



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119176871 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 24

(21) 申请号 202411220211.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2019.07.24

G07K 16/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/702,762 2018.07.24 US

(62) 分案原申请数据

201980058857.X 2019.07.24

(71) 申请人 免疫医疗有限责任公司

地址 美国马里兰州

申请人 胡默波斯生物医学公司

(72) 发明人 C·特卡奇克 B·塞尔曼

M·博罗奥克三世 D·科尔蒂

A·米诺拉

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

专利代理师 沈锦华

权利要求书1页 说明书32页 附图21页

(54) 发明名称

抗金黄色葡萄球菌凝集因子A (CLFA) 的抗体

(57) 摘要

本申请涉及抗金黄色葡萄球菌凝集因子A (CLFA) 的抗体。本发明涉及特异性结合到金黄色葡萄球菌凝集因子A蛋白 (C1fA) 的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及包含所述单克隆抗体的组合物。本发明还关于通过投与单独的抗C1fA单克隆抗体或与特异性结合到金黄色葡萄球菌 α 毒素 (AT) 蛋白的单克隆抗体的组合给个体来治疗金黄色葡萄球菌感染的方法。本发明还提供特异性结合到C1fA和AT两者的双特异性单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的方法。

1. 一种特异性结合到金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 凝集因子A (C1fA) 蛋白的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的可变重链 (VH) 互补决定区CDR 1、含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的VH CDR3、含有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的可变轻链 (VL) CDR 1、含有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的VL CDR3, 且其中所述抗体或抗原结合片段包含含有CSYHLC (SEQ ID NO: 21) 的氨基酸序列的重链恒定域。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的VH。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的VL。

4. 一种特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含 (1) VH、(2) VL和 (3) 含有CSYHLC (SEQ ID NO: 21) 的氨基酸序列的重链恒定域; 其中所述VH包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列。

5. 一种特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含 (1) VH、(2) VL和 (3) 含有CSYHLC (SEQ ID NO: 21) 的氨基酸序列的重链恒定域; 其中所述VL包含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列。

6. 一种特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含SAR114的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述CDR是卡巴特定义的CDR、乔蒂艾定义的CDR或AbM定义的CDR。

8. 根据权利要求6或7所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含含有CSYHLC (SEQ ID NO: 21) 的氨基酸序列的重链恒定域。

9. 根据权利要求1到8中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定域包含MHEACSYHLCQKSLSL (SEQ ID NO: 23) 的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1到9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定域包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列。

抗金黄色葡萄球菌凝集因子A (CLFA) 的抗体

[0001] 本申请是申请日为2019年7月24日、申请号为“201980058857.X”、名称为“抗金黄色葡萄球菌凝集因子A (CLFA) 的抗体”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请一般地涉及抗金黄色葡萄球菌凝集因子A (CLFA) 的抗体。

背景技术

[0003] 由抗微生物抗性 (AMR) 细菌病原体引起的感染对公众健康的威胁越来越大。正进行中的AMR流行疾病部分地是因为实证性广谱抗生素疗法所助长的。此导致探索病原体特定方法 (包括单克隆抗体 (mAb)) 以预防或治疗严重的细菌感染。目前正在开发许多单克隆抗体用于预防或治疗抗生素抗性细菌感染 (参见 (例如) 迪贾恩多梅尼戈 (DiGiandomenico, A.) 与塞尔曼 (B.R.Sellman), 微生物学的最新观点 (Curr.Opin.Microbiol.), 27:78-85 (2015))。此种被动免疫策略提供针对靶病原体的实时且有效的免疫球蛋白反应。理想地, 单克隆抗体或单克隆抗体混合物提供多种作用机制, 以中和关键的细菌毒力机制并增强宿主先天免疫反应, 从而为临床成功提供最大的机会。

[0004] 金黄色葡萄球菌是一种细菌病原体, 其可引起多种疾病, 包括皮肤和软组织感染、心内膜炎、骨髓炎、肺炎和菌血症 (洛伊 (Lowy, F.D.), 新英格兰医学期刊 (N.Engl.J.Med.), 339(8):520-32(1998))。临床前研究指示以单克隆抗体为主的方法有望预防及辅助治疗金黄色葡萄球菌感染 (参见, 例如, 哈真 (Hazenbos) 等人, 公共科学图书馆病原体 (PLoS Pathog.), 9(10):e1003653.doi:10.1371/journal.ppat.1003653(2013); 劳哈 (Rouha, H.), MAbs, 7(1):243-254(2015); 福莱蒂 (Foletti) 等人, 分子生物学期刊 (J.Mol.Biol.), 425(10):1641-1654(2013); 卡拉库姆 (Karauzum) 等人, 生物化学期刊 (J Biol Chem.), 287(30):25203-15(2012); 及华 (Hua) 等人, 抗微生物剂与化疗 (Antimicrob Agents Chemother.), 58(2):1108-17(2014))。针对金黄色葡萄球菌 α 毒素 (AT) 和凝集因子 A (ClfA) 的多机械单克隆抗体组合显示在金黄色葡萄球菌致死菌血症模型中相对于每个单独单克隆抗体增强保护并改善品系覆盖 (特卡奇克 (Tkaczyk) 等人, MBio., 7(3).pii:e00528-16(2016)); 然而, 相对于两个其它创始序列 (ClfA001和ClfA004), 所测试的ClfA单克隆抗体对ClfA创始序列ClfA002展现降低的结合亲和力及功能活性。

[0005] 因此, 仍需要用于治疗金黄色葡萄球菌感染 (特别是对目前可用的抗生素具有抗性的感染) 的组合物及方法。本发明提供此种组合物及方法。

发明内容

[0006] 本文提供结合到金黄色葡萄球菌凝集因子A (ClfA) 蛋白的抗体或抗原结合片段。在某些情况下, 特异性结合到金黄色葡萄球菌ClfA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含含有 SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变重链 (VH) 互补决定区 (CDR) 1、含有 SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2、含有 SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3、含有 SEQ ID NO:4的氨基酸序

列的可变轻链(VL)CDR 1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3,和所述抗体或抗原结合片段包含含有CSYHLC(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链恒定域。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VL。

[0007] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含VH、VL和包含CSYHLC(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链恒定域,其中所述VH包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0008] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含VH、VL和包含CSYHLC(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链恒定域,其中所述VL包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0009] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含SAR114的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在某些情况下,CDR是卡巴特(Kabat)定义的CDR,乔蒂艾(Chothia)定义的CDR或AbM定义的CDR。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含含有CSYHLC(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链恒定域。

[0010] 在某些情况下,所述重链恒定域包含MHEACSYHLCQKSLSL(S) (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列。在某些情况下,所述重链恒定域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的重链。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链。

[0011] 在某些情况下,在纤维蛋白原结合抑制分析中抗体或其抗原结合片段针对C1fA001、C1fA002和C1fA004的IC₅₀是彼此在2μg/ml之内。在某些情况下,在纤维蛋白原结合抑制分析中抗体或其抗原结合片段针对C1fA001、C1fA002和C1fA004的IC₅₀均在1μg/ml与5μg/ml之间。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段对于C1fA001、C1fA002和C1fA004的结合亲和力(K_d)均在200pM与350pM之间。

[0012] 在某些情况下,抗体或其抗原结合片段在使所述抗体或抗原结合片段于23°C下暴露于2kLux/hr的常规白光14天后具有降低不超过5%的单体纯度。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含一突变,所述突变相对于不含所述突变的相同抗体延长在人类FcRn小鼠中的半衰期。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含一突变,所述突变相对于不含所述突变的相同抗体延长半衰期,且其中所述突变相对于不含所述突变的相同抗体或抗原结合片段不抑制OPK活性。

[0013] 本文还提供特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白和金黄色葡萄球菌α毒素(AT)蛋白的双特异性抗体及其抗原结合片段。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白和金黄色葡萄球菌α毒素(AT)蛋白的双特异性抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3、含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VL。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段进一步包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:8的氨基

酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR3、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VL CDR3。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL。

[0014] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含SAR72、SAR80、SAR113、SAR132、SAR352、SAR372、SAR510、SAR547、SAS1、SAS19或SAS203的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在某些情况下,CDR是卡巴特定义的CDR,乔蒂艾定义的CDR或AbM定义的CDR。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段包含含有以如下所示的氨基酸序列的可变重链和可变轻链序列:(a)分别地,SEQ ID NO:17和18、(b)分别地,SEQ ID NO:30和31、(c)分别地,SEQ ID NO:32和33、(d)分别地,SEQ ID NO:34和35、(e)分别地,SEQ ID NO:36和37、(f)分别地,SEQ ID NO:38和39、(g)分别地,SEQ ID NO:40和41、(h)分别地,SEQ ID NO:42和43、(i)分别地,SEQ ID NO:44和45、(j)分别地,SEQ ID NO:46和47、或(k)分别地,SEQ ID NO:48和49。

[0015] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含VH和VL,其中所述VH包含SEQ ID NO:17、30、32、34、36、38、40、42、44、46或48中所示的氨基酸序列。

[0016] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段包含VH和VL,其中所述VL包含SEQ ID NO:18、31、33、35、37、39、41、43、45、47或49中所示的氨基酸序列。

[0017] 在某些情况下,抗体或其抗原结合片段进一步包含重链恒定区。在某些情况下,重链恒定区是选自由人类免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂重链恒定区组成的群组。在某些情况下,重链恒定区是人类IgG₁恒定区。在某些情况下,重链恒定区包含N3、N3E或N3F突变。在某些情况下,重链恒定区包含YTE突变。

[0018] 在某些情况下,抗体或其抗原结合片段进一步包含轻链恒定区。在某些情况下,轻链恒定区是选自由人类免疫球蛋白IgGκ和IgGλ轻链恒定区组成的群组。在某些情况下,轻链恒定区是人类IgGκ轻链恒定区。

[0019] 在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段。

[0020] 在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段是全长抗体。在某些情况下,所述抗体或抗原结合片段是抗原结合片段。在某些情况下,所述抗原结合片段包含Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、经二硫键连接的Fv、胞内抗体、IgG ΔCH2、微型抗体、F(ab')₃、四功能抗体、三功能抗体、双功能抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb²、(scFv)₂或scFv-Fc。

[0021] 在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体包含含有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的轻链。

[0022] 在某些情况下,抗体或其抗原结合片段进一步包含可检测的标签。

[0023] 本文还提供包含本文所提供的抗体的组合物。在某些情况下,组合物包含本文所提供的抗体和药学上可接受的载剂。

[0024] 在某些情况下,组合物包含本文所提供的抗体和特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段、和任选的药学上可接受的载剂。在某些情况下,特异性结合到

