion) 的抗性。没有一种测试的抗原通过ELISA被IgG1 LN01抗体识别(图10)。相反,10E8抗体与gp41的重组外功能区反应。这些结果表明,IgG1 LN01抗体可能识别gp41的MPER中的表位,不同于10E8。

[0110] 最后,测试了IgG1 LN01抗体对融合中间体gp41和未包覆板 (PBS) (命名为gp41int) 的抗性(Lai,R.P.J.等人, A fusion intermediate gp41 immunogen elicits neutralizing antibodies to HIV-1. *J Biol Chem* 289,29912-29926 (2014))。MPER抗体4E10、2F5和10E8以高亲和力识别gp41int抗原。虽然10E8通过ELISA与gp41int反应,但IgG1 LN01抗体不与gp41int反应(图11)。这些结果表明IgG1 LN01抗体识别可能在MPER区域中的保守表位,该保守表位不容易在任何测试的抗原中显现。我们可以推测,当在融合前天然Env构象中显现时,IgG1 LN01抗体识别MPER区域的C-端区域中的同源构象表位。

[0111] 实例5

[0112] LN01对MPE肽缺乏高亲和力结合

[0113] 为了更好地定义IgG1 LN01抗体的特异性,我们通过ELISA测试了其对于28个氨基酸长的肽的结合,28个氨基酸长的肽用于共结晶MPER特异性抗体10E8(Huang等人, *Nature* 2012)。该肽包含整个28-残基gp41 MPER (残基656-683) (序列RRRNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRRRR (SEQ ID NO.:81))。虽然10E8与该MPER肽反应强烈 (avidly),但IgG1 LN01抗体与MPER肽反应非常差(图12)。这些结果表明IgG1 LN01抗体识别可能在MPER区域中的保守表位,该保守表位在包含整个MPERgp41区域的线性肽中不容易显现。

[0114] 实例6

[0115] 具有提高的中和活性的LN01变体

[0116] 为了提高LN01抗体的效力,我们制备了一组变体,在变体中我们在LN01 VH (25种变体) 或VL (15种变体) 中引入了点突变(图13A)。通过将原始的残基替换为W或A,基于预测的表面暴露来选择这些取代。通过将突变的VH或VL分别与亲本VL或VH组合,重组产生了四十(40)种LN01变体。测试这些变体对初始的一组3种HIV-1菌株 (CH119、X1632、BJOX和对照病毒SVA-MLV) 的抗性。一些LN01变体部分或完全丧失中和活性(变体13、14、21、18、19、20、22、23、24、32和33),表明原始的残基在抗原识别中的重要作用 (尤其是在VH的FR3中的残基,在VH的CDR3中的残基和在VL的CDR1中的残基)。值得注意的是,3种变体显示出增加了3

倍以上 (3X) 的中和效力: 变体7 (D32W, 在VH的CDR1中突变)、变体8 (在VH的CDR1中的N33W) 和变体38 (在VL的FR3中的S67W) (图13B和13C)。值得注意的是, 与亲本LN01抗体相比, LN01变体7显示出增加了39倍的效力。当平行测试LN01变体7、8和38以及亲本LN01抗体对8种病毒的多进化枝组进行测试时证实了这些结果 (图14A-K)。在此第二个测试中, 观察到LN01变体7、8和38增加的效力的平均值分别为47、2.3和2.7倍。

[0117] 基于这些结果, 合成了其他LN01变体 (变体41、42、43、44、48和50) 并测试了对一组7种HIV-1菌株的抗性 (图15A-B)。在变体 (v) 41、42、43和44中, VH的CDR1的D32残基突变为F (v41)、Y (v42)、L (v43) 或I (v44)。有趣的是, 这4个突变中没有一个是具有与在变体7中引入W时观察到的相同的效力增加。此外, 只有引入芳族残基 (即, F或Y) 提高了LN01活性, Y (V42) 具有平均3.7倍的最明显的提高 (图15B)。在中和活性方面, 在相同位置引入疏水性残基没有带来任何益处。还测试了2种变体, 其中在变体7中使用的D32W突变存在 (变体48) 或不存在 (变体50) 下, FR1和FR4中的体细胞突变恢复为种系构型。在VH的框架 (FR) 1和FR4中去除体细胞突变并没有明显改变LN01中和活性。在变体50的骨架上引入D32W赋予更有效的中和活性 (比亲本LN01抗体好平均4.7倍)。然而, 值得注意的是, 在VH中的种系FR中的D32W没有达到与完全突变的亲本LN01抗体的骨架上的相同突变 (即变体7) 所观察到的相同效力水平的提高。

[0118] 还在命名为49的新变体中测试了变体7和8中引入的突变 (D32W和N33W) 的组合, 与亲本LN01抗体对一组7种病毒的效力相比, 新变体49显示出高平均81倍的效力 (图16A-B)。该结果表明LN01变体49与高度有效的LN01变体7抗体相当或比LN01变体7抗体优越。

[0119] 最后, 我们测试了另一种LN01变体, 其中五个CDR1体细胞突变回复为种系构型。突变的CDR1序列 DSVSNDNYY (SEQ ID NO.: 82, 包括带下划线的5个CDR1体细胞突变) 恢复为 GSISSSYY (SEQ ID NO.: 32; 种系CDR1) 以产生LN01变体82。令人惊讶地, LN01变体82显示出比亲本LN01抗体高2.9倍的效力 (图17)。该结果表明VH CDR1在LN01中和活性中起重要作用。

[0120] 虽然已经根据优选的实施例描述了某些实施例, 但是应当理解, 本领域技术人员可以做出各种变化和修改。因此, 所附权利要求旨在涵盖落入以下权利要求范围内的所有这些等同变化。

序列表

<110> 沃迪奥斯大学医院中心
生物医学研究所

<120> HIV结合剂

<130> CHUV-15-01-LN01

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 1

Gly Asp Ser Val Ser Asn Asp Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Ser Tyr Trp

1 5 10 15

Tyr Phe Asp Leu

20

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Ser Val Thr Lys Tyr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Leu Ile Tyr Gly Thr Tyr Thr Leu Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Gln Gln Ala His Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Trp Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Arg Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Arg Asn Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Lys Ser Val Asn Val Val

65 70 75 80

Ser Leu Arg Leu Gly Ser Val Ser Ala Ala Asp Thr Ala Gln Tyr Tyr

85 90 95

Cys Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Ser Tyr

100 105 110

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly His Phe Val Ala Val Ser Trp

115 120 125

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

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

<210> 9

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

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

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

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

<210> 11

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

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

<210> 15

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

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

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

<210> 19

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

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

115	120	125
<210> 20		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 20		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Lys Tyr		
20 25 30		
Leu Asn Trp Tyr Gln Phe Lys Thr Gly Gln Ala Pro Arg Ile Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Gly Thr Tyr Thr Leu Leu Ser Gly Val Ser Pro Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Asn Ile Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Thr Pro Trp		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr His Val Ala Ala Asn		
100 105		
<210> 21		
<211> 128		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 21		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Trp Gly		
1 5 10 15		
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Arg Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Asn Trp		
20 25 30		
Trp Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Glu Leu Gln		
35 40 45		
Val Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50 55 60		
Leu Arg Asn Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Lys Ser Val Asn Val Val		
65 70 75 80		
Ser Leu Arg Leu Gly Ser Val Ser Ala Ala Asp Thr Ala Gln Tyr Tyr		
85 90 95		
Cys Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Ser Tyr		
100 105 110		

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly His Phe Val Ala Val Ser Trp
 115 120 125

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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

<210> 23

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

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

	100		105		110
Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly His Phe Val Ala Val Ser Trp					
	115		120		125
<210> 24					
<211> 107					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 24					
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Lys Tyr					
	20		25		30
Leu Asn Trp Tyr Gln Phe Lys Thr Gly Gln Ala Pro Arg Ile Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Gly Thr Tyr Thr Leu Leu Ser Gly Val Ser Pro Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Asn Ile Gln Pro					
65		70		75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Thr Pro Trp					
	85		90		95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr His Val Ala Ala Asn					
	100		105		

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 25

Gly Asp Ser Val Ser Asn Trp Asn Tyr Tyr
1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 26

Gly Asp Ser Val Ser Asn Asp Trp Tyr Tyr
1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Gly Asp Ser Val Ser Asn Phe Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Gly Asp Ser Val Ser Asn Tyr Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Gly Asp Ser Val Ser Asn Leu Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Gly Asp Ser Val Ser Asn Ile Asn Tyr Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Gly Asp Ser Val Ser Asn Trp Trp Tyr Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人
<400> 33
ggtgactcag tcagtaatga taattattat 30
<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人
<400> 34
atctattaca gcggcacaac c 21
<210> 35
<211> 60
<212> DNA
<213> 智人
<400> 35
gttcgcatgc ccagtcacgg attttggagt acttctttct cttactggta tttcgatctc 60
<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人
<400> 36
cagagtgtca ccaaatat 18
<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人
<400> 37
ctcatctatg ggacttatac tttactc 27
<210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人
<400> 38
caacaggtc acagtactcc ctggacc 27
<210> 39
<211> 384
<212> DNA

<213> 智人

<400> 39

gaggtgcagc tgggtggagtc gggcccagga ctggtgcagc cctgggggac cctgtccctc 60
acctgtcgtg tctctggtga ctcagtcagt aatgataatt attattgggc ctggattcgc 120
cagacccccg ggaggggaact gcaggtcatc ggaactatct attacagcgg cacaacctac 180
tacaatccgt cgctcaggaa tcgagtcacg atctcattgg acaagtcctg caatgtggtc 240
tccctgagat tggggctctgt gagggccg gacacggccc aatattattg cgttcgcatg 300
cccagtcacg gattttggag tacttcttct tcttactggt atttcgatct ctggggccgt 360
ggtcatttcg tcgctgtctc ctgg 384

<210> 40

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 40

gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgcct ctgttgaga caaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gaggtcacc aaatatttaa attggtatca gtttaagacc 120
ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgcct 180
cggttcagtg gcgccgcatc tggttcactc tacactctga ccatcaccaa tatacgcct 240
gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gctcacagta ctccctggac ctteggccaa 300
ggaaccacg tggcggccaa c 321

<210> 41

<211> 384

<212> DNA

<213> 智人

<400> 41

gaagtgcagc tgggtggaatc tggccctggc ctggtgcagc cttggggcac actgagcctg 60
acctgtagag tgtccggcga cagcgtgtcc aactggaact actactgggc ctggatccgg 120
cagacccccg gcagagaact gcaagtgate ggcaccatct actacagcgg cacaacctac 180
tacaacccca gcctgcggaa cagagtgacc atcagcctgg acaagagcgt gaacgtgggtg 240
tccctgagac tgggctctgt gtctgccgcc gataccgcc agtactactg cgtgcggatg 300
cccagccacg gcttctggtc taccagcttc agtactggt atttcgacct gtggggcaga 360
ggccacttcg tggccgtgtc ttgg 384

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 42

gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgcct ctgttgaga caaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gaggtcacc aaatatttaa attggtatca gtttaagacc 120

ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgcct 180
 cggttcagtg gcgccggatc tggttcactc tacactctga ccatcaccaa tatacagcct 240
 gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gctcacagta ctccctggac cttcggccaa 300
 ggaacccacg tggcggccaa c 321

<210> 43

<211> 384

<212> DNA

<213> 智人

<400> 43

gaagtgcagc tgggtggaatc tggccctggc ctggtgcagc cttggggcac actgagcctg 60
 acctgtagag tgtccggcga cagcgtgtcc aacgactggt actactgggc ctggatccgg 120
 cagacccccg gcagagaact gcaagtgate ggcaccatct actacagcgg cacaacctac 180
 tacaaccca gcctgcggaa cagagtgacc atcagcctgg acaagagcgt gaacgtggtg 240
 tccctgagac tgggctctgt gtctgccgcc gataccgcc agtactactg cgtgcggatg 300
 ccagccacg gcttctggtc taccagcttc agtactggt acttcgacct gtggggcaga 360
 ggccacttcg tggccgtgtc ttgg 384

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 44

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga caaagtgacc 60
 atcacctgtc gggccagcca gagcgtgacc aagtacctga actggtatca gtttaagacc 120
 ggccaggccc ccagaatcct gatctacggc acctacacc tgctgagcgg cgtgtccct 180
 agattctctg gcgccggaag cggcagcctg tacacctga caatcaccaa catccagccc 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccacagca ccccttggac atttggccag 300
 ggaacacacg tggccgccaa c 321

<210> 45

<211> 383

<212> DNA

<213> 智人

<400> 45

aagtgcagct ggtggaatct ggccctggcc tgggtgcagc ttggggcaca ctgagcctga 60
 cctgtagagt gtccggcgac agcgtgtcca acgacaacta ctactgggc tggatccggc 120
 agacccccgg cagagaactg caagtgatcg gcaccatcta ctacagcggc acaacctact 180
 acaaccccag cctgcggaac agagtgacca tcagcctgga caagagcgtg aacgtggtgt 240
 ccctgagact gggctctgtg tctgccgccg ataccgccc gtactactgc gtgcggatgc 300
 ccagccacgg cttctggtct accagcttca gctactggtta cttcgacctg tggggcagag 360
 gccacttcgt ggccgtgtct tgg 383

<210> 46

<211> 320

<212> DNA

<213> 智人

<400> 46

acatccagat gacccagagc cccagcagcc tgtctgccag cgtgggcgac aaagtgacca 60
tcacctgtcg ggccagccag agcgtgacca agtacctgaa ctggtatcag ttttaagaccg 120
gccaggcccc cagaatcctg atctacggca cctacaccct gctgagcggc gtgtccccta 180
gatttctctgg cgccggatgg ggcagcctgt acaccctgac aatcaccaac atccagcccc 240
aggacttcgc cacctactac tgccagcagg cccacagcac cccttggaca tttggccagg 300
gaacacacgt ggccgccaac 320

