



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108610416 B

(45) 授权公告日 2022. 01. 14

(21) 申请号 201810446003.6	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2009.10.13	C07K 16/10 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61K 39/42 (2006.01)
申请公布号 CN 108610416 A	A61P 31/14 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.10.02	C12N 15/13 (2006.01)
(30) 优先权数据	G01N 33/569 (2006.01)
61/104,911 2008.10.13 US	G01N 33/68 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	(56) 对比文件
200980140759.7 2009.10.13	WO 2004067567 A2,2004.08.12
(73) 专利权人 生物医学研究所	CN 1249781 A,2000.04.05
地址 瑞士贝林佐纳	刘丽华.联合表达I型登革热病毒糖蛋白prM
(72) 发明人 A·兰扎韦基亚	和E的重组痘苗病毒可在小鼠中诱生中和抗体.
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司	《国外医学-预防、诊断、治疗用生物制品分册》
72002	.1994,第17卷(第06期),第184条.
代理人 左路 林晓红	审查员 袁一方
	权利要求书2页 说明书31页 附图2页

(54) 发明名称
登革热病毒中和抗体及其用途

(57) 摘要
本发明涉及中和登革热病毒感染而不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用的抗体及其抗原结合片段以及抗体及其抗原结合片段的混合物。本发明还涉及产生此类抗体和抗原结合片段的永生化B细胞以及结合此类抗体和抗原结合片段的表位。此外,本发明还涉及所述抗体、抗原结合片段和表位在筛选方法以及在登革热病毒感染的诊断和治疗中的用途。

1. 药物组合物,其包含一种、两种或三种人抗体或其抗原结合片段,其中所述组合物中和登革热病毒,但不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用,且其中所述抗体或其抗原结合片段中的至少一种包含:

(i) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:1-6所示;或
(ii) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:17-22所示;或
(iii) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:33-38所示;或
(iv) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:49-54所示;或
(v) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:67-72所示;或
(vi) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:83-88所示;或
(vii) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:83、84、85、99、53和100所示;或

(viii) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:135、136、137、138、139和109所示;或

(ix) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:149、136、137、138、139和109所示;或

(x) 重链CDR 1、2和3和轻链CDR 1、2和3,其序列分别如SEQ ID NO:169-174所示。

2. 权利要求1的药物组合物,其中所述组合物通过结合每一登革热病毒血清型的至少两种不同的表位而中和登革热病毒血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。

3. 权利要求1或2的药物组合物,其中所述抗体是单克隆抗体或重组抗体。

4. 权利要求1或2的药物组合物,其中所述抗体中和两种、三种或四种不同登革热病毒血清型中的一种以上登革热病毒。

5. 权利要求1或2的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段中的至少一种包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:61的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:65的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:96的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:145的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:151的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或包含氨基酸序列SEQ ID NO:181的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:182的轻链可变区,其中所述抗体中和登革热病毒感染。

6. 权利要求1或2的药物组合物,包含抗体HMB-DV5和HMB-DV6或其抗原结合片段,其中抗体HMB-DV5是包含由SEQ ID NO:79的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:80的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体,并且抗体HMB-DV6是包含由SEQ ID NO:95的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:96的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体。

7. 权利要求1或2的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

8. 一种核酸分子,其包含编码前述权利要求任一项的药物组合物中的至少一种抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

9. 权利要求8的核酸分子,其中所述多核苷酸序列与以下核酸序列具有至少70%的相同性:SEQ ID NO:7-12、15、16、23-28、31、32、39-44、47、48、55-60、63、64、66、73-78、81、82、89-94、97、98、101、102、104、140-143、144、147、148、150、152、175-180、183或184。

10. 一种细胞,其表达权利要求1-7中任一项的的药物组合物中的至少一种抗体或其抗原结合片段,或表达包含一或多种权利要求8或9的核酸分子的载体。

11. 一种永生化B细胞克隆,其表达权利要求1-7任一项的药物组合物中的至少一种抗体。

12. 权利要求1或2的药物组合物或包含权利要求10的细胞或权利要求11的永生化B细胞克隆的药物组合物,其进一步包含药用可接受的稀释剂和任选存在的用于延长所述抗体或其抗原结合片段的半衰期的物质。

13. 权利要求1或2的药物组合物或包含权利要求10的细胞或权利要求11的永生化B细胞克隆的药物组合物,其进一步包含药用可接受的载体和任选存在的用于延长所述抗体或其抗原结合片段的半衰期的物质。

14. 权利要求1-7、12和13任一项的药物组合物制备用于抑制或预防登革热病毒感染或登革热病毒相关疾病的药物中的用途。

15. 权利要求14的用途,其中所述药物组合物包含第二治疗剂。

16. 权利要求15的用途,其中所述第二治疗剂是抗病毒剂。

17. 权利要求1-7、12和13任一项的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物(i)用于制备治疗登革热病毒感染,(ii)用于疫苗,(iii)用于诊断登革热病毒感染,或(iv)用于通过核实疫苗的抗原含有具有正确构象的特异性表位而监测抗登革热病毒疫苗的质量。

登革热病毒中和抗体及其用途

[0001] 本申请是2009年10月13日提交的,申请号为200980140759.7,题目为“登革热病毒中和抗体及其用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2008年10月13日提交的申请号为No.61/104,911,发明名称为“登革热病毒中和抗体及其用途(Dengue virus neutralizing antibodies and Use Thereof)”的美国临时申请的优先权,其全部内容通过引用并入本申请。

背景技术

[0003] 登革热病毒(DENV)是严重威胁世界健康的人类病原体。估计这些病毒每年引起数十万例的登革热、登革出血热和登革热休克综合征。黄病毒属有四种密切相关的登革热病毒血清型:DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。这四种病毒通过埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)——一种高度城市化的、成功抵抗所有试图对其进行杀灭和控制努力的蚊子——叮咬而在人与人之间传播。免疫接种被认为是控制登革热的唯一有效方法。为此,一些四价登革热候选疫苗已处于研发的最后阶段。

[0004] 首次感染一种登革热病毒血清型可诱导针对同源血清型的终生免疫。不过,这对不同血清型的感染没有交叉保护作用。实际上,由于存在抗体依赖性感染增强作用(ADE),针对一种血清型的已有的免疫力可增加不同血清型引起的登革热感染和登革出血热的风险。在ADE中,因先前登革热感染或由母亲被动转移来的抗体会形成感染性免疫复合物,后者结合携带Fc-受体的单核巨噬细胞系中的细胞,导致有效感染。

[0005] 因此,目前需要能够预防登革热病毒感染而不增加抗体依赖性感染增强作用的风险的材料和方法。

发明内容

[0006] 本发明部分基于发现了中和登革热病毒感染而不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用的抗体和抗体混合物(cocktails)。因此,在本发明的一个方面,本发明包括一种人抗体、抗体变体或其抗原结合片段,其中和登革热病毒,其中所述抗体、抗体变体或其抗原结合片段不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用。在一个实施方式中,本发明包含人抗体、抗体变体或其抗原结合片段,其中和登革热病毒,其中所述抗体、抗体变体或其抗原结合片段的Fc区包含突变,且其中所述突变降低抗体与Fc受体的结合。

[0007] 在本发明的另一实施方式中,本发明包含药物组合物,其包含两种或更多种人抗体或其抗原结合片段。所述抗体或抗原结合片段通过结合每一登革热病毒血清型的至少两种不同的表位而中和登革热病毒血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。所述药物组合物的抗体不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用。

[0008] 在另一实施方式中,本发明包含一种抗体或其抗原结合片段,其包含至少一种具有以下任一序列的互补决定区(CDR)序列:SEQ ID NO:1-6、17-22、33-38、49-54、67-72、83-88、99、100、105-110、121-123、124、125、135-139、149、153-158、169-174、185-188或189,其中所述抗体中和登革热病毒感染。

[0009] 在另一实施方式中,本发明包含一种抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:29的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:30的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:45的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:46的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:61的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:65的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:79的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:96的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:117的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:118的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:131的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:132的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:145的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:151的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:165的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:166的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:181的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:182的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:195的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:196的轻链可变区,其中所述抗体中和登革热病毒感染。

[0010] 在另一实施方式中,本发明包含重组抗体、抗体变体或其抗原结合片段,其能中和登革热病毒。所述重组抗体、抗体变体或抗原结合片段不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用。

[0011] 在另一方面,本发明包含核酸分子,其包含编码中和登革热病毒感染的本发明的抗体或抗体片段的多核苷酸。在另一方面,本发明包含表达本发明的抗体的细胞。在另一方面,本发明包含一种分离或纯化的免疫原性多肽,其包含结合本发明的抗体的表位。

[0012] 本发明还包含药物组合物,其包含本发明的抗体、抗体变体或抗原结合片段、本发明的核酸或本发明的免疫原性多肽,以及药用可接受的稀释剂或载体和任选存在的用于延长所述抗体或其抗原结合片段的半衰期的物质(agent)。

[0013] 在本发明的另一方面,本发明提供抑制或预防登革热病毒感染或登革热病毒相关疾病的方法或治疗登革热病毒感染或登革热病毒相关疾病的方法。所述方法包括给有需要的对象施用治疗有效量的至少一种本发明的抗体、抗体变体、抗原结合片段或药物组合物。

[0014] 在本发明的另一方面,本发明包含筛选能够诱导或揭示针对登革热病毒的免疫应答的多肽的方法,包括使用本发明的抗体、抗体片段或变体筛选多肽文库。

[0015] 在本发明的另一方面,本发明包含监测抗登革热病毒疫苗的质量的方法。所述方法包括使用本发明的抗体、抗体变体或其抗原结合片段来核实所述疫苗的抗原含有具有正确构象的特异性表位。

[0016] 在本发明的另一方面,本发明包含疫苗,其包含特异性结合本发明的抗体、抗体片段或变体的表位。

[0017] 本发明也包括本发明的抗体或其抗原结合片段、本发明的核酸、本发明的免疫原性多肽或本发明的药物组合物用于(i)制备治疗登革热病毒感染的药物,(ii)疫苗或(iii)

诊断登革热病毒感染中的用途。此外,本发明还包括本发明的抗体或其抗原结合片段用于通过核实疫苗的抗原含有具有正确构象的特异性表位而监测抗DENV疫苗的质量的用途。

[0018] 在另一方面,本发明包含表位,其特异性结合本发明的任一抗体或其抗原结合片段,所述表位用于(i)治疗,(ii)制备治疗登革热病毒感染的药物,(iii)作为疫苗或(iv)筛选能够中和登革热病毒感染的配体。

附图说明

[0019] 图1:使用野生型抗登革热病毒抗体以各血清型登革热病毒在VERO细胞和K562细胞上进行病毒中和和增强测试。登革热病毒抗体以剂量依赖性方式抑制靶病毒对VERO细胞的感染。对于K562细胞,抗体导致剂量依赖性感染增强作用(ADE)。

[0020] 图2:重链中具有CH2L4A和L5A取代的抗登革热病毒抗体(LALA变体)与非修饰的抗体一样中和靶病毒对VERO细胞的感染。但是LALA变体完全消除靶病毒对K562细胞的抗体依赖性感染增强作用。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明基于发现了中和登革热病毒(DENV)感染而不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用(ADE)的抗体和抗体混合物。在本发明的一个方面,本发明包含人抗体、变体抗体或其抗原结合片段,其中和登革热病毒而不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用。所述抗体或抗体片段能够中和一种以上登革热病毒血清型,例如,登革热病毒血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4的2种、3种或全部4种。

[0023] 本发明还包含药物组合物,其包含,例如,包含两种或更多种人抗体、抗体变体或其抗原结合片段的抗体混合物。本发明的包含人抗体、抗体片段或变体混合物的药物组合物中和全部四种登革热病毒血清型,即DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。在一个实施方式中,所述抗体、抗体片段或变体的混合物通过结合各登革热病毒血清型的至少两种不同的表位而中和登革热病毒。要注意到是,药物组合物中的抗体、变体货物片段不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用。在一个实施方式中,所述混合物包含两种抗体、或其片段或变体。在另一个实施方式中,所述混合物包含三种抗体、或其片段或变体。在另一实施方式中,所述混合物包含三种以上抗体,例如,4、5、6、7或8种抗体。

[0024] 在本文中,术语“片段”、“抗体片段”和“抗原结合片段”可互换地使用,指的是本发明抗体的保持所述抗体的抗原结合活性的任何片段。示例性抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和scFv片段。

[0025] 术语“突变”和“取代”可互换地使用,指的是一或多个核酸或氨基酸残基的改变。

[0026] 在本文中,术语“变体”和“抗体变体”可互换地使用,指的是本发明抗体的保持所述抗体的抗原结合活性的任何变体。术语变体包括那些包含突变和/或取代的抗体。示例性抗体变体包括但不限于那些在位置CH2 4、5或两者处具有L取代为A的变体。

[0027] 本发明的抗体

[0028] 本发明提供抗体,所述抗体中和登革热病毒,但不引起登革热病毒感染的ADE。“中和抗体”是能够中和病原体在宿主体内引发感染和/或使感染持续存在的能力的抗体。本发明的抗体能够中和一或多种登革热病毒血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。在一个实施方式中,本发明的抗体中和一种以上,例如,2、3或全部4种登革热病毒血清型。在另一个

实施方式中,包含两种或更多种抗体、抗体片段或变体的药物组合物可中和全部4种登革热病毒血清型。在另一实施方式中,所述包含两种或更多种抗体、抗体片段或变体的药物组合物通过靶向每一登革热病毒血清型的两种不同表位而中和登革热病毒感染。这些抗体、抗原结合片段和变体,如本文所述,经适当配制后可用作预防剂或治疗剂或用作诊断工具。

