



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102046654 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 200880013049. 3

C07K 16/10 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 03. 13

(30) 优先权数据

60/894, 612 2007. 03. 13 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 10. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/001527 2008. 03. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02008/110937 EN 2008. 09. 18

(71) 申请人 胡马斯有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 A·兰扎韦基亚

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 22 页 序列表 37 页
附图 4 页

(54) 发明名称

针对甲型流感病毒 H5N1 株系的抗体

(57) 摘要

本发明人提供了可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的人类抗体。发明人还提供了可中和 H5 亚型进化枝 2 中的甲型流感病毒株系的抗体, 可中和甲型流感病毒 H5N1 株系并具有 λ 轻链的抗体, 和是可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的 IgG 抗体 (但不具有 IgG1 重链) 的抗体。

1. 一种人类单克隆抗体,其可中和甲型流感病毒 H5N1 株系。
2. 如权利要求 1 所述的抗体,其结合甲型流感病毒 H5N1 株系的病毒体中存在的血凝素。
3. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :13 的重链和包含 SEQ ID NO :15 的轻链。
4. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :5 的重链和包含 SEQ ID NO :7 的轻链。
5. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :9 的重链和包含 SEQ ID NO :11 的轻链。
6. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :1 的重链和包含 SEQ ID NO :3 的轻链。
7. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :42 的重链和包含 SEQ ID NO :44 的轻链。
8. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :52 的重链和包含 SEQ ID NO :54 的轻链。
9. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :62 的重链和包含 SEQ ID NO :64 的轻链。
10. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :72 的重链和包含 SEQ ID NO :74 的轻链。
11. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :82 的重链和包含 SEQ ID NO :84 的轻链。
12. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :92 的重链和包含 SEQ ID NO :94 的轻链。
13. 如权利要求 2 所述的抗体,其具有包含 SEQ ID NO :102 的重链和包含 SEQ ID NO :104 的轻链。
14. 一种抗体,其具有选自由 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14、FLD20. 19、FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体的一个或多个 CDR(SEQ ID NO :17-40、45-50、55-60、65-70、75-80、85-90、95-100、105-110)。
15. 一种抗体,其与选自由 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14、FLD20. 19、FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体结合相同的表位。
16. 一种抗体,其可与选自由 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14、FLD20. 19、FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体竞争结合 H5 血凝素蛋白。
17. 一种抗体,其可中和 H5 亚型进化枝 2 中的甲型流感病毒株系。
18. 一种抗体,其可中和甲型流感病毒 H5N1 株系,其中所述抗体具有 λ 轻链。
19. 一种 IgG 抗体,其可中和甲型流感病毒 H5N1 株系,条件是所述抗体不具有 IgG1 重链。
20. 如权利要求 14 至 19 的任一项所述的抗体,其是人类抗体。
21. 如前述权利要求的任一项所述的抗体,其中所述抗体可以 100 μ g/ml 或更低例如 1 μ g/ml 或更低的浓度中和 100TCID₅₀ 的 H5N1 甲型流感病毒。

22. 如权利要求 21 所述的抗体,其中所述抗体可以 100 μ g/ml 或更低例如 1 μ g/ml 或更低的浓度中和 100TCID₅₀ 的进化枝 1 中的 H5N1 甲型流感病毒株系和进化枝 2 中的 H5N1 甲型流感病毒株系二者。

23. 如权利要求 21 或权利要求 22 所述的抗体,其中所述抗体可以 100ng/ml 或更低的浓度进行中和。

24. 一种核酸,其编码前述权利要求的任一项所述的抗体的重链和 / 或轻链。

25. 根据权利要求 1 至 23 的任一项所述的第一抗体和根据权利要求 1 至 23 的任一项所述的第二抗体的组合,其中所述第一抗体和第二抗体结合甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素上的不同表位。

26. 一种治疗患者的方法,所述方法包括向需要其的患者施用权利要求 1 至 23 的任一项所述的抗体或权利要求 25 所述的组合。

27. 第一抗体和第二抗体,其同时分开施用或顺序施用,其中所述第一抗体是根据权利要求 1 至 23 的任一项所述的抗体,且所述第二抗体是根据权利要求 1 至 23 的任一项所述的抗体,且其中所述第一抗体和第二抗体不同。

28. 如权利要求 27 所述的第一抗体和第二抗体,它们共同可中和 H5N1 甲型流感病毒的进化枝 1 株系和进化枝 2 株系。

29. 如权利要求 28 所述的第一抗体和第二抗体,其结合相同 H5 血凝素上的不同表位。

针对甲型流感病毒 H5N1 株系的抗体

[0001] 本申请要求 2007 年 3 月 13 日提交的美国临时申请第 60/894,612 号的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及对流感病毒,并且特别是对人类 H5N1 甲型流感病毒具有特异性的人类抗体。

背景技术

[0003] 甲型流感病毒是在人类中引起严重疾病的病原体。可参考株系的血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 表面蛋白的亚型对它们进行分类。目前有抗原性彼此不同的 16 种已知的 HA 亚型 (H1 至 H16) 和 9 种 NA 亚型 (N1 至 N9)。人类群体中目前流行的甲型流感病毒是 H1N1 或 H3N2 株系。

[0004] 当出现能够进行人类-至-人类(水平)传播并且相对于目前流行的株系具有新 HA 或 NA 亚型的甲型流感病毒株系时,即产生流感大流行。例如,人类群体目前在免疫学上首次接触 (immunologically naive) H5N1 株系, H5N1 株系已在禽类群体中流行了若干年。如果 H5N1 株系变得适应于人类-至-人类传播,则它可引起流感感染的大范围爆发。

[0005] 目前应对 H5N1 爆发的方法包括预防性免疫接种或使用神经氨酸酶抑制剂诸如奥司他韦 (达菲™(Tamiflu™)) 和扎那米韦 (瑞乐沙™(Relenza™))。参考文献 1 报道,具有人类恒定域 (κ 轻链和 IgG1 重链) 和鼠可变域的嵌合单克隆抗体可中和 H5N1 病毒株系,并因而适合于预防和治疗。参考文献 2 公开了针对禽流感株系 A/Ck/HK/Yu22/02 制备的鼠单克隆抗体,并提议可将它们人源化。

[0006] 在 H5 亚型内,根据 HA 序列病毒落入不同的谱系(称为进化枝)。2004 年和 2005 年分别在越南和印度尼西亚分离的病毒指定为进化枝 1 和进化枝 2(有时提及时使用罗马数字 I 和 II) 的参考株系。参考文献 1 的抗体是针对 A/Vietnam/1203/04 和 A/Hong Kong/213/03 株系制备的,二者均在进化枝 1 中 [3]。

[0007] 需要进一步的和改进的材料来预防和治疗 H5N1 甲型流感病毒感染和疾病,包括 H5N1 的各个进化枝。

发明内容

[0008] 如下文更详细地说明的,本发明人提供了可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的人类单克隆抗体。

[0009] 发明人还提供了具有选自 FLA5.10、FLD21.140、FLA3.14 和 FLD20.19 组成的组中的抗体的一个或多个 CDR 的抗体。优选地,这些抗体可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素。

[0010] 发明人还提供了具有选自 FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体的一个或多个 CDR 的抗体。优选地,这些抗体可中和甲型流感病

毒 H5N1 株系的血凝素。

[0011] 发明人还提供了与选自 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14 和 FLD20. 19 组成的组中的抗体结合相同表位的抗体。优选地,这些抗体可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素。

[0012] 发明人还提供了与选自 FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体结合相同表位的抗体。优选地,这些抗体可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素。

[0013] 发明人还提供了与选自 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14、FLD20. 19、FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体竞争结合 H5 血凝素蛋白的抗体。优选地,这些抗体可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素。

[0014] 发明人还提供了可中和 H5 亚型进化枝 2 中的甲型流感病毒株系的血凝素的抗体。

[0015] 发明人还提供了可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的抗体,其中所述抗体具有 lambda (λ) 轻链。

[0016] 发明人还提供了可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的 IgG 抗体,条件是所述抗体不具有 IgG1 重链。

[0017] 发明人还提供了本发明第一抗体和本发明第二抗体的组合,其中所述第一抗体和第二抗体结合甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素上的不同表位。因此所述抗体可能能够同时结合单个血凝素蛋白分子。一个此类组合包含抗体 FLD20. 19 和 FLD194。另一组合包含 (i) 与 FLD20. 19 竞争结合 H5 血凝素蛋白的抗体,和 (ii) 与 FLD194 竞争结合 H5 血凝素蛋白的抗体。另一组合包含 (i) 与 FLD20. 19 结合相同表位的抗体,和 (ii) 与 FLD194 结合相同表位的抗体。

[0018] 这些不同抗体可以各种方式生产,并可用于预防和治疗病毒感染和疾病。它们还可在诊断情况中使用。

[0019] 人类单克隆抗体

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的人类单克隆抗体。和非人类抗体不同,这些人类抗体在施用于人类时将不会引起针对它们的恒定域的免疫应答。与嵌合抗体(诸如参考文献 1 中公开的那些)不同,这些人类抗体的可变域是 100% 人类的(特别是除了互补性决定区 [CDR] 之外,可变域的构架区是 100% 人类的),并且因此不会在施用于人类时引起针对可变域构架区的免疫应答(任选地,任何抗独特型应答除外)。人类抗体不包括不具有人类来源的任何序列。

[0021] 术语“单克隆”在最初涉及抗体使用时指由免疫细胞的单个克隆系产生的抗体,其与“多克隆”抗体相反,多克隆抗体虽然全部识别相同靶蛋白,但是却由不同 B 细胞产生,并且将针对所述蛋白上的不同表位。如本文所用,词语“单克隆”并不暗示任何特定的细胞来源,而是指全部具有相同的氨基酸序列并识别相同靶蛋白中的相同表位的抗体的任何群体。因此,单克隆抗体可使用任何合适的蛋白质合成系统包括免疫细胞、非免疫细胞、非细胞系统等产生。这一用法在本领域中是常见的,例如以下产品的产品数据表均提到这些产品为单克隆抗体:表达于鼠骨髓瘤 NS0 细胞系的 CDR 移植的人源化抗体 Synagis™,表达于 CHO 细胞系的人源化抗体赫赛汀™(Herceptin™),和表达于 CHO 细胞系的噬菌体展示抗体 Humira™。

[0022] 人类单克隆抗体可通过各种方法制备。例如,产生目标抗原的人类 B 细胞可通过

例如用埃巴病毒 (EBV) 感染而被永生。人类单克隆抗体还可在非人类宿主中产生, 通过将所述宿主自身的免疫系统替换为有功能的人类免疫系统, 例如至 Scid 小鼠或三合体 (Trimera) 小鼠中。人类 Ig 基因座转基因的小鼠已成功用于产生人类单克隆抗体 (包括针对流感病毒 M2 蛋白的人类抗体 [4]), 例如 Abgenix 的“异种小鼠 (xeno-mouse)” [5]。噬菌体展示也已成功 [6], 并得到了 Humira™ 产品。产生人类单克隆抗体的优选方法公开于参考文献 7&8。在此方法中, 使用 EBV 在多克隆 B 细胞活化物的存在下转化靶抗原特异性的人类 B 记忆淋巴细胞。

[0023] 在本发明的具体实施方案中, 发明人制备了本文称作 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14 和 FLD20. 19 的人类单克隆抗体。在本发明的进一步具体的实施方案中, 发明人制备了本文称作 FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 的人类单克隆抗体。这些抗体是使用参考文献 7&8 的技术制备的。

[0024] 抗体 FLA5. 10 特异性识别进化枝 1 中的 H5N1 病毒。表位作图研究显示它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :13 (由 SEQ ID NO :14 编码), 并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :15 (由 SEQ ID NO :16 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0025]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	17	18	19	20	21	22

[0026] 抗体 FLD21. 140 特异性识别进化枝 1 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :5 (由 SEQ ID NO :6 编码), 并且它的轻链 (λ) 可变域是 SEQ ID NO :7 (由 SEQ ID NO :8 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0027]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	23	24	25	26	27	28

[0028] 抗体 FLA3. 14 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。表位作图研究显示它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :9 (由 SEQ ID NO :10 编码), 并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :11 (由 SEQ ID NO :12 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0029]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	29	30	31	32	33	34

[0030] 抗体 FLD20. 19 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :1 (由 SEQ ID NO :2 编码), 并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :3 (由 SEQ ID NO :4 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0031]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	35	36	37	38	39	40

[0032] 抗体 FLD84 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :42(由 SEQ ID NO :41 编码),并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :44(由 SEQ ID NO :43 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0033]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	45	46	47	48	49	50

[0034] 抗体 FLD93 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :52(由 SEQ ID NO :51 编码),并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :54(由 SEQ ID NO :53 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0035]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	55	56	57	58	59	60

[0036] 抗体 FLD122 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :62(由 SEQ ID NO :61 编码),并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :64(由 SEQ ID NO :63 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0037]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	65	66	67	68	69	70