金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR3、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VL CDR3。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链。

[0025] 本文还提供使用本文所提供的抗体的方法。在某些情况下,治疗或预防个体的金黄色葡萄球菌感染的方法包括对个体给予本文所提供的抗体或抗原结合片段或本文所提供的组合物。

[0026] 在某些情况下,治疗或预防个体的金黄色葡萄球菌感染的方法包括对个体给予本文所提供的抗体或抗原结合片段和特异性结合到金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)蛋白的抗体或抗原结合片段。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR3、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VL CDR3。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链。在某些情况下,特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链。在某些情况下,本文所提供的抗金黄色葡萄球菌C1fA抗体或抗原结合片段和特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段是同时给予的。在某些情况下,本文所提供的抗金黄色葡萄球菌C1fA抗体或抗原结合片段和特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或抗原结合片段是依序给予的。

[0027] 在某些情况下,治疗或预防个体的金黄色葡萄球菌感染包括抑制金黄色葡萄球菌相关败血症,抑制金黄色葡萄球菌凝集,抑制血栓栓塞病变形形成、毒素中和、诱导调理吞噬作用,抑制金黄色葡萄球菌纤维蛋白原结合,或前述的任何组合。

[0028] 在某些情况下,个体患有糖尿病。在某些情况下,个体是人类。

[0029] 本文还提供多核苷酸。在某些情况下,分离的多核苷酸包含编码本文所提供的抗体或其抗原结合片段的VH或重链的核酸分子。在某些情况下,核酸分子编码SEQ ID NO:13的VH或SEQ ID NO:25、50或52的重链。

[0030] 在某些情况下,分离的多核苷酸包含编码本文所提供的抗体或其抗原结合片段的VL或轻链的核酸分子。在某些情况下,核酸分子编码SEQ ID NO:14的VL或SEQ ID NO:26的轻链。

[0031] 在某些情况下,分离的多核苷酸包含编码本文所提供的抗体或其抗原结合片段的VH或重链和抗体或其抗原结合片段的VH或轻链的核酸分子。

[0032] 本文还提供载体。在某些情况下,分离的载体包含本文所提供的多核苷酸。

[0033] 本文还提供宿主细胞。在某些情况下,宿主细胞包含本文所提供的多核苷酸、本文所提供的载体、或包含本文所提供的多核苷酸的第一载体和包含本文所提供的多核苷酸的第二载体。在某些情况下,宿主细胞是选自由CHO、NS0、PER-C6、HEK-293和HeLa细胞组成的群组。在某些情况下,分离宿主细胞。

[0034] 本文还提供产生抗体或抗原结合片段的方法。在某些情况下,产生抗体或其抗原结合片段的方法包括培养本文所提供的宿主细胞,从而产生抗体或其抗原结合片段。

[0035] 本文还提供用于检测金黄色葡萄球菌或金黄色葡萄球菌C1fA的方法。在某些情况下,用于检测样品中的金黄色葡萄球菌或金黄色葡萄球菌C1fA的方法包括使样品与本文所提供的抗体或其抗原结合片段接触。

附图说明

[0036] 图1是说明在连续稀释(从666 μ M到2.55 μ M)的抗C1fA mAb 11H10(图1A)或SAR114(图1B)存在下测定的纤维蛋白原与三种主要C1fA基因型的结合的抑制的一系列图。资料代表三个独立的实验。

[0037] 图2是说明在人类血浆和抗C1fA mAb存在下金黄色葡萄球菌临床分离株凝集的图。图2显示抑制细菌凝集所需的11H10和SAR114 mAb的最小浓度。资料代表两个独立的实验。c-IgG用作阴性对照并在200 μ g/ml时未显示任何抑制。

[0038] 图3是说明抗C1fA单克隆抗体SAR114对金黄色葡萄球菌临床分离株ARC635(ST5)(图3A)、SF8300(ST8)(图3B)、NRS383(ST346)(图3C)、NRS382(ST5)(图3D)、NRS384(ST8)(图3E)和ARC2081(ST30)(图3F)的调理吞噬杀死(OPK)活性的一系列图。将金黄色葡萄球菌品系与人类HL-60细胞、人类血清和SAR114(正方形)或c-IgG(圆圈)的连续稀释液一起培养。所述图表示三个独立的实验的平均值 \pm 标准偏差(SD)。

[0039] 图4是说明由SAR114单克隆抗体抑制多个金黄色葡萄球菌类型的凝集的图。如在实例1中所述测试代表40个不同序列类型(ST)和一些未发现的(NF)的112个金黄色葡萄球菌临床分离株。

[0040] 图5显示说明SAR114和11H10竞争结合到C1fA001基因型的图。图5A中的图显示如在实例1中所述的ELISA竞争结合分析的结果。数据表示平均值 \pm 标准偏差(SD)。图5B中的图显示描述于实例1中的OCTECT®结合分析的结果。

[0041] 图6提供显示抗细菌抗体中YTE和N3突变对调理吞噬杀死(OPK)的影响的图。Cam004(上图)是抗假单胞菌抗体,和2F4(下图)是抗金黄色葡萄球菌抗体。R347抗体用作阴性对照。(参见实例2。)

[0042] 图7提供显示N3突变不会降低SAR114抑制C1fA001、C1fA002或C1fA1004结合到纤维蛋白原的能力的图。(参见实例2。)

[0043] 图8提供报告凝集和纤维蛋白原效力分析中N3F和N3Y突变对SAR114的影响的表。(参见实例3。)

[0044] 图9提供显示SAR114的人类FcRn(上图)和OPK(下图)转基因小鼠中N3(N3W)、N3F和N3Y突变对药物动力学(PK)的影响的图。(参见实例3。)

[0045] 图10A-M是说明描述于实例4中的致死菌血症小鼠模型中SAR114和MEDI4893*单克

隆抗体的组合提供品系覆盖的一系列图。来自所测试的不同序列类型 (ST) 和 C1fA 基因型的不同金黄色葡萄球菌临床分离株包括: NRS123 (ST1, C1fA012)、NRS387 (ST5, C1fA002)、ARC635 (ST5, C1fA002)、3049043 (ST5, C1fA002)、3049057 (ST8, C1fA001)、SF8300 (ST8, C1fA001)、3049088 (ST30, C1fA004)、3049114 (ST30, C1fA004)、ARC2784 (ST188, C1fA019)、9043、9057、9157 和 2784。所示资料代表三个独立的实验。在末端带有圆圈的虚线表示经 IgG 对照抗体处理的小鼠。在末端带有正方形的线表示经 SAR114 (15mpk) 处理的小鼠。在末端带有向上三角形的线表示经 MEDI4893* (15mpk) 处理的小鼠。在末端带有向下三角形的线表示经 SAR114 和 MEDI4893* (各 7.5mpk) 处理的小鼠。(参见实例 4。)

[0046] 图 11 是说明 BKS.Cg-Dock7^m/+Lepr^{db}/J 型糖尿病小鼠 (db/db) 中 SAR114 和 MEDI4893* 单克隆抗体的组合防止 CA-MRSA SF8300 诱导的 IV 致命性菌血症的一系列图。底部两个图中的水平条代表几何平均 CFU。资料代表三个独立的实验。(参见实例 5。)

[0047] 图 12 提供通过大体病理学 (左) 或在切片的苏木精和伊红染色 (右) 之后证实暴露于 CA-MRSA SF8300 诱导的 IV 致命性菌血症的 db/db 小鼠中 SAR114 和 MEDI4893* 单克隆抗体的组合对肝损伤的影响的图像。(参见实例 7。)

[0048] 图 13 是说明致命性菌血症糖尿病 db/db 小鼠模型中 SAR114 和 MEDI4893* 单克隆抗体的组合提供品系覆盖保护的一系列图。(参见实例 8。)

[0049] 图 14 提供使用抗 C1fAmAb 作为支架 (图 14A) 或经由 10-氨基酸连接体 (GGGGx2) 连接到 C1fA 单克隆抗体重链 N 端 (图 14B) 或重链 C 端 (图 14C) 的抗 AT mAb MEDI4893* 的 scFv 的双特异性构筑体的概视图。(参见实例 9。)

[0050] 图 15 是说明抗 C1fA SAR114 或 11H10/MEDI4893*BiSAb 的体外表征的一系列图, 如实例 9 中所述。图 15A 和 15D 说明在 AT 介导的兔 RBC 溶血性分析中与 MEDI4893* 相比的 BiS₂ 和 BiS₃ 活性。将 BiSAb 和 MEDI4893* 的连续稀释液与单独的 AT (图 15A) 或 10M 过量的 C1fA001 (图 15D) 和 RBC 一起培养。溶血抑制百分比是计算如下: $100 * (100 - (OD_{AT+mAb}) / (OD_{单独AT}))$ 。资料代表三个独立的实验。图 15B 和 15C 说明描述于实例 9 中的固定化纤维蛋白原结合分析的结果。将 BiSAb、SAR114 或 11H10 的连续稀释液与单独的 C1fA (图 15B) 或与 10M 过量的 AT (图 15C) 一起培养。数据表示三个独立的实验的平均值标准偏差。结合抑制百分比计算为 $100 * (100 - (OD_{C1fA+mAb}) / (OD_{单独的C1fA}))$ 。

[0051] 图 16 是说明描述于实例 9 中的抑制纤维蛋白原结合到三个主要 C1fA 基因型的一系列图。在单克隆抗体 11H10 (图 16A)、SAR114 (图 16B) 或各自的双特异性抗体 (图 16C) 的连续稀释液存在下测定对纤维蛋白原结合的抑制。类似的分析是通过在 10M 过量的 AT (6.6mM) (图 16D-F) 存在下使 AT scFv 饱和来进行。

[0052] 图 17 是说明抗 C1fA/AT 双特异性抗体 (BiS) 的调理吞噬杀死 (OPK) 活性的一系列图。将金黄色葡萄球菌纽曼 (Newman) 分离株与人类 HL-60 细胞、人类血清和 11H10 亲本单克隆抗体或 11H10-BiS 分子 (图 17A) 的连续稀释液、或 SAR114 亲本单克隆抗体或 SAR114-BiS 分子 (图 17B) 的连续稀释液一起培养。所述图代表两个独立的实验的平均值 ± SD。(参见实例 9。)

[0053] 图 18 是说明菌血症小鼠模型中抗 C1fA mAb/MEDI4893* 双特异性抗体的效力的一系列图。用指定浓度的 SAR114/MEDI4893*BiS₂、BiS₃、或 SAR114+MEDI4893* 的组合对 Balb/c 小鼠 (n=10) 进行被动免疫 IP, 并在 24 小时后以金黄色葡萄球菌分离株 SF8300 (6e⁷ cfu)