<210> 47

<211> 384

<212> DNA

<213> 智人

<400> 47

gaggtgcagc tgggtggaatc tggacctgga ctggtgcagc cttggggcac tctgtctctg 60
acatgccggg tgagcgggga cagcgtctcc aactttaatt actattgggc ttgatcagg 120
cagacaccag ggcgcgagct gcaggtcatc gggactatct actattccgg aaccacatac 180
tataaccctt ctctgcggaa tagagtgacc atttctctgg acaagagtgt caacgtggtc 240
agtctgcgac tgggatctgt gaggccgct gataccgcac agtactattg cgtgcggatg 300
ccctctcacg gcttctggtc aacaagcttt tcctactggt atttcgatct gtggggacgg 360
ggccatttcg tggccgtctc ctgg 384

<210> 48

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 48

gacatccaga tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcct ctgttggaga caaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gagggtcacc aaatatataa attggtatca gtttaagacc 120
ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgcct 180
cggttcagtg gcgccggatc tggttcactc tacaactetga ccataccaa tatacagcct 240
gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gctcacagta ctcctggac cttcggccaa 300
ggaaccacg tggcggccaa c 321

<210> 49

<211> 384

<212> DNA

<213> 智人

<400> 49

gaggtgcagc tgggtggaatc tggacctgga ctggtgcagc cttggggcac tctgtctctg 60
 acatgccggg tgagcgggga cagcgtctcc aactacaatt actattgggc ttggatcagg 120
 cagacaccag ggcgcgagct gcaggtcatc gggactatct actattccgg aaccacatac 180
 tataaccctt ctctgcggaa tagagtgacc atttctctgg acaagagtgt caacgtggtc 240
 agtctgcgac tgggatctgt gagtgccgct gataccgcac agtactattg cgtgcggatg 300
 cctctcacg gcttctggtc aacaagcttt tctactggt atttcgatct gtggggacgg 360
 ggccattttg tggccgtctc ctgg 384

<210> 50

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 50

gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgect ctgttgaga caaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagtgcacc aaatatttaa attggtatca gtttaagacc 120
 ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgect 180
 cggttcagtg gcgccgcatc tggttcactc tacactctga ccatcaccaa tatacagcct 240
 gaagacttgc ccacctatta ttgtcaacag gtcacagta ctccctggac cttcggccaa 300
 ggaaccacg tggcggccaa c 321

<210> 51

<211> 384

<212> DNA

<213> 智人

<400> 51

cagctgcagc tgcaggagag tggacctgga ctggtgaagc cttcagaaac actgagcctg 60
 acttgcaccg tgtccggcga ctctgtcagt aactggaatt actattgggc atggattaga 120
 cagacaccag gaagagagct gcaggtcatc gggacaatct actatagtgg aaccacatac 180
 tataaccctt cactgcggaa tagagtgacc atttcctgg acaaactctgt caacgtggtc 240
 tctctgcgac tgggctcagt gagcgccgct gatactgccc agtactattg cgtgcggatg 300
 ccagccacg gcttctggtc cactctttt agttactggt atttcgatct gtggggacgg 360
 ggcacactgg tgactgtcag ctcc 384

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 52

gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgect ctgttgaga caaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagtgcacc aaatatttaa attggtatca gtttaagacc 120
 ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgect 180
 cggttcagtg gcgccgcatc tggttcactc tacactctga ccatcaccaa tatacagcct 240

gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gtcacagta ctccctggac cttcggccaa 300
ggaacccacg tggcggccaa c 321
<210> 53
<211> 384
<212> DNA
<213> 智人
<400> 53
gaggtgcagc tgggtggaatc tggacctgga ctggtgcagc cttggggcac tctgtctctg 60
acatgccggg tgagcgggga cagcgtctcc aactggtggt actattgggc ttggatcagg 120
cagacaccag ggcgcgagct gcaggtcatc gggactatct actattccgg aaccacatac 180
tataaccct ctctcggaa tagagtgacc atttctctgg acaagagtgt caatgtggtc 240
agtctgcgac tgggatctgt gagtgccgt gataccgcac agtactattg cgtgcggatg 300
ccctctcacg gcttctggtc aacaagcttt tctactggt atttcgatct gtggggacgg 360
ggccattttg tggccgtctc ctgg 384
<210> 54
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人
<400> 54
gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgcct ctgttggaga caaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gagtgcacc aaatatataa attggtatca gtttaagacc 120
ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgcct 180
cggttcagtg gcgccggatc tggttcactc tacactctga ccatcaccaa tatacgcct 240
gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gtcacagta ctccctggac cttcggccaa 300
ggaacccacg tggcggccaa c 321
<210> 55
<211> 384
<212> DNA
<213> 智人
<400> 55
caggtgcagc tggaggaatc tggacctgga ctggtccagc cttggggggac tctgagcctg 60
acctgccggg tgtcaggcgg gagcatcagc tctctagtt actattgggc ttggattagg 120
cagacaccag gccgcgagct gcaggtcatc ggcactatct actatagtgg gaccacatac 180
tataaccct cactcggaa tagagtgacc atctccctgg acaagtctgt caacgtggtc 240
tctctgcgac tgggatcagt gagcgccgt gataccgcac agtactattg cgtgcggatg 300
cccagccacg gcttctggtc cacatctttt agttactggt atttcgacct gtggggggcgg 360
ggacattttg tggccgtcag ttgg 384
<210> 56
<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 56

gacatccaga tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcct ctggttgaga caaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gagggtcacc aaatatttaa attggtatca gtttaagacc 120
ggccaagccc caagaatcct catctatggg acttatactt tactcagtgg cgtctcgcct 180
cggttcagtg gcgccggatc tggttcactc tacactctga ccatacacia tatacagcct 240
gaagacttcg ccacctatta ttgtcaacag gtcacagta ctccctggac cttcggccaa 300
ggaacccacg tggcggccaa c 321

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 57

ggcgacagcg tgtccaactg gaactactac 30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 58

ggcgacagcg tgtccaacga ctggtactac 30

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 59

ggggacagcg tctccaactt taattactat 30

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 60

ggggacagcg tctccaacta caattactat 30

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 61

ggggacagcg tctccaactt aaattactat 30

<210> 62
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人
<400> 62
ggggacagcg tctccaacat taattactat 30
<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人
<400> 63
ggggacagcg tctccaactg gtggtactat 30
<210> 64
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人
<400> 64
gggagcatca gctcctctag ttactat 27
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 65
Leu Ala Ser Trp Val Lys Tyr Ile Gln
1 5
<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 66
Ile Thr Lys Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
1 5
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 67
Ile Thr Ser Trp Ile Lys Tyr Ile Gln
1 5

<210> 68

<211> 856

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

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

Arg Ser Val Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu		
275	280	285
Asn Thr Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg		
290	295	300
Lys Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile		
305	310	315
Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala		
	325	330
Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln		
	340	345
Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp		
	355	360
Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr		
	370	375
Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp		
385	390	395
Ser Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu		
	405	410
Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys		
	420	425
Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn		
	435	440
Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu		
450	455	460
Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg		
465	470	475
Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val		
	485	490
Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala		
	500	505
Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser		
	515	520
Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu		
	530	535
Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu		
545	550	555
Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu		
	565	570
Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu		

580	585	590
Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val		
595	600	605
Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn		
610	615	620
His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser		
625	630	635
Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn		
645	650	655
Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp		
660	665	670
Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile		
675	680	685
Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile		
690	695	700
Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His		
705	710	715
Leu Pro Thr Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu		
725	730	735
Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser		
740	745	750
Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr		
755	760	765
His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu		
770	775	780
Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu		
785	790	795
Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn		
805	810	815
Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val		
820	825	830
Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg		
835	840	845
Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu		
850	855	

<210> 69

<211> 200

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

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

<210> 70

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

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

50	55	60
Leu		
65		
<210> 71		
<211> 65		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 71		
Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn Arg		
1 5 10 15		
Val Thr Ile Ser Leu Asp Trp Ser Val Asn Val Val Ser Leu Arg Leu		
20 25 30		
Gly Ser Val Ser Ala Ala Asp Thr Ala Gln Tyr Tyr Cys Val Arg Met		
35 40 45		
Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp		
50 55 60		
Leu		
65		
<210> 72		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 72		
Val Arg Met Pro Ser His Gly Ala Trp Ser Thr Ser Phe Ser Tyr Trp		
1 5 10 15		
Tyr Phe Asp Leu		
20		
<210> 73		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 73		
Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Ala Ser Thr Ser Phe Ser Tyr Trp		
1 5 10 15		
Tyr Phe Asp Leu		
20		
<210> 74		
<211> 20		
<212> PRT		

<213> 智人

<400> 74

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Trp Thr Ser Phe Ser Tyr Trp

1 5 10 15

Tyr Phe Asp Leu

20

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Trp Ser Phe Ser Tyr Trp

1 5 10 15

Tyr Phe Asp Leu

20

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 76

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Trp Phe Ser Tyr Trp

1 5 10 15

Tyr Phe Asp Leu

20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Trp Tyr Trp

1 5 10 15

Tyr Phe Asp Leu

20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 78

Val Arg Met Pro Ser His Gly Phe Trp Ser Thr Ser Phe Ser Trp Trp

1	5	10	15
Tyr Phe Asp Leu			
	20		
<210> 79			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 79			
Gln Ser Val Thr Trp Tyr			
1	5		
<210> 80			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 80			
Gln Ser Val Thr Lys Trp			
1	5		
<210> 81			
<211> 34			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 81			
Arg Arg Arg Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Arg			
	20	25	30
Arg Arg			
<210> 82			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 82			
Asp Ser Val Ser Asn Asp Asn Tyr Tyr			
1	5		