[0038] 抗体 FLD127 识别进化枝 1 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :72(由 SEQ ID NO :71 编码),并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :74(由 SEQ ID NO :73 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0039]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	75	76	77	78	79	80

[0040] 抗体 FLD129 识别进化枝 1 中的 H5N1 病毒且识别携带进化枝 1 和进化枝 2 二者中的病毒的流感 H5 HA 的假型病毒 (pseudotypes)。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :82(由 SEQ ID NO :81 编码),并且它的轻链 (λ) 可变域是 SEQ ID NO :84(由 SEQ ID NO :83 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0041]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	85	86	87	88	89	90

[0042] 抗体 FLD132 识别进化枝 1 中的 H5N1 病毒且识别携带进化枝 1 和进化枝 2 二者中的病毒的流感 H5HA 的假型病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :92 (由 SEQ ID NO :91 编码), 并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :94 (由 SEQ ID NO :93 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0043]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	95	96	97	98	99	100

[0044] 抗体 FLD194 识别进化枝 1 和进化枝 2 中的 H5N1 病毒。它识别 HA 蛋白。它的重链可变域的氨基酸序列是 SEQ ID NO :102 (由 SEQ ID NO :101 编码), 并且它的轻链 (κ) 可变域是 SEQ ID NO :104 (由 SEQ ID NO :103 编码)。因此它的 CDR 具有以下序列:

[0045]

CDR	H1	H2	H3	L1	L2	L3
SEQ ID NO :	105	106	107	108	109	110

[0046] 一个或多个这些抗体的 CDR 序列可被转移到可选的可变域以生成共有它们的抗原结合特异性的进一步抗体, 这一过程称为 ‘CDR 移植’ [9-14]。虽然 CDR 移植过程通常用于在不同动物物种的可变域之间转移抗原结合特异性, 但是它还可用于将结合特异性从一种类型的抗体转移至不同类型的抗体。H1、H2 和 H3 CDR 可一起转移到接受体 V_H 结构域, 但是仅转移它们中的一个或两个也可以是足够的 [12]。相似地, L1、L2 和 L3 CDR 的一个、两个或全部三个可转移到接受体 V_L 结构域。优选的抗体将具有供体 CDR 的 1、2、3、4、5 或全部 6 个。当仅转移一个 CDR 时, 通常不是 L2 CDR, L2 CDR 通常是六者中最短的。通常供体 CDR 将全部来自相同的人类抗体, 但是也可以混合它们, 例如转移来自第一抗体的轻链 CDR 和来自第二抗体的重链 CDR。

[0047] CDR 从供体可变域向接受体可变域的转移通常伴有一个或多个构架残基的修饰。

[0048] 作为 CDR 移植的替代, 也可使用 ‘SDR 移植’ 过程 [15、16], 其中仅 CDR 内的特异性决定残基被转移。

[0049] 根据 Kabat 编号 [17], 轻链可变区中的 CDR 是氨基酸 24-34 (L1)、50-56 (L2) & 89-97 (L3), 而重链可变区中的 CDR 是氨基酸 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3)。根据 Chothia 编号 [18], 轻链可变区中的 CDR 是氨基酸 26-32 (L1)、50-52 (L2) & 91-96 (L3), 而重链可变区中的 CDR 是氨基酸 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3)。上面的表格通过标准化的 IMGT 编号系统限定 CDR [19-21], 即: CDR1 = IMGT 位置 27-38; CDR2 = IMGT 56-65; 和 CDR3 = IMGT 105-117。构架或 “FR” 残基是 CDR 之外的可变域残基。

[0050] 参考文献 22 公开了针对流感病毒, 但不是针对 H5 株系的人类单克隆抗体。

[0051] 抗体

[0052] 本发明的抗体可采用各种形式。例如,它们可以是天然抗体,如在哺乳动物中天然发现的。天然抗体由重链和轻链构成。重链和轻链均划分为可变域和恒定域。不同抗体识别不同抗原的能力源自它们轻链和重链二者中的可变域的差异。脊椎动物物种中的天然抗体的轻链是 kappa(κ) 或 lambda(λ),基于它们恒定域的氨基酸序列而言。天然抗体重链的恒定域将是 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ ,分别相应产生 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 类的抗体。类可进一步划分为亚类或同种型例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgA2 等。抗体还可通过同种异型来分类,例如 γ 重链可具有 G1m 同种异型 a、f、x 或 z, G2m 同种异型 n, 或 G3m 同种异型 b0、b1、b3、b4、b5、c3、c5、g1、g5、s、t、u 或 v; κ 轻链可具有 Km(1)、Km(2) 或 Km(3) 同种异型。天然 IgG 抗体具有两条相同的轻链(一个恒定域 C_L 和一个可变域 V_L) 和两条相同的重链(三个恒定域 C_H1 C_H2 & C_H3 和一个可变域 V_H),它们通过二硫桥维持在一起。不同类的天然抗体的结构域和三维结构是公知的。

[0053] 当本发明的抗体具有含恒定域的轻链时,它可以是 κ 或 λ 轻链(虽然在一些实施方案中,抗体必须具有 λ 轻链)。当本发明的抗体具有含恒定域的重链时,它可以是 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 重链。 γ 类(即 IgG 抗体)中的重链是优选的。IgG1 亚类是优选的(虽然在一些实施方案中,抗体不具有 IgG1 重链)。Synagis™ 抗体是含 κ 轻链的 IgG1。本发明的抗体可以具有任何合适的同种异型(参见上文)。

[0054] 本发明的抗体可以是保留了抗原结合活性的天然抗体片段。例如,木瓜蛋白酶消化天然抗体产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点)和无抗原结合活性的残留“Fc”片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点的“F(ab')₂”片段。“Fv”是含有完整抗原结合位点的天然抗体最小片段,其由一个重链和一个轻链可变域的二聚体组成。因此,本发明的抗体可以是天然抗体的 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或任何其他类型片段。

[0055] 本发明的抗体可以是“单链 Fv”(“scFv”或“sFv”),包含 V_H 和 V_L 结构域作为单个多肽链 [23-25]。通常 V_H 和 V_L 结构域通过 V_H 和 V_L 结构域之间短的多肽接头(如 ≥ 12 氨基酸)连接,所述多肽接头使得 scFv 形成用于抗原结合的期望结构。表达 scFv 蛋白的典型方式(至少对于初始选择)是在噬菌体展示文库或其他组合文库环境中 [26-28]。单个多肽链中可连接多个 scFv [29]。

[0056] 本发明的抗体可以是“双抗体(diabody)”或“三链抗体(triabody)”等 [30-33],其包含多个连接的 Fv(scFv) 片段。通过在 V_H 和 V_L 结构域之间使用太短以至于不能允许它们彼此配对的接头(如 < 12 氨基酸),它们被迫改而与另一 Fv 片段的互补结构域配对,并因此产生两个抗原结合位点。

[0057] 本发明的抗体可以是单个可变域或 VHH 抗体。骆驼科动物(如骆驼和羊驼(Llama))和鲨鱼中天然发现的抗体含有重链但不含轻链。因此抗原识别是通过单个可变域决定的,这与哺乳动物天然抗体不同 [34-36]。此类抗体的恒定域可被省略而却保持抗原结合活性。表达单个可变域抗体的一种方式(至少对于初始选择)是在噬菌体展示文库或其他组合文库环境中 [37]。参考文献 38 公开了针对甲型流感病毒 H5N2 株系产生的并具有神经氨酸酶特异性的骆驼科动物抗体(CC07)。

[0058] 本发明的抗体可以是“结构域抗体”(dAb)。此类 dAb 是基于人类抗体重链或轻链

的可变域,并具有大约 13kDa 的分子量(小于完整抗体大小的十分之一)。通过配对识别不同靶的重链和轻链 dAb,可制备具有双重特异性的抗体,并且本发明的 dAb 将包括至少一个可结合甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的结构域。dAb 从身体中快速清除,但是可通过与结合血液蛋白质(如血清白蛋白)的第二 dAb 融合、通过与聚合物(如聚乙二醇)缀合或通过其他技术而保留在循环中。

[0059] 本发明的抗体可以是具有来自一种生物体(如人类)的恒定域但是来自不同生物体(如非人类)的可变域的嵌合抗体。最初开发抗体的嵌合化是为了促进抗原特异性从容易获得的鼠单克隆抗体向人类抗体转移,从而避免直接产生人类单克隆抗体的困难。因为发明人已经提供了人类抗体作为进一步工作的起点,所以嵌合化对于实施本发明来说通常是不需要的。但是,如果产生了针对甲型流感病毒 H5N1 株系的非人类抗体,则它们可用于制备嵌合抗体。相似地,如果本发明的人类抗体用于非人类生物体,则它们的可变域可与来自非人类生物体的恒定域连接。

[0060] 本发明的抗体可以是 CDR 移植抗体。CDR 移植过程如上所述。因为发明人已经提供了人类抗体作为进一步工作的起点,所以和嵌合化一样,CDR 移植通常是不需要的。

[0061] 因此,本文所用的术语“抗体”涵盖了具有多样化结构特征的一系列蛋白(通常包括至少一个免疫球蛋白结构域,该免疫球蛋白结构域具有全 β 蛋白质折叠(all- β protein fold),所述全 β 蛋白质折叠为安排在两个 β 片层之间的反平行 β 链的双层三明治),但是所有蛋白质均拥有结合甲型流感病毒 H5N1 株系病毒体中存在的蛋白质(通常是血凝素,其是两种主要表面糖蛋白之一)的能力。

[0062] 本发明的抗体可包括单个抗原结合位点(如在 Fab 片段或 scFv 中)或多个抗原结合位点(如在 F(ab')₂ 片段或双抗体或天然抗体中)。当抗体具有多于一个抗原结合位点时,则有利地其可以造成抗原的交联。

[0063] 当抗体具有多于一个抗原结合位点时,所述抗体可以是单特异性的(即所有抗原结合位点识别相同抗原)或其可以是多特异性的(即抗原结合位点识别多于一种抗原)。因此,在多特异性抗体中,至少一个抗原结合位点将识别 H5N1 甲型流感病毒且至少一个抗原结合位点将识别不同的抗原。

[0064] 本发明的抗体可包括非蛋白质物质,例如通过共价缀合。例如,抗体可包括放射性同位素,例如泽娃灵™(Zevalin™)和百克沙™(Bexxar™)产品分别包括 ⁹⁰Y 和 ¹³¹I 同位素。作为进一步的实例,抗体可包括细胞毒性分子,例如麦罗塔™(Mylotarg™)连接于 N-乙酰基- γ -加利车霉素(一种细菌毒素)。作为进一步的实例,抗体可包括共价附着的聚合物,例如已报道附着聚氧乙烯化多元醇或聚乙二醇(PEG)增加抗体的循环半衰期。

[0065] 在本发明的一些实施方案中,抗体可包括一个或多个恒定域(如包括 C_H 或 C_L 结构域)。如上文提及的,恒定域可形成 κ 或 λ 轻链,或 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 重链。当本发明的抗体包括恒定域时,它可以是天然恒定域或修饰的恒定域。重链可包括三个(如在 α 、 γ 、 δ 类中)或四个(如在 μ 、 ϵ 类中)恒定域。恒定域不直接参与抗体和抗原之间的结合相互作用,但是它们可以提供各种效应功能,包括但不限于:抗体参与抗体依赖性细胞毒作用(ADCC);C1q 结合;依赖补体的细胞毒性;Fc 受体结合;吞噬作用;和细胞表面受体的下调。

[0066] 恒定域可形成“Fc 区”,其是天然抗体重链的 C-末端区。当本发明的抗体包括 Fc

区时,它可以是天然 Fc 区或修饰的 Fc 区。Fc 区对于一些抗体的功能是重要的,例如赫赛汀™的活性是 Fc 依赖性的。尽管天然抗体 Fc 区的边界可能不同,但是人类 IgG 重链 Fc 区通常被定义为从位置 Cys226 或 Pro230 处的氨基酸残基延伸至重链的 C- 末端。Fc 区将通常能够结合一种或多种 Fc 受体,诸如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ R II (如 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB1、Fc γ RIIB2、Fc γ RIIC)、Fc γ R III (如 Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB)、FcRn、Fc α R (CD89)、Fc δ R、Fc μ R、Fc ϵ RI (如 Fc ϵ RI $\alpha\beta\gamma_2$ 或 Fc ϵ RI $\alpha\gamma_2$)、Fc ϵ R II (如 Fc ϵ RIIA 或 Fc ϵ RIIB) 等。Fc 区还可或替代地能够结合补体蛋白,如 C1q。抗体 Fc 区的修饰可用于改变其效应功能,例如增加或降低受体结合亲和力。例如,参考文献 39 报道通过突变 Fc 区残基 234、235、236、237、297、318、320 和 / 或 322 可修饰效应功能。相似地,参考文献 40 报道突变以下 Fc 区残基 (EU 目录 Kabat 编号) 可改善人类 IgG1 的效应功能:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 和 / 或 439。Fc 残基 322、329 和 / 或 331 的修饰在参考文献 41 中报道用于修饰人类 IgG 抗体的 C1q 亲和力,而参考文献 42 中选择残基 270、322、326、327、329、331、333 和 / 或 334 用于修饰。参考文献 43 报道了对人类 IgG 与 FcRI、FcR II、FcR III 和 FcRn 受体的结合重要的残基的作图,以及具有改善的 FcR 结合性质的变体的设计。完整的 C_H 结构域可在同种型之间替代,例如参考文献 44 公开了其中人类 IgG4 的 C_H3 结构域 (和任选地 C_H2 结构域) 被人类 IgG1 的 C_H3 结构域替代的抗体,以提供抑制的聚集体形成。参考文献 44 还报道了将人类 IgG4 位置 409 (EU 目录 Kabat) 的精氨酸突变为例如赖氨酸显示抑制的聚集体形成。用来改变其效应功能的可用单克隆抗体的 Fc 区的突变是已知的,例如参考文献 45 报道美罗华™ (RITUXAN™) 的突变研究改变 C1q 结合,而参考文献 46 报道 NUMAX™ 的突变研究改变 FcR 结合,且残基 252、254 和 256 的突变使 FcRn 结合增加 10 倍而不影响抗原结合。