(图18A)或3049057 (5×10^7 cfu) (图18B)的LD₅₀进行IV感染。针对SF8300 (图18C)或30419057 (图18D)攻击评估11H10/MEDI4893*BiS₂、BiS₃或11H10+MEDI4893*mAb的保护效力。监测存活2周。用对数秩(曼特尔考克斯(Mantel Cox))测试分析结果。若 $p < 0.05$,则认为相对于c-IgG的统计分析在统计学上不同,并用星号(*)表示。资料代表三个独立的实验。(参见实例10。)

[0054] 图19是说明致死性肺炎小鼠模型中C1fA使SAR114/MEDI4893*BiSAb隔离的一系列图。用指定浓度的BiS₂、BiS₃、MEDI4893*、或SAR114+MEDI4893*mAb组合对C57/B6小鼠($n = 10$)进行被动免疫IP,并在24小时后用 1.5×10^6 cfu金黄色葡萄球菌分离株SF8300 (图19A)或SF8300 Δ c1fA同基因突变体 (图19B)进行鼻内(IN)感染。监测存活6天。用对数秩(曼特尔考克斯)测试分析结果。若 $p < 0.05$,则认为相对于c-IgG的统计分析在统计学上不同。资料代表三个独立的实验。(参见实例11。)

[0055] 图20显示给予5mg/kg抗体后60天内SAR114、SAR114 N3F和SAR114 N3Y的浓度是食蟹猕猴。

[0056] 图21是使用离体PBMC刺激分析来说明野生型和N3Y Fc区的免疫原性的图。

具体实施方式

[0057] 本发明提供结合到金黄色葡萄球菌凝集因子A (C1fA) 蛋白(和任选地还结合到金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)蛋白)的抗体及其抗原结合片段(例如,单克隆抗体及其抗原结合片段)。本发明还提供包含这类抗体或其片段的组合物,以及使用这类抗体、其片段或组合物的方法。

[0058] 术语“抗体”表示通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合到靶标(如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”包括完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、嵌合抗体、人类化抗体、人类抗体、包含抗体的融合蛋白及任何其它经修饰免疫球蛋白分子,只要所述抗体展示所需的生物活性即可。抗体可是任何五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM、或其亚类(同型物)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),根据其重链恒定域的同一性,分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同且众所周知的亚单元结构及三维构型。抗体可裸露或与其它分子(如毒素、放射性同位素等)共轭。

[0059] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指由B细胞的单个纯系产生并结合到相同抗原决定基的抗体。相反,术语“多克隆抗体”是指由不同B细胞产生并结合到相同抗原的不同抗原决定基的抗体群。

[0060] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。“抗原结合片段”、“抗原结合域”或“抗原结合区”是指结合到抗原的完整抗体的一部分。抗原结合片段可包含完整抗体的抗原决定区(例如,互补决定区(CDR))。抗体的抗原结合片段的实例包括(但不限于)Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体和单链抗体。抗体的抗原结合片段可衍生自任何动物物种,如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠或仓鼠)及人类,或可人工产生。

[0061] 完整抗体通常由四个多肽组成:重(H)链多肽的两个相同复本和轻(L)链多肽的两个相同复本。各重链包含一个N端可变(VH)区和三个C端恒定(CH1、CH2和CH3)区,及各轻链包含一个N端可变(VL)区和一个C端恒定(CL)区。每对轻链和重链的可变区形成抗体的抗原结合位点。VH和VL区具有相同的一般结构,每个区包含四个框架区,其序列相对保守。如本

文所用,术语“框架区”是指可变区内相对保守的氨基酸序列,其位于超变区或互补决定区(CDR)之间。每个可变域中有四个框架区,所述框架区命名为FR1、FR2、FR3和FR4。框架区形成 β 片,其提供可变区的结构框架(参见,例如,珍妮薇(C.A. Janeway)等人(编),免疫生物学(Immunobiology),第5版,花环出版社(Garland Publishing),纽约(New York),NY(2001))。三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)形成抗体的“超变区”,其负责抗原结合。

[0062] 术语“卡巴特编号”及类似术语是所属领域中公认的并是指编号抗体或其抗原结合片段的重链和轻链可变区中氨基酸残基的系统。在某些方面中,CDR可根据卡巴特编号系统确定(参见,例如,卡巴特(Kabat EA)&吴(Wu TT)(1971)纽约科学院年鉴(Ann NY Acad Sci)190:382-391和卡巴特等人,(1991)免疫相关蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生与人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH公开案第91-3242号)。使用卡巴特编号系统,抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31到35(其可任选地包含一个或两个另外氨基酸,35(在卡巴特编号方案中称为35A和35B)(CDR1)后)、氨基酸位置50到65(CDR2)、及氨基酸位置95到102(CDR3)。使用卡巴特编号系统,抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24到34(CDR1)、氨基酸位置50到56(CDR2)及氨基酸位置89到97(CDR3)。在一个特定实施例中,本文所述抗体的CDR已根据卡巴特编号方案确定。

[0063] 相反,乔蒂艾是指结构环的位置(乔蒂艾与莱斯克(Lesk),分子生物学期刊196:901-917(1987))。根据环的长度,乔蒂艾CDR-H1环的末端在使用卡巴特编号规约编号时在H32与H34之间改变(此是因为卡巴特编号方案将插入放置在H35A和H35B;若35A和35B皆不存在,则环结束于32;若仅存在35A,则环结束于33;若35A和35B皆存在,则环结束于34)。AbM超变区代表在卡巴特CDR与乔蒂艾结构环之间的折衷,并是通过牛津分子(Oxford Molecular)的AbM抗体模型化软件使用。

回路	卡巴特	AbM	乔蒂艾
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
[0064]		(卡巴特编号)	
	H1	H31-H35	H26-H35
		(乔蒂艾编号)	
	H2	H50-H65	H50-H58
	H3	H95-H102	H52-H56
		H95-H102	H95-H102

[0065] 在一个实施例中,所述组合物包含特异性结合到金黄色葡萄球菌凝集因子A蛋白(C1fA)的第一抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)和结合到金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)蛋白的第二抗体或其抗原结合片段(例如单克隆抗体或片段)。在许多金黄色葡萄球菌表面黏附素中,凝集因子A(C1fA)已证实在重度血流感染中起着重要作用(福斯特(Foster)等人,自然评论微生物学(Nat.Rev.Microbiol.),12:49-62(2014);及墨菲

(Murphy) 等人, 人类疫苗 (Hum. Vaccin.), 7 (增刊): 51-59 (2011))。ClfA 结合纤维蛋白原并促进细菌黏附到纤维蛋白原及细菌凝集, 此两者均是金黄色葡萄球菌血流感染的发展的关键属性 (瓦道斯 (Vaudaux) 等人, 传染与免疫 (Infect. Immun.), 63: 585-590 (1995); 麦克德维特 (McDevitt) 等人, 分子微生物学 (Mol. Microbiol.), 11: 237-248 (1994); 及麦克德维特等人, 欧洲生物化学期刊 (Eur. J. Biochem.), 247: 416-424 (1997))。在损伤部位结合到纤维蛋白或纤维蛋白原结合或涂布于留置装置上的 ClfA 可促进细菌群居 (福斯特等人, 同前述) 及细菌凝集, 此被认为可增强细菌侵袭性 (麦克德维特等人, 欧洲生物化学期刊, 247: 416-424 (1997); 麦卡多 (McAdow) 等人, 公共科学图书馆病原体, 7: e1002307 (2011); 弗里克 (Flick) 等人, 血液 (Blood), 121: 1783-1794 (2013); 及罗福科 (Rothfork) 等人, 免疫学期刊 (J. Immunol.), 171: 5389-5395 (2003))。也已报导 ClfA 会损及调理吞噬细菌杀死 (OPK) 所需的补体沉积 (Hair 等人, 传染与免疫, 78: 1717-1727 (2010))。与此等观察结果一致, 在感染模型中同基因 Δ clfA 突变体展示降低的毒力 (麦卡多等人, 同前述; 约瑟夫松 (Josefsson) 等人, 科学公共图书馆综合 (PLoS One), 3: e2206 (2008); 及约瑟夫松等人, 传染病学期刊 (J Infect. Dis.), 184: 1572-1580 (2001))。此外, 用富含人类抗 ClfA 的静脉内 (i.v.) 免疫球蛋白 (Ig) (INH-A21 或法奈特 (Veronate)) 或单克隆抗体 (替非株单抗 (tefibazumab) 或 Aurexis) 被动免疫化改善患有金黄色葡萄球菌血流感染的患者的疾病结果 (法奈乔 (Vernachio) 等人, 抗微生物制剂和化学疗法 (Antimicrob. Agents Chemother.), 47: 3400-3406 (2003); 及法奈乔等人, 抗微生物制剂和化学疗法, 50: 511-518 (2006))。然而, 此等抗体制剂未能改善用万古霉素预防或治疗非常低出生体重婴儿的金黄色葡萄球菌菌血症的预防或辅助疗法的临床研究结果 (德容格 (DeJonge) 等人, 儿科期刊 (J. Pediatr.), 151: 260-265 (2007); 卡帕雷利 (Capparelli) 等人, 抗微生物制剂和化学疗法, 49: 4121-4127 (2005); 及布鲁姆 (Bloom) 等人, 儿科传染病 (Pediatr. Infect. Dis.), 24: 858-866 (2005))。ClfA 结构及功能详细描述于 (例如) 麦克德维特等人, 分子微生物学, 11: 237-248 (1994) 中。