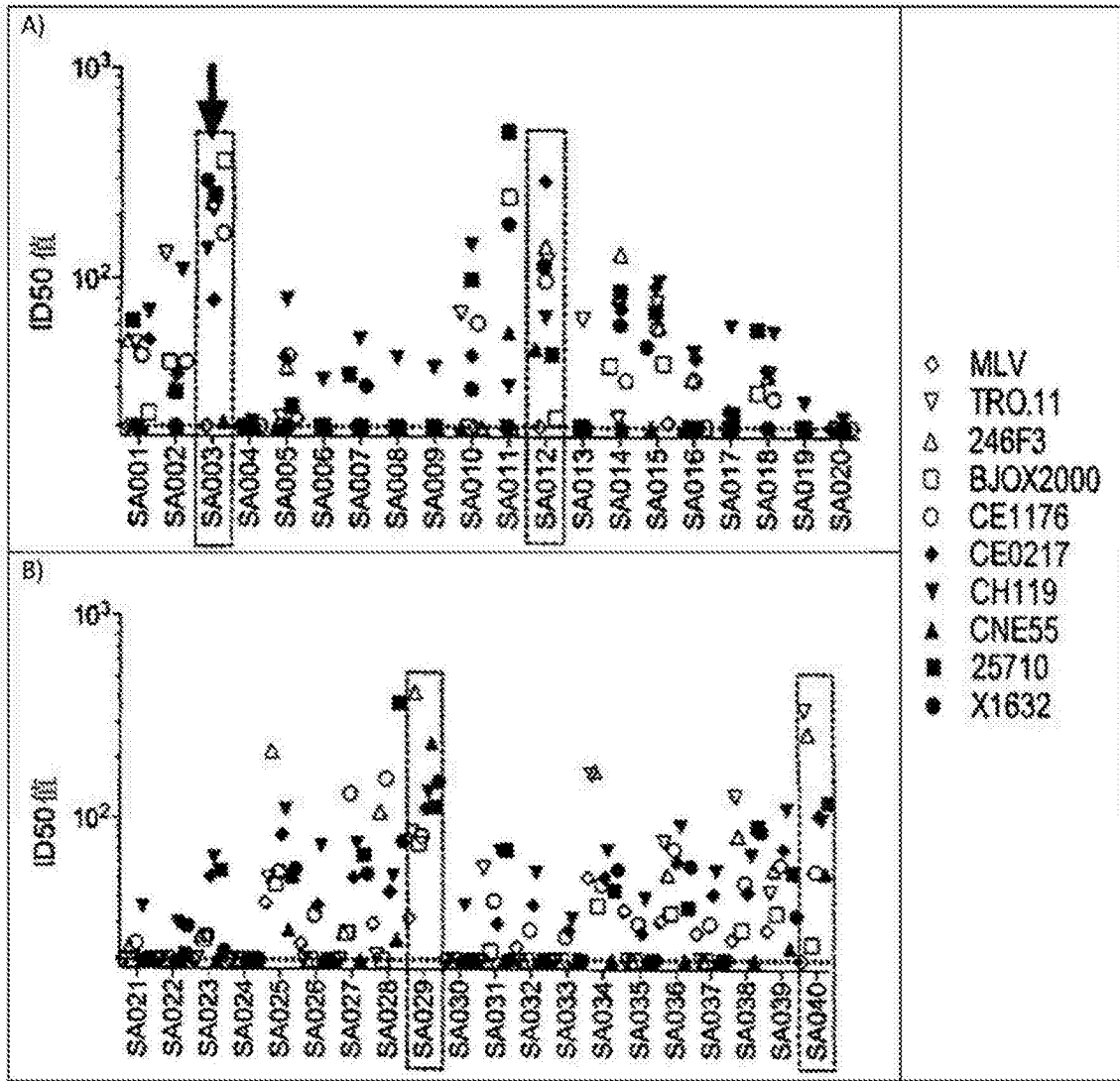


图1A-B

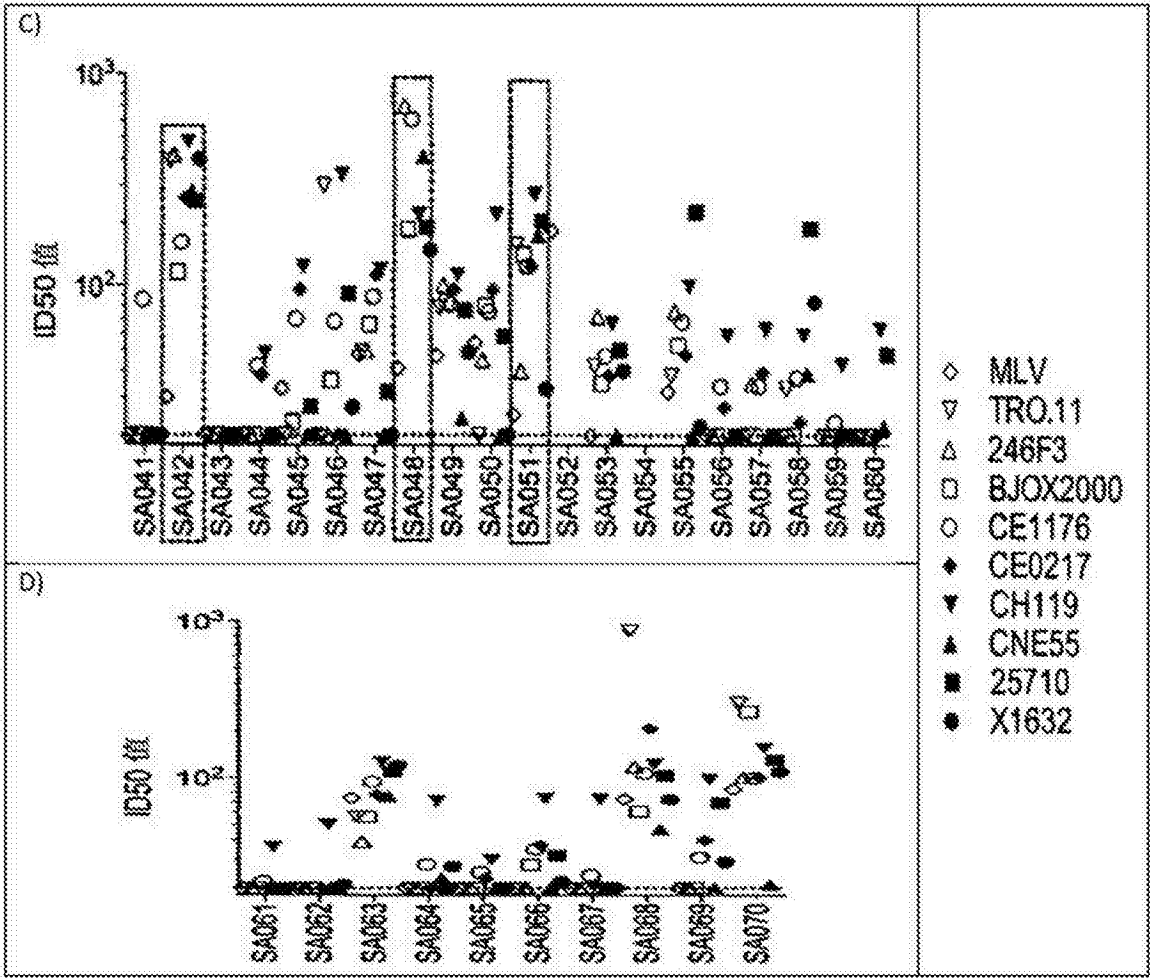


图1C-D

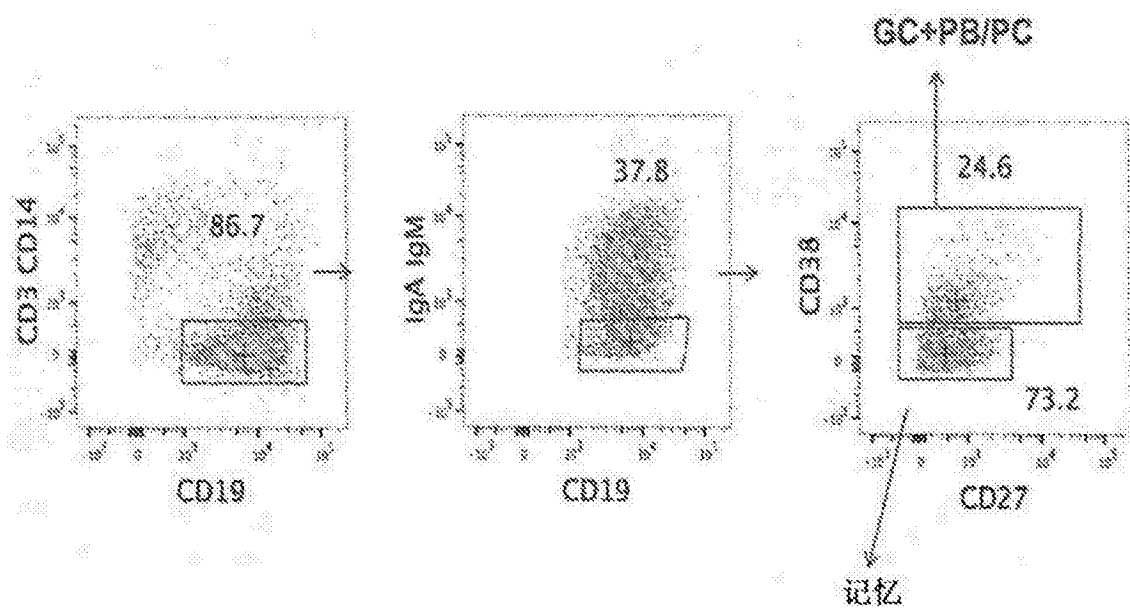


图2

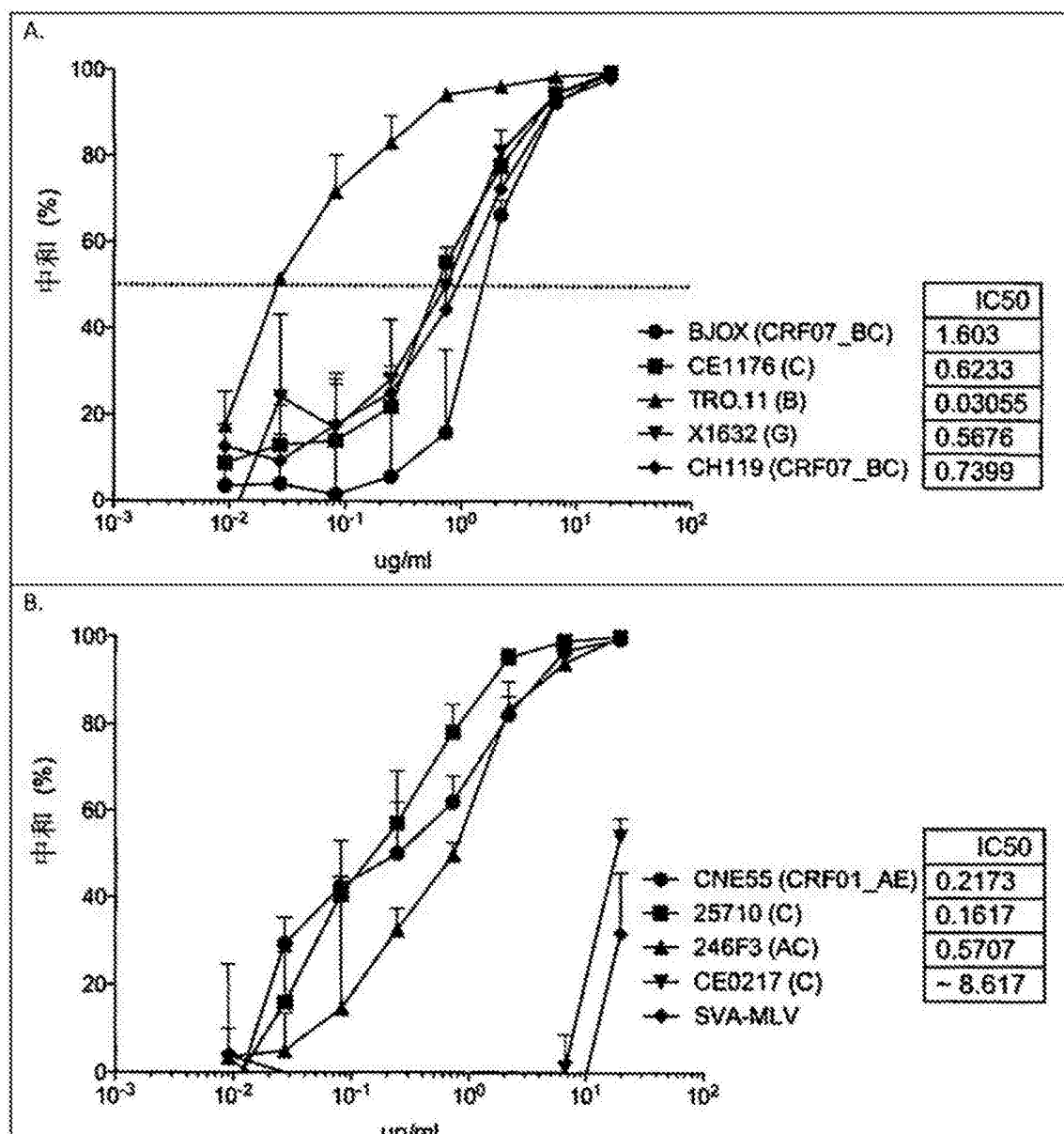


图3

标准 ID	退化技*	IC50	标准 ID	退化技*	IC50
65353	B	1.331	CNE19	BC	1.226
QH088242	B	0.515	CNE20	BC	0.518
SC422861A	B	0.282	CNE21	BC	0.053
PD34	B	0.493	CNE17	BC	1.112
TR011	B	0.185	CNE30	BC	0.597
AC10B29	B	1.694	CNE52	BC	>25
NHPA42597	B	10.365	CNE53	BC	0.321
THRO415618	B	9.831	CNE56	BC	0.287
REJO454187	B	0.281			
TRJO455156	B	0.416	AS208A1	A	>25
WITQ416033	B	0.224	Q3317	A	0.512
CAW5342A2	B	2.242	Q461a2	A	2.829
			Q769d22	A	0.428
WEAL1412_410_5017	B (TF)	2.471	Q359d217	A	0.488
1058_11_C3_1801	B (TF)	0.548	Q842d12	A	7.924
1054_07_TC4_1488	B (TF)	0.082	Q330v4c3	A	0.243
1058_10_TA11_1828	B (TF)	0.080	Q280v8c36	A	>25
1012_11_TX21_3257	B (TF)	0.041			
0280_08_TA5_4522	B (TF)	1.978	191856_A11	A (TF)	1.668
0284_13_B5_4578	B (TF)	0.088	191884B7-19	A (TF)	2.614
02357_16_D3_4588	B (TF)	0.043	900485_A3_4	A (TF)	0.408
SC05_BC11_2344	B (TF)	0.710			
			T257-31	CRE02_AG	21.984
Du15612	C	0.146	028-28	CRE02_AG	0.088
Du17217	C	0.059	253-8	CRE02_AG	0.355
Du4221	C	0.029	T250-4	CRE02_AG	2.202
2M197MP07	C	0.127	T251-18	CRE02_AG	>25
2M213MP115	C	0.040	T278-50	CRE02_AG	5.182
2M233MP06	C	0.073	T255-34	CRE02_AG	0.277
2M245MP11	C	0.044	211-9	CRE02_AG	0.583
2M53MP012	C	11.114	235-47	CRE02_AG	0.574
2M109FPM	C	0.018			
2M135MP110a	C	0.710	020345c01	CRE01_AE	1.547
CAF45x00G3	C	1.078	CNE3	CRE01_AE	0.028
CAF210200E8	C	>25	C1088c03	CRE01_AE	0.324
HM-D01428-242	C	24.089	02184c04	CRE01_AE	0.080
HM-D013965-211	C	0.028	01168c01	CRE01_AE	0.083
HM-16055-23	C	0.174	03265c08	CRE01_AE	1.138
HM-16845-222	C	0.040	C2101c01	CRE01_AE	0.739
			C3347c11	CRE01_AE	0.001
Ca1086_S2	C (TF)	0.328	C4118c09	CRE01_AE	2.022
Ca0383_C3	C (TF)	>25	CNE5	CRE01_AE	4.348
Ca1178_A3	C (TF)	1.032	0JON008009.024	CRE01_AE	1.212
Ca2010_F3	C (TF)	11.811			
Ca0882_E4	C (TF)	0.028	0JON015000.115	CRE01_AE (TF)	0.529
Ca1172_H1	C (TF)	0.070	0JON016000.082	CRE01_AE (TF)	0.353
Ca2080_G3	C (TF)	4.050	0JON025000.011	CRE01_AE (TF)	0.186
Ca703010054_2A2	C (TF)	1.793	0JON028000.183	CRE01_AE (TF)	1.097
BE1268431a	C (TF)	>25			
246F_C1G	C (TF)	4.834	X1193_c1	G	0.851
249M_B1G	C (TF)	2.789	00402_c3_11	G	3.038
2M247v1(Rev.)	C (TF)	0.501	X1254_c3	G	3.068
7039102001ES(Rev.)	C (TF)	4.385	X2088_c9	G	>25
1394C8Q1(Rev.)	C (TF)	5.864	X2131_C1_B5	G	0.229
Ca704809221_183	C (TF)	3.078	E1981_C5_3	G	0.118
			X1632_S2_B1G	G	1.646
0019_v9c45	D	0.250			
007412M1_vic12	D	0.326	0817_v2c58	GD	14.039
231985c01	D	0.593	0480_v4c25	GD	6.271
231986c02	D	0.348	0952_v1c20	GD	0.188
			0811_v7c18	GD	5.002
191821_E8_1	D (TF)	1.239	09-F1_2_25	GD	3.043
			3301_v1c24	AC	7.543
			0041_v3c23	AC	1.728
			0540_v4c1	AC	3.885
			0545_v4c1	AC	2.977
			0815_v3c3	ACD	0.384
			0103_v3c10	ACD	>25