[0067] 本发明的抗体将通常是糖基化的。例如附着在重链 C_H2 结构域的 N- 联聚糖可影响 C1q 和 FcR 结合 [43], 未糖基化的抗体对这些受体具有更低的亲和力。聚糖结构还可影响活性,例如根据聚糖双天线链 (biantennary chain) 末端的半乳糖数量 (0、1 或 2) 可观察到补体介导的细胞死亡差异。抗体的聚糖优选地在施用后不导致人类免疫原性应答。

[0068] 本发明的抗体可制备为不含与它们天然缔合的产物的形式。抗体的天然环境中的污染物组分包括材料如酶、激素或其他宿主细胞蛋白。

[0069] 本发明的抗体可直接使用 (如作为药物或诊断试剂的活性成份), 或它们可用作进一步的开发工作的基础。例如,抗体可进行序列变化或化学修饰以改善期望的特性,例如结合亲和力或亲合力、药代动力学性质 (如体内半衰期) 等。以这种方式修饰抗体的技术在本领域是已知的。例如,抗体可进行“亲和力成熟”, 其中一个或多个残基 (通常位于 CDR) 被突变以改善它对靶抗原的亲和力。可使用随机或定向诱变,但是参考文献 47 描述了通过 V_H 和 V_L 结构域改组作为随机点突变的替代的亲和力成熟。参考文献 48 报道了 NUMAX™ 是如何通过 SYNAGIS™ 重链和轻链 CDR 的体外亲和力成熟过程衍生的, 产生了具有对 RSV F 蛋白的增强效价和 70 倍更高的结合亲和力的抗体。

[0070] 本发明的优选抗体对来自甲型流感病毒 H5N1 株系的抗原是特异性的。因此所述抗体对所述抗原将具有比对任意的对照抗原 (例如人类蛋白质) 更紧密的结合亲和力。

优选的抗体具有对靶抗原的纳摩尔或皮摩尔亲和力常数,例如 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 或更紧密的)。此类亲和力可使用常规分析技术确定,例如使用 BIAcore™ 仪器中配备的表面等离子体共振技术并根据生产商的说明进行操作。使用放射标记的靶抗原(血凝素)的放射免疫测定是测量结合亲和力的另一方法。

[0071] 本发明的抗体可识别 H5 病毒的进化枝 1 和 / 或进化枝 2。它们还可识别其他 H5 进化枝。在一些实施方案中,抗体必须识别进化枝 2。

[0072] 参考文献 49 公开了与 H5 血凝素反应的单克隆抗体用于免疫测定设备。

[0073] 中和活性

[0074] 本发明的抗体可用于中和可感染人类的甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素。因此,它们可以中和所述病毒在人类宿主中启动和 / 或持续感染的能力。各种测定可用于确定中和活性,如本文所述的微量中和测定。优选的抗体可中和 100TCID₅₀(50% 组织培养感染剂量)的 H5N1 病毒对 MDCK 细胞的感染性。用于此类测定的 H5N1 病毒可从任何合适的来源获得,如 CDC (Atlanta, GA) 的流感病毒部门。它们还可分离自感染的患者,或通过使用反向遗传学技术将 H5- 亚型 HA 和 N1- 亚型 NA 与六个其他病毒区段组合。作为使用病毒进行流感中和测定的替代,在本发明的一些实施方案中可改而使用携带流感 H5HA 的逆转录病毒假型病毒 [50]。

[0075] 测定使用的 MDCK 细胞可从 ATCC 获得,目录号为 CCL-34。

[0076] 在本发明的优选实施方案中,抗体可以 100 $\mu\text{g/ml}$ 或更低例如 75 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml、75ng/ml、50ng/ml、10ng/ml 或更低的浓度中和 100TCID₅₀ 的 H5N1 甲型流感病毒。特别优选的抗体可在 100ng/ml 或更低进行中和。特别有用的抗体可在这些浓度下中和 100 TCID₅₀ 的分别为进化枝 1 中的 H5N1 甲型流感病毒株系和进化枝 2 中的 H5N1 甲型流感病毒株系。

[0077] 中和甲型流感病毒 H5 株系的能力并不必然意味着所述抗体不能中和其他 15 种血凝素亚型的任一种。在一些实施方案中,抗体可中和多种血凝素亚型(如所有 16 种亚型)。在其他实施方案中,抗体可能不中和 H3N2 流感病毒。在其他实施方案中,抗体可仅中和 H5 亚型。

[0078] 核酸和重组抗体表达

[0079] 本发明还涵盖编码本发明的抗体的核酸序列。当本发明的抗体具有多于一条链(如重链和轻链)时,本发明涵盖编码各条链的核酸。本发明还涵盖编码本发明抗体 CDR 的氨基酸序列的核酸序列。

[0080] 编码抗体的核酸可从表达目标抗体的细胞、病毒或噬菌体制备。例如,核酸(如 mRNA 转录物或 DNA)可从目标永生 B 细胞制备,然后编码目标抗体的基因可被克隆并用于后续重组表达。对于药物目的而言,来自重组来源的表达要比来自 B 细胞或杂交瘤的表达更常见,例如出于稳定性、再现性、培养容易等原因。从 B 细胞获得并测序免疫球蛋白基因的方法是本领域公知的,例如参见参考文献 51。因此,可进行培养、传代培养、克隆、亚克隆、测序、核酸制备等各种步骤以使目标细胞或噬菌体持续表达抗体。本发明涵盖此类步骤过程中使用和制备的所有细胞、核酸、载体、序列、抗体等。

[0081] 本发明提供制备编码目标抗体的一种或多种核酸分子(例如重链和轻链基因)的方法,其包含如下步骤:(i) 提供表达目标抗体的永生 B 细胞克隆;(ii) 从所述 B 细胞克隆

获得编码所述目标抗体的核酸。步骤 (ii) 中获得的核酸可插入不同的细胞类型,或可对它进行测序。

[0082] 本发明还提供制备重组细胞的方法,其包括如下步骤:(i) 从 B 细胞克隆获得编码目标抗体的一种或多种核酸(例如重链和 / 或轻链基因);和 (ii) 将所述核酸插入表达宿主以允许目标抗体在该宿主中表达。

[0083] 相似地,本发明提供制备重组细胞的方法,其包括如下步骤:(i) 测序来自 B 细胞克隆的编码目标抗体的核酸;和 (ii) 使用步骤 (i) 的序列信息制备核酸以插入表达宿主以允许目标抗体在该宿主中表达。

[0084] 这些方法产生的重组细胞然后可用于表达和培养目的。它们对于表达抗体用于大规模药物生产特别有用。

[0085] 本发明提供制备本发明的抗体的方法,其包括培养细胞以使它产生抗体的步骤。所述方法可进一步包括回收已产生的抗体以提供纯化抗体的步骤。如本文其它地方所述,这些方法中使用的细胞可以是重组细胞、永生 B 细胞或任何其他合适的细胞。来自这些方法的纯化的抗体然后可用于药物和 / 或诊断组合物等。

[0086] 用于重组表达的细胞包括细菌、酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(如 CHO 细胞,人类细胞诸如 PER.C6 (ECACC 保藏 96022940 [52])、NS0 细胞 (ECACC 保藏 85110503) 或 HKB-11 [53、54] 细胞)等),以及植物细胞。优选的表达宿主可使本发明的抗体糖基化,特别是使用自身在人类中无免疫原性的碳水化合物结构(参见上文)。优选可在无血清培养基中生长的表达宿主。优选可在不存在动物衍生产品的培养基中生长的表达宿主。

[0087] 可培养表达宿主以产生细胞系。

[0088] 可操作本发明所用的核酸以插入、缺失或修改某些核酸序列。此类操作带来的变化包括但不限于,引入限制位点、修改密码子使用、添加或优化转录和 / 或翻译调节序列等的变化。还可能改变核酸以改变所编码的氨基酸。例如,向抗体的氨基酸序列引入一个或多个(如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个等)氨基酸取代、一个或多个(如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个等)氨基酸缺失和 / 或一个或多个(如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个等)氨基酸插入可以是有用的。此类点突变可修饰效应功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可引入氨基酸以附着共价基团(如标记物)或可引入标签(如用于纯化目的)。突变可在特异性位点引入或可随机引入,然后进行选择(如分子进化)。

[0089] 本发明的特定核酸序列包含 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、14 和 / 或 16 中的一个或多个。

[0090] 本发明的核酸可存在于载体(如质粒),例如于克隆载体或于表达载体中。因此,编码目标氨基酸序列的序列可位于启动子下游,以使其转录受到适当控制。本发明提供此类载体,并且还提供含有它们的细胞。

[0091] 本发明还提供可分泌可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素的抗体的永生人类 B 细胞。本发明还提供可分泌本发明抗体的永生人类 B 细胞。

[0092] 药物组合物

[0093] 抗体作为药物活性成分用途现在是普遍的,包括产品赫赛汀™(曲妥珠单抗)、美罗华™、麦罗塔™、泽娃灵™、Synagis™(帕利珠单抗)、赛尼哌™(Zenapax™)(达利珠单抗)等。特别是 Synagis™ 和 Numax™(莫维珠单抗(motavizumab))在预防呼吸道疾病中是有效

的。因此发明人提供含有本发明的一种或多种抗体的药物组合物。将单克隆抗体纯化至药物级的技术是本领域公知的。

[0094] 可中和 H5N1 甲型流感病毒的进化枝 1 株系的至少一种抗体和可中和 H5N1 甲型流感病毒进化枝 2 株系的至少一种抗体的组合是特别有用的。包含结合甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素上的不同表位的两种抗体的组合也是有用的。这些组合中的抗体可通过同时分开或顺序施用给予患者。

[0095] 因此,例如,发明人提供包含可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的第一人类单克隆抗体和可中和甲型流感病毒 H5N1 株系的第二人类单克隆抗体的药物组合物,其中所述第一抗体和第二抗体分别结合甲型流感病毒 H5N1 株系的血凝素上的不同表位。第一抗体和第二抗体共同 (between them) 可中和 H5N1 甲型流感病毒的进化枝 1 株系和进化枝 2 株系,和 / 或它们可分别结合相同 H5 血凝素上的不同表位。

[0096] 作为将抗体作为活性成分递送于患者 (如在被动免疫接种中) 的替代,可以递送包括本发明的抗体所识别的表位的肽 (如在主动免疫接种中)。因此,本发明的药物组合物可含有包含表位的多肽,所述表位被选自 FLA5. 10、FLD21. 140、FLA3. 14、FLD20. 19、FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 组成的组中的抗体所识别。所述多肽可短于全长 HA0、HA1 或 HA2 肽。

[0097] 作为递送抗体的进一步替代,可递送编码抗体的核酸,以使所述核酸可于患者中原位表达。因此,本发明的药物组合物可含有编码本发明的抗体的核酸。核酸可以是复制或非复制载体的形式。可使用病毒或非病毒载体。合适的基因治疗和核酸递送载体是本领域已知的。

[0098] 药物组合物将通常含有一种或多种药学可接受载体和 / 或赋形剂。此类组分的详尽讨论可在参考文献 55 中获得。这些可包括液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,辅助物质如润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲物质可存在于此类组合物中。

[0099] 药物组合物可以各种形式制备,例如作为注射剂,无论是作为液体溶液还是悬浮液。还可制备成适合在注射之前溶解或悬浮于液体运载体 (vehicle) 的固体形式 (如冻干的组合物,像 Synagis™ 和赫赛汀™,其使用无菌水或缓冲液重构 (reconstitution),任选地含有防腐剂)。组合物可制备为用于局部施用,例如作为软膏剂、乳膏或粉剂。组合物可制备为用于经口施用,例如作为片剂或胶囊,作为喷雾剂,或作为糖浆 (任选地调味的),在这种情形下它将通常含有保护活性成分不被降解的物质。组合物可制备为用于肺部施用,例如作为吸入剂,使用细小的粉末或喷雾。组合物可制备为栓剂或阴道栓剂。组合物可制备为用于鼻部、耳部或眼部施用,例如作为滴剂。组合物可以是试剂盒形式,其设计为使组合的组合物在施用于患者之前使用时重构 (如用无菌水或无菌缓冲液),例如抗体可以干燥形式提供。