[0029] 本发明的抗体可以是单克隆的,例如,人单克隆抗体或重组抗体。本发明还提供本发明的抗体的片段,特别是那些保持所述抗体的抗原结合活性的片段。尽管说明书中,包括权利要求书中,在某些部分可能明确提到抗体片段、变体和/或抗体衍生物,但要理解,术语“抗体”或“本发明的抗体”包括抗体的所有范畴,即,抗体片段、抗体变体和抗体衍生物。

[0030] 无意于受到任何理论的限制,认为抗体依赖性登革热病毒感染增强作用是由抗体的Fc区,特别是IgG分子的重链Fc区与宿主细胞的Fc受体(例如,Fc γ 受体)的结合引起的。而本发明则提供这样的抗体,包括IgG分子,它们与Fc受体(FcR)的结合是降低的。在一个实施方式中,本发明的抗体的Fc区包含一或多个突变。所述突变可以是任何降低抗体与Fc受体结合的突变。在一个实施方式中,本发明的抗体的Fc区包含在位置CH2 4、5或两者处的取代。通常,野生型IgG1和IgG3的CH2的位置4和5处的氨基酸是亮氨酸(“L”)。在一个实施方式中,本发明的抗体在位置CH2 4、5或两者处包含不是的L的氨基酸。在另一个实施方式中,本发明的抗体在位置CH2 4或5或两者处包含丙氨酸(“A”)。包含CH2L4A和L5A取代的抗体在本文中称为“LALA”变体。

[0031] 或者,本发明提供不具有Fc区的抗体片段,因此它们不结合FcR。示例性抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和scFv。

[0032] 本发明的一些示例性抗体(每种抗体均包含三个重链CDR和三个轻链CDR)的重链和轻链序列已经确定。根据IMGT编号系统[1,2,3]对CDR氨基酸的位置进行定义。序列表中给出了本发明的多种示例性抗体的CDR、重链、轻链的序列以及编码所述CDR、重链、轻链的核酸分子的序列。表1分别给出了本发明的示例性抗体的6个CDR、重链和轻链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO。表2给出了编码本发明的示例性抗体的CDR、重链和轻链的核酸分子的序列的SEQ ID NO。

[0033] 表1:抗体CDR、重链和轻链的氨基酸SEQ ID

[0034]

抗体	CDR	重链可变区	轻链可变区
HMB-DV-1	1-6	13	14
HMB-DV-2	17-22	29	30
HMB-DV-3	33-38	45	46
HMB-DV-4	49-54	61,65	62
HMB-DV-5	67-72	79	80
HMB-DV-6	83-88	95	96
HMB-DV-7	83-85,99,53,100	95	103
HMB-DV-8	105-110	117	118
HMB-DV-9	121-123,70 124,125	131	132
HMB-DV-10	135-139,109	145	146
HMB-DV-11	149,136-139,109	151	146
HMB-DV-12	153-158	165	166

HMB-DV-13	169-174	181	182
HMB-DV-14	185-188, 37, 189	195	196

[0035] 表2: 抗体CDR、重链和轻链的核酸SEQ ID

抗体	CDR	重链可变区	轻链可变区
HMB-DV-1	7-12	15	16
HMB-DV-2	23-28	31	32
HMB-DV-3	39-44	47	48
HMB-DV-4	55-60	63, 66	64
HMB-DV-5	73-78	81	82
HMB-DV-6	89-94	97	98
HMB-DV-7	89-91, 101, 59, 102	97	104
HMB-DV-8	111-116	119	120
HMB-DV-9	126-128, 76, 129, 130	133	134
HMB-DV-10	140-143, 115, 144	147	148
HMB-DV-11	150, 141-143, 115, 144	152	148
HMB-DV-12	159-164	167	168
HMB-DV-13	175-180	183	184
HMB-DV-14	190-193, 43, 194	197	198

[0037] 在一个实施方式中, 本发明的抗体或抗原结合片段包含的一或多个重链或轻链CDR。在示例性实施方式中, 本发明的抗体或抗原结合片段中和登革热病毒感染, 并包含至少一个具有以下任一序列的CDR序列: SEQ ID NO: 1-6、17-22、33-38、49-54、67-72、83-88、99、100、105-110、121-123、124、125、135-139、149、153-158、169-174、185-188或189。

[0038] 在另一个实施方式中, 本发明的抗体、抗体变体或抗原结合片段包含重链, 所述重链包含以下一或多个氨基酸序列: SEQ ID NO: 1-3、17-19、33-35、49-51、67-69、83-85、105-107、121-123、135-137、149、153-155、169-171或185-187。在另一实施方式中, 本发明的抗体、抗体变体或抗原结合片段包含选自以下一组中的重链CDR1: SEQ ID NO: 1、17、33、49、67、83、105、121、135、149、153、169和185; 选自以下一组中的重链CDR2: SEQ ID NO: 2、18、34、50、68、84、106、122、136、154、170和186; 和选自以下一组中的重链CDR3: SEQ ID NO: 3、19、35、51、69、85、107、123、137、155、171和187。

[0039] 例如, 本发明的抗体包含重链, 所述重链具有序列为SEQ ID NO: 1的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 2的CDRH2、序列为SEQ ID NO: 3的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 17的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 18的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 19的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 33的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 34的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 35的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 49的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 50的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 51的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 67的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 68的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 69的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 83的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 84的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 85的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 105的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 106的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 107的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 121的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 122的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 123的CDRH3; 序列为SEQ ID NO: 135的CDRH1、序列为SEQ ID NO: 136的CDRH2和序列为SEQ ID NO: 137的

CDRH3;序列为SEQ ID NO:149的CDRH1、序列为SEQ ID NO:136的CDRH2和序列为SEQ ID NO:137的CDRH3;序列为SEQ ID NO:153的CDRH1、序列为SEQ ID NO:154的CDRH2和序列为SEQ ID NO:155的CDRH3;序列为SEQ ID NO:169的CDRH1、序列为SEQ ID NO:170的CDRH2和序列为SEQ ID NO:171的CDRH3;和序列为SEQ ID NO:185的CDRH1、序列为SEQ ID NO:186的CDRH2和序列为SEQ ID NO:187的CDRH3。

[0040] 在另一实施方式中,本发明的抗体、抗体变体或抗体片段包含轻链,所述轻链包含以下一或多个氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6、20-22、36-38、52-54、70-72、86-88、99、100、108-110、124、125、138、139、156-158、172-174、188或189。在另一实施方式中,本发明的抗体、抗体变体或抗体片段包含选自以下一组中的轻链CDR1:SEQ ID NO:4、20、36、52、70、86、99、108、138、156、172和188;选自以下一组中的轻链CDR2:SEQ ID NO:5、21、37、53、71、87、109、124、157和173;和选自以下一组中的轻链CDR3:SEQ ID NO:6、22、38、54、72、88、100、110、125、139、158、174和189。

[0041] 例如,本发明的抗体包含轻链,所述轻链具有序列为SEQ ID NO:4的CDRL1、序列为SEQ ID NO:5的CDRL2、序列为SEQ ID NO:6的CDRL3;序列为SEQ ID NO:20的CDRL1、序列为SEQ ID NO:21的CDRL2、序列为SEQ ID NO:22的CDRL3;序列为SEQ ID NO:36的CDRL1、序列为SEQ ID NO:37的CDRL2、序列为SEQ ID NO:38的CDRL3;序列为SEQ ID NO:52的CDRL1、序列为SEQ ID NO:53的CDRL2、序列为SEQ ID NO:54的CDRL3;序列为SEQ ID NO:70的CDRL1、序列为SEQ ID NO:71的CDRL2、序列为SEQ ID NO:72的CDRL3;序列为SEQ ID NO:86的CDRL1、序列为SEQ ID NO:87的CDRL2、序列为SEQ ID NO:88的CDRL3;序列为SEQ ID NO:99的CDRL1、序列为SEQ ID NO:53的CDRL2、序列为SEQ ID NO:100的CDRL3;序列为SEQ ID NO:108的CDRL1、序列为SEQ ID NO:109的CDRL2、序列为SEQ ID NO:110的CDRL3;序列为SEQ ID NO:70的CDRL1、序列为SEQ ID NO:124的CDRL2、序列为SEQ ID NO:125的CDRL3;序列为SEQ ID NO:138的CDRL1、序列为SEQ ID NO:109的CDRL2、序列为SEQ ID NO:139的CDRL3;序列为SEQ ID NO:156的CDRL1、序列为SEQ ID NO:157的CDRL2、序列为SEQ ID NO:158的CDRL3;序列为SEQ ID NO:172的CDRL1、序列为SEQ ID NO:173的CDRL2、序列为SEQ ID NO:174的CDRL3;和序列为SEQ ID NO:188的CDRL1、序列为SEQ ID NO:37的CDRL2、序列为SEQ ID NO:189的CDRL3。

[0042] 在一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-1的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-2的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-3的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-4的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-5的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-6的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-7的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。

[0043] 在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-

8的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-9的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-10的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-11的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-12的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-13的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表1所列的抗体HMB-DV-14的全部CDR,并中和人类宿主的登革热病毒感染。

[0044] 在另一实施方式中,本发明的抗体包含重链,其氨基酸序列与以下序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的相同性:SEQ ID NO:13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181或195。在另一实施方式中,本发明的抗体包含轻链,其氨基酸序列与以下序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的相同性:SEQ ID NO:14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182或196。

[0045] 在另一实施方式中,本发明的抗体、抗体变体或抗体片段包含重链可变区,其具有以下任一氨基酸序列:SEQ ID NO:13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181或195;并包含轻链可变区,其具有以下任一氨基酸序列:SEQ ID NO:14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182或196。

[0046] 在另一实施方式中,本发明的抗体、抗体变体或抗体片段中和登革热病毒感染,并包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:29的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:30的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:45的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:46的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:61的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:65的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:62的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:79的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:80的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:96的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:95的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:103的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:117的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:118的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:131的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:132的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:145的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:151的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:146的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:165的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:166的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:181的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:182的轻链可变区;或具有氨基酸序列SEQ ID NO:195的重链可变区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:196的轻链可变区。

[0047] 链置换和CDR移植的方法是本领域已知的。最初开发这些方法是为了对非人类抗

体(通常是小鼠抗体)进行人源化或用于选择与非人类抗体具有同等生物学活性的人抗体对等物。这些方法包括置换技术,其中仅保留非人类抗体的一个CDR,例如CDR3,而V区的其余部分,包括构架和其他两个CDR,例如CDR1和CDR2,则通过依次的步骤而被分别置换(例如,美国专利申请No.20030166871;Rader,et al.,Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-15,1998;Steinberg,et al.,J Biol Chem 275:36073-78,2000;Rader,et al.,J Biol Chem 275:13668-76,2000)。

[0048] 此外,专利申请No.W005/069,970描述了产生对靶抗原具有参比抗体的结合特异性的抗体的方法。这些方法包括将参比抗体的基本必需结合特异性从参比抗体转移至受者抗体。可以转移的区域的实例包括但不限于转移单个CDR节段,例如来自重链和/或轻链的CDR3节段,或D节段,或CDR3-FR4节段,或包含基本必需结合特异性决定簇的任何CDR3-FR4节段。采用这些方法产生的抗体保留参比抗体的结合特异性,且通常保留参比抗体的亲和力。

[0049] 本发明的抗体、抗体变体或抗体片段包括这样的抗体,所述抗体,除了其他部分以外,包含本发明的示例性抗体的一或多个CDR、重链或轻链,并保留它们的特异性和中和登革热病毒感染的能力。

[0050] 本发明的示例性抗体包括但不限于HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。

[0051] HMB-DV4变体的组成为:具有SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:65所示氨基酸序列的重链变体和具有SEQ ID NO:62所示氨基酸序列的轻链。编码所述重链变体的核酸序列见SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:66。编码所述轻链的核酸序列见SEQ ID NO:64。因此,包含HMB-DV4变体重链(SEQ ID NO:61、65)和轻链(SEQ ID NO:62)的抗体属于本发明的范围。

[0052] 在本文中,术语“HMB-DV4”用来指HMB-DV4的任何和/或全部变体,例如,那些具有相应于SEQ ID NO:61和65的重链和相应于SEQ ID NO:62的轻链的变体。

[0053] 在一个实施方式中,本发明的抗体混合物包含选自如下一组中的两种或更多种抗体:HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。在另一个实施方式中,本发明的混合物包含选自如下一组中的三种抗体:HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。在另一实施方式中,本发明的抗体混合物包含选自如下一组中的三种以上,例如,4、5、6、7或8种抗体:HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。在示例性实施方式中,本发明的混合物包含HMB-DV5、HMB-DV6和HMB-DV8。

[0054] 本发明还包括能够结合一表位的抗体或其片段,所述表位能够结合本发明的抗体。本发明还包含与本发明的抗体竞争的抗体或抗体片段。

[0055] 在另一方面,本发明还包括编码本发明的抗体的部分或全部轻链和重链和CDR的核酸序列。在一个实施方式中,本发明的核酸序列包括与编码本发明的抗体的重链或轻链的核酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同性的核酸序列。在另一个实施方式中,本发明的核酸序列具有编码本发明的抗

体的重链或轻链CDR的核酸的序列。例如,本发明的核酸序列包含与以下核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同性的序列:SEQ ID NO:7-12、23-28、39-44、55-60、73-78、89-94、101、102、111-116、126-128、129、130、140-144、150、159-164、175-180和190-194。