[0066] α 毒素 (AT) 是几种金黄色葡萄球菌疾病 (包括肺炎、皮肤和软组织感染 (SSTI) 及菌血症) 的关键毒力因子 (布贝克瓦尔登堡 (Bubeck Wardenburg, J.) 与施尼温德 (O. Schneewind), 实验医学学报 (J. Exp. Med.), 205: 287-294 (2008); 依诺秀玛 (Inoshima) 等人, 皮肤病学研究期刊 (J. Invest. Dermatol.), 132: 1513-1516 (2012); 及福莱蒂等人, 同前述)。抗 AT 单克隆抗体的被动免疫化降低肺炎及皮肤坏死模型中的疾病严重度 (华等人, 抗微生物制剂和化学疗法, 58: 1108-1117 (2014); 特卡奇克等人, 临床与疫苗免疫学 (Clin. Vaccine Immunol.), 19: 377-385 (2012); 及拉格 (Ragle, B.E.) 与布贝克瓦尔登堡, 传染与免疫, 77: 2712-2718 (2009)), 及在小鼠致命性菌血症及肺炎模型中用含有 H35L 突变的 AT 类毒素 (ATH35L) 进行疫苗接种可防止死亡 (布贝克瓦尔登堡, 同前述, 福莱蒂等人, 同前述, 华等人, 同前述, 拉格, 同前述, 孟席斯 (Menzies, B.E.) 与克诺德尔 (D.S. Kernodle), 传染与免疫, 77: 2712-2718 (2009); 及阿迪卡里 (Adhikari) 等人, 科学公共图书馆综合, 7: e38567 (2012))。AT 有助于菌血症及败血症期间金黄色葡萄球菌病理的多个方面, 包括刺激败血症的过度发炎反应特性及活化内皮细胞紧密连接的 ADAM10 介导的切割, 导致血管完整性丧失 (鲍尔斯 (Powers) 等人, 传染病学期刊 (J. Infect. Dis.), 206: 352-356 (2012); 维尔克 (Wilke, G.A.) 与布贝克瓦尔登堡, 美国科学院论文集 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 107:

13473-13478(2010);及贝克尔(Becker)等人,天然免疫期刊(J Innate Immun.),6:619-631(2014))。AT也已证实靶向血小板,此可防止受损的内皮障壁的修复并通过血小板-嗜中性粒细胞聚集物形成促进器官功能障碍(鲍尔斯等人,细胞宿主与微生物(Cell Host Microbe),17:775-787(2015))。 α 毒素结构及功能详细描述于(例如)哈迪(Bhakdi,S.)与詹森(J.Tranum-Jensen),微生物分子生物学研究(Microbiol.Mol.Biol.Rev.),55(4):733-751(1991)中。

[0067] 结合C1fA的单克隆及多克隆抗体是所属领域中已知的(参见,例如,美国专利7,364,738;哈尔(Hall)等人,传染与免疫,71(12):6864-6870(2003);及法奈乔等人,抗微生物制剂和化学疗法,47(11):3400-3406(2003))并可从如(例如)源麦生物(Creative Biolabs)(雪莉(Shirley),NY)的来源购得。如上所述,虽然一些抗C1fA单克隆抗体(例如,描述于特卡奇克等人,MBio.,7(3).pii:e00528-16(2016)中的11H10单克隆抗体)在菌血症模型中显示对抗金黄色葡萄球菌感染的效力,但已发现这类抗体展示对C1fA的亲和力降低及对纤维蛋白原结合到由某些甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)品系表达的C1fA创始序列(C1fA002)的抑制受损。因此,本发明提供一种特异性结合到C1fA的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段),其对三个显著C1fA变体(包括C1fA002)的亲和力增加超过100倍,及有效地抑制112个不同临床分离株的细菌凝集。就此来说,在一个实施例中,本文所述的组合物的第一抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)特异性结合到C1fA并包含(i)含有SEQ ID NO:1的互补决定区1(CDR)氨基酸序列、SEQ ID NO:2的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列的重链多肽,和(ii)含有SEQ ID NO:4的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:6的CDR3氨基酸序列的轻链多肽,基本上由其组成,或由其组成。在另一个实施例中,第一抗体或抗原结合片段的重链多肽(例如,单克隆抗体或片段)包含SEQ ID NO:13的可变区氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,及第一抗体或抗原结合片段的轻链多肽包含SEQ ID NO:14的可变区氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。在某些情况下,抗体或抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)包含含有CSYHLC(SEQ ID NO:21)、MHEACSYHLCQKSLSL(SAQ ID NO:23)或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链恒定域。

[0068] 结合AT的单克隆及多克隆抗体在所属领域中也是已知的(参见,例如,华等人,抗微生物制剂和化学疗法,58(2):1108-1117(2014);及奥加涅相(Oganessian)等人,生物化学期刊(J.Biol.Chem.),289:29874-29880(2014))并可从如(例如)西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)(密苏里州圣路易斯市(St.Louis,MO))和AbCam(马萨诸塞州剑桥(Cambridge,MA))的来源购得。在一个实施例中,本文所述的组合物的第二抗体或抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)特异性结合到金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)蛋白并包含(i)含有SEQ ID NO:7的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的CDR3氨基酸序列的重链多肽和(ii)含有SEQ ID NO:10的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:11的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:12的CDR3氨基酸序列的轻链多肽,基本上由其组成,或由其组成。在另一个实施例中,第二抗体或抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)的重链多肽包含SEQ ID NO:15的可变区氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,和/或第二单克隆抗体的轻链多肽包含SEQ ID NO:16的可变区氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成。

[0069] 以下提供示例性抗C1fA和抗AT抗体的序列。在某些情况下,本文所述的抗体或其

抗原结合片段结合到C1fA和/或AT并包含以下两表中列出的抗体的6个CDR(也就是说,第一表中列出的抗体的3个VH CDR和第二表中列出的相同抗体的三个VL CDR)。抗AT抗体MEDI4893是先前描述于国际专利申请公布WO 2012/109285和WO 2014/074540中的“LC10”的半衰期延长(YTE)形式(所述两个公开案均以其全文引用的方式并入本文中)。MEDI4893*不含YTE突变。

[0070] VH CDR氨基酸序列

抗体	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
[0071] SAR114	NSYWS (SEQ ID NO:1)	YLYSSGRNTNYTPSLKS (SEQ ID NO:2)	THLGGFHYGGGFWF DP (SEQ ID NO: 3)
MEDI4893 和 MEDI4893*	SHDMH (SEQ ID NO:7)	GIGTAGDTYYPD SVKG (SEQ ID NO:8)	DRYSPTGHYYGMDV (SEQ ID NO:9)

[0072] VL CDR氨基酸序列

抗体	VL CDR1(SEQ ID NO:)	VL CDR2(SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
[0073] SAR114	RASQSITSYLN (SEQ ID NO:4)	ASSSLQS (SEQ ID NO: 5)	QESYSTPPT (SEQ ID NO: 6)
MEDI4893 和 MEDI4893*	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:10)	KASSLES (SEQ ID NO:11)	KQYADYWT (SEQ ID NO:12)

[0074] 在某些情况下,本文所述的抗体或其抗原结合片段结合到C1fA和/或AT并包含下表中列出的抗体的VH,例如,与VL组合。

[0075] 可变重链(VH)氨基酸序列

抗体	VH 氨基酸序列(SEQ ID NO)
[0076] SAR114	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIQNSYWSWIRQPPGKGLEWIG YLYSSGRNTNYTPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTH LGGFHYGGGFWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)
MEDI4893 和 MEDI4893*	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGKGLEW VSGIGTAGDTYYPD SVKGRFTISRRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYC ARDYSPTGHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 15)
SAR72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFSFRNALMSWVRQAPGKGLEW VGRSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYY CTTGPGGGPPGDYYYDGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)
SAR80	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMTWVRQAPGKGLEW VGRIRSKTAGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMTSLKIEDTALY YCMTDGLGLLNFGDSDPHHYWGQGTRVTVSS (SEQ ID NO: 30)
SAR113	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKAXGYXFTSYWIGWVRQVPGKGLEW MGIHYPGDS DTRHSPSFQGGVTVISVDKSISTAYLQWSSLKASDSAMYCYC

[0077]

	ARHQSGSHGFDAFEIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 32)
SAR132	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTNYWIAWVRQMPGKGLEW MGIIYSGDSDTRYSPSFLGQVSISVDKSFTTAYLQWRSLKASDTAMYCYC ARRPGGQKPYDYWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO:34)
SAR352	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNAWMSWVRQAPGKGLEW VGRIKSETAGGTTDYAAPVKGRFSISRDDSRNTLYLEMNSLKTEDTAVY YCTTDSYTPLEPCPNGVCYTYYYYGMDVWGQGTTVTVTVSS (SEQ ID NO:36)
SAR372	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFNRYSMNWVRQAPGKGLEWV SYISSSSSPIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAS RVTLGLEFDWVGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 38)
SAR510	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMCGVWIRQPPGKALEW LALIEWDDDDKYNTSLKTRLSISKDTSKNQVVLTMNMDPVDGTGYCYC ARHSSSSSRGFDYWVGQGTALTVTVSS (SEQ ID NO: 40)
SAR547	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIAWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDS TRYSPSFQGVVTSADKSTATAYLQWSSLNASDSAMYCYC ARQGGSHGYDAFHMWVGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:42)
SAS1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTYALNWVRQAPGKGLEWV AGINGTGYNTYYADSVRGRFTISRDNKNTVTLEMNSLRVEDTATYYC HKVPWWGQGTLSVTVSS (SEQ ID NO: 44)
SAS19	QVQLQESGPRLVKPSETLSLTCFVSGGSINNSYWTWIRQPPGQGLEWIGF VFSSGRTNYSPLKSRVTISVDTSKNLFSRLTSVTAADTAVYFCARQVH YDFWSGYSLTKTNWFDWPWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO:46)
SAS203	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVVS GGGSINNSYWTWIRQPPGQGLEWIG FVYSSGRTYYSPLKSRVTISVDTSKNFFSLRLNSVTAADTAVYFCARQV HYDLWSGYSLTKTNWFDWPWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO:48)

[0078] 在某些情况下,本文所述的抗体或其抗原结合片段结合到C1fA和/或AT并包含下表中列出的抗体的VL,例如,与VH(任选地,上表中列出的相同抗体的VH)组合。

[0079] 可变轻链(VL)氨基酸序列

[0080]

抗体	VL 氨基酸序列(SEQ ID NO)
SAR114	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA SSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQESYSTPPTFGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 14)
MEDI4893 和 MEDI4893*	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GPVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCKQYADYWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:16)
SAR72	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDAVPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYE DKKRPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSSEGVFGG GTKLTVL (SEQ ID NO: 18)
SAR80	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIHE DTKRPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYHCYSTDSGVSFVG GTKLTVL (SEQ ID NO:31)

[0081]