[0100] 用于抗体施用的优选药物形式包括适合胃肠外施用的形式,如通过注射或输注,例如通过团注或持续输注。当产品用于注射或输注时,它可采用于油性或水性运载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且它可含有载体 / 赋形剂,如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0101] 药物组合物将通常具有介于 5.5 和 8.5、优选地介于 6 和 8 和更优选地约 7 的 pH。pH 可通过缓冲液维持。

[0102] 组合物将通常是无菌的。组合物将通常是无热原的,例如含有 < 1 EU(内毒素单位,一种标准度量)每剂量,并且优选地 < 0.1 EU 每剂量。组合物优选地不含谷蛋白。组合物可以是相对于人类基本上等渗的。

[0103] 组合物可包括抗微生物剂和 / 或防腐剂。

[0104] 组合物可包含去污剂。当存在时,去污剂一般以低水平使用,例如 $< 0.01\%$ 。

[0105] 组合物可包括钠盐(如氯化钠)以产生张力。通常是 $10 \pm 2\text{mg/ml}$ 浓度的 NaCl。

[0106] 组合物可包含糖醇(如甘露醇)或二糖(如蔗糖或海藻糖),例如在 $15\text{--}30\text{mg/ml}$ 左右(如 25mg/ml),特别是如果它们将被冻干或如果它们包括从冻干材料重构的材料时。

[0107] 组合物可包括游离氨基酸,例如组氨酸。例如,参考文献 56 公开了用于 Synagis™ 抗体的改进的水性制剂,所述制剂包含于水性载体中的组氨酸。

[0108] 药物组合物将包括有效量的活性成分。组合物中的成分浓度当然将根据待递送的组合物体积而变化,并且已知的基于抗体的药物将在这方面提供指导。例如,提供 Synagis™ 用于重构,以在 0.5ml 中产生 50mg 抗体或在 1.0ml 中产生 100mg 抗体。基于它们的建议剂量向患者递送合适的体积。

[0109] 配制后,本发明的组合物可直接施用于对象(参见下文)。优选使组合物适于施用于人类对象。这将一般是以液体(如水性)形式。

[0110] 在包括抗体的组合物特别是药物组合物中,抗体优选地构成组合物中总蛋白的至少 50% (以重量计)(如至少 60% 、 70% 、 80% 、 90% 、 95% 、 97% 、 98% 、 99% 或更多)。所述抗体因而是纯化形式的。

[0111] 本发明的药物组合物优选地以密封容器供应。

[0112] 本发明还提供制备药物组合物的方法,其包括将本发明的抗体与一种或多种药理学可接受成分混合的步骤。

[0113] 医疗和用途

[0114] 本发明的抗体可用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病,特别是在人类中。因此本发明提供用于治疗的本发明抗体。还提供治疗患者的方法,其包括向所述患者施用本发明的抗体。还提供本发明的抗体在制备用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途。还提供用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的本发明的抗体。

[0115] 发明人还提供了用于同时分开施用或顺序施用的第一抗体和第二抗体。在一些实施方案中,所述第一抗体和第二抗体共同可中和进化枝 1 株系和进化枝 2 株系,如上所述。在一些实施方案中,所述第一抗体和第二抗体结合相同 H5 血凝素上的不同表位,如上所述。

[0116] 发明人还提供了组合用于治疗的所述第一抗体和第二抗体。他们还提供了用于治疗的所述第一抗体和第二抗体的组合。他们还提供了用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的方法的所述第一抗体和第二抗体。

[0117] 发明人还提供了所述第一抗体和第二抗体在制备用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途。他们还提供了所述第一抗体在制备用于治疗和 / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途,其中所述药物制备为与所述第二抗体一起施用。相似地,他们提供所述第二抗体在制备用于治疗和 / 或预防甲型流

感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途,其中所述药物制备为与所述第一抗体一起施用。

[0118] 发明人还提供了所述第一抗体在制备用于治疗 and / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途,其中所述患者先前已用第二抗体治疗。相似地,他们提供所述第二抗体在制备用于治疗 and / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的药物中的用途,其中所述患者先前已用第一抗体治疗。所述预治疗的患者可在身体循环中仍具有先前施用的抗体。

[0119] 发明人还提供了用于治疗 and / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的方法的所述第一抗体,其中所述第一抗体与所述第二抗体一起施用(或制备为与所述第二抗体一起施用)。他们还提供了用于治疗 and / 或预防甲型流感病毒 H5N1 株系引起的疾病的方法的所述第二抗体,其中所述第二抗体与所述第一抗体一起施用(或制备为与所述第一抗体一起施用)。

[0120] 抗体的治疗用途与以下两方面有关:人类的来自非人类生物体(通常是禽类)的 H5N1 病毒的动物传染的感染和 H5N1 流感的人类大流行爆发。

[0121] 抗体可用于免疫预防(被动免疫接种) and / 或免疫治疗。为了确认预防性功效而不对患者施加感染攻击,可在例如中和测定中检验循环抗体水平。为了确认施用本发明的药物组合物后的治疗功效,可使用用于评估甲型流感病毒感染存在 and / 或严重度的任何已知方法。此类方法在抗病毒和疫苗领域中通常用于流感。

[0122] 治疗可针对特别具有 H5N1 感染风险或易受 H5N1 感染的患者组。此类对象组包括但不限于:免疫受损对象,如患有 HIV 的那些或经受免疫抑制治疗的那些例如移植患者;年长者(如 ≥ 50 岁、 ≥ 60 岁和优选地 ≥ 65 岁);年幼者(如 ≤ 5 岁);住院患者;医护人员;武装部队和军事人员;孕妇;慢性病患者;免疫缺陷患者;在接受疫苗之前 7 天内服用抗病毒化合物(如奥司他韦或扎那米韦化合物)的患者;已用抗病毒化合物进行治疗但显示不足的抗病毒应答的患者;和出国旅游的人们。

[0123] 本发明的药物组合物可通过多种路径施用,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮、经皮、经口、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠路径。无针注射器(Hypospray)也可用于施用本发明的药物组合物。通常治疗组合物可制备为注射剂,无论是作为液体溶液还是悬浮液。还可制备成适合在注射之前溶解或悬浮于液体运载体的固体形式。

[0124] 组合物的直接递送将一般通过皮下、腹膜内、静脉内或肌内注射,或递送于组织的胞间隙而实现。组合物还可施用于损伤。剂量治疗可以是单个剂量方案或多个剂量方案。已知的基于抗体的药物提供关于施用频率的一些指导,例如药物是否应每天一次、每周一次、每月一次等递送。频率和剂量还可取决于症状的严重度。

[0125] 患者将接受有效量的活性成分,即足以治疗、改善或预防 H5N1 甲型流感病毒感染的量。治疗效应还可包括身体症状的减轻。用于任何特定对象的最佳有效量将取决于他们的体型和健康、病症的本质和程度,以及选择来施用的治疗剂或治疗剂的组合。给定情形递送的有效量可通过常规实验确定,并在医师的判断范围内。对于本发明目的,有效剂量将通常是在其所施用的个体中约 0.01mg/kg 至约 50mg/kg,或约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg 的本发明组合物。已知的基于抗体的药物在此方面提供指导,例如赫赛汀™ 通过静脉内输注

21mg/ml 溶液施用,初始加载剂量为 4mg/kg 体重,且每周维持剂量为 2mg/kg 体重;美罗华™ 以 375mg/m² 施用每周一次;Synagis™ 以 15mg/kg 体重肌肉施用,通常在 RSV 季节期间每月一次;等等。

[0126] 本发明的抗体可与其他治疗剂一起施用(组合或分开地),例如与针对流感病毒有活性的抗病毒化合物(例如奥司他韦和/或扎那米韦)一起。这些抗病毒剂包括神经氨酸酶抑制剂,如(3R,4R,5S)-4-乙酰基氨基-5-氨基-3-(1-乙基丙氧基)-1-环己烯-1-羧酸或5-(乙酰基氨基)-4-[(氨基亚氨基甲基)-氨基]-2,6-酞-3,4,5-三脱氧-D-甘油-D-半乳糖酰-2-烯酸(5-(acetylamino)-4-[(aminoiminomethyl)-amino]-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-enonic acid),包括其酯(如乙酯)和其盐(如磷酸盐)。优选的抗病毒剂是(3R,4R,5S)-4-乙酰基氨基-5-氨基-3-(1-乙基丙氧基)-1-环己烯-1-羧酸,乙酯,磷酸盐(1:1),也称为奥司他韦磷酸盐(达菲™)。此类组合治疗可提供治疗功效的协同改善。此类抗病毒剂在与多于一种的本发明抗体在组合治疗时一起施用特别有效,如本文其他地方所公开的。

[0127] 诊断

[0128] 除了治疗有用之外,本发明抗体(包括非中和性抗体)的结合活性意味着它们可用于诊断。抗体可用作免疫测定、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)等中的试剂。本发明的抗体可因此附着于固体支持物。此附着可有利于它们在诊断测定中的使用。其还可有利于它们在纯化它们的靶抗原中的使用。

[0129] 本发明的抗体可用分析学可检测的试剂如放射性同位素、荧光分子或酶进行标记。此标记有利于它们在诊断测定中的使用。

[0130] 在一些实施方案中,本发明的抗体可用作免疫测定中的试剂,以筛选和/或鉴别抗原性或免疫原性肽,例如鉴别在施用于患者时可引起有用的抗 HA 应答的肽。

[0131] 一般术语

[0132] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”,例如“包含”X 的组合物可唯一地由 X 组成或可包括其他的事物,例如 X+Y。

[0133] 词语“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y 的组合物可完全不含 Y。必要时,词语“基本上”可从本发明的定义中省略。

[0134] 术语“约”在关于数值 x 时指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0135] 本发明方法中的不同步骤可任选地由不同地方(如不同国家)的不同人们在不同的时间执行。

[0136] 附图简述

[0137] 图 1 显示免疫预防实验中感染(第 0 天)之后 15 天时间段内小鼠的存活比例(%) (Kaplan-Meier 存活曲线)。图 4 和 5 显示血清治疗实验的相似数据。

[0138] 图 2 显示预防研究中小鼠脑、脾和肺中的平均病毒滴度(\log_{10} TCID₅₀ 每克组织)。显示了感染后第 2 天和第 4 天抗体 D2.2(对照)、FLA3.14 和 FLA5.10 的数据。星号指示统计学显著性(* = $P < 0.01$, 对比 D2.2; ** = $P < 0.001$, 对比 D2.2)。箭头显示测定中的检测下限($1.5 \log_{10}$ TCID₅₀/g)。

[0139] 图 3 显示小鼠肺的免疫组织化学分析。图 A&C 显示用 FLA5.10 抗体治疗的小鼠的肺。图 B&D 显示未治疗的对照小鼠的肺。图 E&F 是图 B&D 的放大视图。‘Br’ 指示细支气

管。

[0140] 发明实施方式

[0141] 永生 B 细胞的产生

[0142] 四名成年人被诊断为 HPAI (高致病性禽流感) H5N1 感染。在早期的康复过程中 (疾病发作后 1-4 个月), 所有对象具有针对他们自体病毒的可检测的中和抗体滴度。获得患者的书面知情同意后, 从所有四名患者采集血液。

[0143] 融化冷冻的外周血单核细胞 (PBMC), 并用针对 CD22、IgM、IgD 和 IgA 的抗体染色。CD22⁺IgM⁻、IgD⁻、IgA⁻B 细胞使用 FACS Aria 仪器分离。然后使用 EBV 在 CpG 寡脱氧核苷酸 2006 和受辐照的转基因 PBMC 存在下, 以 30 个细胞 / 孔对 B 细胞进行永生化 [8]。细胞在补充 10% 胎牛血清的完全 RPMI 1640 (cRPMI) 中培养。14 天后收集培养物上清液并筛选中和活性。

[0144] 中和通过微量中和测定使用 MDCK 细胞和 100 TCID₅₀A/VietNam/1203/04 (H5N1) 评估, 基本如参考文献 58 所述。简要而言, 在添加至 MDCK 细胞单层之前, 将纯上清液与 100TCID₅₀ 病毒在室温温育 1 小时。将细胞单层温育另外 2-3 天并检查细胞病变效应 (CPE)。中和抗体滴度终点的确定以相似的方式执行, 除了血浆或上清液样品在与 100TCID₅₀ 病毒混合之前进行连续两倍稀释。血浆样品以 1 : 10 的起始稀释度开始检验, 而上清液以 1 : 8 的起始稀释度开始检验, 并且检验每种稀释度下 4 个孔中的残留感染性。中和滴度定义为 100TCID₅₀ 的适当野生型 H5N1 病毒对 MDCK 细胞的感染性在 50% 的孔中被完全中和的血清最高稀释度的倒数。感染性通过第 4 天 CPE 的存在鉴定并且通过 Reed-Muench 方法计算滴度。