[0056] 鉴于遗传密码具有冗余性,这些序列存在编码同一氨基酸序列的变体。这些变体也属于本发明的范围。

[0057] 变体抗体也属于本发明的范围。因此,本申请中所述序列的变体也属于本发明的范围。此类变体包括在体内免疫应答过程中体细胞突变产生的天然变体或永生化B细胞克隆在培养时体外产生的天然变体。或者,也可由于如上所述的遗传密码子简并性产生变体或由于转录或翻译错误而产生变体。也可引入变体来改变抗体效应物功能,例如引入Fc区以降低抗体与Fc受体的结合。

[0058] 也可使用本领域已知的方法获得具有改进的亲合力和/或效力的更多抗体序列的变体,这些变体属于本发明的范围。例如,可采用氨基酸取代来获得具有进一步改进的亲合力的抗体。或者,可采用核苷酸密码子优化来提高用于产生抗体的编码系统的翻译效率。此外,包含通过对本发明的任一核酸序列进行定向演化方法而使得抗体特异性或中和活性得以优化的序列的多核苷酸也属于本发明的范围。

[0059] 在一个实施方式中,变体抗体序列可与本申请中所述的序列具有70%或以上(即,75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更高)的氨基酸序列相同性。在一些实施方式中,通过与参比序列(即,本申请中所述的序列)的全长进行比较而计算这种序列相同性。在一些其他实施方式中,使用BLAST version 2.1.3来确定在此所述的百分比相同性,其中所使用的默认参数参考NCBI(the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62matrix;缺口开放罚分=11,缺口延伸罚分=1]。

[0060] 本发明还包括载体,例如表达载体,其包含本发明的核酸序列。被此类载体转化的细胞也属于本发明的范围。此类细胞的实例包括但不限于真核细胞,例如酵母、动物细胞或植物细胞。在一个实施方式中,细胞是哺乳动物细胞,例如人、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤的细胞。

[0061] 本发明还涉及单克隆抗体,其结合能够结合本发明的抗体的表位。在一个实施方式中,本发明包括单克隆抗体,其结合表位,所述表位能够结合选自如下一组中的单克隆抗体:HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。

[0062] 单克隆抗体和重组抗体对于鉴定和纯化其所针对的各种多肽或其他抗原是特别有用的。本发明的抗体的进一步用途在于它们可用作免疫测定、放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)中的试剂。在这些用途中,抗体可以标记上可分析检测的试剂,例如放射性同位素、荧光分子或酶。抗体也可用于对可以进行分子鉴定和表征(表位作图(epitope mapping))。

[0063] 本发明的抗体典型地是糖基化的。例如,附着于重链C_H2结构域的N-连接的聚糖看影响C1q和FcR结合,无糖基化的抗体(aglycosylated antibodies)对这些受体具有较低的亲和力。聚糖结构也可影响活性,例如,可以发现补体介导的细胞死亡依据聚糖的双触角链

(biantennary chain)末端的半乳糖的数量(0、1或2)而不同。在施用后,抗体的聚糖优选地不引起人免疫原性应答。

[0064] 本发明的抗体可偶联于用于输送至治疗部位的药物,或偶联于可检测标记物以便对包含感兴趣细胞(例如感染了登革热病毒的细胞)的部位进行成像。将抗体与药物或可检测标记物偶联的方法是本领域已知的,例如用于使用可检测标记物进行成像的方法。使用多种标记物,标记的抗体可用于多种测定法中。给抗体附着上可检测物质有助于检测本发明的抗体与感兴趣的表位(DENV表位)之间形成的抗体-抗原复合物。合适的检测手段包括使用一些标记物,例如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、发色团、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基复合物、自由基、粒子、染料等等。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括抗生蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、dichlorotriazinylamine fluorescein、丹酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例是鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母萤光素;合适的放射性物质的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。此类标记试剂可用于多种熟知的测定法,例如放射免疫测定法,酶免疫测定法例如ELISA,荧光免疫测定法等等。

[0065] 本发明的抗体可缀合于治疗部分例如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子或放射性同位素。放射性同位素的实例包括但不限于I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、Bi-213、Pd-109、Tc-99、In-111等等。此类抗体缀合物可用于改变特定的生物学应答;所述药物部分不应理解为限于经典的化学治疗剂。例如,所述药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括,例如毒素,例如相思豆毒蛋白、蓖麻蛋白A、假单胞菌外毒素、卡奇霉素、细菌毒素或白喉毒素。

[0066] 将此类治疗剂缀合于抗体的技术是已知的。见,例如,Arnon et al.(1985)“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,ed.Reisfeld et al.(Alan R.Liss, Inc.),pp.243-256;ed.Hellstrom et al.(1987)“Antibodies for Drug Delivery,”in Controlled Drug Delivery,ed.Robinson et al.(2d ed;Marcel Dekker,Inc.),pp.623-653;Thorpe(1985)“Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:A Review,”in Monoclonal Antibodies’84:Biological and Clinical Applications,ed.Pinchera et al.pp.475-506(Editrice Kurtis,Milano,Italy,1985);“Analysis, Results,and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy,ed.Baldwin et al.(Academic Press,New York,1985),pp.303-316;和Thorpe et al.(1982)Immunol.Rev.62:119-158。

[0067] 或者,抗体可缀合于第二抗体以形成参考文献4所述的杂抗体缀合物。此外,在标记物和本发明的抗体之间可以使用接头[5]。抗体或其抗原结合片段可直接标记放射性碘、铟、钇或本领域已知的其他放射性颗粒[6]。治疗可包括同时或先后施用缀合的抗体和非缀合的抗体的组合治疗[7,8]。

[0068] 本发明的抗体还可附着于固相支持物。

[0069] 此外,本发明的抗体或其功能性抗体片段可通过共价缀合于聚合物而修饰,以便

例如增加其循环半衰期。参考文献9-12给出了聚合物的实例和将它们连接于多肽的方法。在一些实施方式中,聚合物可选自聚氧乙烯多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG在室温可溶于水,其具有通式: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R可以是氢或保护基如烷基或链烯醇基团。在一个实施方式中,保护基可具有1到8个碳。在另一个实施方式中,保护基是甲基。符号n是正整数。在一个实施方式中,n是1到1,000。在另一个实施方式中,n是2到500。在一个实施方式中,PEG的平均分子量是1,000到40,000。在另一个实施方式中,PEG的平均分子量是2,000到20,000。在另一个实施方式中,PEG的平均分子量是3,000到12,000。在一个实施方式中,PEG具有至少一个羟基。在另一个实施方式中,PEG具有末端羟基。在另一个实施方式中,该末端羟基被活化与抑制剂的游离氨基发生反应。不过,应该理解,保护基的类型和数量可以改变,以便实现共价缀合的PEG/本发明的抗体。

[0070] 可通过在重链的CH2或CH3结构域的特定区域内引入随机氨基酸突变而修饰本发明的抗体,以使得其与FcRn的结合亲和力和/或其血清半衰期与非修饰的抗体相比发生改变。此类修饰的实例包括但不限于对选自重链恒定区氨基酸残基250、314和428中的至少一个氨基酸进行取代。

[0071] 水溶性聚氧乙烯多元醇也可用于本发明。它们包括聚氧乙烯山梨醇、聚氧乙烯葡萄糖、聚氧乙烯甘油(POG)等等。在一个实施方式中,使用POG。无意于收到任何理论的限制,由于聚氧乙烯甘油的甘油主链与例如动物和人中的甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯天然存在的主链相同,因此这种分支在体内可能不会被视作外来物。在一些实施方式中,POG具有与PEG相同的分子量范围。POG的结构见参考文献13,对POG/IL-2缀合物的讨论见参考文献9。

[0072] 可用于增加循环半衰期的另一药物输送系统是脂质体。制备脂质体输送系统的方法见参考文献14、15和16。其他药物输送系统是本领域已知的,可参见例如参考文献17和18。

[0073] 本发明的抗体可以是纯化的形式。典型地,含有所述抗体的组合物基本上不含其他多肽,例如组合物中由其他多肽组成的部分少于90%(重量)、通常少于60%、更通常少于50%。

[0074] 本发明的抗体在非人(或异种)宿主例如小鼠中可具有免疫原性。具体而言,抗体可具有独特位(idiotope),其在非人素质中具有免疫原性,而在人类宿主中不具有免疫原性。给人类应用的本发明的抗体包括不能容易地分离自例如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等等的宿主,且通常不能通过人源化或从异种小鼠而获得的那些抗体。

[0075] 本发明的抗体可以是任何同种型(例如,IgA、IgG、IgM即 α 、 γ 或 μ 重链),但通常是IgG。在IgG的同种型中,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。在一个实施方式中,看提示IgG1。本发明的抗体可具有 κ 或 λ 轻链。

[0076] 本发明还包括DENV中和性重组或工程化双特异性抗体分子或其抗原结合片段。此类抗体和片段可包括针对第一种登革热病毒血清型的一个表位的第一结合位点和针对同一或不同(例如第二、第三或第四)种登革热病毒血清型的第二表位的第二结合位点。可形成相应结合位点的可变结构域作为本发明的免疫球蛋白同种型或作为通过一或多个肽接头连接在一起的异二聚体Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、ScFv或双特异性抗体。

[0077] 抗体的产生

[0078] 可通过任何本领域已知的方法制备本发明的单克隆抗体。使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的通用方法是已知的[19,20]。优选地,使用替代性的EBV永生化方法,见参考文献21。

[0079] 使用参考文献21的方法,可在存在多克隆B细胞活化剂的情况下以转化EBV产生本发明的抗体的B细胞。以EBV转化是标准技术,可容易地纳入多克隆B细胞活化剂。

[0080] 可在转化步骤过程中任选地加入其他细胞生长和分化刺激物以便进一步提高效率。这些刺激物可以是细胞因子例如IL-2和IL-15。在一个方面,在永生化步骤中加入IL-2以进一步提高永生化的效率,但这不是必需的。

[0081] 可使用本领域已知的方法培养以这些方法产生的永生化B细胞并从中分离抗体。

[0082] 还可使用英国专利申请0819376.5中描述的方法通过在微孔培养板中培养单个浆细胞而制备本发明的抗体。此外,可使用已知的方法从单个浆细胞培养物中提取RNA并进行单细胞PCR。可通过RT-PCR扩增抗体的VH和VL区,测序并克隆进表达载体,然后将后者转染至HEK293T或其他宿主细胞中。可采用本领域已知的任何方法将核酸克隆入表达载体、转染宿主细胞并分离产生的抗体。

[0083] 如果需要,可使用过滤、离心和各种色谱法例如HPLC或亲和层析进一步纯化单克隆抗体。单克隆抗体纯化技术,包括产生药物级抗体的技术,是本领域已知的。

[0084] 可从单克隆抗体获得本发明的单克隆抗体的片段,所使用的方法包括酶消化,例如使用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶,和/或通过化学还原裂解二硫键。或者,可通过克隆并表达重链或轻链的部分序列而获得单克隆抗体的片段。抗体“片段”可包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明也包括衍生自本发明的单克隆抗体的重链和轻链的单链Fv片段(scFv),例如,本发明包括具有来自本发明的抗体的CDR的scFv。还包括重链或轻链单体和二聚体以及单链抗体,例如单链Fv,其中重链和轻链可变结构域通过肽接头连接。

[0085] 可使用标准分子生物学技术制备编码本发明的抗体或抗体片段或变体的DNA序列。可通过寡核苷酸合成技术完全或部分合成所需的DNA序列。可适当使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0086] 可使用合适的宿主细胞/载体系统来表达编码本发明的抗体分子或其片段的DNA序列。可部分使用细菌例如大肠杆菌和其他微生物系统来表达抗体片段例如Fab和F(ab')₂片段,且特别是Fv片段和单链抗体片段,例如,单链Fv。可使用真核宿主细胞例如哺乳动物宿主细胞表达系统来产生较大的抗体分子,包括完整的抗体分子。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0087] 本发明还提供产生本发明的抗体的方法,包括在适合从编码本发明的抗体的DNA表达蛋白质的条件下培养含有本发明的载体的宿主细胞,并分离抗体分子。

[0088] 抗体分子可仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下,仅需要使用重链或轻链多肽的编码序列转染宿主细胞。为了产生同时包含重链和轻链的产物,可以两种载体转染细胞系,第一种载体编码轻链多肽,第二种载体编码重链多肽。或者,可使用单一载体,该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0089] 或者,可如下产生本发明的抗体:i)在细胞中表达本发明的核酸序列,和ii)分离表达的抗体产物。此外,该方法可包括iii)纯化所述抗体。

[0090] 筛选和分离B细胞

[0091] 可从转化的B细胞中筛选出产生具有所需抗原特异性的抗体的那些细胞,然后从这些阳性细胞产生单个B细胞克隆。

[0092] 可通过ELISA进行筛选步骤,其中可使用组织活细胞(包括感染的或转染的细胞)染色、中和测定或本领域已知的多种用于鉴定所需抗原特异性的其他方法之一。这种测定法的选择可基于简单的抗原识别或基于所需的其它功能,例如选择中和抗体而非仅仅是抗原结合抗体,选择可改变靶细胞特征的抗体,所述特征例如是它们的信号级联、它们的形状、它们的生长速度、它们影响其他细胞的能力、它们对其他细胞或其他试剂或其他条件改变的影响的应答、它们的分化状态等等。