SAR113	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQGVLSRSNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYN NLRTFGQGTKVEIR (SEQ ID NO: 33)
SAR132	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQRISNWLAWYQKKPGKAPKLLIY KASTLESEVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDLLATYYCHQYISYYTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:35)
SAR352	QSVLTQPPSVSAAPGEKVTISCSGSSNIGANSVSWYQQFPGTAPKLLIY DNDKRPSGVPDRFSGSGSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWVGILSA GWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 37)
SAR372	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLKPEDFAVYYCQLRSNWAYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO: 39)
SAR510	SYGLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALAKQYVYWYQQKPGQAPVLVID KDRERPSGIPERFSGSSSGTTVLTISGVQAEDEADYYCQSADSSRTYVF GTGTKVTVL (SEQ ID NO:41)
SAR547	DVVM TQSPSLPVT LGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSP RRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGT HLTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)
SAS1	DIVLTQSPESLAVSLGERATISCKSSQSLFFKSNNKNYLAWYQQKPGQPP KVIIYWASTRESGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCHQYYST QYSFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:45)
SAS19	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCRTSQSISNFLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRVNGSTSGTEFTLTSSLQPEDFATYYCQSYSTPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:47)
SAS203	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCRTSQSISNFLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRVNGSTSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQSYSTPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:49)

[0082] 在某些情况下,本文所述的抗体或其抗原结合片段结合到C1fA和/或AT并包含下表中列出的抗体的重链,例如,与轻链组合。

[0083] 全长重链氨基酸序列

[0084]

抗体	全长重链氨基酸序列(SEQ ID NO)
SAR114	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIQNSYWSWIRQPPGKGLEWI GYLYSSGRTNYTPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RTHLGGFHYGGGFWD P W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)
SAR114 N3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIQNSYWSWIRQPPGKGLEWI GYLYSSGRTNYTPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA

[0085]

	RTHLGGFHYGGGFWFDWPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEACSWHLCQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:52)
SAR114 N3Y	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIQNSYWSWIRQPPGKGLEWI GYLYSSGRNTYTPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RTHLGGFHYGGGFWFDWPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEACSYHLCQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:50)
MEDI4893	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGKGLE WVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAV YYCARDRYSPTHGYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:27)
MEDI4893*	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGKGLE WVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAV YYCARDRYSPTHGYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:51)

[0086] 在某些情况下,本文所述的抗体或其抗原结合片段结合到C1fA和/或AT并包含下表所列出的抗体的轻链,例如,与重链(任选地,上表中列出的相同抗体的重链)组合。

[0087] 全长轻链氨基酸序列

[0088]

抗体	全长轻链氨基酸序列(SEQ ID NO)
SAR114	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITSYLNWYQQKPGKAPKLLI YASSSLQSGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQESYSTPPTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)
MEDI4893 和	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI

[0089]

MEDI4893*	YKASSLESQVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCKQYADYWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGE (SEQ ID NO:28)
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0090] 在某些方面中,抗体或其抗原结合片段的CDR可根据乔蒂艾编号方案确定,所述方

案是指免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,乔蒂艾(Chothia C)&莱斯克(Lesk AM), (1987),分子生物学期刊(J Mol Biol)196:901-917;拉齐尼(Al-Lazikani B)等人,(1997)分子生物学期刊273:927-948;乔蒂艾等人,(1992)分子生物学期刊227:799-817;索伦托(Tramontano A)等人,(1990)分子生物学期刊215(1):175-82;及美国专利第7,709,226号)。通常,当使用卡巴特编号规约时,乔蒂艾CDR-H1环存在于重链氨基酸26到32、33或34,乔蒂艾CDR-H2环存在于重链氨基酸52到56,和乔蒂艾CDR-H3环存在于重链氨基酸95到102,而乔蒂艾CDR-L1环存在于轻链氨基酸24到34,乔蒂艾CDR-L2环存在于轻链氨基酸50到56,和乔蒂艾CDR-L3环存在于轻链氨基酸89到97。根据环的长度,乔蒂艾CDR-H1环的末端在使用卡巴特编号规约编号时在H32与H34的间改变(这是因为卡巴特编号方案将插入放置在H35A和H35B;若35A和35B皆不存在,则环结束于32;若仅存在35A,则环结束于33;若35A和35B皆存在,则环结束于34)。

[0091] 在某些方面中,本文提供包含SAR114和/或MEDI4893*抗体的乔蒂艾VH和VL CDR的抗体及其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含一个或多个CDR,其中所述乔蒂艾和卡巴特CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本文提供包含卡巴特CDR和乔蒂艾CDR的组分的抗体及其抗原结合片段。

[0092] 在某些方面中,抗体或其抗原结合片段的CDR可根据IMGT编号系统来确定,如勒弗朗(LeFranc M-P), (1999)免疫学者(The Immunologist)7:132-136和勒弗朗等人,(1999)核酸研究(Nucleic Acids Res)27:209-212中所述。根据IMGT编号方案,VH-CDR1是在位置26到35,VH-CDR2是在位置51到57,VH-CDR3是在位置93到102,VL-CDR1是在位置27到32,VL-CDR2是在位置50到52,及VL-CDR3是在位置89到97。在一个特定实施例中,本文提供包含SAR114和/或MEDI4893*抗体的IMGT VH和VL CDR的抗体及其抗原结合片段,例如,如勒弗朗(1999)同前述及勒弗朗等人,(1999)同前述)中所述。

[0093] 在某些方面中,抗体或其抗原结合片段的CDR可根据麦克卡伦(MacCallum RM)等人,(1996)分子生物学期刊262:732-745来确定。还可参见,例如,马丁(Martin A.)“抗体可变域的蛋白质序列及结构分析(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains)”,抗体工程化(Antibody Engineering),康特曼(Kontermann)与度贝尔(Dübel)编,第31章,第422到439页,柏林施普林格(Springer-Verlag,Berlin) (2001)。在一个特定实施例中,本文提供抗体或其抗原结合片段,其包含SAR114和/或MEDI4893*抗体的VH和VL CDR,通过麦克卡伦等人的方法来确定。

[0094] 在某些方面中,抗体或其抗原结合片段的CDR可根据AbM编号方案来确定,其提及代表在卡巴特CDR与乔蒂艾结构环之间折衷的AbM超变区,并通过牛津分子(Oxford Molecular)的AbM抗体模型化软件(牛津分子集团有限公司(Oxford Molecular Group, Inc.))进行使用。在一个特定实施例中,本文提供抗体或抗原结合片段,其包含SAR114和/或MEDI4893*抗体的VH和VL CDR,如通过AbM编号方案来确定。

[0095] 在另一个实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)可包含任何适合的类别的恒定区(Fc)(IgG、IgA、IgD、IgM和IgE),其已经修饰以便改善效应功能(例如,调理吞噬细菌杀死(OPK))或存在于组合物中的第一和/或第二抗体或抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)的半衰期。例如,本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)可包含Fc,其包含一突变,所述突变相对于不含所述突变的相同

抗体延长半衰期,且其中所述突变相对于不含所述突变的相同抗体或抗原结合片段(突变)不抑制OPK活性。Fc区改造在所属领域中广泛用于延长治疗性抗体的半衰期并防止体内降解。在一些实施例中,可修饰IgG抗体或抗原结合片段的Fc区以便增加IgG分子对新生儿Fc受体(FcRn)的亲合力,其介导IgG分解代谢并保护IgG分子免于降解。本文所述的任何抗体或抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)的Fc区可包含(如通过增加IgG分子对FcRn的亲合力)改善或延长抗体半衰期或效应功能的一个或多个氨基酸取代或修饰。适合的Fc区氨基酸取代或修饰是所属领域中已知的并包括(例如)三重取代M252Y/S254T/T256E(称为“YTE”)(参见,例如,美国专利7,658,921;美国专利申请公布2014/0302058;及Yu等人,抗微生物制剂和化学疗法,61(1):e01020-16(2017))。在另一个实施例中,Fc区可衍生自高亲和力FcRn结合Fc变体N3E-YTE(参见,例如,博罗克(Borrok)等人,生物化学期刊,290(7):4282-4290(2015)),其包含C_H2及位置432和437的半胱氨酸残基的YTE突变。例如,N3E-YTE变体可缺少YTE突变(称为“N3E”),或可在Fc残基432(使用卡巴特编号)经(例如)序列CSWHLC(称为“N3”;SEQ ID NO:19)、CSFHLC(称为“N3F”;SEQ ID NO:20)或CSYHLC(称为“N3Y”;SEQ ID NO:21)取代。与YTE变体相比,N3、N3F和N3Y Fc变体特定地展示增强的药物动力学(PK)性质(例如,血清持久性)及效应功能(例如,调理吞噬细菌杀死(OPK))。

[0096] 以下提供示例性Fc变体的序列。

Fc 变体	序列(SEQ ID NO)
N3 (也称为 N3W)	CSWHLC (SEQ ID NO:19)
N3F	CSFHLC (SEQ ID NO:20)
N3Y	CSYHLC (SEQ ID NO:21)
从铰链开始的 N3 Fc	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEACSWHLCQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29)
从铰链开始的 N3Y Fc	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEACSYHLCQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:24)

[0098] 本发明提供结合到C1fA的抗体及其抗原结合片段(例如,包含CDR、VH和/或VL(重链和/或轻链)或上表中列出的Fc变体序列的抗体及抗原结合片段)并在纤维蛋白原结合抑制分析中其针对C1fA001、C1fA002和C1fA004的IC₅₀彼此在2μg/ml之内。例如,抗体或其抗原结合片段对C1fA001、C1fA002和C1fA004的IC₅₀均可在1μg/ml与5μg/ml之间。抗体或其抗原结合片段对C1fA001、C1fA002和C1fA004的结合亲和力(K_D)均可在200pM与350pM之间。

[0099] 本发明提供结合到C1fA的抗体及其抗原结合片段(例如,包含CDR、VH和/或VL(重链和/或轻链)或上表中列出的Fc变体序列的抗体及抗原结合片段)并于23℃下暴露于2kLux/hr的常规白光14天后的单体纯度降低不超过5%。

[0100] 本发明并不受限于包含C1fA结合抗体或抗原结合片段及以上所述的AT结合抗体或抗原结合片段的组合物。实际上,本发明还分开地提供抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段),其包含:(a)含有SEQ ID NO:1的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的CDR2氨

氨基酸序列和SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列的重链多肽,和(b)含有SEQ ID NO:4的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:6的CDR3氨基酸序列的轻链多肽。