[0145] 通过有限稀释以 0.5 个细胞 / 孔在 CpG 2006 和受辐照的 PBMC 的存在下克隆具有可测量的中和活性的培养物。B 细胞克隆以高细胞密度在 cRPMI 10% Ig⁻ 耗竭 FCS 中于 CELLline 双室生物反应器 (Two-Compartment Bioreactors) 中培养以产生含有 1-3mg/ml 抗体的富集上清液。抗体还在 G 蛋白柱上纯化。抗体的同种型、亚类和轻链通过使用特异性抗体和 HRP- 标记的抗人 Ig 抗体的 ELISA 表征。抗体参考标准认证制品 (Sigma-Aldrich, Buchs, SG) 定量。

[0146] 分离了产生中和性人类抗体的几个独立克隆。还从每个供体中鉴定了产生通过 ELISA 识别 H5-HA 但不中和活病毒的抗体的克隆。选择命名为 'FLA3.14'、'FLA5.10'、'FLD20.19' 和 'FLD21.140' 的四个克隆用于进一步的研究。所有克隆分泌具有针对在越南分离的甲型流感进化枝 1H5N1 病毒的中和活性的 IgG1 抗体。记录了针对 100 TCID₅₀ 的三个不同 H5N1 进化枝 1 株系的人类抗体中和滴度:

[0147]

Ab (浓度)	针对所示株系的倒数中和滴度		
	VN/CL26/04	VN/115/05	VN/VL1/06
FLA5.10 (0.7mg/ml)	2958	107	1782
FLA3.14 (1.5mg/ml)	372	208	1260
FLD20.19 (1.5 mg/ml)	1,280	4,012	2,460
FLD21.140 (1.5 mg/ml)	896	2,880	3,208
D2.2 (0.7mg/ml)	<10	<10	<10

[0148] NB :D2.2 是不识别流感病毒的对照抗体

[0149] FLA5.10 和 FLD21.140 显示针对进化枝 1H5N1 病毒的参考株系的体外中和活性，FLD21.140 比 FLA5.10 更有效。FLA3.14 和 FLD20.19 显示针对进化枝 1 和进化枝 2 二者的参考 H5N1 病毒的体外中和活性。特别是 FLD20.19 高效中和进化枝 1 和进化枝 2H5N1 甲型流感病毒。所述抗体无一中和 H3N2 流感病毒 A/California/7/04。倒数中和滴度如下所示，已归一化为 1mg/ml 抗体浓度：

[0150]

株系	HK/491/97	HK/213/03	VN/1203/04	JPHN/30321/05	Indo/5/05	CA/7/04
亚型	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H3N2
H5N1 进化枝	1	1	1	1	2	-
FLA3.14.	403	508	226	508	508	10
FLA5.10	127	4,064	508	806	10	10
FLD20.19	905	5,120	1,613	6,451	5,120	10
FLD21.140	32	≥ 14,882	5,120	12,902	10	19
D2.2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

[0151] 另一系列单克隆抗体是从分离自 4 个供体之一的冷冻 PBMC 的 B 细胞产生的。分离了产生中和性人类抗体的几个独立克隆。选择命名为 ‘FLD84’、‘FLD93’、‘FLD122’、‘FLD127’、‘FLD129’、‘FLD132’ 和 ‘FLD194’ 的七个克隆用于进一步的研究。FLD127、FLD129 和 FLD132 显示针对进化枝 1H5N1 病毒参考株系的体外中和活性，FLD132 和 FLD129 比 FLD127 更有效。FLD84、FLD93、FLD122、FLD194 显示针对进化枝 1 和进化枝 2 二者的参考 H5N1 病毒的体外中和活性。特别是 FLD194 和 FLD122 高效中和进化枝 1 和进化枝 2H5N1 甲型流感病毒。培养物上清液的倒数中和滴度如下所示：

名称	倒数中和滴度:		
	HK/491/97 H5N1 进化枝 1	VN/1203/04 H5N1 进化枝 2	Indo/5/05 H5N1 进化枝 2
<i>FLD20.19</i> *	181	181	813
FLD84	40	16	102
FLD93	20	40	406
FLD122	161	40	362
FLD127	102	81	<8
FLD129	1448	323	<8
FLD132	2048	1024	<8
FLD194	406	102	406

[0153] *FLD20.19 的这些滴度不能直接与先前的数据比较。此测定使用了不同的抗体初始浓度和不同的病毒剂量。

[0154] 特别是 FLD122 和 FLD194 中和所检验的三种病毒,其效价与先前筛选中分离的最佳单克隆抗体 (FLD20.19) 所显示的效价相当。

[0155] 小鼠中的预防性和治疗性血清治疗

[0156] BALB/c 小鼠对 1997 年和 2003 年以来在亚洲分离的 HPAI H5N1 病毒感染高度易感。采用鼻内施用,1997 年以来在亚洲分离的 H5N1 病毒在小鼠肺中复制到高滴度,并且一些分离株散布至肺外位点,且对小鼠是致死性的。为了探索抗 H5N1 人类抗体对接触前免疫预防或接触后免疫治疗的功效,将 BALB/c 小鼠用抗体被动免疫,然后在 24 小时后鼻内用 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 攻击,或用 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 攻击并在 24、48 或 72 小时后注射抗体。4-8 只雌性 BALB/c 小鼠 (4-6 周龄) 组用于所有实验。小鼠的接种和组织收获由佩戴动力式空气净化呼吸器 (powered airpurifying respirators) 的人员在生物安全柜中执行。

[0157] 为了测量预防性功效,小鼠腹腔内 (i. p.) 注射分级剂量的 1ml 单克隆抗体 FLA3.14 或 FLA5.10,或注射针对 A/VN/1203/2004 (H5N1) 的重组 HA 产生的高免疫绵羊抗血清。作为对照,小鼠接受人类单克隆抗体 D2.2 (白喉毒素特异性的) 或 A146 (炭疽保护性抗原特异性的)。i. p. 施用 24 小时后,对小鼠放血以测量中和抗体滴度,然后用 50 μ l 的 10^5 TCID₅₀A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 鼻内攻击。病毒感染之前和之后每天观察并称重。如图 1 所示,接受高免疫抗-H5 多克隆绵羊抗血清的小鼠得到了完全的保护。所有 FLA5.10 制品在预防性功效测定中对 A/Vietnam/1203/04 致死性赋予 100% 的保护。FLA3.14 也赋予致死性保护,但是功效较低且呈剂量依赖性方式。接受最高剂量 FLA3.14 的小鼠几乎得到了完全的保护。检验的最低剂量的 FLA3.14 (1mg/kg) 延迟了死亡时间,但是没有防止致命感染。这些数据显示 FLA5.10 相对 FLA3.14 在体内相对更高的效价,这与针对 A/Vietnam/1203/04 测量的体外中和滴度 (参见上文) 是一致的。

[0158] 为了探索 FLA3.14 和 FLA5.10 抗体如何能赋予致死性保护,研究了被动免疫小鼠中的病毒感染动力学。FLA3.14、FLA5.10 或 D2.2 被动免疫的小鼠在 24 小时后用 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 攻击。在第 2 天和第 4 天杀死小鼠并在无菌条件下取出肺、脑和

脾。组织在补充抗生素-抗真菌剂溶液的 Leibovitz L-15 培养基中匀浆以得到肺 (10% w/v)、脾 (5% w/v) 和脑 (10% w/v) 的悬浮液, 然后以一式四份将悬浮液滴定至 MDCK 细胞单层上。病毒滴度通过 Reed Muench 方法计算并表示为 $\log_{10}TCID_{50}/g$ 组织。图 2 显示在第 2 天和第 4 天在接受 FLA3. 14 或 FLA5. 10 的小鼠的脑、脾和肺组织中回收的病毒显著少于接受对照 D2. 2 抗体的小鼠。

[0159] 为了进行病理学研究, 对小鼠进行尸体剖检, 肺用 10% 中性缓冲的福尔马林膨胀, 包埋于石蜡中并制备切片。载玻片用苏木精和伊红染色。为了 H5 抗原的免疫组织化学展示, 制备石蜡切片并使用针对禽流感 H5 的山羊抗体山羊 α H5 (以 1 : 1000 稀释) 和 Vector 兔抗山羊二抗进行 ABC 免疫组织化学, 且 Vector ABC Elite 标记物二氨基联苯胺作为发色团和苏木精作为复染剂。图 3 显示接受 FLA5. 10 预防的小鼠在肺部气道和实质组织具有显著更少的病理变化。因此, 在接受 FLA5. 10 预防的小鼠肺切片中具有坏死和病毒 HA 抗原的异常细支气管的百分比 (13%) 低于对照小鼠 (80%) (图 3, 图 A&C 对比 B&D 或对比 E&F)。相似地, 给予 FLA5. 10 的小鼠的肺切片中通过免疫组织化学染色检测到 H5 抗原的炎性间质性 (I) 损伤相对于对照抗体 D2. 2 较少 (1 对比 10+)。这些数据暗示 FLA3. 14 或 FLA5. 10 预防很可能通过限制肺中的病毒复制、弱化病毒诱导的肺病理学和阻断病毒向远端器官的肺外散布的组合赋予致死性攻击保护。

[0160] 已建立的感染的弱化代表针对 H5N1 感染的抗病毒治疗的临床有关的终点。为此, 在 BALB/c 小鼠中确定了 FLA3. 14、FLA5. 10、FLD20. 19 和 FLD21. 140 (以 1mg/ 只小鼠 i. p 注射) 的治疗功效, 所述小鼠在 24、48 或 72 小时前用 5LD₅₀A/Vietnam/1203/04 鼻内感染。图 4 显示 FLA3. 14、FLA5. 10、FLD20. 19 和 FLD21. 140 在 A/Vietnam/1203/04 感染的小鼠中于所有时间点提供有力的致死性保护, 而对照 (D2. 2) 则没有保护。还评估了抗体 FLA3. 14、FLA5. 10 和 FLD20. 19 针对 A/Indonesia/5/05 (一种来自进化枝 2 的不同抗原性的 H5N1 病毒) 的治疗功效。图 5 显示 FLA3. 14 和 FLD20. 19 在于病毒攻击 24 小时后给予时在 A/Indonesia/5/05 感染的小鼠中提供有力的致死性保护, 而 FLA5. 10 和对照 (D2. 2) 则无保护作用, 这与体外中和数据一致 (参见上文)。这些数据提供了概念证明, 即在小鼠模型中感染后至少多达 72 小时进行单克隆抗体治疗可显著改善高毒性 H5N1 感染的存活率。重要的是, 这些数据还暗示使用由进化枝 1 病毒引发的抗体可能获得针对进化枝 2H5N1 病毒的显著交叉保护, 例如通过共用的表位。

[0161] 针对一组 H5N1 病毒的单克隆抗体的反应性的宽度

[0162] 使用逆转录病毒假型病毒评估了中和性单克隆抗体的交叉反应性的宽度 [50]。使用含有来自 H5N1 甲型流感病毒进化枝 1、2. 1、2. 2 和 2. 3 的全长 HA 开放读框的假型病毒。数据代表以 ng/ml 表达的 IC₅₀ 值:

[0163]

株系	HK/ 213/03	VN/ 1203/04	VN/ 1194. 04	IN/ 5/05	WS/Mong /244/05	TY/TY/ 1/05	Anhui/ 1/05
进化枝	1	1	1	2. 1	2. 2	2. 2	2. 3

FLA3.14	33	65	86	12	67	76	172
FLA5.10	2.5	24	26	Nn	Nn	Nn	Nn
FLD20.19	10	16	13	77	4	10	104
FLD21.119	0.7	5	7	Nn	22	5	Nn
FLD84	14	42	17	30	30	32	118
FLD93	11	48	22	59	11	13	Nn
FLD122	2	5	6	4	6	8	19
FLS127	750	13	19	Nn	Nn	Nn	Nn
FLD129	0.5	1.7	1.2	678	3	6	16
FLD132	0.5	1	1.6	Nn	1	1	1800
FLD194	2	5	4	5	3	5	2

[0164] Nn :不中和

[0165] 除了FLD20.19之外,两种其它 mAb (FLD122&FLD194) 显示高反应性宽度,能够以高效价中和来自不同进化枝的所有测试病毒。

[0166] 抗体表征

[0167] 测序了编码抗体 FLA5.10、FLD21.140、FLA3.14 和 FLD20.19 的重链和轻链的基因 (SEQ ID NO 2、4、6、8、10、12、14、16)。推断了所编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO 1、3、5、7、9、11、13、15) 并使用 IMGT 编号系统鉴定了 CDR 残基 [19-21] (SEQ ID NO 17 至 40)。

[0168] 测序了编码抗体 FLD84、FLD93、FLD122、FLD127、FLD129、FLD132 和 FLD194 的重链和轻链的基因 (SEQ ID NO 41、43、51、53、61、63、71、73、81、83、91、93、101、103)。推断了所编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO 42、44、52、54、62、64、72、74、82、84、92、94、102、104) 并使用 IMGT 编号系统鉴定了 CDR 残基 [19-21] (SEQ ID NO 45-50、55-60、65-70、75-80、85-90、95-100、105-110)。

[0169] 使用交叉抑制实验鉴定抗体的非重叠特异性。测试了不同抗体针对 FLD20.19、FLA3.14 和 FLD194.110 的竞争,和%抑制如下所示:

竞争物	结合抑制 (%)		
	FLD20.19	FLA3.14	FLD194
FLA3.14	0	100	100
FLA5.10	100	0	100
FLD20.19	100	0	0
FLD21.119	100	0	0
[0170] FLD84	100	0	0
FLD93	100	0	0
FLD122	100	65	100
FLD127	100	0	0
FLD129	100	0	100
FLD132	0	0	52
FLD194	0	0	100

[0171] 因此, FLD20.19 和 FLD194 不交叉竞争结合 HA, 所以它们应识别不同的非重叠表位。这些抗体因此可组合用于围堵 (containment) 病毒逃逸突变体。

[0172] 应理解, 本发明仅通过示例方式描述, 并且可进行修饰而仍保留在本发明的范围和精神内。

[0173] 参考文献

[0174] Hanson 等人 (2006) Respiratory Research 7 :126.