[0093] 从阳性细胞混合物中分离各个克隆的克隆步骤可使用有限稀释、微操作、通过细胞分选或其他已知的技术进行单个细胞沉积而进行。

[0094] 可以多种形式使用本发明的永生化B细胞克隆,例如作为单克隆抗体的来源,作为编码感兴趣的单克隆抗体的核酸(DNA或mRNA)的来源,用于研究等等。

[0095] 本发明提供包含永生化记忆B细胞的组合物,其中所述细胞产生中和一或多种登革热病毒血清型的抗体,且其中所述抗体以每细胞每天 $\geq 5\text{pg}$ 的速度产生。本发明还提供包含永生化记忆B细胞的克隆的组合物,其中所述克隆产生中和一或多种登革热病毒血清型的单克隆抗体,且其中所述抗体以每细胞每天 $\geq 5\text{pg}$ 的速度产生。

[0096] 本发明的示例性永生化B细胞克隆包括但不限于HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。

[0097] 表位

[0098] 如上所述,本发明的抗体可用于对其结合的表位进行作图(map)。本发明的抗体所识别的表位可具有多种用途。纯化或合成形式的表位及其模拟位(mimotope)可用于引发免疫应答(即,作为疫苗或用于产生用于其他目的的抗体)或用于筛选患者血清中的与所述表位或其模拟位发生免疫反应的抗体。在一个实施方式中,这种表位或模拟位或包含这种表位或模拟位的抗原可用作疫苗用于引发免疫应答。本发明的抗体和抗原结合片段还可用于监测疫苗质量的方法中。具体而言,所述抗体可用于核实疫苗中的抗原含有具有正确构象的特异性表位。

[0099] 表位还可用于筛选与所述表位结合的配体。此类配体包括但不限于,抗体,包括那些来自骆驼、鲨鱼和其他物种的抗体,抗体片段,肽,噬菌体展示技术的产物,适体、adnectins、合成化合物或其他病毒或细胞蛋白质的片段,它们可阻断所述表位且因此可预防感染。此类配体属于本发明的范围。

[0100] 重组表达

[0101] 本发明的永生化记忆B细胞也可用作核酸的来源,用于克隆抗体基因,用于后续的重组表达。出于例如稳定性、可重复性、培养便捷性等等原因,与从B细胞或杂交瘤相比,从重组来源进行表达对于制药目的而言更加常见。

[0102] 因此,本发明提供制备重组细胞的方法,包括如下步骤:(i)从编码感兴趣抗体的B细胞克隆获得一或多种核酸(例如,重链和/或轻链基因);和(ii)将所述核酸插入表达宿主以便允许感兴趣的抗体在该宿主中表达。

[0103] 类似地,本发明提供制备重组细胞的方法,包括如下步骤:(i)测序来自B细胞克隆

的编码感兴趣抗体的核酸;和(ii)使用来自步骤(i)的序列信息制备核酸用于插入表达宿主以便允许感兴趣的抗体在该宿主中表达。可在步骤(i)和(ii)之间操作核酸(但不必需),以引入限制性位点、改变密码子使用、优化转录和/或翻译调控序列、和/或改变效应物功能。

[0104] 本发明还提供制备重组细胞的方法,包括如下步骤:以一或多种编码感兴趣的单克隆抗体的核酸转化宿主细胞,其中所述核酸是来自本发明的永生化B细胞克隆的核酸。因此,首先制备核酸和随后使用它来转化宿主细胞的步骤可在不同时间由不同地方(例如,在不同国家)的不同人来进行。

[0105] 本发明的这些重组细胞然后可用于表达和培养目的。它们特别适合于为大规模药物生产而进行的抗体表达。它们也可用作药物组合物的活性成分。任何合适的培养技术均可使用,包括但不限于静态培养、滚瓶培养、腹水液、空纤维型生物反应器装置、模块小型发酵器、搅动瓶、微载体培养、陶瓷芯灌注等等。

[0106] 从B细胞获得免疫球蛋白基因并测序的方法是本领域已知的(例如,参见参考文献22)。

[0107] 表达宿主优选地是真核细胞,包括酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(例如,CHO细胞、NS0细胞、人细胞如PER.C6[Cruce11;参考文献23]或HKB-11[Bayer;参考文献24&25]细胞、骨髓瘤细胞[26&27]等等),以及植物细胞。优选的表达宿主可糖基化本发明的抗体,特别是碳水化合物结构,它们本身对人不具有免疫原性。在一个实施方式中,表达宿主可生长于无血清培养基中。在另一个实施方式中,表达宿主可生长于无动物来源产物的培养物中。

[0108] 表达宿主可培养产生细胞系。

[0109] 本发明提供制备一或多种编码感兴趣的抗体的核酸分子(例如,重链和轻链基因)的方法,包括如下步骤:(i)制备本发明的永生化B细胞克隆;(ii)从所述B细胞克隆获得编码感兴趣的抗体的核酸。本发明还提供获得编码感兴趣的抗体的核酸序列的方法,包括如下步骤:(i)制备本发明的永生化B细胞克隆;(ii)测序来自所述B细胞克隆的编码感兴趣的抗体的核酸。

[0110] 本发明还提供制备一或多种编码感兴趣的抗体的核酸分子的方法,包括如下步骤:从B细胞克隆获得核酸,所述B细胞克隆从本发明的转化的B细胞获得。因此,首先获得所述B细胞克隆和随后从它制备核酸的步骤可在非常不同的时间由不同地方(例如,在不同国家)的不同人来进行。

[0111] 本发明提供制备抗体(例如,用于制药)的方法,包括如下步骤:(i)获得和/或测序一或多种核酸(例如,重链和轻链基因);(ii)使用来自步骤(i)的序列信息制备核酸用于插入表达宿主以便允许感兴趣的抗体在该宿主中表达;(iii)在所述感兴趣抗体表达的条件下培养或次代培养表达宿主;和任选存在的(iv)纯化感兴趣的抗体。可从表达感兴趣抗体的B细胞克隆获得所述核酸和/或测序所述核酸(但不必需)。在一个实施方式中,来自步骤(i)的还是可任选地被修饰以便在抗体的氨基酸序列中引入所需的取代。

[0112] 本发明还提供制备抗体的方法,包括如下步骤:在所述感兴趣抗体表达的条件下培养或次代培养表达宿主细胞群体和任选地纯化所述感兴趣的抗体,其中所述表达宿主细胞群体已经通过如下步骤制备:(i)提供编码感兴趣的抗体的核酸;(ii)将所述核酸插入能

够表达所述感兴趣抗体的表达宿主;和(iii)培养或次代培养包含所述插入的核酸的表达宿主以产生所述表达宿主细胞群体。

[0113] 药物组合物

[0114] 本发明提供一种药物组合物,其含有本发明的抗体和/或抗体片段和/或编码此类抗体的核酸和/或表达此类抗体的永生化B细胞和/或被本发明的抗体识别的表位。药物组合物可还含有药用可接受的载体以允许施用。载体自身不应诱导产生对接受所述组合物的个体有害的抗体,而且不应该有毒。合适的载体可以是大的、缓慢代谢的大分子,例如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物和失活的病毒颗粒。

[0115] 可使用药用可接受的盐,例如矿物酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0116] 治疗性组合物中的药用可接受的载体可额外地含有液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。此外,此类组合物中可存在辅助物质例如湿化剂或乳化剂、或pH缓冲物质。此类载体使得药物组合物能够被配制为供患者服用的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂和悬液。

[0117] 在本发明中,施用形式可包括那些适合肠外施用的形式,例如,通过注射或输注,例如通过弹丸注射或连续输注。如果产品用于注射或输注,其形式可以是悬液、溶液或置于油性或水性介质中的乳液,并可以含有配制剂,例如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体分子可以是干燥形式的,用于在使用前以合适的无菌液体重建。

[0118] 配制后,本发明的组合物可直接施用给对象。在一个实施方式中,组合物适合施用于人类对象。

[0119] 本发明的药物组合物可通过多种途径施用,包括但不限于,口服、静脉、肌肉、动脉内、髓鞘内、腹腔内、气管内、脑室内、透皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠内途径。无针注射器也可用于施用本发明的药物组合物。典型地,治疗组合物可制备为可注射形式,即液体溶液或悬浮液。也可制备为固体形式,用于在注射前在液体介质中配制成溶液或悬浮液。

[0120] 直接递送组合物通常通过注射、皮下、腹腔内、静脉内或肌肉内实现,或递送至组织间隙。剂量治疗可以是单剂方案或多剂方案。已知的基于抗体的药物提供了与施用频率有关的指导,例如药物是应该每日、每周还是每月施用等等。频率和剂量也可能取决于症状的严重程度。

[0121] 本发明的组合物可制备为多种形式。例如,组合物可制备为可注射形式,即液体溶液或悬浮液。也可制备为固体形式,用于在注射前在液体介质中配制成溶液或悬浮液(例如,冻干组合物如SynagisTM和HerceptinTM,用于以汉语防腐剂的无菌水重建)。组合物可以制备为用于局部施用,例如药膏、乳剂或粉剂。组合物可以制备为用于口服施用,例如片剂或胶囊,喷剂或糖浆(任选地加入调味剂)。组合物可以制备为用于肺部施用,例如吸入,使用细粉或喷剂。组合物可以制备为栓剂或阴道栓剂。组合物可以制备为用于鼻部、耳部或眼部施用,例如滴剂。组合物可以是盒的形式,设计为在施用于患者之前配制为组合的组合物。例如,冻干的抗体可以含有无菌水或无菌缓冲液的盒的形式提供。

[0122] 应该理解,组合物中的活性成分是抗体分子、抗体片段或其变体和衍生物。因此,其在胃肠道中易于降解。因此,如果组合物要提供胃肠道途径施用,该组合物需要含有能够

保护抗体免于降解而又能在抗体从胃肠道吸收后将其释放的物质。

[0123] 对药用可接受的载体的详尽讨论可参见Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472。

[0124] 本发明的药物组合物的pH通常在5.5至8.5之间, 在一些实施方式中, 可以是在6至8之间, 在教育部的实施方式中是大约7。可以使用缓冲液保持pH。组合物可以是无菌的和/或无热源的。对人而言, 组合物可以是等张的。在一个实施方式中, 本发明的药物组合物以密封容器提供。

[0125] 药物组合物可包括治疗有效量的一或多种本发明的抗体和/或含有结合本发明的抗体的表位的多肽, 即该量足以治疗、改善或预防有关的疾病或情况, 或显示出可检测的治疗效果。治疗效果也包括减少身体症状。对任一具体对象的精确的有效量取决于其体重和健康情况、疾病的性质和程度以及所选择用于施用的治疗剂或治疗剂的组合。对特定情况的有效量可通过常规实验确定, 并需要临床医生的判断。就本发明而言, 有效剂量通常为给待施用的个体大约0.01mg/kg到大约50mg/kg或大约0.05mg/kg到大约10mg/kg的本发明的组合物。已知的基于抗体的药物给出了这方面的教导, 例如HerceptinTM静脉输注施用的是21mg/ml溶液, 初始负荷剂量为4mg/kg体重, 且每周的维持量为2mg/kg体重; RituxanTM以每周375mg/m²施用; 等等。

[0126] 在一个实施方式中, 药物组合物可包括一种以上(例如, 2、3、4、5、6、7、8种等等) 本发明的抗体。在另一实施方式中, 组合物包含两种或更多种(例如, 2、3、4、5种等等) 抗体, 其中第一抗体对第一DENV表位具有特异性, 而第二抗体对第二DENV表位具有特异性。在另一实施方式中, 所述药物组合物包含三种本发明的抗体。在另一个实施方式中, 组合物包含两种或更多种(例如, 2、3、4、5种等等) 抗体, 它们一起中和一种以上登革热病毒血清型。在另一实施方式中, 所述两种或更多种本发明的抗体一起中和全部四种登革热病毒血清型, 即DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。在另一个实施方式中, 两种或更多种本发明的抗体通过结合各登革热病毒血清型上的至少两种不同表位而中和全部四种登革热病毒血清型。

[0127] 用于药物组合物中的中和登革热病毒而不引起抗体依赖性登革热病毒感染增强作用的本发明的示例性抗体包括但不限于HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14。

[0128] 在一个实施方式中, 药物组合物包括两种本发明的示例性抗体, 例如, HMB-DV3和HMB-DV7; HMB-DV3和HMB-DV9; HMB-DV3和HMB-DV12; HMB-DV3和HMB-DV14; HMB-DV6和HMB-DV7; HMB-DV6和HMB-DV8。在另一个实施方式中, 药物组合物包括三种本发明的示例性抗体, 例如, HMB-DV2、HMB-DV3和HMB-DV6; HMB-DV2、HMB-DV6和HMB-DV8; HMB-DV2、HMB-DV8和HMB-DV9; HMB-DV2、HMB-DV8和HMB-DV12; HMB-DV2、HMB-DV8和HMB-DV14; HMB-DV5、HMB-DV6和HMB-DV8。基于本说明书的教导, 本领域人员能够确定用于药物组合物中的其他的抗体组合。

[0129] 在一个实施方式中, 本发明提供一种药物组合物, 其包含抗体HMB-DV1或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中, 本发明提供一种药物组合物, 其包含抗体HMB-DV2或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中, 本发明提供一种药物组合物, 其包含抗体HMB-DV3或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中, 本发明提供一种药物组合物, 其包含抗体HMB-DV4或其

抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV5或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV6或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV7或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。

[0130] 在另一实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV8或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV9或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV10或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV11或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV12或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV13或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。在另一实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含抗体HMB-DV14或其抗原结合片段和药用可接受的稀释剂或载体。