图4

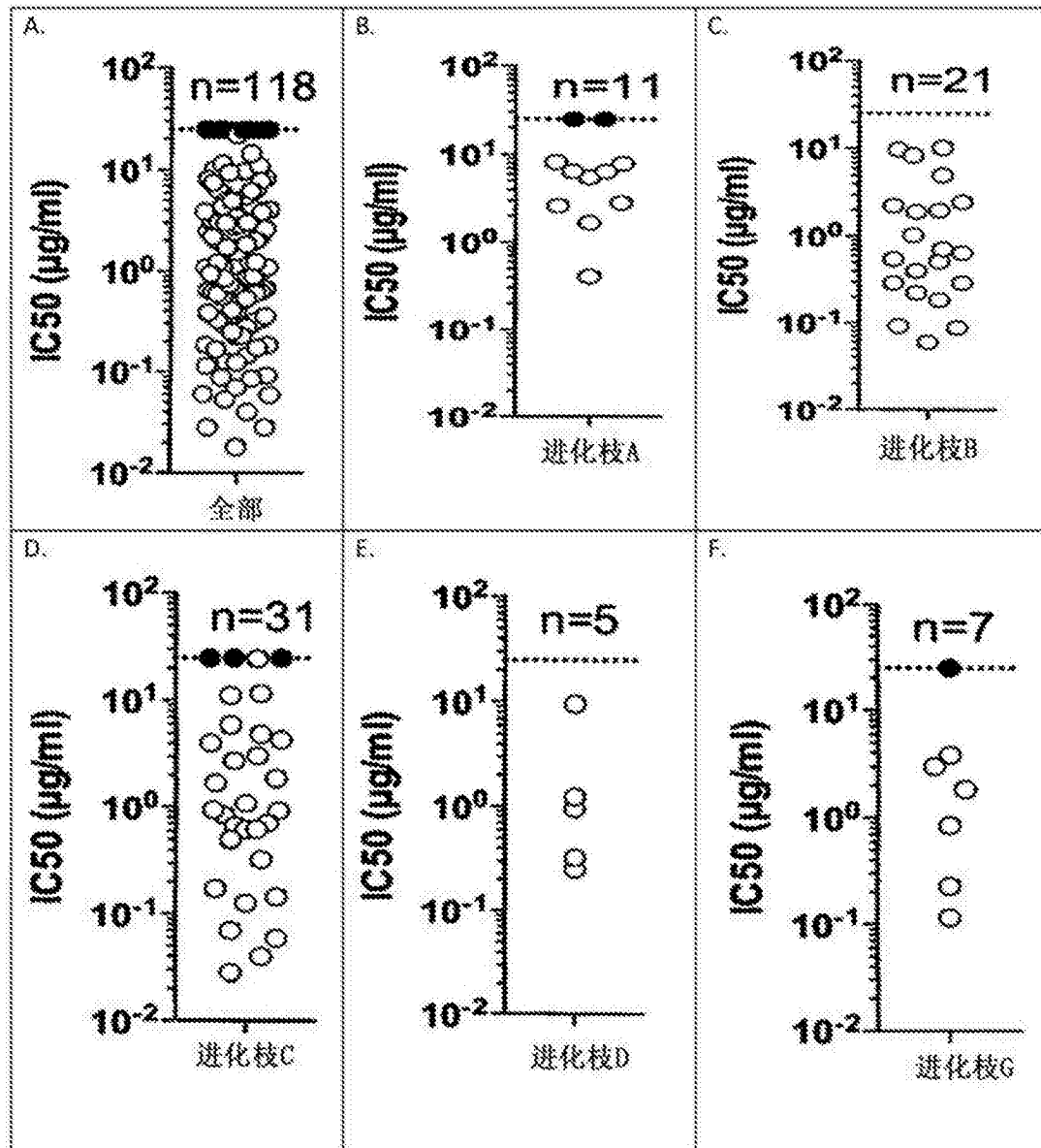


图5A-F

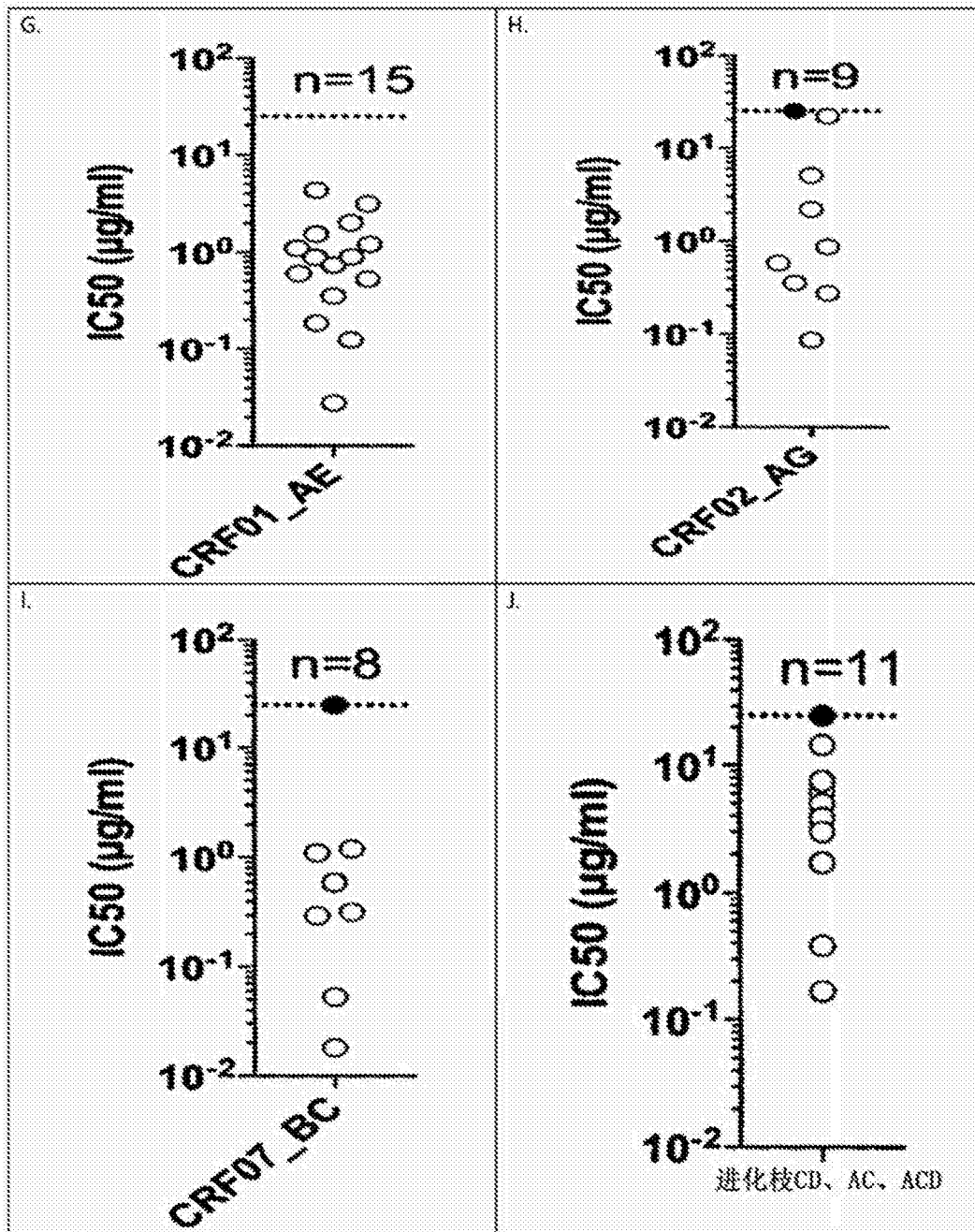


图5G-J

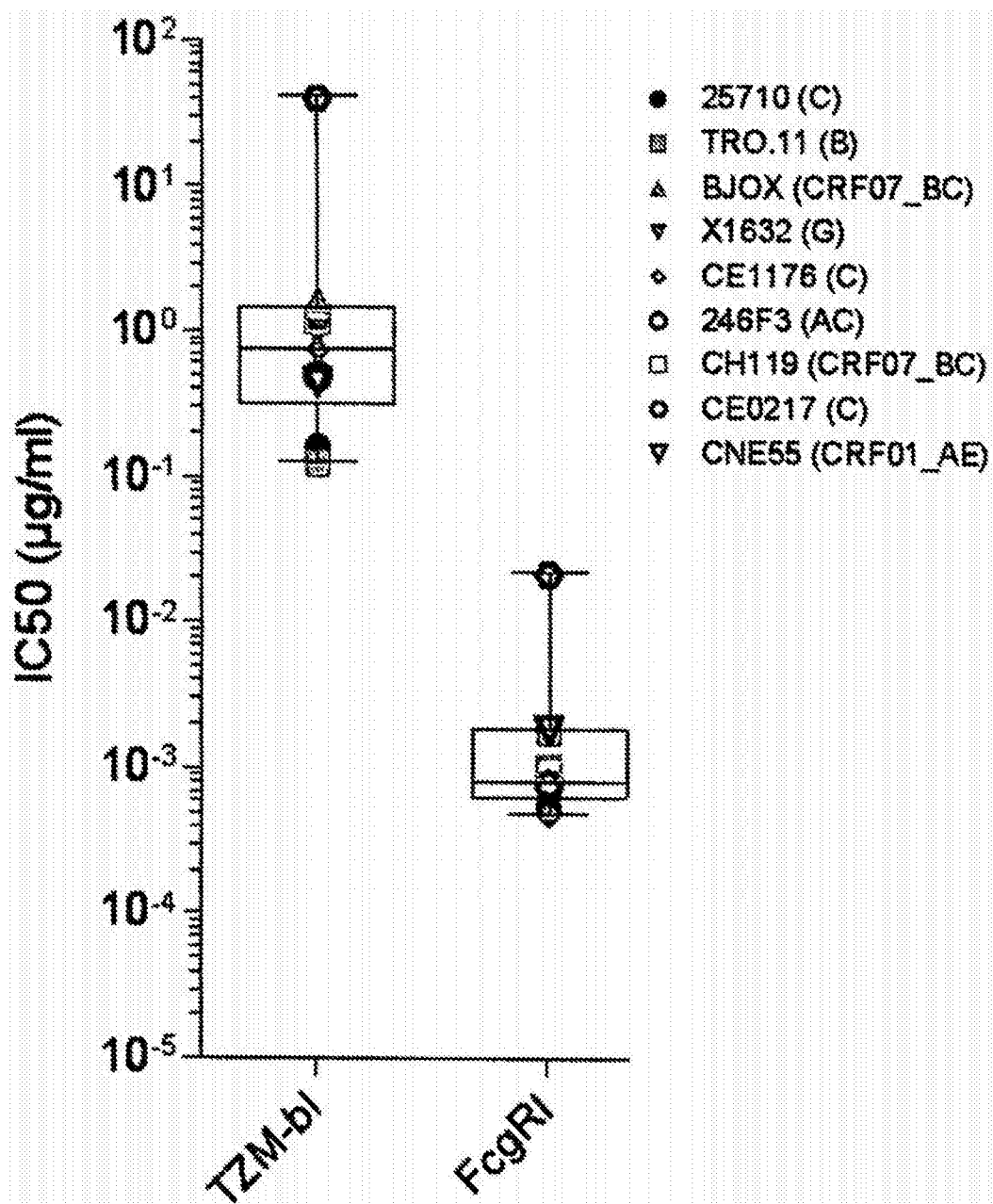


图6

TZM-bl细胞中IC50(μ g/ml)		25	25	25	25	25	25	25
病毒	LN01	1	1	1	1	1	1	1
进化株 B HIV-1		NEQELLALDKWASLWNWFDITKWLWYIKIFIMIV						
HIV-2/7312A	>25	NMYELQKLNSWDVFGNWFDLASWVKYIQYGVYIV						
HIV-2/7312A.C1C	<0.011	-----LA-D--KNLW-----ITK-LW--K-----						
HIV-2/7312A.C3	>25	-----LA-DK-ASLW-----						
HIV-2/7312A.C4	<0.011	-----ITK-LW--K-----						
HIV-2/7312A.C6	>25	-----IT--I-----						
HIV-2/7312A.C7	>25	-----A-DKWA-----						
HIV-2/7312A.C8	<0.011	-----SLW-----ITK-LW--K-----						