[0175] W02007/089753.

[0176] WHO 文件: Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine viruses developed for potential use as pre-pandemic vaccines.

[0177] W003/078600.

[0178] Green (1999) J Immunol Methods. 231 (1-2) :11-23.

[0179] Mancini 等人 (2004) New Microbiol. 27 (4) :315-28.

[0180] W02004/076677.

[0181] Traggiari 等人 (2004) Nat Med. 10 (8) :871-5.

[0182] Ewert 等人 (2004) Methods 34 (2) :184-99.

[0183] Riechmann 等人 (1988) Nature 332 :323-327.

[0184] O' Brien & Jones (2003) Methods Mol Biol. 207 :81-100.

[0185] Iwahashi 等人 (1999) Mol Immunol. 36 (15-16) :1079-91.

[0186] Lo (2004) Methods Mol Biol. 248 :135-59.

[0187] Verhoeyen 等人 (1988) Science 239 :1534-1536.

[0188] Kashmiri 等人 (2005) Methods 36 (1) :25-34.

- [0189] Gonzales 等人 (2004) *Mol Immunol*. 41(9) :863-72.
- [0190] Kabat 等人 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版
Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- [0191] Chothia & Lesk (1987) *Mol. Biol.* 196 :901-917.
- [0192] Lefranc 等人 (1997) *Immunol Today* 18 :509.
- [0193] Lefranc 等人 (1999) *The Immunologist* 7 :132-6.
- [0194] Lefranc 等人 (2003) *Dev Comp Immunol* 27 :55-77.
- [0195] W002/46235.
- [0196] Worn & Pluckthun (2001) *J Mol Biol.* 305(5) :989-1010.
- [0197] W093/16185
- [0198] Adams & Schier (1999) *J Immunol Methods*. 231(1-2) :249-60.
- [0199] Hallborn & Carlsson (2002) *Biotechniques Suppl* :30-7.
- [0200] Pini & Bracci (2000) *Curr Protein Pept Sci* 1(2) :155-69.
- [0201] Walter 等人 (2001) *Comb Chem High Throughput Screen.* 4(2) :193-205.
- [0202] Gruber 等人 (1994) *J Immunol* 152(11) :5368-74.
- [0203] US-5591828
- [0204] WO 93/11161.
- [0205] Hollinger 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :6444-6448.
- [0206] Hudson & Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231 :177-89.
- [0207] Muylldermans (2001) *J Biotechnol* 74(4) :277-302.
- [0208] Dumoulin 等人 (2002) *Protein Sci.* 11(3) :500-15.
- [0209] Sidhu 等人 (2004) *J Mol Biol.* 338(2) :299-310.
- [0210] Kotz 等人 (2004) *Eur J Biochem.* 271(9) :1623-9.
- [0211] W02007/052242.
- [0212] 美国专利 5,624,821.
- [0213] 美国专利 6,737,056.
- [0214] 美国专利 6,538,124.
- [0215] 美国专利 6,528,624.
- [0216] Shields 等人 (2001) *J Biol Chem* 276 :6591-604.
- [0217] W02006/033386.
- [0218] Idusogie 等人 (2000) *J Immunol* 164(8) :4178-84.
- [0219] Dall'acqua 等人 (2006) *J Biol Chem* 281(33) :23514-24.
- [0220] Marks 等人 (1992) *Bio/Technology* 10 :779-83.
- [0221] Wu 等人 (2005) *J Mol Biol* 350(1) :126-44.
- [0222] W02007/021002.
- [0223] Temperton 等人 (2007) *Influenza and other Respiratory Viruses*. DOI :
10.1111/j.1750-2659.2007.00016.x.
- [0224] Kuby *Immunology* 第四章 (第4版, 2000 ;ASIN :0716733315
- [0225] Jones 等人 *Biotechnol Prog* 2003, 19(1) :163-8

- [0226] Cho 等人 Cytotechnology 2001,37 :23-30
- [0227] Cho 等人 Biotechnol Prog 2003,19 :229-32
- [0228] Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy. 第 20 版, ISBN :0683306472.
- [0229] 美国专利 7,132,100.
- [0230] Simmons 等人 (2007)PLoS Medicine 4 :e178.
- [0231] Rowe 等人 (1999)J Clin Microbiol 37(4) :937-43.

序列表

<110> 胡马斯有限公司

<120> 针对甲型流感病毒 H5N1 株系的抗体

<130>P047217W0

<140>PCT/IB2008/

<141>2008-03-13 _____

<150>US 60/894, 612

<151>2007-03-13

<160>110

<170>SeqWin99, 版本 1.02

<210>1

<211>129

<212>PRT

<213> 人类

<400>1

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

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

Ser

<210>2

<211>388

<212>DNA

<213> 人类

<400>2

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgacggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcage aattatggta tcagttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gtcttgattg gatgggaggg atcatccctt tgtttggaac agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag ctctccaac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatgtc 300
 cacaattacg attttttgac tggttatcca ctcatctct acggtatgga cgtctggggc 360
 caagggacca cggtcaccgt ctctcag 388

<210>3

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<400>3

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

<210>4

<211>322

<212>DNA

<213> 人类

<400>4

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattage acctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
ggaatacccc caaagctcct gatcaatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagatthtg caagttacta ttgtcaacag acttacagtt cccctccaac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa ac	322

<210>5

<211>125

<212>PRT

<213> 人类

<400>5

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

<210>6

<211>376

<212>DNA

<213> 人类

<400>6

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgcagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcage agtgggactt actactggag ctggatccgc 120
catcaccag ggaaggcct ggagtggatt ggttacatct atcacagtgg gagcgcctac 180
tacaatccgt ccctcgagag tegagttacc atgtcagtag acacgtctaa gaatcagttc 240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcca tatattactg tgcgagagct 300
gagaatcttt tgtctcctta tttagccgag ggcttcgacc cctggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctcag 376
```

<210>7

<211>111

<212>PRT

<213> 人类

<400>7

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

<210>8

<211>334

<212>DNA

<213> 人类

<400>8

```
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccate 60
```

tcttgttctg gaagcacctc caacategga agtaatgctg taaactggta ccagcagctc 120
 ccaggaacgg ccccaact cctcatetat agtaataatc agcggcctc aggggtcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccag 240
 tctgaggatg aggctgatta ctactgtgca gcatgggatg acagcctgag tggttcttgg 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctac 334

<210>9

<211>125

<212>PRT

<213> 人类

<400>9

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

<210>10

<211>376

<212>DNA

<213> 人类

<400>10

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtcagg cgtctggata cagctttacc agccgctgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg ggtgggattc atctatccta gtgactctga tgtagatat 180
 agtccgtcct ttgaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgectac 240

ctacagtgga gcagcctgaa ggcccteggac accgccatgt atttctgtgc gagacttggg 300
 gaaataagg actacggtga ctacctctgg tacttccatc tctggggccg tggcgcctg 360
 gtcactgtct cctcag 376

<210>11

<211>106

<212>PRT

<213> 人类

<400>11

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

<210>12

<211>319

<212>DNA

<213> 人类

<400>12

gaaatagtga tgacgcagtc tccagacacc ctgtctgtgt ctccaggaga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttaac aggaggtag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catccatgat gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagatdddg cagtttatta ctgtcagcag tatgataact ggctctcctt cggccagggg 300
 acacgactgg agattaaac 319

<210>13

<211>120

<212>PRT

<213> 人类

<400>13

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

<210>14

<211>361

<212>DNA

<213> 人类

<400>14

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgaa	gtgaaggagc	ctgggtccgc	gatgaaggtc	60
tcctgcaagg	cctctggagg	caccttcagt	agtgatgcct	tctgctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacgag	ggcttgagtg	gatgggaggg	atcatccctg	tctttcaaac	tgcaaaactac	180
ggaccgaact	tccagggcag	agtcaccatt	agcgcggacg	tttacacgac	cacgetttac	240
ctggaattga	gtggcctgac	atctgaggac	acggccgtgt	atTTTTgtgc	gagatccggg	300
gatggctaca	actactactt	tcccctctgg	ggccagggaa	ccctgggtcac	cgctctctca	360
g						361

<210>15

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<400>15

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

<210>16

<211>321

<212>DNA

<213> 人类

<400>16

gacatccaga	tgaccagtc	tccttcacc	ctgtctggat	cagtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggccagtca	gaatattggt	ccctggttgg	cctggtacca	acaagaatca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctctagg	gctgtctattt	tagaaagtgg	ggtcccatca	180
agattcagcg	gcactggaac	tgggacagaa	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gatgattttg	caacttatta	ctgccaacac	tataatgctt	attgggggac	gttcggccaa	300
gggaccaagg	tggaaatcaa	c				321

<210>17

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>17

Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Asp	Ala
1				5			

<210>18

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>18

Ile Ile Pro Val Phe Gln Thr Ala

1 5

<210>19

<211>13

<212>PRT

<213> 人类

<400>19

Ala Arg Ser Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Phe Pro Leu

1 5 10

<210>20

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>20

Gln Asn Ile Gly Pro Trp

1 5

<210>21

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>21

Arg Ala Ser

1

<210>22

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>22

Gln His Tyr Asn Ala Tyr Trp Gly Thr

1 5

<210>23

<211>10

<212>PRT

<213> 人类

<400>23

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Thr Tyr Tyr

1 5

<210>24

<211>7

<212>PRT

<213> 人类

<400>24

Ile Tyr His Ser Gly Ser Ala

1 5

<210>25

<211>17

<212>PRT

<213> 人类

<400>25

Ala Arg Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Tyr Leu Ala Glu Gly Phe Asp

1 5 10 15

Pro

<210>26

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>26

Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala

1 5

<210>27

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>27

Ser Asn Asn

1

<210>28

<211>12

<212>PRT

<213> 人类

<400>28

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Ser Trp Val

1 5 10

<210>29

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>29

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Arg Trp

1 5

<210>30

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>30

Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Val

1

5

<210>31

<211>18

<212>PRT

<213> 人类

<400>31

Ala Arg Leu Gly Gly Asn Lys Asp Tyr Gly Asp Tyr Leu Trp Tyr Phe

1

5

10

15

Asp Leu

<210>32

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>32

Gln Ser Val Asn Arg Arg

1

5

<210>33

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>33

Asp Ala Ser

1

<210>34

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>34

Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Leu Ser

1

5

<210>35

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>35

Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1

5

<210>36

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>36

Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala

1

5

<210>37

<211>22

<212>PRT

<213> 人类

<400>37

Ala Arg Asp Val His Asn Tyr Asp Phe Leu Thr Gly Tyr Pro Leu His

1

5

10

15

Leu Tyr Gly Met Asp Val

20

<210>38

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>38

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr

1

5

<210>39

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>39

Val Ala Ser

1

<210>40

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>40

Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Pro Thr

1

5

<210>41

<211>388

<212>DNA

<213> 人类

<400>41

caggtgcaac tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctteggagac cctgtccctc	60
atctgcgctg tctctggtgc ctccataagt agttcttact ggagctggat tcggcagccc	120
ccaggggaagg gactggagtg gattggatat atctattaca gtggggtcac caaatacaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccctttct gtggacacgt ccaagaacca cttctccctg	240
aagctgagct atgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aaatcttccg	300
gatattgcgg tggtagctgc tgttcaggat gcgactccgg tctggttcga cccctggggc	360
ccgggcaccc tggctctccgt ctctctcag	388

<210>42

<211>129

<212>PRT

<213> 人类

<400>42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1

5

10

15

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

<210>43

<211>325

<212>DNA

<213> 人类

<400>43

gacatccagt tgaccagtc tccatcatcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattatc acgtatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg acatacagtt tgcaaaatgg ggtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta gcctcatggt cacttttggc 300
 caggggacca agctggacat caaac 325

<210>44

<211>108

<212>PRT

<213> 人类

<400>44

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

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

<210>45

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>45

Gly Ala Ser Ile Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210>46

<211>7

<212>PRT

<213> 人类

<400>46

Ile Tyr Tyr Ser Gly Val Thr
 1 5

<210>47

<211>23

<212>PRT

<213> 人类

<400>47

Ala Arg Asn Leu Pro Asp Ile Ala Val Val Thr Ala Val Gln Asp Ala
 1 5 10 15
 Thr Pro Val Trp Phe Asp Pro
 20

<210>48

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>48

Gln Gly Ile Ile Thr Tyr

1 5

<210>49

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>49

Ala Thr Tyr

1

<210>50

<211>10

<212>PRT

<213> 人类

<400>50

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Leu Met Phe Thr

1 5 10

<210>51

<211>382

<212>DNA

<213> 人类

<400>51

tggtggcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggagg	caccttcagc	agctatgata	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaggg	atcatcccta	tctatggcac	agcaaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgata	accgcgagc	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgttt	attactgtgc	gagagcaggt	300

ggtgatagta gtggttatta tgggtgccttg gggcggttct tccagcactg gggccagggc 360
accctgggtca cegtctctc ag 382

<210>52

<211>127

<212>PRT

<213> 人类

<400>52

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

<210>53

<211>322

<212>DNA

<213> 人类

<400>53

gtcatctgga tgaccagtc tccatcttta ctctctgcat ctacaggaga cagagtcacc 60
atcagttgtc ggatgagtca gggcattagc agttatntag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctgagctcct gatccatact gcatacactt tgaaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggtatc tgggaaagat ttcactctca ccatcagtg cctgcagtct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagtt tcccgtacac ttttgccag 300
gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210>54

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<400>54

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

<210>55

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>55

Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asp
1				5			

<210>56

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>56

Ile	Ile	Pro	Ile	Tyr	Gly	Thr	Ala
1				5			

<210>57

<211>20

<212>PRT

<213> 人类

<400>57

Ala Arg Ala Gly Gly Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ala Leu Gly Arg

1 5 10 15

Phe Phe Gln His

20

<210>58

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>58

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210>59

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>59

Thr Ala Tyr

1

<210>60

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>60

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210>61

<211>370

<212>DNA

<213> 人类

<400>61