[0131] 本发明的抗体可与其他治疗剂一起施用(组合地或分开地),例如与化疗化合物一起,与放疗一起。优选的治疗化合物包括抗病毒化合物。相对于各个治疗剂单独施用而言,这种组合治疗提供相加的或协同的治疗效果的改善。术语“协同”用于描述两种或更多种活性药物的组合作用大于各个相应的活性药物的单独作用的总和。因此,如果两种或更多种药物的组合作用导致对活性或过程的“协同抑制”,那么它指的是对该活性或过程的抑制作用大于各个相应的活性药物的各自抑制作用的总和。术语“协同治疗作用”指的是以两种或更多种治疗的组合所观察到的治疗作用,其中该治疗作用(例如通过测量多种参数中的任一种)大于相应的各个治疗的单独治疗作用的总和。

[0132] 在包括本发明的抗体的本发明的组合物中,抗体占据组合物中的总蛋白的至少50%重量(例如,60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更高)。抗体因此是纯化的形式。

[0133] 本发明提供制备药物的方法,包括如下步骤:(i)制备本发明的抗体;和(ii)将纯化的抗体与一或多种药用可接受载体混合。

[0134] 本发明还提供制备药物的方法,包括如下步骤:将抗体与一或多种药用可接受载体混合,其中所述抗体是从本发明的转化的B细胞获得的单克隆抗体。因此,首先获得单克隆抗体的过程和然后制备药物的过程可在非常不同的时间由不同地方(例如,不同国家)的不同的人进行。

[0135] 作为递送用于治疗目的的抗体的替代方式,可以给对象递送编码感兴趣的单克隆抗体(或其活性片段)的核酸(典型地是DNA),以便核酸可以在对象内原位表达,以提供所需治疗作用。合适的基因治疗法和核酸递送载体是本领域已知的。

[0136] 本发明的组合物可以是免疫原性组合物,且在一些实施方式中,可以是包含含有DENV表位的抗原的疫苗组合物。本发明的疫苗可以是预防性的(即,预防感染)或治疗性的(即,治疗感染)。

[0137] 组合物可包括抗微生物剂,特别是当包装成多剂量形式时。组合物可包括去垢剂,

例如Tween (聚山梨醇酯), 例如Tween 80。去垢剂通常以低水平存在, 例如<0.01%。组合物可包括钠盐(例如, 氯化钠)以产生)渗透压。NaCl的典型浓度为 $10 \pm 2 \text{ mg/ml}$ 。

[0138] 组合物可包含糖醇(例如, 甘露醇)或二糖(例如, 蔗糖或海藻糖), 例如大约15-30mg/ml(例如, 25mg/ml), 在需要冻干时或如果包含已经从冻干材料重建的材料时, 尤其如此。在冻干之前, 用于冻干的组合物的pH可以调整至大约6.1。

[0139] 本发明的组合物还可包含一或多种免疫调节剂。在一个实施方式中, 所述一或多种免疫调节剂包括佐剂。

[0140] 医学治疗和用途

[0141] 本发明的抗体、抗原结合片段、其衍生物和变体, 或本发明的混合物和药物组合物可用于治疗DENV感染、预防DENV感染或诊断DENV感染。

[0142] 诊断方法包括将抗体或抗体片段与样品接触。此类样品可以是取自, 例如, 唾液腺、肺、肝脏、胰腺、肾脏、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑或皮肤的组织样品。诊断方法也可包括检测抗原/抗体复合物。

[0143] 本发明因此提供以下各项在治疗中的用途: (i) 本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物, (ii) 本发明的永生B细胞克隆, (iii) 能够结合本发明的抗体的表位, 或(iv) 配体, 优选地为抗体, 其能够结合结合本发明的抗体的表位。

[0144] 本发明还提供治疗对象的方法, 包括给该对象施用(i) 本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物或药物组合物, 或配体, 优选地为抗体, 其能够结合结合本发明的抗体的表位。

[0145] 本发明还提供以下各项在制备用于预防或治疗DENV感染的药物中的用途: (i) 本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物, (ii) 本发明的永生B细胞克隆, (iii) 能够结合本发明的抗体的表位, 或(iv) 配体, 优选地为抗体, 其能够结合结合本发明的抗体的表位。

[0146] 本发明提供一种药物组合物, 其作为药物用于预防或治疗DENV感染。本发明还提供本发明的抗体和/或包含结合本发明的抗体的表位的蛋白质在制备用于治疗患者和/或诊断患者的药物中的用途。本发明还提供治疗对象例如人类对象的方法。所述方法包括给对象施用治疗有效剂量的本发明的组合物的步骤。核实治疗效果的一种方法涉及在施用本发明的组合物之后监测疾病症状。治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

[0147] 在一个实施方式中, 给由此需要的对象施用本发明的抗体、抗体片段、抗体变体、表位或药物组合物。所述对象包括但不限于特别处于DENV感染风险或对DENV感染特别易感的对象。

[0148] 本发明的抗体可用于被动免疫。本发明的抗体及其片段或变体或编码本发明的抗体及抗体片段或变体的核酸还可用于诊断登革热病毒感染的试剂盒。

[0149] 能够结合本发明的抗体的表位, 例如能够结合单克隆抗体HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13和HMB-DV14的表位, 可用于试剂盒中, 用于通过检测是否存在保护性抗DENV抗体而监测免疫接种程序的效果。

[0150] 本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物可用于试剂盒中用于监测具有所需免疫原性的疫苗生产。

[0151] 本发明还提供制备药物组合物的方法, 包括以下步骤: 将单克隆抗体与一或多种

药用可接受载体混合,其中所述单克隆抗体是从本发明的表达宿主中获得的单克隆抗体。因此,首先获得所述单克隆抗体(例如,表达和/或纯化该抗体)与然后将其与药用载体混合的步骤可以在非常不同的时间由不同地方(例如,不同国家)的不同人来进行。

[0152] 从本发明的转化的B细胞开始,可进行培养、次代培养、克隆、亚克隆、测序、核酸制备等等多个步骤,并对各个步骤任选地优化,以便所述转化的B细胞不断表达所述抗体。在优选的实施方式中,上述方法还包括对编码抗体的核酸施加优化技术(例如,亲和成熟或优化)。本发明涵盖这些步骤中所使用 and 制备的所有细胞、核酸、载体、序列、抗体等等。

[0153] 在所有这些方法中,可对表达宿主中使用的核酸进行操作,以插入、缺失或修改特定的核酸序列。此类操作产生的改变包括但不限于引入限制性位点、修改密码子使用、添加或优化转录和/或翻译调控序列等改变。还可以改变核酸以改变所编码的氨基酸序列。例如,可以在抗体的氨基酸序列中引入一或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等等)氨基酸取代、缺失和/或插入。此类点突变可修饰效应物功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等等,可引入氨基酸用于附着共价基团(例如,标记物)或可引入标签(例如,用于纯化目的)。可在特定位点引入突变或随机引入突变,随后进行筛选(例如,分子演化)。例如,可随机或定点诱变编码本发明的抗体的任何CDR区、重链可变区或轻链可变区的核酸,以便在所编码的氨基酸序列中引入不同的特性。此类改变可以是一个可叠加过程的结果,其中最初的改变被保留,同时又在其他位置引入新的改变。此外,独立步骤中实现的改变还可以组合。引入所编码的氨基酸序列中的不同特性包括但不限于亲和力增加。

[0154] 一般概念

[0155] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”,例如,“包含”X的组合物可仅由X组成,也可包括一些额外的,例如X+Y。

[0156] “基本上”一词并不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,“基本上”一词可以从本发明的定义中省略。

[0157] 术语“大约”在涉及数值x时是指,例如, $x \pm 10\%$ 。

[0158] 在此,术语“疾病”与术语“疾患”和“情况”(如医学情况)同义并可互换使用,它们均反映人或动物体或其一部分的异常情况,所述异常情况影响正常的功能性,疾病通常表现出不同的体征和症状,并引起人或动物的生命缩短或生活质量下降。

[0159] 在此,提到对患者的“治疗”指的是包括预防以及治疗。术语“患者”指所有的哺乳动物,包括人。通常,患者是人。

实施例

[0160] 以下实施例提供了本发明的示例性实施方式。以下实施例仅用于例证本发明和帮助本领域人员实施本发明的目的。这些实施例无意于以任何方式限制本发明的范围。

[0161] 实施例1:克隆B细胞并筛选以鉴定登革热病毒特异性抗体

[0162] 从DENV免疫供者的血液分离记忆B细胞并按照文献所述使用EBV和CpG进行永生化。简言之,使用CD22珠分离IgG⁺记忆B细胞,随后使用抗体和细胞分选去除IgM⁺、IgD⁺ IgA⁺ B细胞。使用EBV在存在CpG2006和照射的异基因单个核细胞的情况下对分选的细胞(IgG⁺)进行永生化。在若干96孔U形底培养板中设置一式两份的培养物,每份含有30-50个记忆B细胞。两周后收集培养物上清液,并通过免疫荧光分析测试其对感染了1、2、3或4种血清型

DENV的C6/36细胞的染色能力,和/或通过ELISA检测其结合重组DENV1-4E2蛋白的能力。测试了上清液中和VERO细胞或DC-SIGN-转染的Raji细胞的DENV感染的能力和增强K562细胞感染的能力。B细胞克隆分离自阳性多克隆培养物,如文献所述[28]。使用IgG-特异性ELISA测定选定克隆的上清液中的IgG浓度。

[0163] 实施例2:来自永生化B细胞的人mAb识别登革热病毒蛋白质并中和感染

[0164] 对于病毒中和和病毒增强分析,将滴定量的弱化1、2、3或4种血清型DENV与等体积的培养物上清液混合。使用的病毒和感染复数(MOI)为:rDEN1 Δ 30 (03JB186-1A+V2) MOI 0.04;rDEN2/4 Δ 30 (04JBV351-1A-V2) MOI 0.04;rDEN3/4 Δ 30 (DEN3#107C) MOI 0.02;rDEN4 Δ 30 (06JBV591-V3+1A1+v2) MOI 0.04。室温温育1小时后,将混合物添加至96孔平底培养板内的靶细胞(例如,VERO细胞、DC-SIGN-Raji细胞或K562细胞)中,37°C温育72-96小时。然后使用针对登革热病毒1-4E蛋白的小鼠单克隆抗体(克隆4G2)染色细胞,随后使用荧光素标记的山羊抗小鼠Ig染色,并通过FACS分析。将使得DENV感染减少50%的抗体浓度(μ g/ml)作为中和效价

[0165] 为了鉴定由单克隆抗体识别的靶抗原,使用单克隆抗体染色展示登革热病毒E蛋白结构域III或结构域I-II的酵母,随后使用Cy5-标记的山羊抗人IgG抗体,并通过FACS进行分析。使用DENV感染的细胞的裂解物进行蛋白质印迹实验。

[0166] 表3显示鉴定了三种不同类型的抗体。它们包括特异于E蛋白结构域III(DIII)的那些抗体,特异于E蛋白结构域I-II(DI-II)的那些抗体,和特异于prM的那些抗体。抗体对四种不同DENV血清型显示出不同程度的交叉反应性,并中和其所结合的那些血清型。

[0167] 表3:抗登革热病毒中和抗体的靶抗原特异性

[0168]

抗体	靶抗原	中和的登革热病毒血清型
HMB-DV-1	E,DIII	1,2,3
HMB-DV-2	E,DIII	1,3
HMB-DV-3	prM	1,2,3,4
HMB-DV-4	E,DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-5	E,DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-6	E,DIII	1,2,3
HMB-DV-7	E,DIII	1,2,3
HMB-DV-8	E	4
HMB-DV-9	E,DIII	2
HMB-DV-10	E,DIII	1,2,3,4
HMB-DV-11	E,DIII	1,2,3,4
HMB-DV-12	E,DI-DII	2
HMB-DV-13	E,DIII	1,2,3,4
HMB-DV-14	E,DIII	2

[0169] 表4显示了在VERO细胞和DC-SIGN-转染的Raji细胞上进行的病毒中和测定的结果

[0170] 表4:抗体对登革热病毒(血清型DENV1-DENV4)的中和

抗体	细胞类型	中和 EC ₅₀ 值 (μg/ml)			
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
[0171]	HMB-DV-1	VERO	0.013	0.577	0.014
		DC-SIGN-Raji	0.032	5.340	0.055
	HMB-DV-2	VERO	0.006	> 20	0.006
		DC-SIGN-Raji	0.014	> 20	0.013
	HMB-DV-3	VERO	0.912	1.615	0.120
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-4	VERO	0.591	0.251	0.809
		DC-SIGN-Raji	2.250	1.370	0.613
	HMB-DV-5	VERO	0.066	0.034	0.118
		DC-SIGN-Raji	2.390	0.504	0.348
	HMB-DV-6	VERO	0.008	0.002	0.011
		DC-SIGN-Raji	0.027	0.440	0.332
	HMB-DV-7	VERO	0.016	0.004	0.020
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
[0172]	HMB-DV-8	VERO	> 20	> 20	> 20
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-9	VERO	> 20	0.002	> 20
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-10	VERO	> 20	0.084	> 20
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-11	VERO	> 20	0.048	> 20
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-12	VERO	ND	0.003	ND
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-13	VERO	0.993	3.326	1.513
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND
	HMB-DV-14	VERO	> 20	0.002	> 20
		DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND

[0173] ND: 未确定

[0174] 实施例3:Fc区具有突变的重组抗登革热病毒中和抗体在K562细胞上不引起病毒感染增强作用

[0175] 文献中已经描述过抗体依赖性登革热病毒感染增强作用(ADE)。这一特性可能会限制抗登革热病毒抗体在临床上使用的治疗有效性。因此,从表达抗体HMB-DV-5、HMB-DV-6和HMB-DV-8的永生B细胞系中分离mRNA,使用oligo-dT特异性引物合成cDNA,使用特异性引物对重链和轻链可变区进行测序并克隆入表达载体。将载体转染进宿主细胞进行重组表达。除了重组产生野生型IgG1抗体以外,还通过定点诱变以丙氨酸取代每一重链CH2结构域的第4和5位氨基酸处的天然亮氨酸,由此产生每一可以LALA变体。从表达细胞系收集重组野生型抗体和突变抗体并纯化。野生型IgG1型抗登革热病毒抗体和LALA变体均以同等的方式结合靶蛋白(结果未显示)。

[0176] 如上所述在VERO细胞和K562细胞上测定病毒中和和增强作用。三种抗体的每一种都具有确定的分子靶以及血清靶(见表3)。图1显示,未修饰的重组抗体以剂量依赖性方式中和靶病毒对VERO细胞的感染(虚线)。在K562细胞(这是一种不被登革热病毒有效感染的

细胞系)上,未修饰抗体在通常高于中和作用所需浓度的浓度显示出病毒感染的增强作用(实线)。使用每种抗体的LALA变体重复该实验。图2显示出重组抗登革热病毒抗体的每一LALA变体也以剂量依赖性方式在VERO细胞上中和靶病毒(虚线)。但是,每一LALA抗体在K562细胞上没有显示出抗体依赖性感染增强作用的证据(实线)。要注意,对于K562细胞,在本实验中所使用的抗体浓度下剂量应答是平滑的,因此该线看起来与X-轴非常接近。

[0177] 本文所提及的所有专利和出版物均通过引用以其全部内容并入本申请。

[0178] 应该理解,本发明可以不同方式实施,并且在不脱离本发明的范围和实质的情况下,可做出多种变化。因此,这些实施方式是说明性的而非限制性的,且本发明不限于在此给出的具体说明,而是可以在所附权利要求书的范围和等同物内发生变化。

[0179] 参考文献

[0180] [1]Lefranc et al.(2003)Dev Comp Immunol.27(1):55-77.

[0181] [2]Lefranc et al.(1997)Immunology Today,18:509.

[0182] [3]Lefranc(1999)The Immunologist,7:132-136.

[0183] [4]US 4,676,980

[0184] [5]US 4,831,175

[0185] [6]US 5,595,721

[0186] [7]W000/52031

[0187] [8]W000/52473

[0188] [9]US 4,766,106

[0189] [10]US 4,179,337

[0190] [11]US 4,495,285

[0191] [12]US 4,609,546

[0192] [13]Knauf et al.(1988)J.Bio.Chem.263:15064-15070

[0193] [14]Gabizon et al.(1982)Cancer Research 42:4734

[0194] [15]Cafiso(1981)Biochem Biophys Acta 649:129

[0195] [16]Szoka(1980)Ann.Rev.Biophys.Eng.9:467

[0196] [17]Poznansky et al.(1980)Drug Delivery Systems(R.L.Juliano,ed., Oxford,N.Y.)pp.253-315

[0197] [18]Poznansky(1984)Pharm Revs 36:277

[0198] [19]Kohler,G.and Milstein,C,.1975,Nature 256:495-497.

[0199] [20]Kozbar et al.1983,Immunology Today 4:72.

[0200] [21]W02004/076677

[0201] [22]Chapter 4of Kuby Immunology(4th edition,2000;ASIN:0716733315)

[0202] [23]Jones et al.Biotechnol Prog 2003,19(1):163-8

[0203] [24]Cho et al.Cytotechnology 2001,37:23-30

[0204] [25]Cho et al.Biotechnol Prog 2003,19:229-32

[0205] [26]US 5,807,715

[0206] [27]US 6,300,104

[0207] [28]Traggiai et al.(2004)Nat Med 10(8):871-875

[0208] 序列表

SEQ ID	mAb	说明	序列
1	HMB-DV-1	CDRH1 aa	GFSFSSSS
2		CDRH2 aa	ISTSGNYI
3		CDRH3 aa	ARDPCSSTTCYFGYYAMDV
4		CDRL1 aa	NIGSKT
5		CDRL2 aa	RDT
6		CDRL3 aa	QVWDGTSVV
7		CDRH1 nuc	ggattcagctttagtagctctagc
8		CDRH2 nuc	atcagtactagtggttaattacac
9		CDRH3 nuc	gcgagagatccctgtagtagtaccacgtgctattttggtattacgctatggacgt
10		CDRL1 nuc	aatattggaagtaaaact
11		CDRL2 nuc	agggatacc
12		CDRL3 nuc	caggtgtgggacggcacttctgtggtg
13		重链 aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASGFSFSSSSMNWV RQAPGKGLQWVSYISTSGNYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSVYLQMSLRVEDTAVYYCARDPCSSTTCYFGY YAMDVWGQGTAVSS
14		轻链 aa	SYELTQPLSVSVALGQTARVTCGGNNIGSKTVHWYQ QRPGQAPVLVIYRDTNRPSGIPERFSGSKSGSAATLTIS RAQAGDEAEYYCQVWDGTSVVFGGGTKLTVL
15		重链 nuc	gaggtgcagctggtgcagctctggggaggcctggtcaagccgggggggtccctga gactctcctgtacagcctctgattcagctttagtagctctagcatgaactgggtccgc cagggtccagggaaggggctgcagtggtctcatatcagtagtagtgtaattac atctactacgcagactcagtggaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaag aactcagtgatctgcaaatgaacagcctgagagtcgaggacacggctgtgtattact gtgcgagagatccctgtagtagtaccacgtgctattttggtattacgctatggacgtct ggggccaagggaaccacggctgcccgtctcctcag
16		轻链 nuc	tcctatgagctgactcagccactctctgtgtcagtgccctgggacagacggccagg gttacctgtgggggaacaatattggaagtaaaactgtgactgtaccagcagagg ccaggccaggccctgtgtgtcatttataggataccaaccggccctctgggac cctgagcgattctctggtccaagtcggggagcgcggccaccctgaccatcagcag agcccaagccggggataggctgagtattactgccaggtgtgggacggcacttctgt gggttctggcggagggaaccaagctgaccgtcctag
17	HMB-DV-2	CDRH1 aa	GGSISSASY
18		CDRH2 aa	IYTSGST
19		CDRH3 aa	AREWAARGGIVDY
20		CDRL1 aa	QSISSY
21		CDRL2 aa	GAS
22		CDRL3 aa	QQSYDFPRT
23		CDRH1 nuc	ggtggctccatcagcagtgctagtactac
24		CDRH2 nuc	atctataccagcgggagcacc
25		CDRH3 nuc	gcgagagagtgggcagctcggggggcattgttgactac
26		CDRL1 nuc	cagagcattagttactat
27		CDRL2 nuc	ggtgcatcc
28		CDRL3 nuc	caacaaagttacgatttctcggacg

[0209]

[0210]

29		重链 aa	QVQLQESGPTLVKPSQTLSTCSVSGGSISSASYYSW IRQPAGKGLEWIGQIYTSGSTKYNPSLKSRLTSLMDTS KNQFTLKLSSVTAADTALYYCAREWAARGGIVDYW GQGLTVTVSS
30		轻链 aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISYYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSETDFTLTSS LQPEDFATYYCQQSYDFPRTFGQGTKVEIK
31		重链 nuc	cagggtgcagctgcaggagtcggggccaacactggtgaagccttcacagacctgtc cctcacctgcagtgctctgtggtgctccatcagcagtgctagtactactggagctgga tccggcagcccgcgggaaggactggagtgattgggcaaatctataccagcgg gagcaccaggtacaacccctccctcaagagtcgactcacctgtcaatggacacgtc caagaaccagttcacctgaagctgagctctgtgaccgccgcagatacggccttatat tattgcgcgagagagtgggcagctcgggggggcattgtgactactggggccaggg aaccttggtcacctgtctctcag
32		轻链 nuc	gacatccagatgacccagtcctccatccctgtctgcatctgtaggagacagagtca ccatcacttgccgagcaagtcagagcattagtactatttaattggtatcagcagaaa cccggaagcccctaaggctctgatctatggtgcatcagttgcaagcgggggtc ccatcaaggttcagtggtgagctgagacagattcactctcaccatcagcagctct gcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacaagttacgatttctcggacgttc ggccaagggaaccaaggtggaaatcaagc
33	HMB-DV-3	CDRH1 aa	GGSISSSGYS
34		CDRH2 aa	ISASGTT
35		CDRH3 aa	ARDTECSDTSCFPSIWFDT
36		CDRL1 aa	NIGTKG
37		CDRL2 aa	YDS
38		CDRL3 aa	QVWDNTDDSSDHPV
39		CDRH1 nuc	ggtggctccatcagcagtagtggttactcc
40		CDRH2 nuc	atttctgccagtgggaccacc
41		CDRH3 nuc	gcgagggatacggagtgtagtgatacaggttgccttccctccatctggttcgatacc
42		CDRL1 nuc	aacattggaactaaaggt
43		CDRL2 nuc	tatgatagc
44		CDRL3 nuc	cagggtgtgggataatactgatgacagtagtgatcacccgggtg
45		重链 aa	QVQLQESGPGLVKSSQTLSTCTVSGGSISSSGYSWN WIRQPAGKGLEWIGRISASGTTNYPNPSVKSRTVSVD TSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYCARDTECSDTSCFPSI WFDTWGQALVTVSS
46		轻链 aa	SYELTQPPSVSVAPGKTATITCGGNIGTKGVHWYQR KAGQAPVLVIYYDSVRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDNTDDSSDHPVFGGSGSKLTVL
47		重链 nuc	cagggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagagttcacagacctgtc cctcacctgcactgtctctggtggtccatcagcagtagtggttactcctggaactgga tccggcagcccgcgggaaggactggagtgattgggcgtatttctgccagtggg accaccaactacaacccctccgtcaagagtcgaggcactgtttcagtagacacgtcc aagaaccagttcctctgaggctgacctctgttaccgccgcggacacggccgttact attgtgcgagggatacggagtgtagtgatacaggttgccttccctccatctggttcgata cctggggccaggagccctgggtcacctgtctctcag
48		轻链 nuc	tcctatgtgctgactcagccacctcagtgctcagtggtggccaggaagacggccacc attacctgtgggggaacaacattggaactaaaggtgtcactggtaccagcgggaag gcaggccagggccctgtgttggtcatctattatgatagcgtccggccctcaggatcc ctgagcgttctctggtccaactctgggaacacggccacctgacctcagcaggg tcgaagccggggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggataatactgatgaca

[0211]

			gtagtgatcacccggtgttcggcgagggtccaagctgaccgtcctag
49	HMB-DV-4	CDRH1 aa	SGSISTSDYY
50		CDRH2 aa	VYYSEST
51		CDRH3 aa	ARQRGNWFDS
52		CDRL1 aa	QGISNY
53		CDRL2 aa	AAS
54		CDRL3 aa	QQLNNYEFT
55		CDRH1 nuc	agtggctccatcagcactagtgtactactac
56		CDRH2 nuc	gtctattatagtgtgagagcacc
57		CDRH3 nuc	gccagacaacgaggaaactggttcgactcc
58		CDRL1 nuc	cagggcattagcaattat
59		CDRL2 nuc	gctgcatcc
60		CDRL3 nuc	caacaacttaataattacgaattcact
61		重链 aa	QLQMHESGPGLVKPSETLSLTCIVSSGSISTSDYYWGW IRQPPGKGLEWIGSVYYSESTYYSPSLKSRITISVDTSR NQFSLNVSSVTAADTAIFYCARQRGNWFDSWGQGT LTVSS
62		轻链 aa	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQ KPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQLNNYEFTFGPGTKVDIK
63		重链 nuc	cagctgcagatgcacgagtcgggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacgtgcattgtctctagtggctccatcagcactagtgtactactggggctggat ccgccagccccaggaaggggctggagtggtggtggtgtctattatagtgtgaga gcacctactacagtcgctccctcaagagtcgaatcaccataccgtagacacgtccag gaaccagttctccctgaacgtgagttctgtgaccgccgagacacggctatatattct gtgccagacaacgaggaaactggttcgactcctggggccagggaacctggtcacc gtctcctcag
64		轻链 nuc	gccatccagttgaccagtcctccatcctcctatctgcatctgtaggagacagagtcac catcacttgccgggccagtcagggcattagcaattattagcctggtatcagcaaaaa ccagggaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccactttgcaagtggggtcc catcaaggttcagcggcagtcggtctgggacagattcactctcaccatcagcagcct gcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacaacttaataattacgaattcattcg gccctgggaccaaagtggatatcaaac
65		重链 var1 aa	QLQMHESGPGLVKPSETLSLTCIVSSGSISTSDYYWG WIRQPPGKGLEWIGSVYYSESTYYSPSLKSRITISVDTS RNQFSLNVSSVTAADTAIFYCARQRGNWFDSWGQGT LTVSS
66		重链 var1 nuc	cagctgcagatgcacgagtcgggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacgtgcactgtctctagtggctccatcagcactagtgtactactggggctgga tccgccagccccaggaaggggctggagtggtggtggtgtctattatagtgtgaga gcacctactacagtcgctccctcaagagtcgaatcaccataccgtagacacgtccag gaaccagttctccctgaacgtgagttctgtgaccgccgagacacggctatatattct gtgccagacaacgaggaaactggttcgactcctggggccagggaacctggtcacc gtctcctcag
67	HMB-DV-5	CDRH1 aa	AFNFSTNA
68		CDRH2 aa	ISYDGSHK
69		CDRH3 aa	ATVGVLTPVNAEYFHH