图7

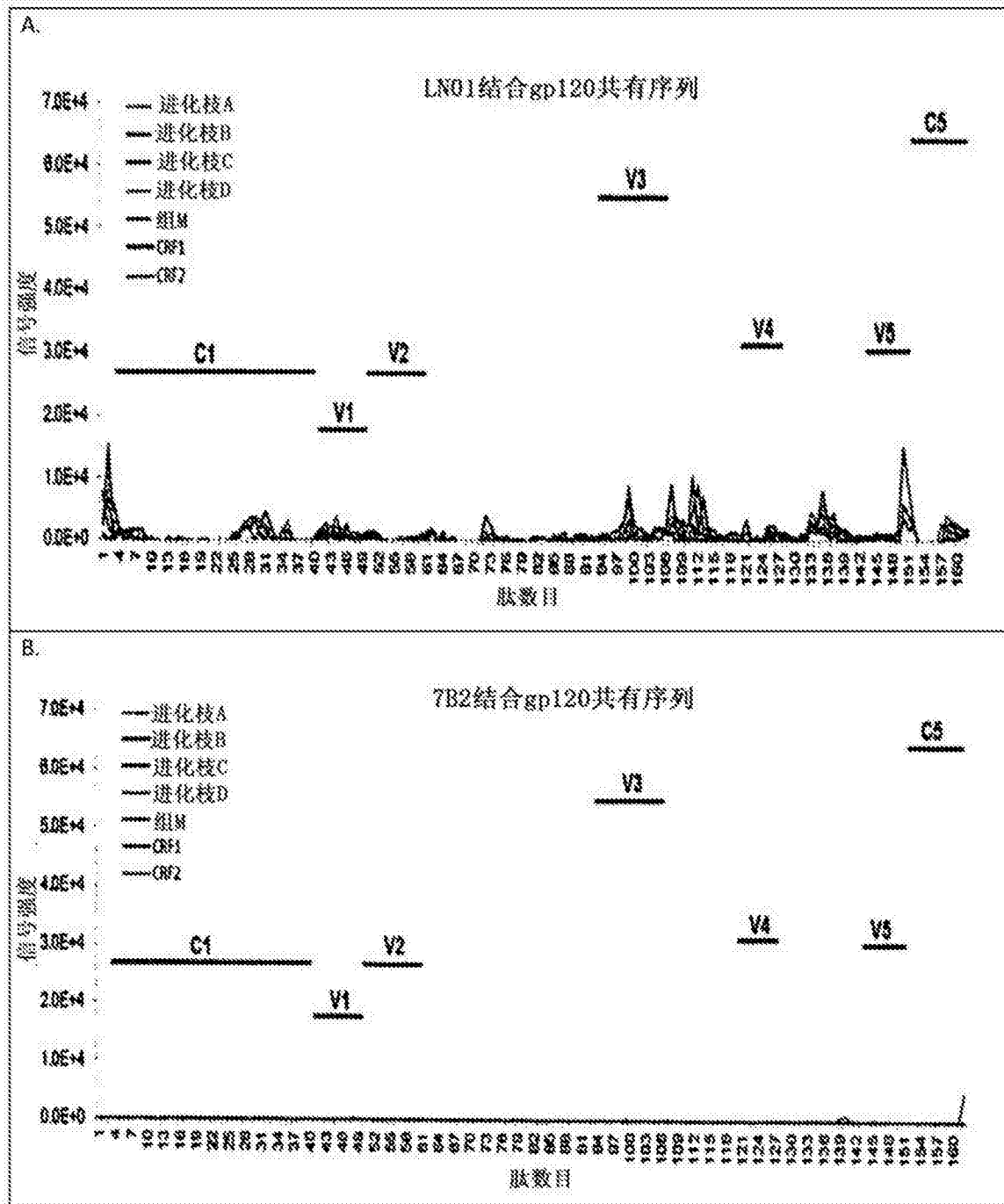


图8A-B

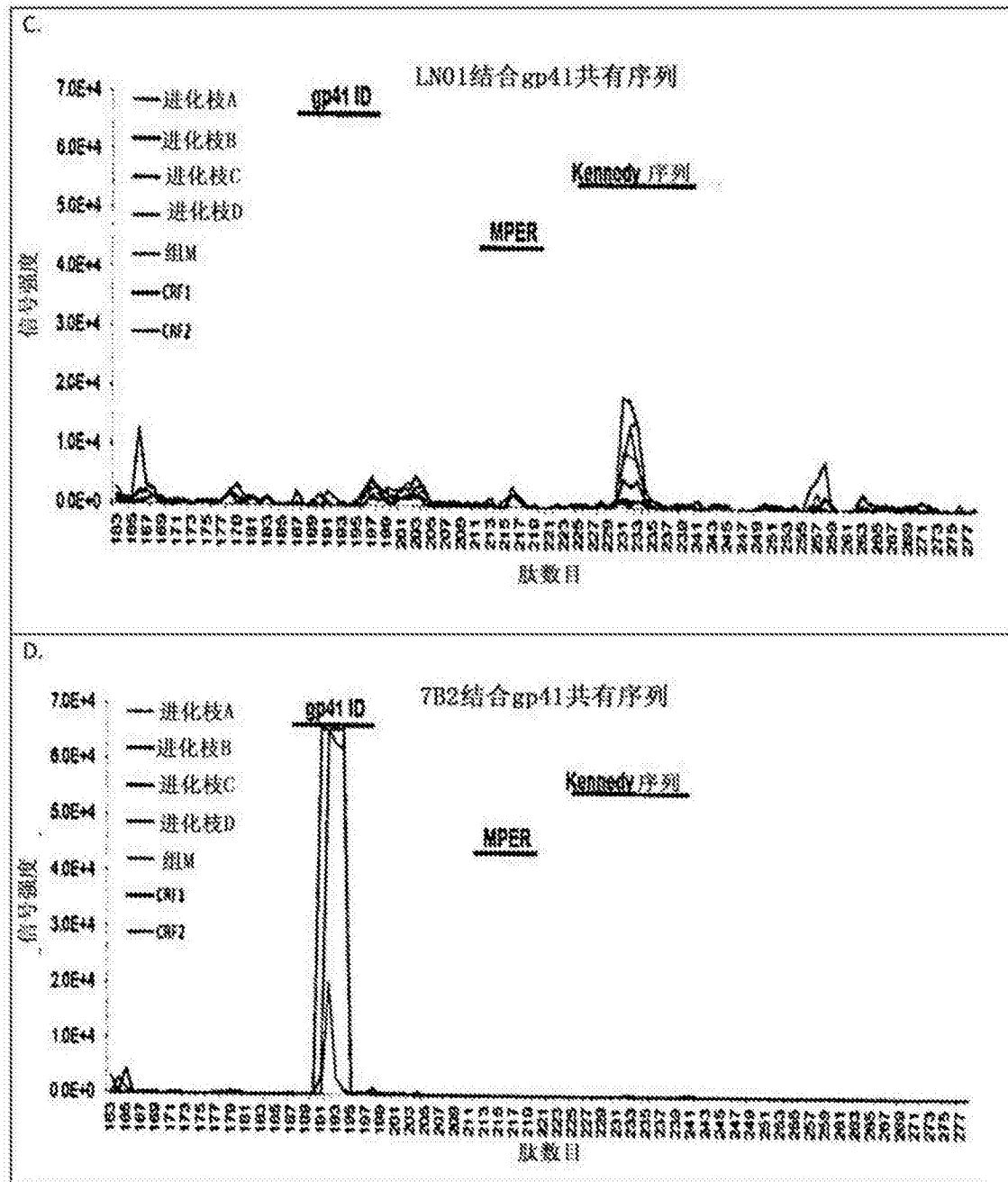


图8C-D

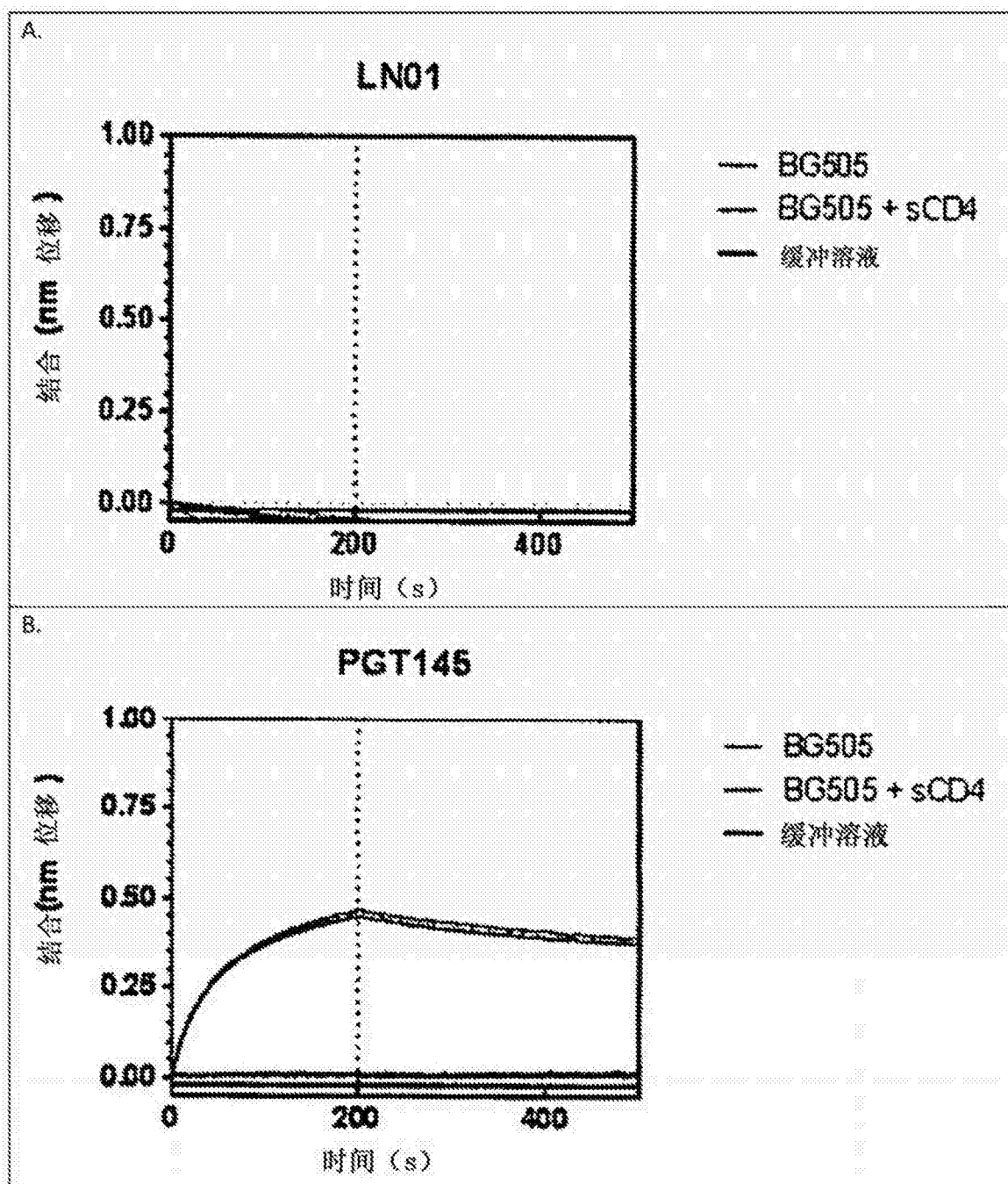


图9A-B

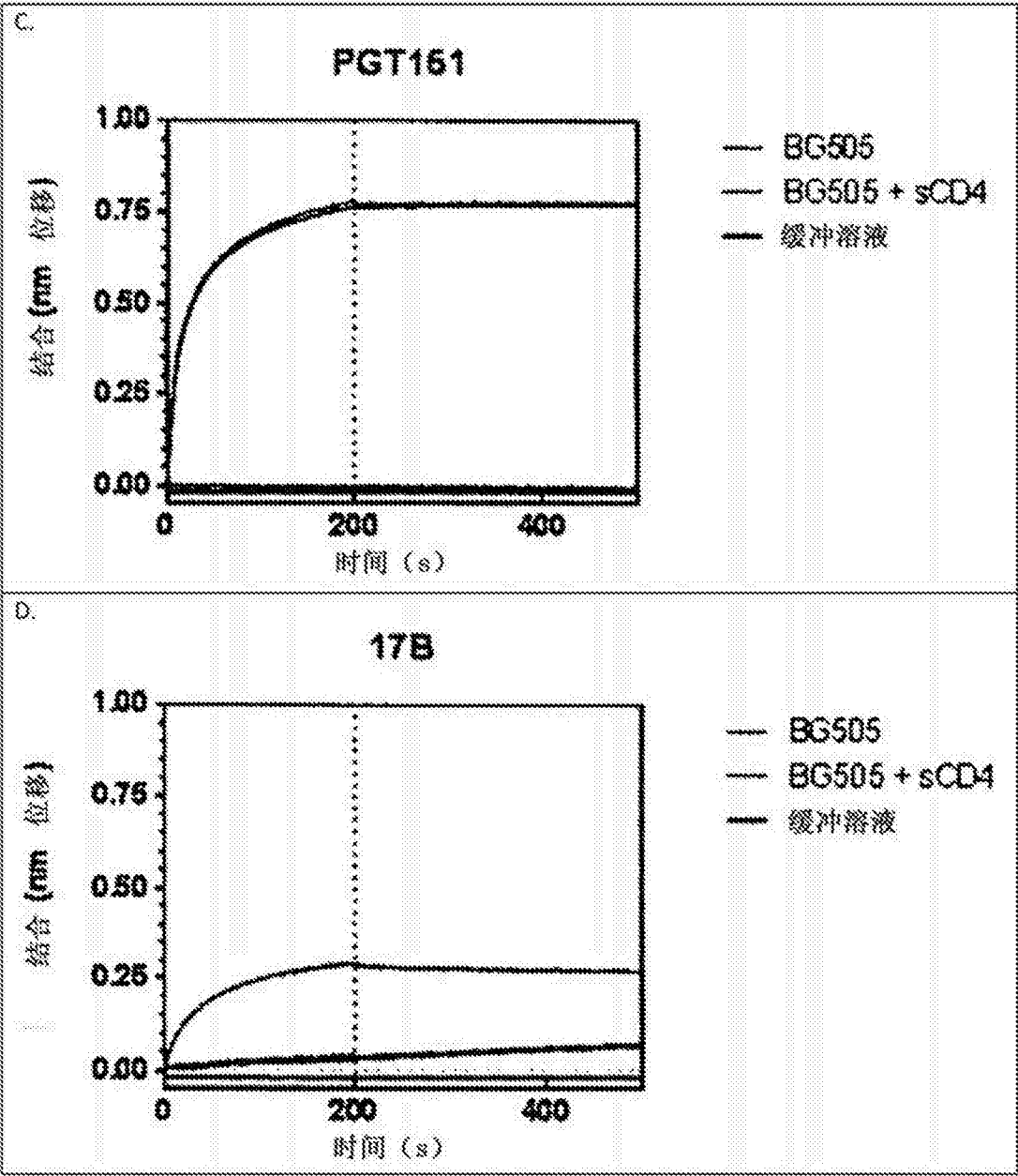