```

cagtttcaac tgggtgcagtc tggacctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctgggcta cacttccacc acctacggga tcagctgggt gcgacaggtc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctt acaacggaaa cccacattat      180
ggacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagagaca catccacaaa tactgcctac      240
ctggaaatat tgagcctcag atctgacgac acggcctctc attactgtgc gagagatggg      300
tggggccagc aactggttcc ctattacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctcctcag                                     370

```

<210>62

<211>123

<212>PRT

<213> 人类

<400>62

```

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

```

<210>63

<211>337

<212>DNA

<213> 人类

<400>63

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc    60
atctcctgca gggctagtca ggcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg    120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcttgattc agttgggttc tactcgggcc    180
tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttcac actcgaatc    240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaacttccc    300
ctcgccttcg gcccaaggac acgactggag attaaac                                337

```

<210>64

<211>112

<212>PRT

<213> 人类

<400>64

```

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

```

<210>65

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>65

```

Gly Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr Gly
1           5

```

<210>66

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>66

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Pro

1 5

<210>67

<211>16

<212>PRT

<213> 人类

<400>67

Ala Arg Asp Gly Trp Gly Gln Gln Leu Val Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210>68

<211>11

<212>PRT

<213> 人类

<400>68

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr

1 5 10

<210>69

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>69

Leu Gly Ser

1

<210>70

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>70

Met Gln Ala Leu Gln Leu Pro Leu Ala

1

5

<210>71

<211>376

<212>DNA

<213> 人类

<400>71

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agttatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtg	atatggtatg	atggagataa	taaatactat	180
ggagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cactctgttt	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	actactgtgc	gaaagacacg	300
gccgaccacg	gtgactacgt	agacctcggg	ttttttgacg	cctggggcca	gggaaccctg	360
gtcaccgtct	cctcag					376

<210>72

<211>125

<212>PRT

<213> 人类

<400>72

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

Ala Lys Asp Thr Ala Asp His Gly Asp Tyr Val Asp Leu Gly Phe Phe
 100 105 110
 Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210>73

<211>322

<212>DNA

<213> 人类

<400>73

gacatccaga tgaccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggatgtgagc acctggtag cctggatca gctgaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggate tgggacagat ttactctca ctgtcagcag cctgcagcct 240
 gaagatcttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggcct 300
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210>74

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<400>74

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

<210>75

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>75

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210>76

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>76

Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Lys

1 5

<210>77

<211>18

<212>PRT

<213> 人类

<400>77

Ala Lys Asp Thr Ala Asp His Gly Asp Tyr Val Asp Leu Gly Phe Phe

1 5 10 15

Asp Ala

<210>78

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>78

Gln Asp Val Ser Thr Trp

1 5

<210>79

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>79

Ala Ala Ser

1

<210>80

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>80

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

<210>81

<211>388

<212>DNA

<213> 人类

<400>81

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttagt	gacttttga	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtggccaac	atagaccaag	atggaaatga	gagattctat	180
gcggactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaatga	ccagcctgag	agccgacgac	acggccgttt	attactgtgc	gagagatggg	300
agagagggat	atttctatgg	tccggggagt	ttttataacc	ttaaggtct	caattggggc	360
cagggaaacc	tgctcaccgt	ctcctcag				388

<210>82

<211>129

<212>PRT

<213> 人类

<400>82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe

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

<210>83

<211>331

<212>DNA

<213> 人类

<400>83

```

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc      60
tcctgctctg gaaccagctc caacattggg aaaaattatg tctcctggta ccagcagctc      120
ccaggagcag ccccaact cctcatttat gacaatgata agcgaccctc agggattcct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cgactccag      240
actggggacg aggccgatta ttattgcggc acatgggata gcagtctgag tgttgggatg      300
ttcggcggag ggaccaggct gaccgtecta g                                     331

```

<210>84

<211>110

<212>PRT

<213> 人类

<400>84

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

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

<210>85

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>85

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Trp

1

5

<210>86

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>86

Ile Asp Gln Asp Gly Asn Glu Arg

1

5

<210>87

<211>22

<212>PRT

<213> 人类

<400>87

Ala Arg Asp Gly Arg Glu Gly Tyr Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Tyr

1

5

10

15

Asn Leu Lys Gly Leu Asn

20

<210>88

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>88

Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr

1 5

<210>89

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>89

Asp Asn Asp

1

<210>90

<211>11

<212>PRT

<213> 人类

<400>90

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Gly Met

1 5 10

<210>91

<211>376

<212>DNA

<213> 人类

<400>91

gaggtgcaac tgggtgcagtc tggagcagag ctgaaaatgc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg cttctggata cacctttacg aattactgga tcggctgggt gcgccagacg	120
cccgggaaag gcctggaatg gatggggatc atctttcctc ctgactctca aacttcatac	180
agtcctgctt tccaaggcca ggtcaccttc tcagtcgaca actccattag tgttgectac	240
atacagtgga gtagcctgaa ggccctcggac actgccatat attactgtgc gagatcagga	300
atTTTTgatt ggTccgcccc ccttgTtgaa gctTTTTgata tttggggcca agggacagtg	360

gtcaccgtct cttcag

376

<210>92

<211>125

<212>PRT

<213> 人类

<400>92

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

<210>93

<211>322

<212>DNA

<213> 人类

<400>93

gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtgggaga cggagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc ggacatttac atttatttag cctggtatca gcaaaaaccg 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcctccactc tgcagggtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcaacaa cctgcagcct 240
 gaggattttg caacttattt ctgtcagcaa cttaatggct accccctcac tttcggegga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210>94

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<400>94

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

<210>95

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>95

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
 1 5

<210>96

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>96

Ile Phe Pro Pro Asp Ser Gln Thr
 1 5

<210>97

<211>18

<212>PRT

<213> 人类

<400>97

Ala Arg Ser Gly Ile Phe Asp Trp Ser Ala Pro Leu Val Glu Ala Phe

1

5

10

15

Asp Ile

<210>98

<211>6

<212>PRT

<213> 人类

<400>98

Gln Asp Ile Tyr Ile Tyr

1

5

<210>99

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>99

Ala Ala Ser

1

<210>100

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>100

Gln Gln Leu Asn Gly Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210>101

<211>376

<212>DNA

<213> 人类

<400>101

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata cagtttttagc gattactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
cccggggaag gcctggaatg gatggggate atctatcctg ctagttctga aatcagatac      180
agccccgtcct tccagggcct ggteaccate tcagccgaca agtccatcaa caccgcctcc      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggectcggac accgccatct attactgcgc gagacatgcc      300
tctttagtagtg ctcgtagctg ttattggggg cccgttgact actggggcca ggaaccctg      360
gtcaccgtct cctcag                                     376

```

<210>102

<211>125

<212>PRT

<213> 人类

<400>102

```

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

```

<210>103

<211>337

<212>DNA

<213> 人类

<400>103

```

gatattgtga tgactcagtc tccactetcc ctgcccgtct cccctggaga gccggcctcc    60
atctcctgca ggtctagtca gaccctccta catggtaatg gatacaacta tttggattgg    120
tacctgcaga agccagggca gtctccacgc ctctgatct atttgggttc taatcgggcc    180
tccggggtcc ctgataggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc    240
agcagagtgg aggctgaaga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg    300
ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaac                                337

```

<210>104

<211>112

<212>PRT

<213> 人类

<400>104

```

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

```

<210>105

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>105