[0212]

70		CDRL1 aa	SSNIGAGYD
71		CDRL2 aa	GNN
72		CDRL3 aa	QSYDSSLTGTV
73		CDRH1 nuc	gcattcaacttcagtaccaatgcc
74		CDRH2 nuc	atatcatatgatggaagccataaa
75		CDRH3 nuc	gcgacagtgggagtccttacatggcccgtaacgctgagtactttcaccac
76		CDRL1 nuc	agctccaacatcggggcaggttatgat
77		CDRL2 nuc	ggtaacaac
78		CDRL3 nuc	cagtcctatgacagcagcctgactggtgtgta
79		重链 aa	QAHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASAFNFSTNAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGS HKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAADTAVYYCATVGVLTWVPVN AEYFHHWGQGSLSVSS
80		轻链 aa	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVISCTGSSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLICGNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDSSLTGTVVFGGGTKLTVL
81		重链 nuc	caggcgccactggtggaatctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctga gactctcctgtgcagcctctgcattcaacttcagtaccaatgccatgcactgggtccgc caggctccaggcaagggtggaatgggtggcagtaatatcatatgatggaagcca taaatactacgcagactccgtgaagggtccgattcaccatctccagagacaattccaag aacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagcggcgacacggcgtgtctattac tgtgcgacagtgggagtccttacatggcccgtaacgctgagtactttcaccactggg gccagggtccctggtcagcgtctctcag
82		轻链 nuc	cagtcgtgctgacgcagcgcctcagtcgtctggggccccagggcagagggtcac catctcctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgacactggtac cagcagctctctggaacagccccaaactcctcatctgtgtaacaacaatcgccct caggagtcctgaccgattctctggtccaagtctggcacctcagcctccctggccat cactgggtccaggctgaggatgaggctgattatttgcagtcctatgacagcagc ctgactggtgtggtattcgccggaggggaccaagctgaccgtcctag
83	HMB-DV-6	CDRH1 aa	GFTFDDYA
84		CDRH2 aa	ISWNSATI
85		CDRH3 aa	AKGGPRGLQLLSSWVDY
86		CDRL1 aa	QDIRRY
87		CDRL2 aa	TTS
88		CDRL3 aa	QQSYSPPH
89		CDRH1 nuc	ggattcacgtttgatgattatgcc
90		CDRH2 nuc	attagtggaaatagtgccaccata
91		CDRH3 nuc	gcgaaagggggccctagggggctgcaactgctatcatcgtgggtcactac
92		CDRL1 nuc	caggacattcgaggtat
93		CDRL2 nuc	actacatcc
94		CDRL3 nuc	caacagagtacagtcctccctcacact
95		重链 aa	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMFW VRQAPGKGLEWISGISWNSATIGYADSVKGRFTISRDN AKKSLDLQMNSLRPDDTALYYCAKGGPRGLQLLSSW VDYWGQGTLLTVSS
96		轻链 aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIRRYLNWYQ QRPGRVPQLLIYTTSTLQSGVPSRFSGSGSVTDFTLTIS SLQPEDFGTYCQSYSPPHFTFGQGTKLEIK

[0213]

97		重链 nuc	gaagtcagctggaggagctctggggaggcctgtgtacagcctggcaggtccctgag actctcctgtgcagcctctggattcacgtttgatgattatgcatgttctgggtccggca agctccagggaaggccctggaatggatctcaggtattagttggaatagtgccacat aggctatgcggactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaaga agtccttggtatctgcagatgaatagctgtgagacatgatgacagggccttatattattgtg cgaaagggggccctagggggctgcaactgctatcatcgtgggtcgactactggggc cagggaaccttggtaccgtctcctcgg
98		轻链 nuc	gacatccagatgaccagtcctccgtccctcctgtctgctgtgtggggacagagtca ccatcacttgcgggcaagtcaggacattcgcaggtattgaattggtatcagcagag accaggggagagtcctcagctcctgatctatactacatccactctccaaagtggggtc ccatccaggttcagtggcagtgatctgtgacagatttactctcaccatcagcagctt gcaacctgaagattttggaacttactactgtcaacagagttacagtcacctcacttt tgccaggggaccaagctggagatcaagc
99	HMB-DV-7	CDRL1 aa var1	QGISNW
53		CDRL2 aa var1	AAS
100		CDRL3 aa var1	QQANSFPPT
101		CDRL1 nuc var1	cagggtattagcaactgg
59		CDRL2 nuc var1	gctgcatcc
102		CDRL3 nuc var1	cagcaggctaacagttccctccgacg
103		轻链 aa var1	DILMTQSPSFVSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQ QKPGKAPNLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYFCQQANSFPPTFGQGTKVESK
104		轻链 nuc var1	gacatcctcatgaccagtcctcatcttctgtgtctgcatctgtaggagacagagtcac catcacttgcgggagtcagggtattagcaactggttagcctggtatcagcagaaa ccagggaagccccctaacctcctgatctctgctgcatccagttgcaagtggggctcc catcaaggttcagcggcagtgatctgggacagatttactctcaccatcagcagcct gcagcctgaagattttgcaacttactttgtcagcaggctaacagtttccctccgacgtt cggccaagggaccaaggtggaaagcaaac
105	HMB-DV-8	CDRH1 aa	GFTFSRYD
106		CDRH2 aa	ITTAGDT
107		CDRH3 aa	ARGPPTDCSSGRCLGVGVGLDP
108		CDRL1 aa	KLGGKY
109		CDRL2 aa	QDT
110		CDRL3 aa	QAWDSTTHVI
111		CDRH1 nuc	ggattcaccttcagtaggtacgac
112		CDRH2 nuc	attactactgctggtgacaca
113		CDRH3 nuc	gcaagagggcccccagccgatttagtagtggtcgtcgttaggggtcggagtggg gcttgacccc
114		CDRL1 nuc	aaattggggaaaaaatat
115		CDRL2 nuc	caagatacc
116		CDRL3 nuc	caggcgtgggacagcaccactcatgtaata
117		重链 aa	EVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHW VRQVTGKGLEWVSAITTAGDTYYPDsvKGRFTISREN AKSSLYLQMNNLRAGDTALYYCARGPPTDCSSGRCL GVGVGLDPWGQGLTVTVSS

[0214]

118		轻链 aa	SYEVTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKKYTSWYQQ KPGQSPLLVIYQDTRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWDSTTHVIFGGGTKLTVL
119		重链 nuc	gaggtgcagctggtgagctctgggggaggtggtacagcctggggggctcctga gactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtaggtacgacatgcactgggtcgc caagtcacaggcaaaaggtctgagtggtctcagctattactactgctggtgacacat actatcctgactcctgaaggccgattcacctctccagagaaaatgccaagagct ccttgatctcaaatgaacaacctgagagccggggacacggctcttattactgtgca agagggcccccagccgattgtagtagtgctgctgcttaggggtcggagtggggctt gaccctggggccagggaacctgggtcaccgtctcctcag
120		轻链 nuc	tcctatgaagtactcagccaccctcagtgctccgtgtcccaggacagacagccagc atcacctgctctggagataaattggggaaaaataatacttctggtatcagcagaagc caggccagtcctcctctactggtcctctatcaagataccaagcggcctcagggatcc ctgagcgggtctctggtcctcaactctgggaacacagccactctgacctcagcggga cccaggtatggatgaggctgactattactgtcaggcgtgggacagcaccactatgt aatatcggcgaggaggaccaagctgacctcctcag
121	HMB-DV-9	CDRH1 aa	GYTFTNYY
122		CDRH2 aa	IDPTGGTT
123		CDRH3 aa	ARGGGYSRNWYSYQNYGLDV
70		CDRL1 aa	SSNIGAGYD
124		CDRL2 aa	GNS
125		CDRL3 aa	QSYDSSLSGFV
126		CDRH1 nuc	ggatacaccttcaccaactactat
127		CDRH2 nuc	atcgacctactggtgtaccacc
128		CDRH3 nuc	gcgagagggggaggatagtcgcaactggtacagctaccagaattacggtttgga cgtc
76		CDRL1 nuc	agctccaacatcggggcaggttatgat
129		CDRL2 nuc	ggtaatagc
130		CDRL3 nuc	cagtcctatgacagcagcctgagtggtttgtc
131		重链 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCKASGYTFTNYYLHW VRQAPGQGLEWMGIIDPTGGTTPYAQKFHGRFTMTS DTSTSTVFMELSSLRLDDTAVYYCARGGGYSRNWYS YQNYGLDVWGRGTTTVTVSS
132		轻链 aa	QAVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHW YQQFPGTAPKLLIYGNSDRPSGVPDRFSGSQSGTSASL AITEQLAADEADFYCQSYDSSLSGFVFGTGTKTVL
133		重链 nuc	caggtacagctggtacagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgag gcttctctgtaaggcatctggatacacttcaccaactactatctacactgggtgcgaca ggccctggacaagggttgagtggtgggaataatcgacctactggtggtaccac cccctacgcgcagaagtccatggcagattcaccatgaccagtacacgtccacgag cacagctctcatggagttgagcagcctgagattagatgatacggcgtatattactgtg cgagagggggaggatagtcgcaactggtacagctaccagaattacggtttggac gtctggggccgagggaaccacagtcaccgtctcctca
134		轻链 nuc	caggctgtgctgacgcagccgccctcagtgctggggccccaggacagagggtca ccatctcctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggta ccagcagttccaggaaacagccccaaactcctcatttatggaatagcagtcggccc tcaggggctccctgaccgattctctggctcccagctctggaacttcagcctcctggccat cactgagctccaggctgcggatgaggctgattttactgccagtcctatgacagcagc ctgagtggtttgtcttcggaactgggaccaaggtcaccgtccta
135	HMB-DV-10	CDRH1 aa	GFTFNRSW

[0215]

136		CDRH2 aa	IIPDGSEK
137		CDRH3 aa	ARVAEFDYVWGSFDF
138		CDRL1 aa	KLGYKY
109		CDRL2 aa	QDT
139		CDRL3 aa	QAWDSRTGV
140		CDRH1 nuc	ggtttcacctttaataggtcttgg
141		CDRH2 nuc	ataatccagatggaagtgagaaa
142		CDRH3 nuc	gcgagagtggcggagtgtgattacgtttgggggagtttgacttc
143		CDRL1 nuc	aaattgggatataaatat
115		CDRL2 nuc	caagatacc
144		CDRL3 nuc	caggcgtgggacagccgactggggtg
145		重链 aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRSWMNW VRQAPGKGLEWVANIIPDGSEKYYMDSVKGRFTVSR DNTKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAEFDYVWG SFDFWGQGLTVTVSS
146		轻链 aa	SYELTQTPSVSVSPGHAASITCSGDKLGYKYTSWYQQ KPGQSPVLVIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISA TQAMDEADYYCQAWDSRTGVVFGGGTKLTVL
147		重链 nuc	gaggtgcagttggtggagtcggggggaggcttggccagcctgggggtccctga gactctcctgtgcagcctctggttcacctttaataggtcttggatgaactgggtccgcc aggctccagggaaggggctggagtggtggccaatataatccagatggaagtga gaaatactatatggactctgtgaaggccgattcaccgtctccagagacaacaccaa gaactcagtgatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtctatta ctgtgcgagagtggcggagtgtgattacgtttgggggagtttgacttctggggccag ggaacctgtgacccgtctcctctg
148		轻链 nuc	tcctatgagttgactcagacaccctcagtgctcgtgtcccccaggacacgcagccagc atcacctgtcttgagataaattgggatataaatatacttctggtatcaacagaagcc aggccagtcctctgtgctggtcatctatcaagataccaagcggccctcagggtatccct gagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgacctcagcgcgacc caggctatggatgagcgtgactattactgtcaggcgtgggacagccgactgggggtg ttcggcggagggaacaaactgaccgtcctgg
149	HMB-DV-11	CDRH1 aa var1	GFTFSRSW
150		CDRH1 nuc var1	aaattgggatataaatat
151		重链 aa var1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRSWMNW VRQAPGKGLEWVANIIPDGSEKYYMDSVKGRFTVSR DNTKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAEFDYVWG SFDFWGQGLTVTVSS
152		重链 nuc var1	gaggtgcagttggtggagtcggggggaggcttggccagcctgggggtccctga gactctcctgtgcagcctctggttcacctttagtaggtcttggatgaactgggtccgcc aggctccagggaaggggctggagtggtggccaatataatccagatggaagtga gaaatactatatggactctgtgaaggccgattcaccgtctccagagacaacaccaa gaactcagtgatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtctatta ctgtgcgagagtggcggagtgtgattacgtttgggggagtttgacttctggggccag ggaacctgtgacccgtctcctctg
153	HMB-DV-12	CDRH1 aa	GFTFSYAW
154		CDRH2 aa	IKSKMNGETT
155		CDRH3 aa	ITDPGNAGSASYGMDV
156		CDRL1 aa	QSLHSDGKTY

[0216]