[0101] 本发明还提供结合(例如,同时)C1fA和AT二者的双特异性抗体或抗原结合片段。术语“双特异性单克隆抗体”(也称为“双重特异性”单克隆抗体)是指单克隆抗体,其包含两个不同抗原识别域并因此可同时地结合两个不同抗原决定基。识别并结合到超过两个不同抗原决定基的单克隆抗体在所属领域中称为“多特异性单克隆抗体”。第一双特异性抗体是通过两种抗体分泌细胞的体细胞杂交产生的,但由于亲本重链和轻链的随机组装而产生的产量很低(米尔斯坦(Milstein,C.)与奎洛(A.C.Cuello),今日免疫学(Immunol.Today),5:299-304(1984))。单链可变片段(scFv)的发现及抗体改造的进展已产生用于开发双特异性抗体的新方法(奥克特(Orcutt)等人,蛋白质工程化设计与选择(Protein Eng.Des.Sel.),23:221-228(2010);及科洛马(Coloma,M.J.)与莫里森(S.L.Morrison),自然生物技术(Nat.Biotechnol.),15:159-163(1997))。根据IgG支架上的scFv编号及融合位置,现有至少50种不同双特异性抗体形式(康特曼(Kontermann,R.E.),MAbs,4:182-197(2012))。双特异性及多特异性抗体可以几种不同结构形式制得,包括(但不限于)串接式scFv、双功能抗体、串接式双功能抗体、双重可变域抗体、及使用基序(如CH1/Ck域或Dock和Lock基序)的异二聚化(参见,例如,查恩斯(Chames,P.)与贝蒂(D.Baty),当前药物发现与发展观点(Curr.Opin.Drug.Discov.Devel.),12:276-283(2009))。在一个实施例中,本发明提供抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段),其特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白和金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)蛋白(也就是说,双特异性抗体),其包含:(a)包含SEQ ID NO:1的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列的第一重链多肽,(b)含有SEQ ID NO:4的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:6的CDR3氨基酸序列的第一轻链多肽,(c)含有SEQ ID NO:7的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的CDR3氨基酸序列的第二重链多肽,和(d)含有SEQ ID NO:10的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:11的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:12的CDR3氨基酸序列的第二轻链多肽。在另一个实施例中,上述双特异性抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)的第一重链多肽及第一轻链多肽分别包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的可变区氨基酸序列,及上述双特异性抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)的第二重链多肽及第二轻链多肽分别包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的可变区氨基酸序列。与MEDI4893或MEDI4893*的AT中和活性相比,例如,由于SAR114强力结合到C1fA的结果,这类双特异性(任选地,单克隆)抗体(包含SAR114和MEDI4893或MEDI4893*序列的抗体)可具有降低的AT-中和活性。此点与结合到金黄色葡萄球菌C1fA和AT蛋白(例如,包含11H10和MEDI4893或MEDI4893*序列的抗体)的其它双特异性(任选地,单克隆)抗体相反,与MEDI4893或MEDI4893*的AT-中和活性相比,其具有不显著降低的AT-中和活性。用于产生双特异性或多特异性(任选地,单克隆)抗体的方法是所属领域中已知的并描述于(例如)霍利格(Holliger)等人,美国科学院论文集,90(14):6444-6448(1993);布曼(Brinkmann,U.)与康特曼,MAbs,9(2):182-212(2017);及西格尔(Segal,D.M.)与巴斯特(Bast,B.J.)2001.双特异性抗体的产生(Production of Bispecific Antibodies)。当前免疫学协议(Current Protocols in Immunology)。14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16)中。

[0102] 本文所述的抗体或抗原结合片段(例如单克隆抗体或片段)可是或可从人类抗体、

人类化抗体、非人类抗体或嵌合抗体获得。“嵌合”抗体是指包含人类及非人类区域的抗体或其片段。“人类化”抗体是包含人类抗体支架及从非人类抗体获得或衍生得的至少一个CDR的抗体。非人类抗体包括从任何非人类动物(如(例如)啮齿动物(例如,小鼠或大鼠))分离得的抗体。人类化抗体可包含从非人类抗体获得或衍生得的一个、两个或三个CDR。完全人类抗体不含从非人类动物获得或衍生得的任何氨基酸残基。应明了,完全人类及人类化抗体在人类中诱导免疫反应的风险低于小鼠或嵌合抗体(参见,例如,哈定(Harding)等人,mAbs,2(3):256-26(2010))。在一个实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段是完全人类抗体。

[0103] 人类抗体、非人类抗体、嵌合抗体或人类化抗体可通过任何方式获得,包括通过体外来源(例如,杂交瘤或重组产生抗体的细胞系)和体内来源(例如,啮齿动物、人类扁桃体)。用于产生抗体的方法是所属领域中已知的并描述于(例如)科勒(Köhler)与米尔斯坦(Milstein),欧洲免疫学期刊(Eur.J.Immunol.),5:511-519(1976);哈洛(Harlow)与莱恩(Lane)(编),抗体(Antibodies):实验室手册(A Laboratory Manual),冷泉港出版社(CSH Press)(1988);及珍妮薇(Janeway)等人(编),免疫生物学(Immunobiology),第5版,花环出版社,纽约,N.Y.(2001))中。在某些实施例中,人类抗体或嵌合抗体可使用转基因动物(例如小鼠)产生,其中一个或多个内源性免疫球蛋白基因是经一个或多个免疫球蛋白基因替代。其中内源性抗体基因是经人类抗体基因有效替代的转基因小鼠的实例包括(但不限于)梅达雷克斯(Medarex)HUMAB-MOUSETM、麒麟(Kirin)TC MOUSETM和麒麟协和工业(Kyowa Kirin)KM-MOUSETM(参见,例如,伦贝格(Lonberg),自然生物技术,23(9):1117-25(2005)、和伦贝格,实验药理学手册(Handb.Exp.Pharmacol.),181:69-97(2008))。人类化抗体可使用所属领域中已知的任何适合的方法来产生(参见,例如,安(An,Z.)(编),治疗性单克隆抗体:从长凳到诊所(Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic),约翰威立国际出版公司(John Wiley&Sons,Inc.),霍博肯(Hoboken),N.J.(2009)),包括(例如)将非人类CDR移植到人类抗体支架上(参见,例如,克什米尔(Kashmiri)等人,方法(Methods),36(1):25-34(2005);及侯(Hou)等人,生物化学期刊(J.Biochem.),144(1):115-120(2008))。在一个实施例中,人类化抗体可使用描述于(例如)美国专利申请公布2011/0287485A1中的方法来产生。

[0104] 本发明还提供一个或多个分离的核酸序列,其编码C1fA结合抗体、AT结合抗体、或结合如本文所述的C1fA和AT二者的抗体、或其抗原结合片段(视情况地,其中所述抗体或片段是单克隆的)。术语“核酸序列”意欲涵盖DNA或RNA的聚合物,也就是说,多核苷酸,其可是单股或双股的并可包含非天然或经改变的核苷酸。如本文所用术语“核酸”和“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA))的聚合形式。此等术语是指分子的一级结构,并因此包括双股及单股DNA、和双股及单股RNA。所述术语包括作为等效物的RNA或DNA的类似物,其由核苷酸类似物和经修饰的多核苷酸(如(但不限于)甲基化和/或封端的多核苷酸)制成。核酸通常通过磷酸键连接以形成核酸序列或多核苷酸,尽管许多其它连接是所属领域中已知的(例如,硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯及类似者)。

[0105] 本发明进一步提供一个或多个载体,其包含一个或多个核酸序列,所述核酸序列编码C1fA结合抗体、AT结合抗体、或结合如本文所述的C1fA和AT二者的抗体、或其抗原结合片段(视情况地,其中所述抗体或片段是单克隆的)。载体可是(例如)质体、离合染色小体

(episome)、黏接质体、病毒载体(例如,逆转录病毒或腺病毒)或噬菌体。适合的载体和载体制备方法是所属领域中众所周知的(参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆(Molecular Cloning),实验室手册,第3版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Press),冷泉港实验室,N.Y.(2001)、和奥苏伯尔(Ausubel)等人,分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology),约翰威立出版有限公司(Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons),纽约,N.Y.(1994))。

[0106] 除了编码C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或结合如本文所述的C1fA和AT二者的抗体或抗原结合片段(任选地,其中所述抗体或片段是单克隆的)的核酸序列外,所述载体理想地包含表达控制序列,如启动子、增强子、多腺苷酸化信号、转录终止子、内部核糖体进入位点(IRES)及类似者,其提供编码序列于宿主细胞中的表达。示例性表达控制序列是所属领域中已知的并描述于(例如)哥德尔(Goeddel),基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology),第185卷,美国学术出版社(Academic Press),加利福尼亚州圣地亚哥市圣迭戈(San Diego,Calif.)(1990)中。

[0107] 可将包含编码本文所述的抗体或抗原结合片段的氨基酸序列(例如,编码C1fA结合抗体的重链及/或轻链的氨基酸序列)(视情况地,单克隆抗体或片段)的核酸的载体引入到能够表达由其编码的多肽的宿主细胞(包括任何适合的原核或真核细胞)中。因此,本发明提供一种分离的细胞,其包含载体。可使用的宿主细胞包括彼等可容易且可靠地生长,具有相当快的生长速率,具有良好表征的表达系统,并可容易且有效地转形或转染的宿主细胞。适合的原核细胞的实例包括(但不限于)来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细胞(如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*))、埃希氏菌(*Escherichia*)属(如大肠杆菌(*E.coli*))、假单胞菌(*Pseudomonas*)、链霉菌(*Streptomyces*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和欧文氏菌(*Erwinia*)。特别有用的原核细胞包括各种大肠杆菌品系(例如,K12、HB101(ATCC No.33694)、DH5a、DH10、MC1061(ATCC No.53338)和CC102)。适合的真核细胞是所属领域中已知的并包括(例如)酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。在一个实施例中,载体是在哺乳动物细胞中表达。数个适合的哺乳动物宿主细胞是所属领域中已知的,且许多可从美国模式培养物保藏所(ATCC,马纳萨斯(Manassas,VA))获得。适合的哺乳动物细胞的实例包括(但不限于)中国仓鼠卵巢细胞(CHO)(ATCC No.CCL61)、CHO DHFR细胞(乌尔劳布(Urlaub)等人,美国科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),97:4216-4220(1980))、人胚肾(HEK)293或293T细胞(ATCC No.CRL1573)和3T3细胞(ATCC No.CCL92)。其它适合的哺乳动物细胞系是猴COS-1(ATCC No.CRL1650)和COS-7细胞系(ATCC No.CRL1651)、以及CV-1细胞系(ATCC No.CCL70)。哺乳动物细胞理想地是人类细胞。例如,哺乳动物细胞可是人类淋巴或淋巴衍生的细胞系,如源自前B淋巴细胞的细胞系、PER.C6®细胞系(荷兰克鲁塞尔生物制药公司(Crucell Holland B.V.,The Netherlands))、或人胚肾(HEK)293或293T细胞(ATCC No.CRL1573)。