图9C-D

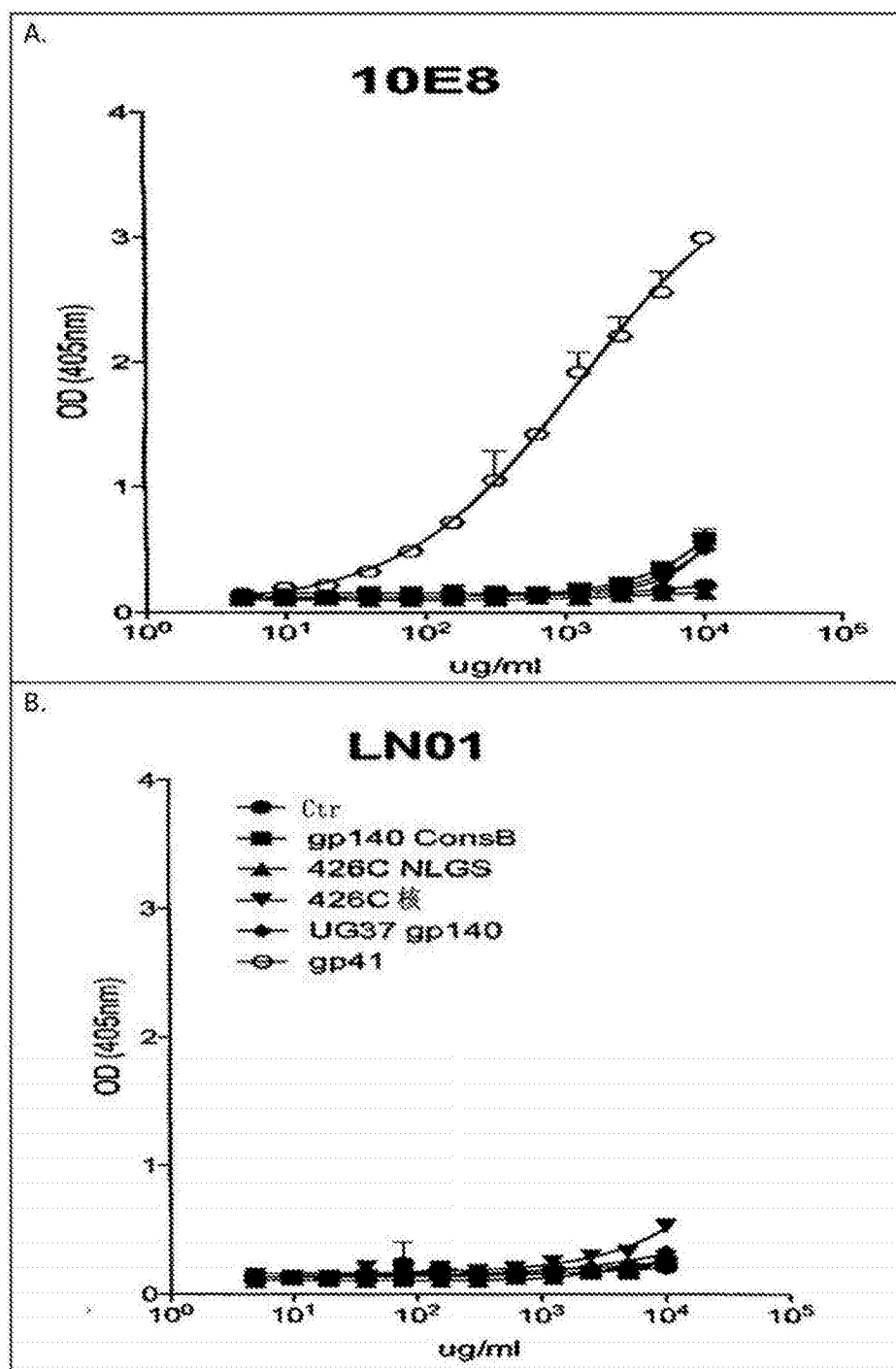


图10

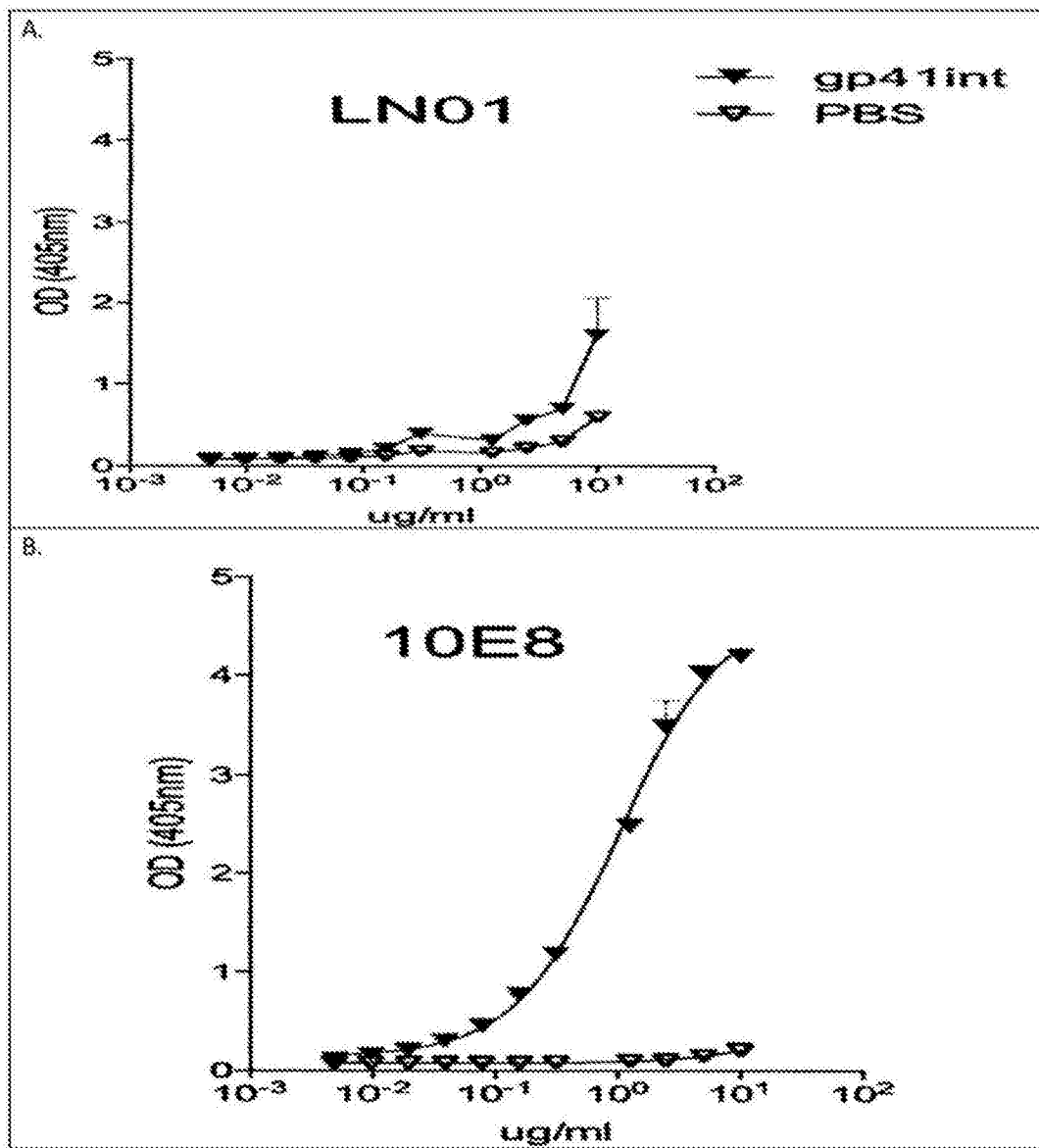


图11

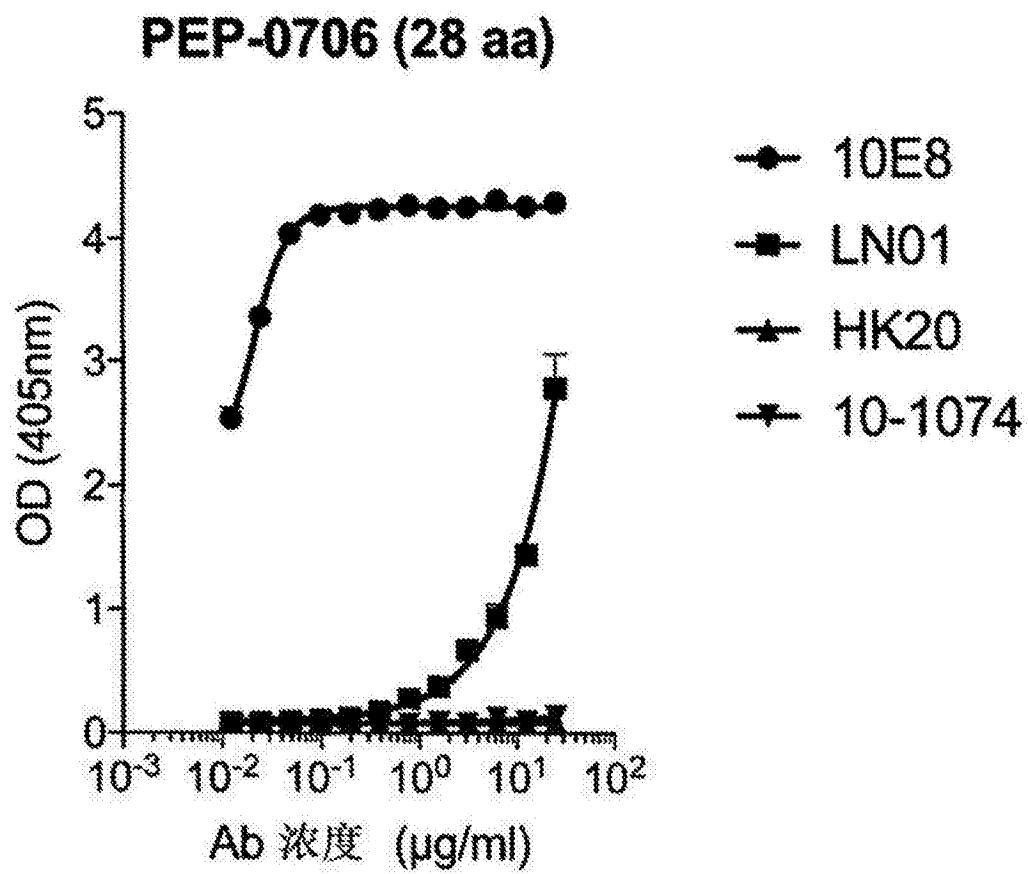


图12