157		CDRL2 aa	EVS
158		CDRL3 aa	MQSVQSLG
159		CDRH1 nuc	ggattcactttcagttacgcctgg
160		CDRH2 nuc	attaaaagcaaaatgaatggcgagacaaca
161		CDRH3 nuc	atcacagaccctgggaacgctggttcggcgagttacggaatggacgtt
162		CDRL1 nuc	cagagcctcctgcatagtgatggaaagacctat
163		CDRL2 nuc	gaagtttcc
164		CDRL3 nuc	atgcaaaagtgtacagtcctcgtt
165		重链 aa	EEQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCGASGFTFSYAWMSW VRQAPGKGLEWVARIKSKMNGETTDYAAPVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMSSLKTEDTAVYYCITDPGNAGSAS YGMDEVWGQGTITVTVSS
166		轻链 aa	DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQSLLHSDGKTYL YWYLQKPGQAPQLLIFEVSTRFPGVPHRFSGSGSTDF TLKISRVEAEDVGVYYCMQSVQSLGFGGGTKVEIK
167		重链 nuc	gaggagcagctggtgagctctgggggaggcttgtaaacctggggggtcccttag actctcgtgtgagcctctggattcactttcagttacgcctggatgagttgggtccgcc aggctccaggcaagggtgagtggttggccgtattaaaagcaaaatgaatggc gagacaacagactacgtgcacccgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgat tcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgagtagcctgaaaccaggacacagccgtc tattattgtatcacagaccctgggaacgctggttcggcgagttacggaatggacgttg ggccaagggtaccacgggtcaccgtctcctcag
168		轻链 nuc	gatattgtgatgaccagactccactctctgtcgcgtcacccctggacagccggcctc catctcctgaagtctagtcagagcctcctgcatagtgatgaaagacatttattg gtatctgcagaagccaggccaggctccacaactcctgattttgaagttccaccgggt tccctggagtgccacataggtcagtggcagcgggtcaggacagatttcacactga aatcagccgggtggaggtgaggtggttgggttattactgcatgcaaagtgtaca gtccctcgttctggcgaggacgaagggtggagatcaaac
169	HMB-DV-13	CDRH1 aa	GFTFNFTD
170		CDRH2 aa	ISGSSSYI
171		CDRH3 aa	SRVLWDSSTGTGTFDS
172		CDRL1 aa	NIGSKS
173		CDRL2 aa	DDS
174		CDRL3 aa	QVWDSSTGPFVV
175		CDRH1 nuc	ggattcaccttcaatacctttgac
176		CDRH2 nuc	attagtggtagtagttacata
177		CDRH3 nuc	tcgagagtctgtgggacagcagctcgactggcaccttgactct
178		CDRL1 nuc	aacattggaagtaaaagt
179		CDRL2 nuc	gatgatagc
180		CDRL3 nuc	caggtgtgggtagtagtagtggtcctttgtggtt
181		重链 aa	EVQLVESGGGLVLRPGSLRLSCAASGFTFNFTDMNW VRQAPGRGLEWVSSISGSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRVLWDSSTGTGTFD SWGQGRVTVSS
182		轻链 aa	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVYYDDSDRPSGIPERLSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDSSTGPFVVFVGGGTKLTVL

[0217]

183		重链 nuc	gaggtgcagctggaggagctctggggaggcctggcaggcctggggggtccctga gactctcctgtgcagcctctggattcaccttcaatacctttgacatgaactgggtccgcc aggctccaggagggggctggagtggtctcatccattagtggttagtagttacat atactacgcagactcagtgaaggggccgattcaccatctccagagacaacgccaaga actcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtatttgt tcgagagtgtgtgggacagcagctcgaactggcaccttgactctgggggcaggga accgggtcacctgtctcctcag
184		轻链 nuc	tcctatgtgtgactcagccaccctcgggtgctagtgccccaggacagacggccag gattacctgtgggggaacaacattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaa gccaggccaggccccctgtgtgtgtctatgatagcagccggccctcagggat ccctgagcgactctgtgtccaactctgggaacacggccaccctgacctcagcag ggtcgaagccgggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtg tcctttgtgttttcggcgaggaggaccaagctgacctcctag
185	HMB-DV-14	CDRH1 aa	GGSVSSGSYY
186		CDRH2 aa	IYYSGPT
187		CDRH3 aa	ARAFKNWFDP
188		CDRL1 aa	NIGSRN
37		CDRL2 aa	YDS
189		CDRL3 aa	QVWDGSSDVAI
190		CDRH1 nuc	gggtggctccgtcagcagtggttagttactac
191		CDRH2 nuc	atctattacagtgggccacc
192		CDRH3 nuc	gcgagagcatttgcgaagaactggttcgacccc
193		CDRL1 nuc	aacattggaagtcgaaat
43		CDRL2 nuc	tatgatagc
194		CDRL3 nuc	caggtgtgggatggttagtagtgatgttgcaatt
195		重链 aa	QVQLQESGPGLLKASETSLTCTVSGGSVSSGSYYWT WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGPTNYPNPSLKSRTVMSVD TSKNQFSLKVRSVTAADTAVYYCARAFKNWFDPW GQGTSLTVSS
196		轻链 aa	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSRNVHWYQQ KPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDGSSDVAIFGGGTKLTVL
197		重链 nuc	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactgctgaaggcttcggagacctgtc tctacatgcactgtctctgtgtggtccgtcagcagtggttagttactactggacctggat ccggcagccccagggaagggactggagtggttggtatattactattacagtgggc ccaccaactacaatccctccctcaagagtcgagtcaccatgtcagtagacacgtccaa gaaccagttctccctgaagggtgaggtctgtgaccgctcggacacggccgtatattac tgtcgcgagagcatttgcgaagaactggttcgaccttggggccagggaacctgtgt caccgtctcctcag
198		轻链 nuc	tcctatgtgtgactcagccaccctcagtgctgggtggccccaggaaagacggccag gattacctgtgggggaacaacattggaagtcgaaatgtacactggtaccagcagaa gccaggccaggccccctgtgtgtgtcatctattatgatagcagccggccctcagggatc cctgagcgattctgtgtccaactctgggaacacggccaccctgacctcagcagg gtcgaagccgggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatggttagtagtgat gttgcaatttttggcgaggaggaccaagctgacctcctag

野生型mAb的中和作用和抗体依赖性增强作用

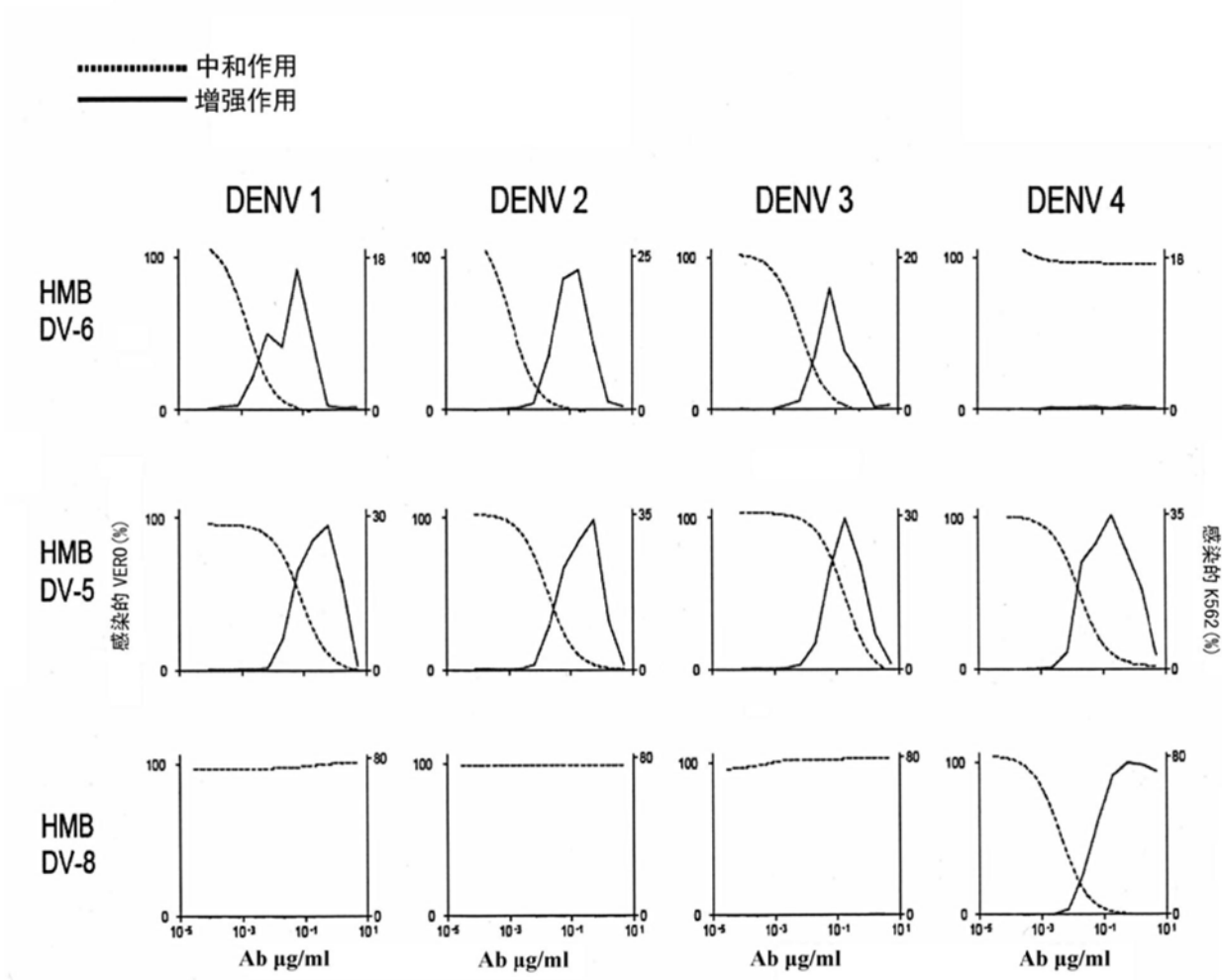


图1

LALA变体mAb的中和作用和抗体依赖性增强作用

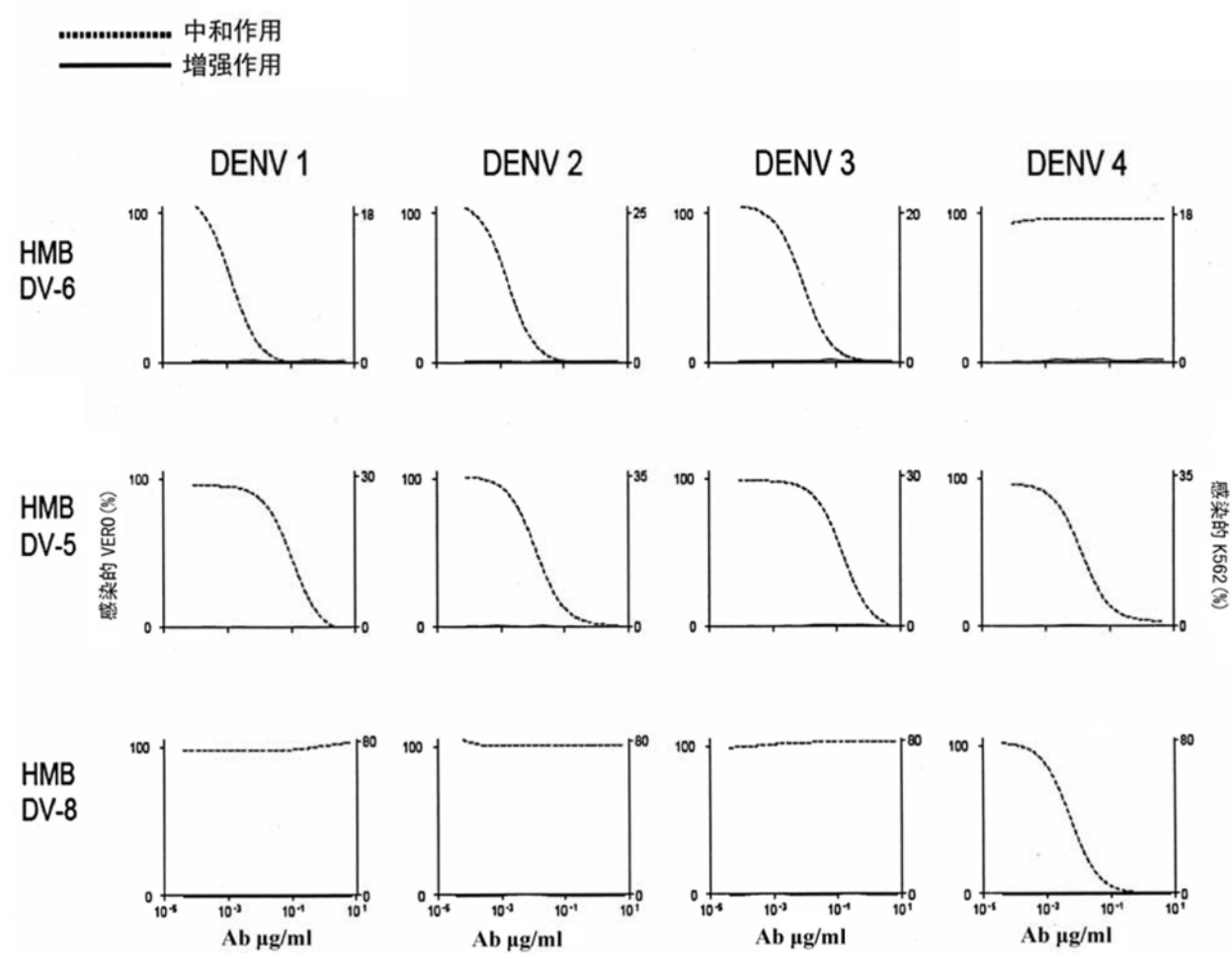


图2