[0108] 可通过“转染”、“转形”或“转导”将编码本文所述的任何抗体或抗原结合片段(任选地,单克隆抗体或片段)的氨基酸的核酸序列引入到细胞中。如本文所用,“转染”、“转形”或“转导”是指通过使用物理或化学方法将一个或多个外源性多核苷酸引入到宿主细胞中。许多转染技术是所属领域中已知的并包括(例如)磷酸钙DNA共沉淀(参见,例如,默里

(Murray E.J.) (编), 分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology), 第7卷, 基因转移及表达方法 (Gene Transfer and Expression Protocols), 瑚玛娜出版社 (Humana Press) (1991)); DEAE-葡聚糖; 电穿孔; 阳离子脂质体介导的转染; 钨粒促进的微粒轰击 (约翰斯顿 (Johnston), 自然界 (Nature), 346:776-777 (1990)); 及磷酸锆DNA共沉淀 (布拉什 (Brash) 等人, 分子细胞生物学报 (Mol. Cell Biol.), 7:2031-2034 (1987))。噬菌体或病毒载体可在适合的包装细胞中生长感染性颗粒后引入到宿主细胞中, 其中包装细胞中的许多可商业获得。

[0109] 本发明提供一种组合物, 其包含有效量的本文所述的抗体或其抗原结合片段中的任何一者或组合及药学上可接受的载剂。在一个实施例中, 例如, 所述组合物可包含特异性结合到如上所述的金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的第一抗体或其抗原结合片段 (任选地, 单克隆)、和特异性结合到如上所述的金黄色葡萄球菌AT蛋白的第二抗体或其抗原结合片段 (任选地, 单克隆)、和药学上可接受的载剂。或者, 所述组合物可包含特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的抗体或其抗原结合片段或特异性结合到金黄色葡萄球菌AT蛋白的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载剂。在又一个实施例中, 所述组合物可包含编码C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段和/或抗C1fA/AT双特异性抗体或抗原结合片段的核酸序列、或包含这类核酸序列的一个或多个载体。在一个实施例中, 所述组合物是药学上可接受的 (例如, 生理上可接受的) 组合物, 其包含载剂 (如药学上可接受的 (例如, 生理上可接受的) 载剂)、和C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、抗C1fA/AT双特异性抗体或抗原结合片段、核酸序列或载体。在本发明上下文中可使用任何适合的载剂, 且这类载体是所属领域中众所周知的。载剂的选择将部分地由组合物可给予的特定部位及用于给予组合物的特定方法来确定。任选地, 所述组合物可是无菌的。可将所述组合物冷冻或冷冻干燥储存并在使用前于适合的无菌载剂中复水。所述组合物可按照描述于 (例如) 雷明登 (Remington): 药学科学与实验 (The Science and Practice of Pharmacy), 第21版, 利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司 (Lippincott Williams & Wilkins), 费城 (Philadelphia, PA) (2001) 中的常规技术来产生。

[0110] 所述组合物理想地包含C1fA结合抗体和/或AT结合抗体、和/或抗C1fA/AT双特异性抗体、或其抗原结合片段 (例如, 单克隆抗体或片段), 其量是可有效治疗或预防金黄色葡萄球菌感染的。因此, 本发明提供一种治疗或预防个体 (例如人类) 的金黄色葡萄球菌感染的方法, 所述方法包括对此需要的个体给予包含本文所述的抗体或其抗原结合片段 (例如单克隆抗体或片段) 中的任何一者或组合的组合物, 因此所述个体中金黄色葡萄球菌感染得到治疗或预防。本发明还提供一种以C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、和/或本文所述的抗C1fA/AT双特异性抗体或抗原结合片段、或包含本文所述的抗体或其片段中的任何一者或组合的组合物于制造用于治疗或预防金黄色葡萄球菌感染的药物中的用途。如本文所述, 金黄色葡萄球菌是引起广泛临床感染的主要人类病原体。金黄色葡萄球菌是菌血症和感染性心内膜炎以及骨关节感染、皮肤感染及软组织感染、胸膜肺感染及装置相关感染的主要原因。约30%的人口感染有金黄色葡萄球菌 (韦尔特海姆 (Wertheim) 等人, 柳叶刀传染病 (Lancet Infect. Dis.), 5:751-762 (2005))。金黄色葡萄球菌皮肤感染的症状包括 (例如) 脓疮、脂肪团 (cellulitis) 和脓疱病。金黄色葡萄球菌还可引起食物中毒、血液中毒 (也称作菌血症)、中毒性休克症候群和化脓性关节炎。金黄色葡萄球

菌感染的流行病学、病理生理学及临床表达详细描述于(例如)童(Tong)等人,临床微生物学评论(Clin.Microbiol.Rev.),28(3):603-661(2015)中,及已对几个不同金黄色葡萄球菌品系的基因组进行测序(参见,例如,GenBank/EMBL登录号BX571856、BX571857、BX571858、FN433596、FN433597、FN433598、HE681097、FR821777、FR821778、FR821779和FR821780)。如本文所述,个体(例如,人类个体)可患有糖尿病。

[0111] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”及类似者是指获得所需的药理学和/或生理学作用。在一个实施例中,所述作用是治疗性的,也就是说,所述作用部分或完全治愈由疾病和/或所述疾病引起的不良症状。为此,所公开的方法包括给予“治疗有效量”的C1fA结合抗体、AT结合抗体、和/或抗C1fA/AT双特异性抗体、或其抗原结合片段、或包含上述抗体或片段(包括单克隆抗体或片段)中的任一者或组合的组合物。“治疗有效量”是指在必要剂量及必要时间段下有效达成所需治疗结果的量。治疗有效量可根据因素(如疾病状态、个体的年龄、性别及体重、和抗体或抗原结合片段在个体中引发所需反应的能力)而变化。例如,C1fA结合抗体或其抗原结合片段、AT结合抗体或其抗原结合片段、或C1fA/AT双特异性抗体或其抗原结合片段的治疗有效量是在人类中抑制金黄色葡萄球菌相关败血症,抑制金黄色葡萄球菌凝集,抑制血栓栓塞病变形形成,中和 α 毒素,诱导调理吞噬作用,抑制金黄色葡萄球菌纤维蛋白原结合,抑制金黄色葡萄球菌凝集,或前述的任何组合的量。

[0112] 或者,药理学和/或生理学作用可是预防性的,也就是说,所述作用完全或部分地预防疾病或其症状。在所述方面中,所公开的方法包括给予“预防有效量”的C1fA结合抗体、AT结合抗体和/或抗C1fA/AT双特异性抗体、或其抗原结合片段(包括单克隆抗体或片段)。“预防有效量”是指在必要剂量及必要时间段下有效达成所需预防结果(例如,预防金黄色葡萄球菌感染或疾病发作)的量。

[0113] 治疗或预防效力可通过定期评估所治疗的患者来监测。对于数天或更长时间的重复给予,取决于病情,可重复治疗直到发生所需的疾病症状抑制。然而,其它剂量方案可是有用的并在本发明的范围内。所需剂量可通过单次推注给予组合物,通过多次推注给予组合物,或通过连续输注给予组合物来递送。

[0114] 治疗或预防金黄色葡萄球菌感染的方法可包括投与本文所述的C1fA结合抗体、本文所述的AT结合抗体、本文所述的C1fA结合抗体和AT结合抗体二者、或本文所述的C1fA-AT双特异性抗体、或其抗原结合片段。在其中将C1fA结合抗体和AT结合抗体或片段(例如,单克隆抗体或片段)投与个体的实施例中,每个抗体或片段可存在于相同组合物中或存在于单独组合物中。当对个体投与单独组合物时,每种组合物可同时地或以任何顺序依次地投与。

[0115] 包含有效量的本文所述的抗体、或其抗原结合片段中的任何一者或组合、编码任何前述的核酸序列、或包含所述核酸序列的载体的组合物可使用标准投与技术(包括静脉内、腹膜内、皮下和肌肉内投与途径)投与给个体(如人类)。所述组合物可适用于非经肠给予。如本文所用,术语“非经肠”包括静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内投与。在一些实施例中,所述组合物是通过静脉内、腹膜内或皮下注射使用外周全身递送投与给个体。

[0116] C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、和/或抗C1fA/AT双特异性抗体或抗原结合片段、或包含其组合物可单独投与或与常规用于治疗金黄色葡萄球

菌感染的其它药物(例如,作为佐剂)组合投与。包含C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或C1fA-AT双特异性抗体或抗原结合片段的组合物可与(例如)一种或多种抗生素(如青霉素酶抗性 β -内酰胺抗生素(例如,苯唑西林(oxacillin)或氟氯西林(flucloxacillin))组合使用。健大霉素(Gentamicin)可用于治疗严重感染,如心内膜炎。然而,大多数金黄色葡萄球菌品系现对青霉素具有抗性,且100人中有两人携带甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌品系(MRSA)。MRSA感染通常用万古霉素(vancomycin)治疗,且轻度皮肤感染可用三重抗生素软膏治疗。

[0117] 除了治疗用途外,本文所述的抗体中的任何一者或组合可用于诊断或研究应用。就此来说,C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或C1fA-AT双特异性抗体或抗原结合片段可用于分析中以监测个体的金黄色葡萄球菌感染。研究应用包括(例如)使用C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或C1fA-AT双特异性抗体或抗原结合片段和标签以检测样品中(例如,人体流体中或细胞或组织提取物中)金黄色葡萄球菌的方法。C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或C1fA-AT双特异性抗体或抗原结合片段可在具有或不具有修饰下(如以可检测的部分共价或非共价标记)使用。例如,可检测的部分可是放射性同位素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I)、荧光或化学发光化合物(例如,异硫氰酸荧光素、罗丹明或荧光素)、酵素(例如,碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶)或辅成基。所属领域中已知的用于将抗体或其抗原结合片段单独地偶联到可检测的部分的任何方法可用于本发明的上下文中(参见,例如,亨特(Hunter)等人,自然,194:495-496(1962);大卫(David)等人,生物化学(Biochemistry),13:1014-1021(1974);佩恩(Pain)等人,免疫学方法期刊(J.Immunol.Meth.),40:219-230(1981);及尼格兰(Nygren,J.),组织化学与细胞化学(Histochem.And Cytochem.),30:407-412(1982))。