```

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Trp
1           5

```

<210>106

<211>8

<212>PRT

<213> 人类

<400>106

Ile Tyr Pro Ala Ser Ser Glu Ile

1 5

<210>107

<211>18

<212>PRT

<213> 人类

<400>107

Ala Arg His Ala Ser Cys Ser Ala Arg Ser Cys Tyr Trp Gly Pro Val

1 5 10 15

Asp Tyr

<210>108

<211>11

<212>PRT

<213> 人类

<400>108

Gln Ser Leu Leu His Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr

1 5 10

<210>109

<211>3

<212>PRT

<213> 人类

<400>109

Leu Gly Ser

1

<210>110

<211>9

<212>PRT

<213> 人类

<400>110

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1

5

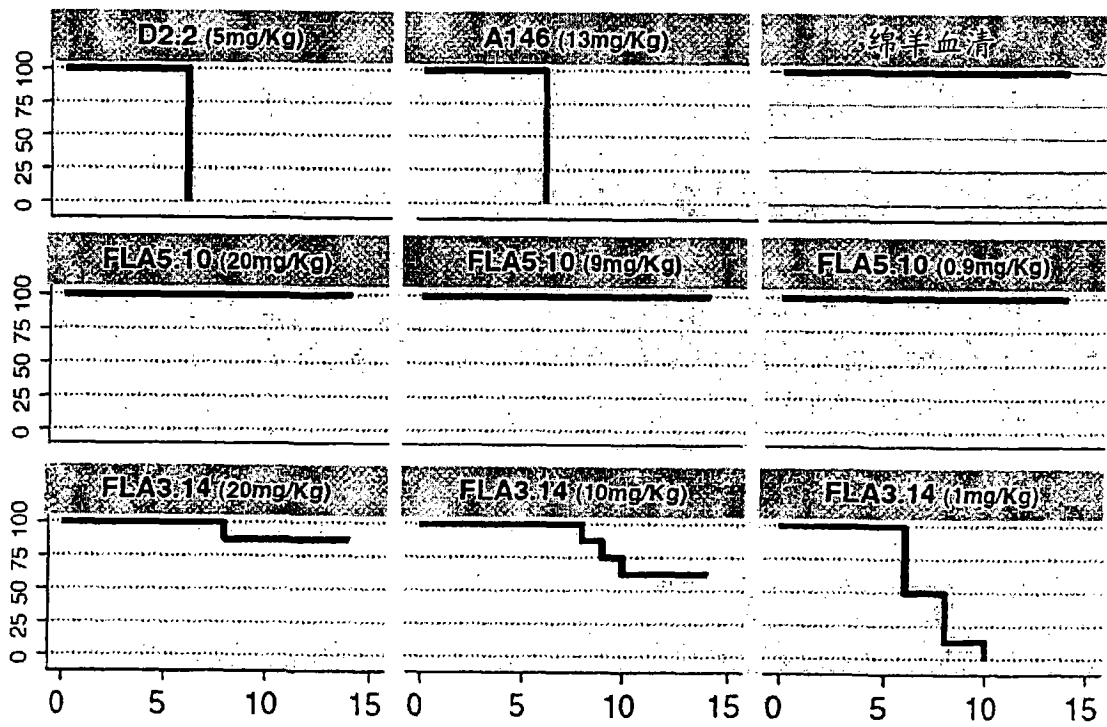


图 1

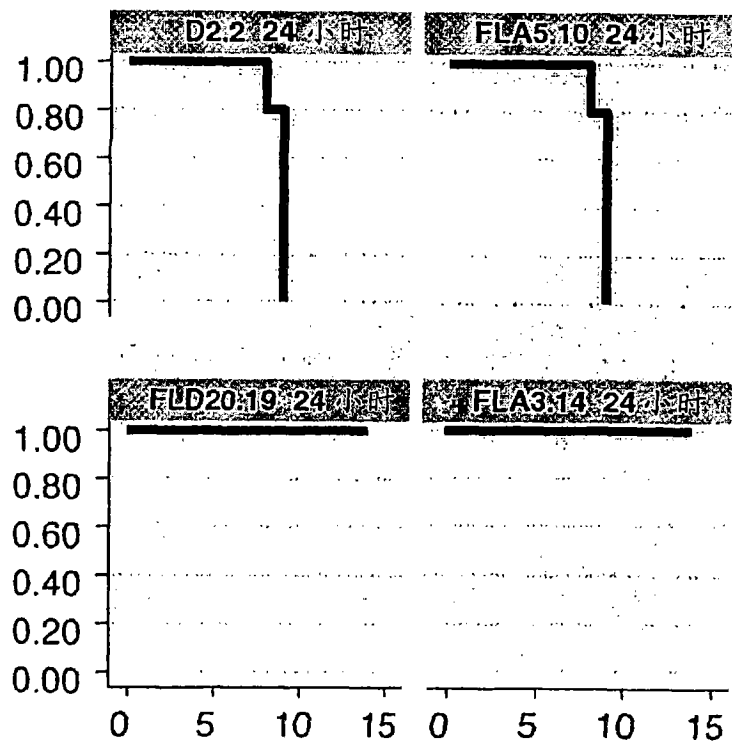


图 5

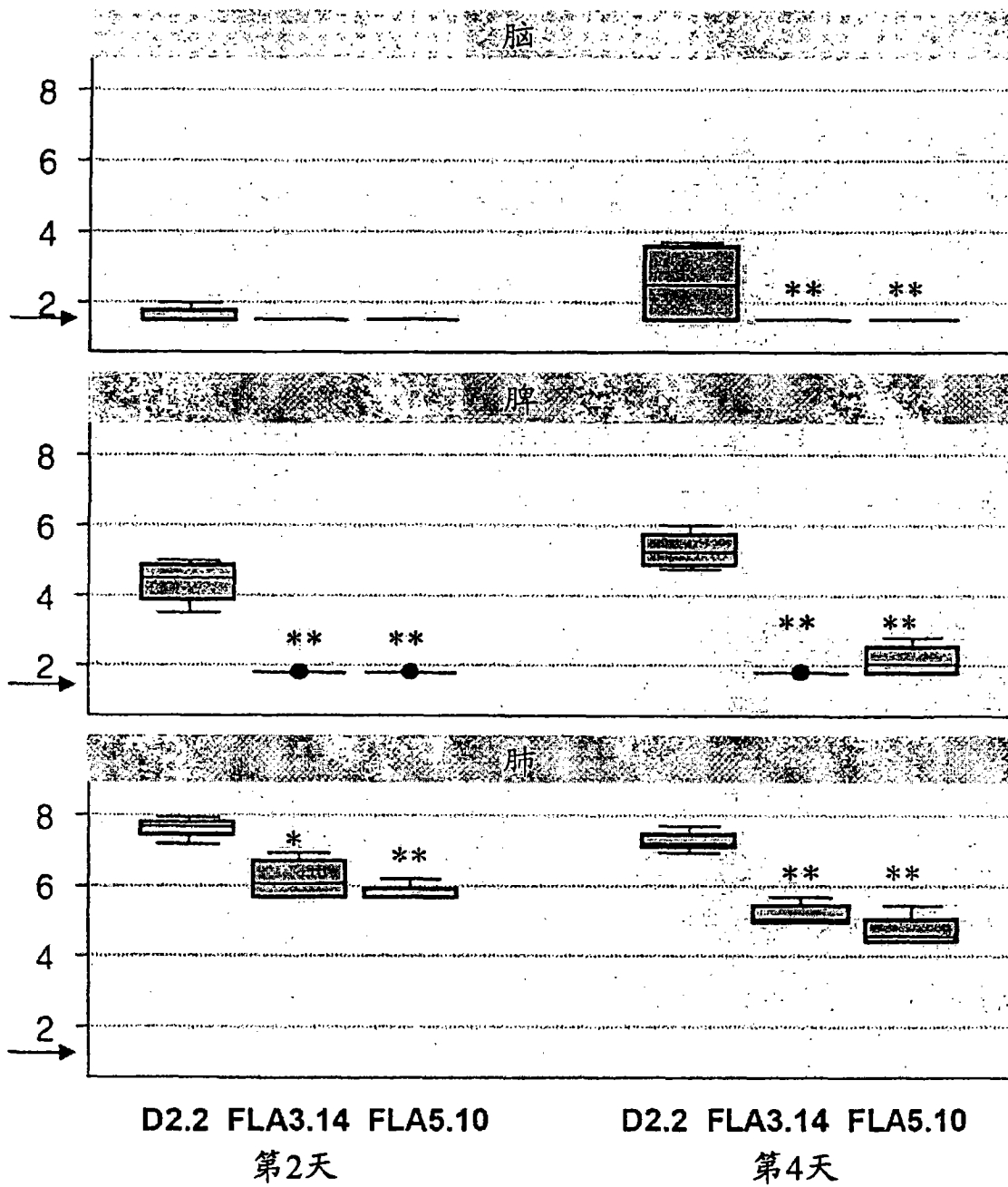


图 2

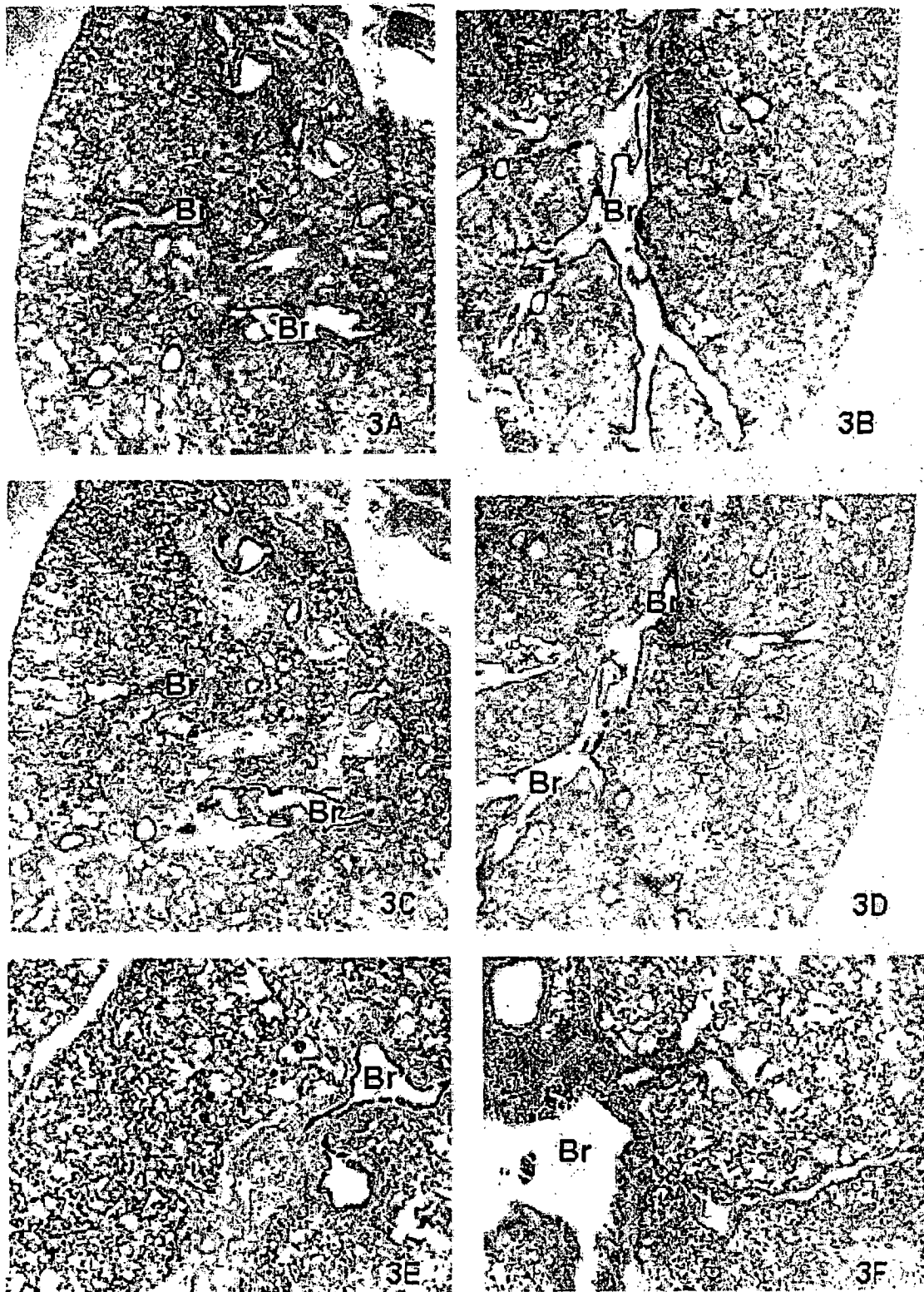


图 3

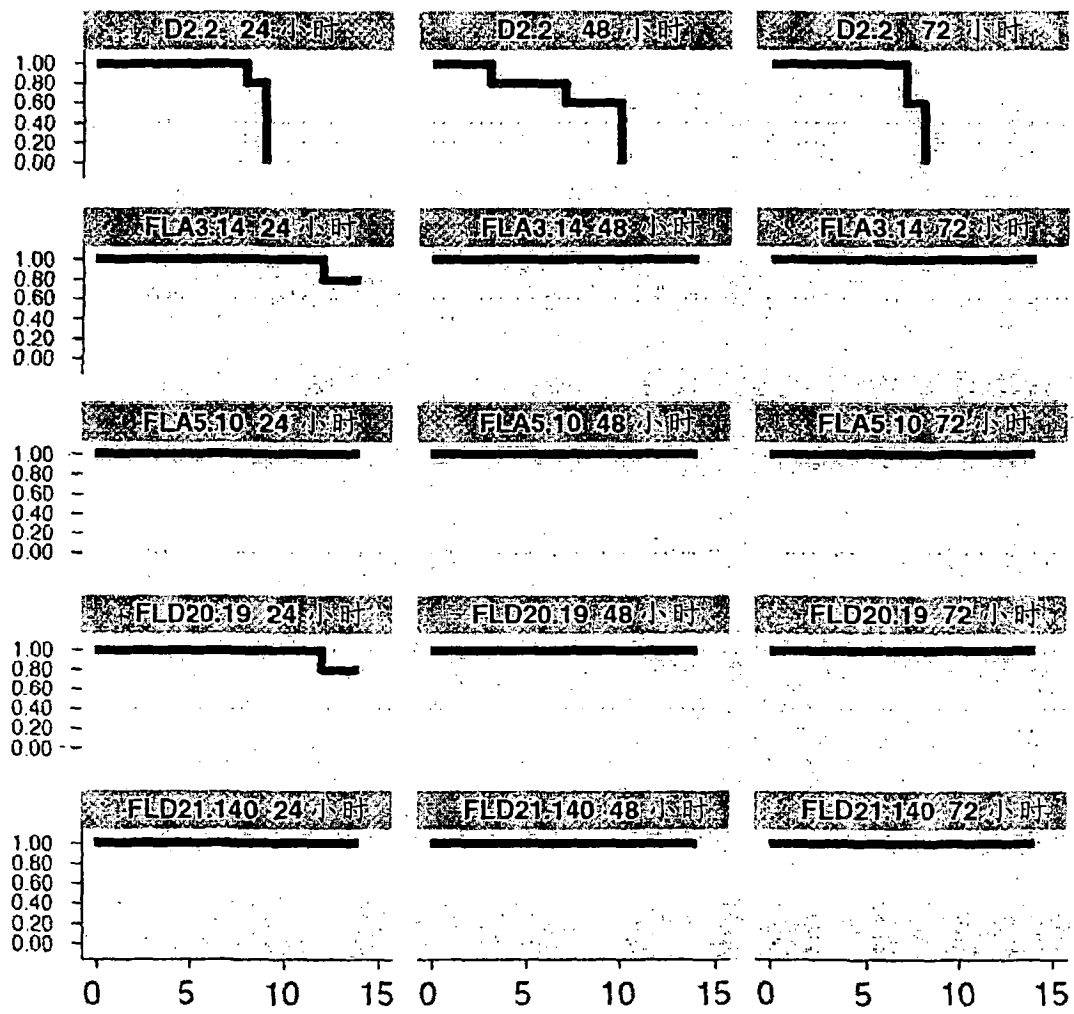


图 4