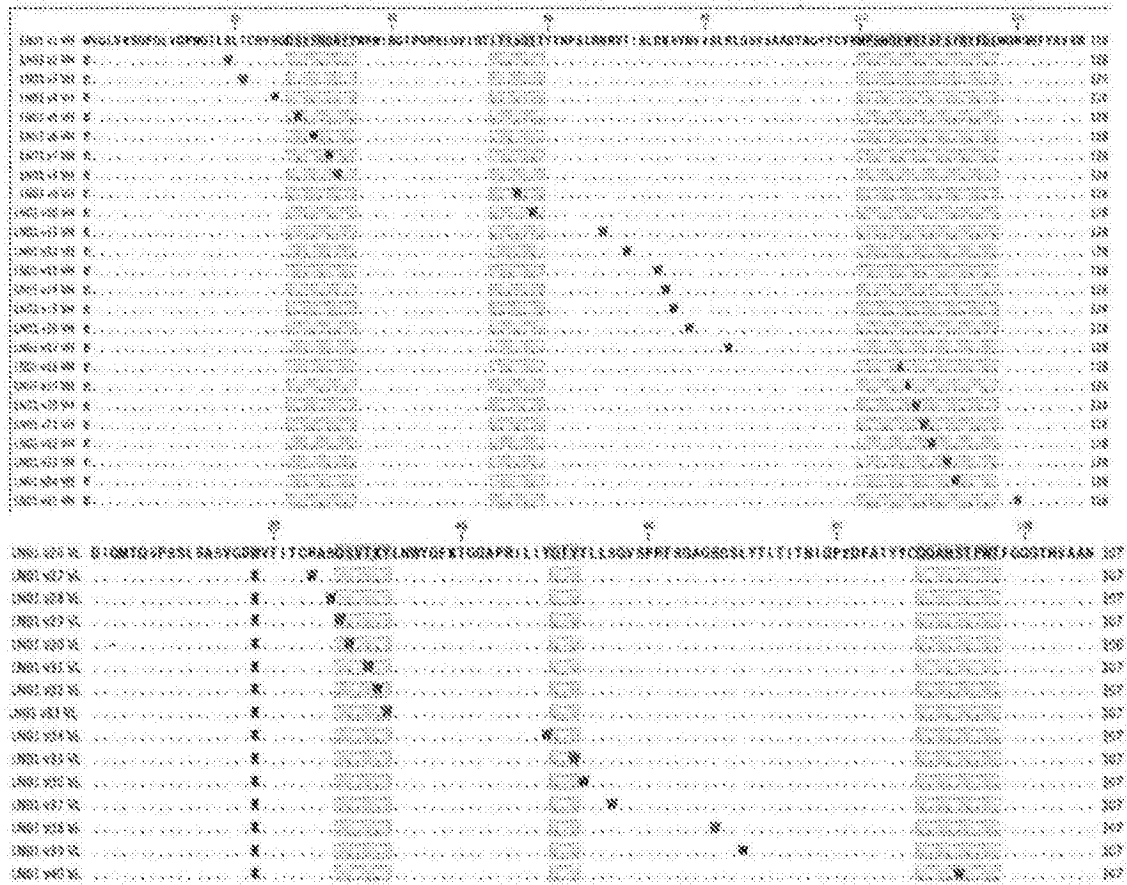


图13A

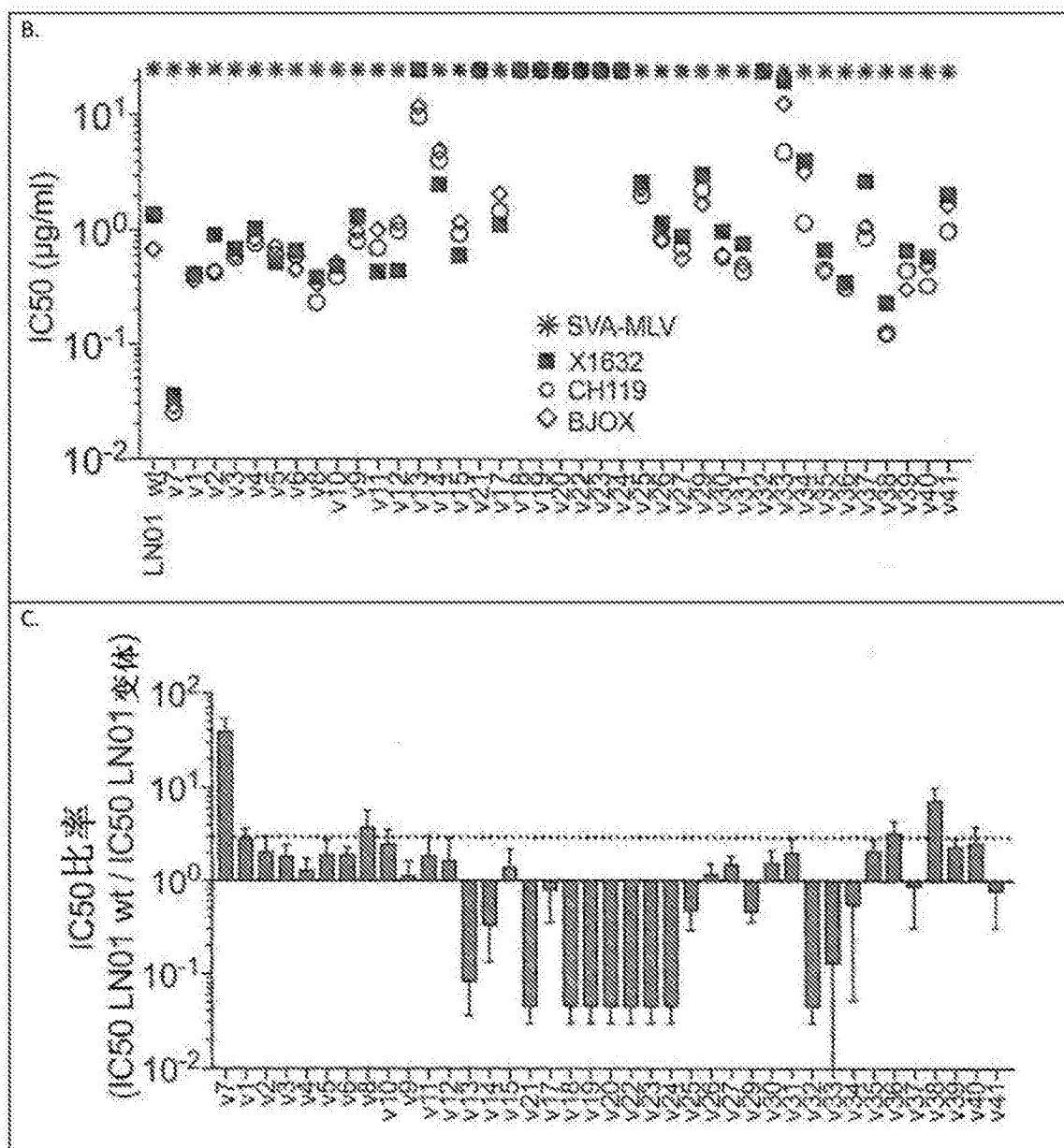


图13B-C

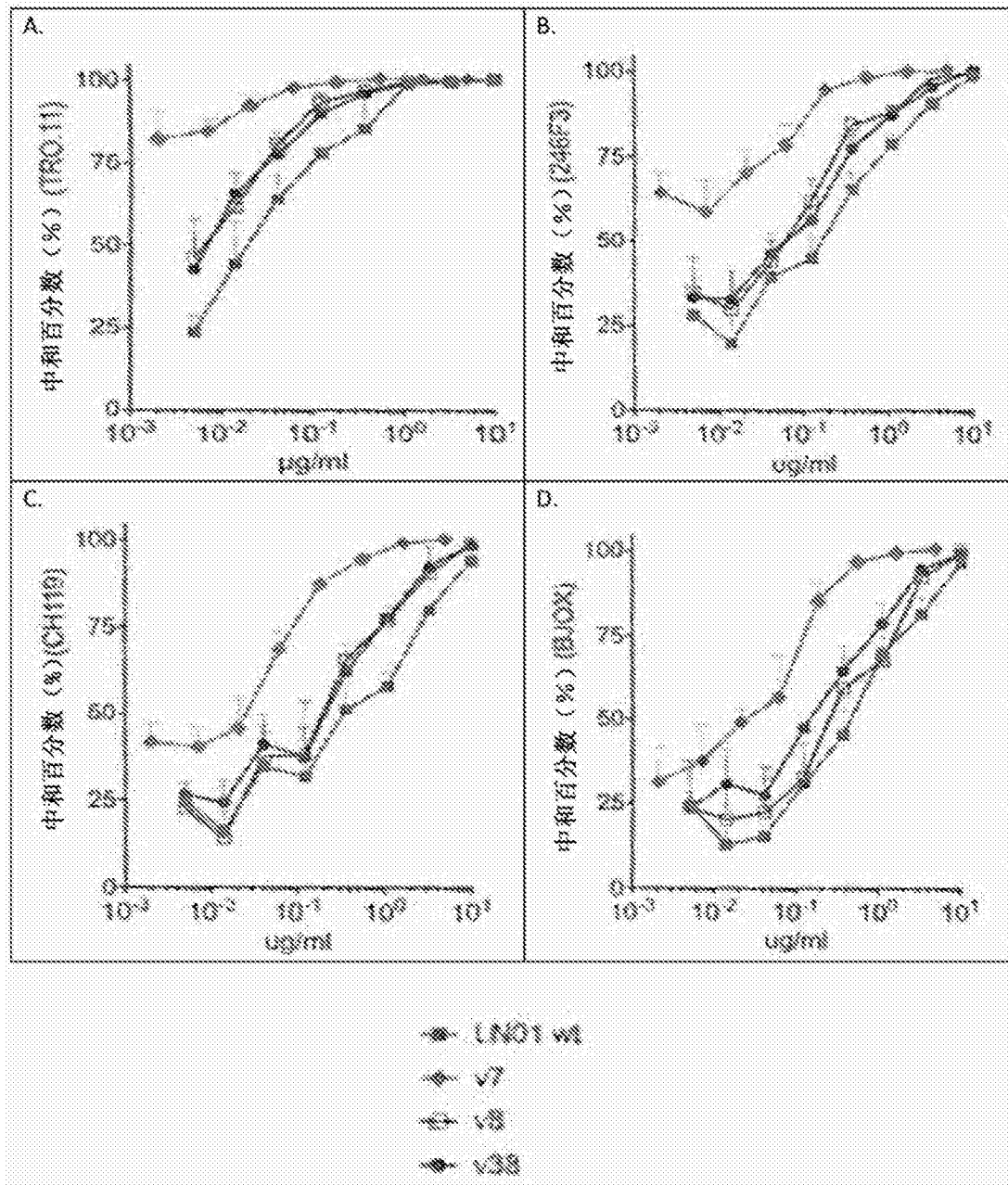
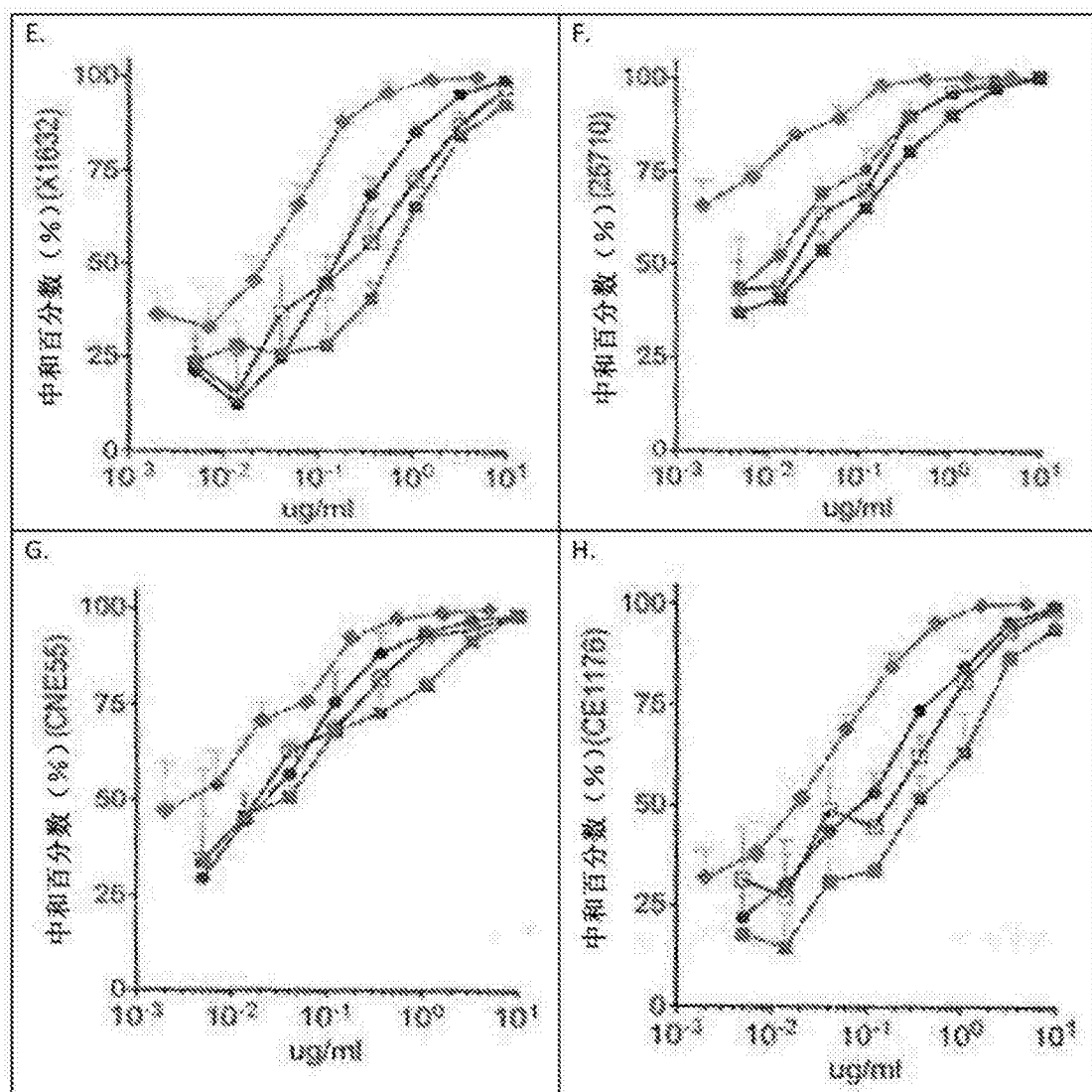


图14A-D



◆ LN01 wt
◆ v7
◆ v8
◆ v38

图14E-H

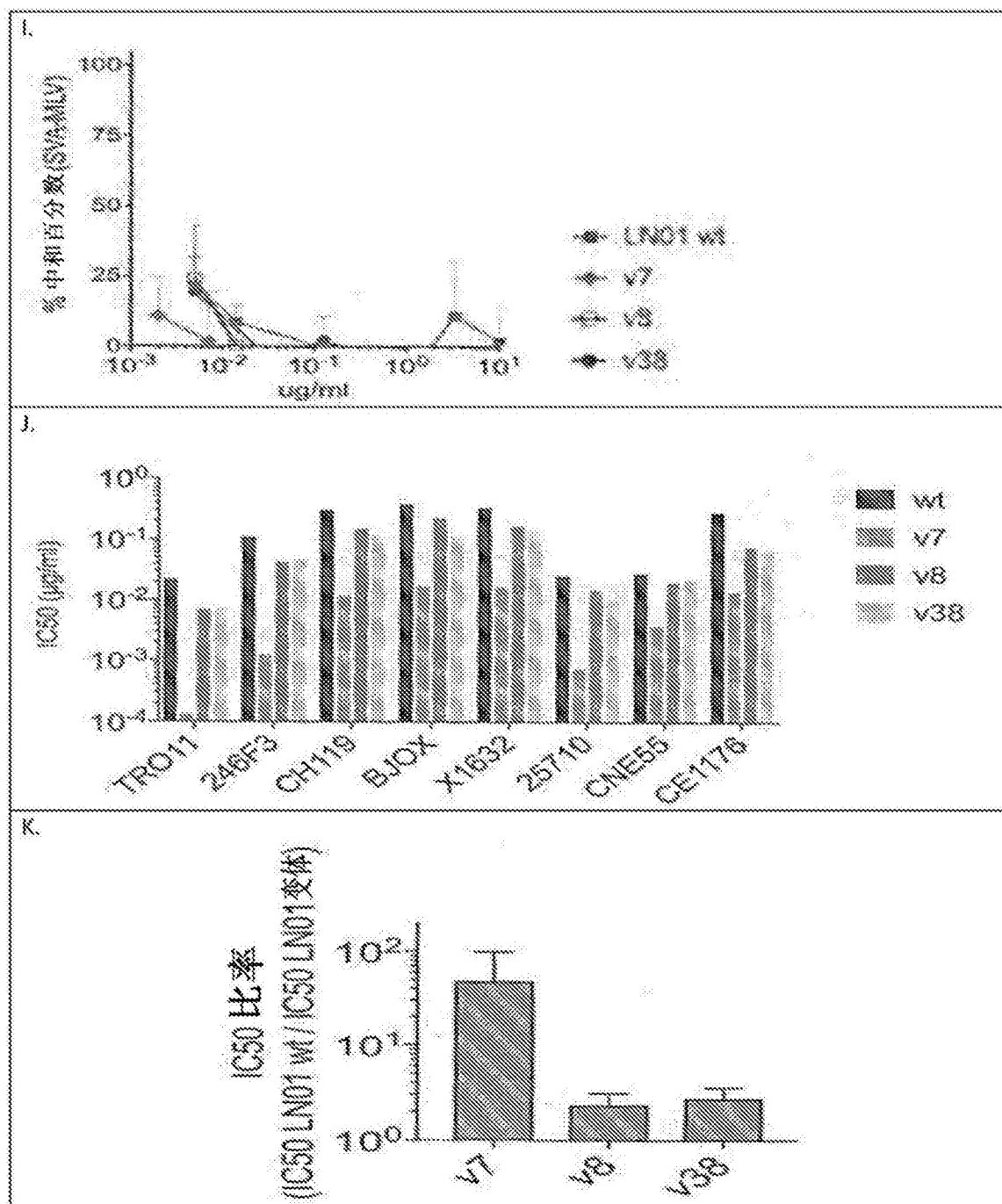


图14I-K

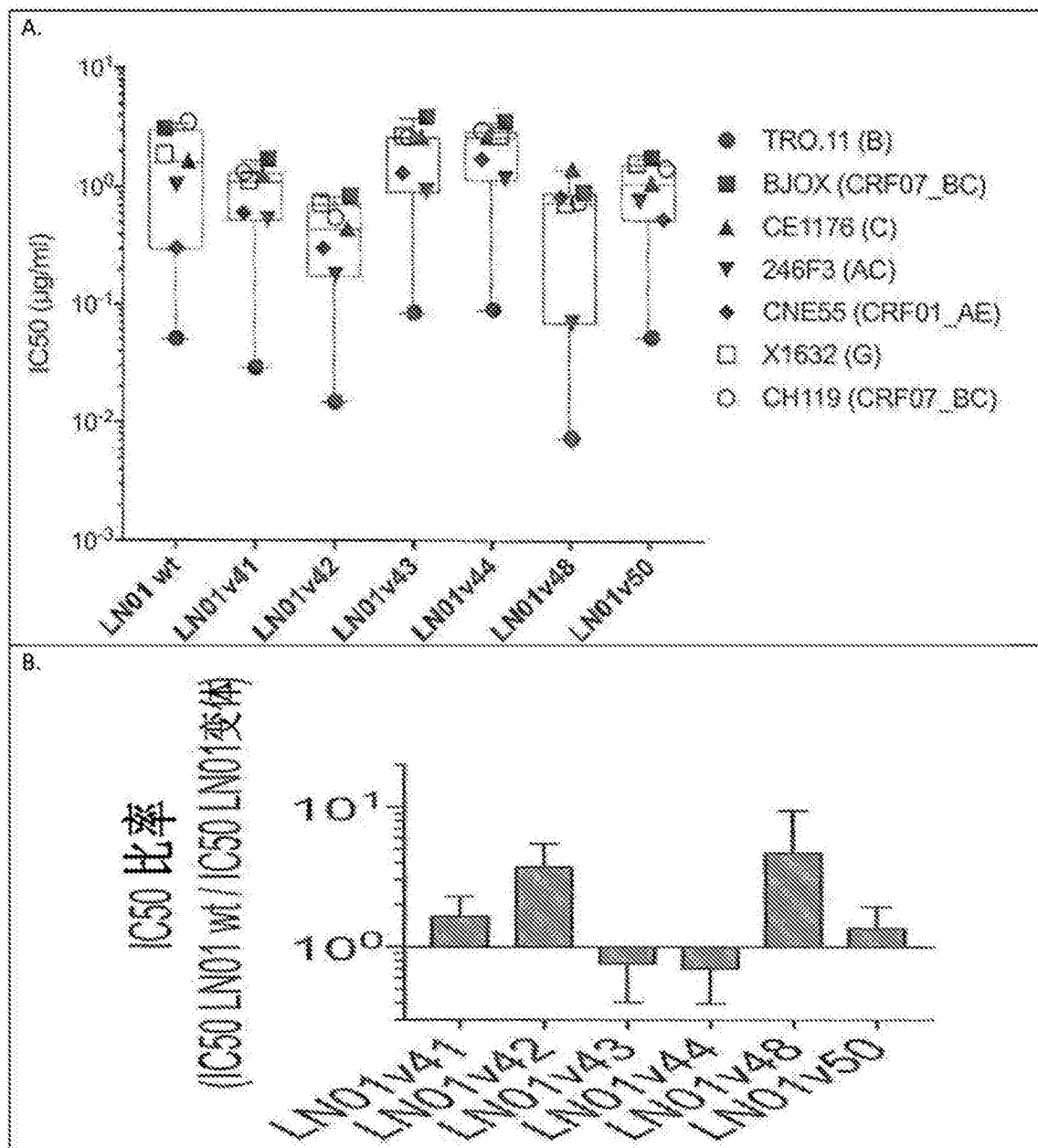


图15A-B

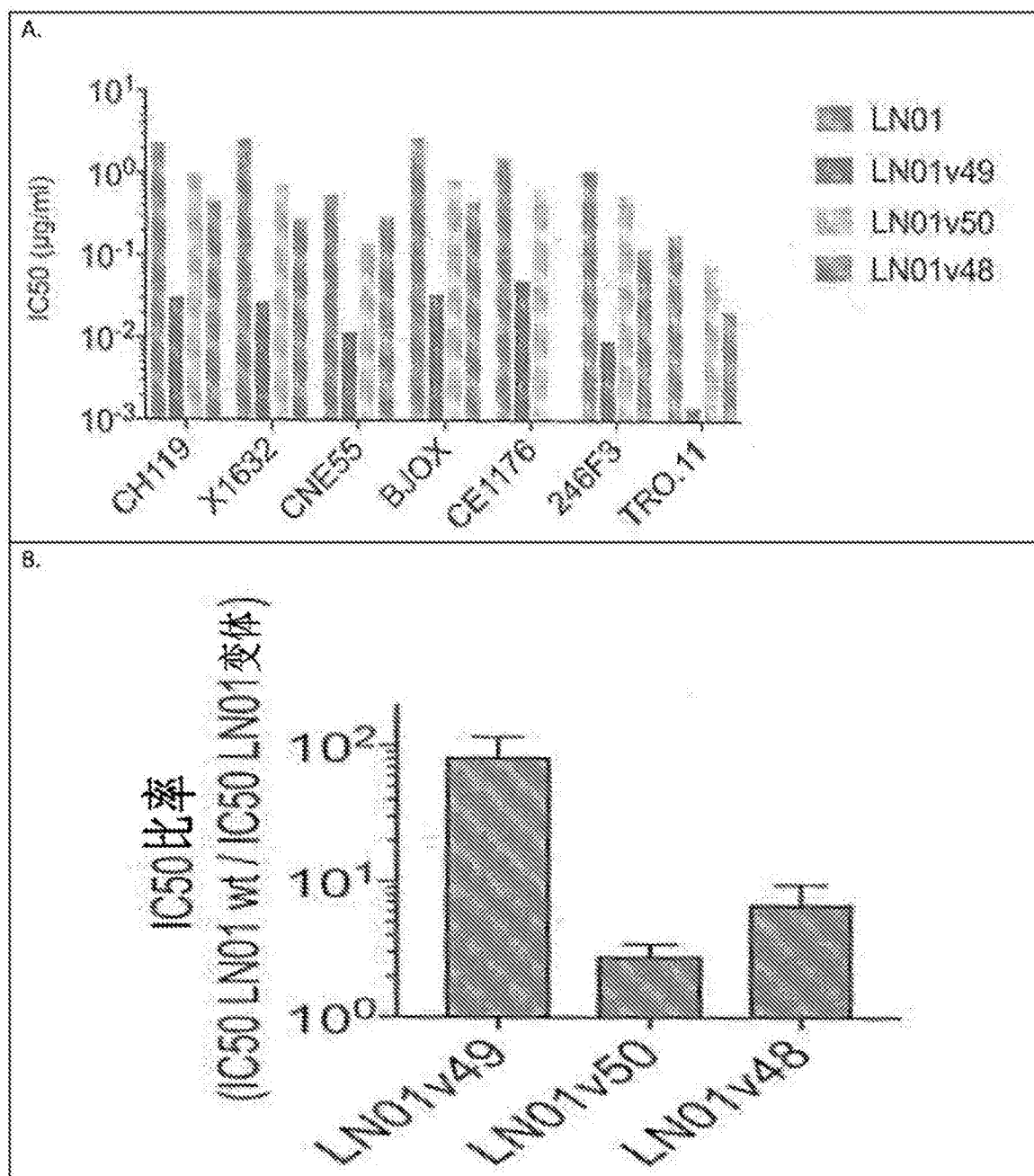


图16A-B

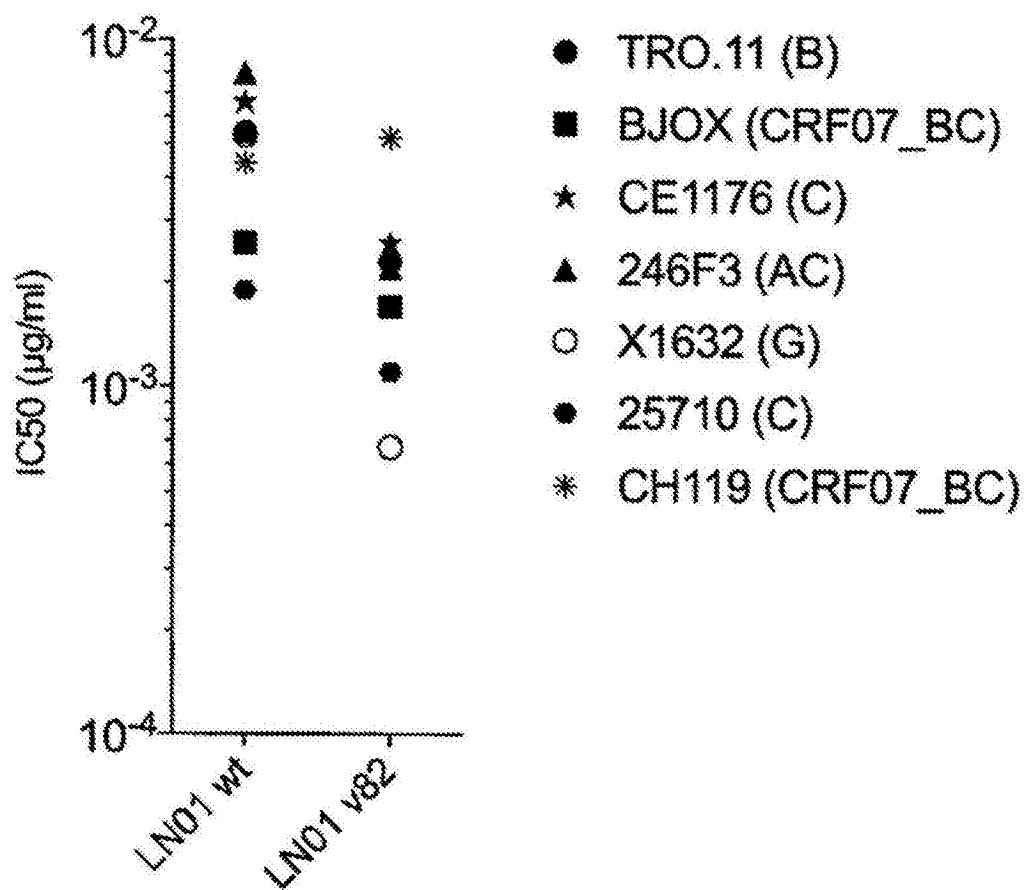


图17