[0118] 本文所述的抗体、或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体或片段)、编码任何前述的核酸序列、包含所述核酸序列的载体、或包含任何前述的组合物中的任何一者或组合可提供在试剂盒中(也就是说,预定量的试剂与用于进行诊断分析的说明书的包装组合)。若C1fA结合抗体或抗原结合片段、AT结合抗体或抗原结合片段、或C1fA-AT双特异性抗体或抗原结合片段经酵素标记,则试剂盒理想地包括酵素所需的受质和辅因子(例如,提供可检测的发色团或荧光团的受质前体)。另外,试剂盒中可包括其它添加剂,如稳定剂、缓冲剂(例如,阻断缓冲液或裂解缓冲液)及类似者。可改变各种试剂的相对量以提供试剂的溶液中浓度,此大体上优化分析的灵敏度。所述试剂可呈干粉(通常是冷冻干燥的)提供,包括赋形剂,其在溶解时将提供具有适合浓度的试剂溶液。

[0119] 以下实例进一步说明本发明,但当然,不应被理解为以任何方式限制本发明的范围。

[0120] 实例1

[0121] 所述实例证实特异性结合到金黄色葡萄球菌C1fA蛋白的单克隆抗体的选择及表征。

[0122] 先前已报导,于金黄色葡萄球菌致死性菌血症模型中,通过用抗金黄色葡萄球菌 α 毒素(AT)单克隆抗体(mAb)(称为“MEDI4893*”,描述于国际专利申请公布W0 2012/109285中,及称为“LC10”,描述于W0 2014/074540中)与抗C1fA mAb(称为“11H10”)组合预防,相对

于用单个mAb预防,提供增强的保护能力及分离株覆盖(特卡奇克等人,国际学术期刊,7(3).pii:e00528-16(2016))。(应注意,MEDI4893,其包含不存在于MEDI4893*中的YTE突变,但未用于小鼠中,因为尽管YTE突变增加人类中的IgG半衰期,但其会降低小鼠的血清暴露。)尽管11H10显示有效的抗ClfA活性,但在纤维蛋白原结合抑制分析中,相对于其它ClfA创始序列ClfA001和ClfA004,11H10对于ClfA创始序列ClfA002展示减低大于1000倍的亲和力(K_{on} 低于检测极限,表1中的ND)和约40倍增加的 IC_{50} ,如图1A和表1所示。ClfA002是通过显著性金黄色葡萄球菌医院获得性MRSA(HA-MRSA;USA100或序列类型5(ST5))(沙玛-库克(Sharma-Kuinkel)等人,临床微生物期刊(J.Clin.Microbiol.),53:227-236(2015);及门德斯(Mendes)等人,临床微生物期刊,50:3694-3702(2012))表达。

[0123] 表1.抗ClfA mAb:亲和力与体外活性之间的相关性

		Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	亲和力 Koff(s^{-1})	Kd	CHI ²	纤维蛋白原结合 IC ₅₀ (μg/ml)
[0124]	SAR114					
	ClfA001	2.41E+06	6.01E-06	2.493pM	0.206	1.166
	ClfA002	2.13E+06	9.53E-05	44.77pM	0.383	1.161
	ClfA004	5.62E+06	6.46E-06	1.15pM	0.330	1.627
	11H10					
	ClfA001	1.092E+06	6.80E-03	6.22nM	0.214	0.881
[0125]	ClfA002			27.6μM		9.772
		Kon ($M^{-1}s^{-1}$)	亲和力 Koff(s^{-1})	Kd	CHI ²	纤维蛋白原结合 IC ₅₀ (μg/ml)
[0125]	ClfA004	8.457E+5	6.390E-3	7.555nM	0.502	0.662

[0126] 为增加潜在的临床分离株覆盖,筛选人类扁桃体B细胞库以寻找更广泛反应性抗ClfA mAb。具体来说,使用藻红素(PE)-Cy7标记的CD19微珠(BD生物科学事业部(BD Biosciences),加利福尼亚州圣荷西(San Jose,CA)),接着用抗PE珠(美天旎公司(Miltenyi Biotec,Inc.),加利福尼亚州圣荷西)染色,并通过FACS Aria(BD生物科学事业部,加利福尼亚州圣荷西)上的细胞分选耗尽携带IgM、IgD和IgA的细胞,从分离自扁桃体的冷冻保存的淋巴细胞分离记忆B细胞。如查格埃(Traggiai)等人,自然医学(Nat.Med.),10:871-875(2004)中所述,使用爱泼斯坦巴尔(Epstein Barr)病毒(EBV),在无性繁殖条件下使细胞永生。两周后,使用以384孔为主的ELISA分析筛选培养物上清液中ClfA001特异性单克隆抗体的存在。简单地说,将抗ClfA mAb的连续稀释液(1:2或1:600)添加到涂布ClfA的板,接着添加生物素化11H10(1:600)。竞争百分比计算为 $100 * (OD_{mAb+11H10biot} / (OD_{11H10biot}))$ 。将阳性培养物在完全RPMI培养基中扩增并选择其以高亲和力结合到ClfA基因型001、002和004的能力。通过RT-PCR检索VH和VL序列。

[0127] 通过所述种努力,鉴定出单克隆抗体(称为“SAR114”),其展示对ClfA001、002和004的高亲和力($KD=1.15-44.7pM$,表1)及由三个显著性创始ClfA基因型对纤维蛋白原结合的有效抑制($IC_{50} \sim 20\mu M$),如图1B中所示。SAR114还展示针对几个金黄色葡萄球菌临床分离株的调理吞噬杀死(OPK)活性,如图3A-3F中所示(参见,例如,特卡奇克等人,关于测定OPK杀死的方法,同前述)及与11H10相比对人类血浆中细菌凝集的抑制的改善,如以下图2、图4和表2中所示)。人类血浆中的凝集抑制是通过在胰蛋白酶大豆混合物(TSB)中培养112

个金黄色葡萄球菌临床分离株过夜,在PBS中洗涤,并在冰冷的PBS中悬浮到原始体积的十分之一来测定。抗C1fA单克隆抗体在30 μ l PBS中以200 μ g/ml开始连续稀释(2倍)并与96孔U型底板(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific),马塞诸塞州沃尔瑟姆(Waltham, MA))中与30 μ l柠檬酸化人类血浆混合。添加细菌(30 μ l)并在37°C下培养5分钟。目测评价各孔,并记录细菌凝集情况下的最低单克隆抗体浓度。R347(人类抗gp120单克隆抗体)用作同型对照人类IgG1(c-IgG)。人类阴性对照单克隆抗体(c-IgG)在高达200 μ g/ml时未显示任何抑制作用。

[0128] 表2:抑制细菌凝集所需的最低SAR114浓度。

[0129]	品系	CC	μ g/ml	品系	CC	μ g/ml
	2784	1	3	NRS383	8	1.5
[0130]	801	5	3	3691	8	0.7
	4211	5	1.5	3406	8	25
	ARC634	5	1.5	3691	8	3
	ARC635	5	0.7	3527	8	6
	ARC797	5	6	ARC2081	30	0.7
	NRS382	5	3	NRS383	30	6
	9105	5	1.5	UAMS-1	30	1.5
	9057	8	6	484	30	0.35
	ARC2464	8	3	9048	45	3
	BAA1556	8	6	NRS22	45	1.5
	NRS384	8	6	9112	45	1.5

[0131] 数据代表以相同供体作为血浆源的三次独立实验。

[0132] 确定SAR114抗体的重链多肽包含SEQ ID NO:13的可变区氨基酸序列、SEQ ID NO:1的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列。确定SAR114抗体的轻链多肽包含SEQ ID NO:14的可变区氨基酸序列、SEQ ID NO:4的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:6的CDR3氨基酸序列。发现通过ELISA和在以Octet为主的竞争分析中11H10和SAR114竞争结合到C1fA001,如图5A和5B中所示。简单地说,在氨基丙基硅烷(APS)生物传感器上捕捉以5 μ g/ml稀释在PBS中的mAb,历时7分钟。将经涂布的生物传感器移到含有阻断缓冲液的孔(PBS,1mg/ml BSA(西格玛奥德里奇,圣路易斯))中6分钟以阻断游离传感器结合位点,用稀释于阻断缓冲液中的2.5 μ g/ml C1fA001培养7分钟,并最后移到含有以5 μ g/ml稀释于阻断缓冲液中的竞争性mAb的孔中。使用OCTET®数据采集和分析软件(颇尔弗里蒙特公司(Pall ForteBio LLC),加利福尼亚州弗里蒙特(Fremont,CA))分析数据。没有竞争性mAb的缔合导致竞争,并因此识别相同的抗原位点,而当检测到第二mAb的缔合时观察到不竞争。

[0133] 所述实例的结果指示抗C1fA单克隆抗体11H10和SAR114结合C1fA001上的重迭抗原决定基,此表明其针对C1fA002的活性差异可能是由不同结合亲和力引起的。

[0134] 实例2

[0135] 所述实例描述SAR114-N3的产生,SAR114-N3具有比SAR114增加的半衰期。

[0136] 众所周知的抗体的Fc区在其半衰期方面起著作用,且Fc改造已被用于操纵治疗性生物制剂的半衰期。例如,三重氨基酸取代M252Y/S254T/T256E(称为“YTE”取代)已被改造至抗体(包括抗金黄色葡萄球菌MEDI4893抗体)的Fc区中,且其可导致半衰期增加3到4倍。然而,也已显示YTE突变导致与C1q和Fc γ R的结合降低并降低效应功能(如ADCC和CDC活

性)。(莫涅 (Monnet C.) 等人,免疫学前沿 (Front Immunol.) 6:39 (2015))。YTE突变还减少抗细菌抗体的调理吞噬杀死 (OPK)。(参见图6,显示YTE取代降低抗假单胞菌抗体Cam004的OPK)。因此,尽管抗C1fA抗体需要延长半衰期,但YTE突变并不适于SAR114。

[0137] 博罗克 (Borrok) 等人, (生物化学期刊, 290 (7): 4282-4290 (2015)。)研究其它Fc改变 (包括“N3”变体) 的影响。“N3”变体在彼等相同位置改为包含CH3域中的序列CSWHLC (SEQ ID NO:19) 替代野生型序列 (LHNHYT; SEQ ID NO:22)。所述Fc变体还增加半衰期 (参见图9, 上图), 但如图6中所示, 不会减少抗细菌抗体Cam004 (上图) 或2F4 (下图) 的OPK杀死。

[0138] 因此, 评估N3突变对SAR114的结合的影响。在此等实验中, 使用拜克 (Biacore) 平台确定亲本和Fc变体抗体SAR-114和SAR114-N3分别针对于CLFA001、CLFA002和CLFA004蛋白质的结合的动力学速率/亲和力 (K_D) 常数。结果显示于下表3中。

[0139] 表3. 对于三个主要C1fA基因型的SAR-114和SAR114-N3结合亲和力

[0140]

捕捉	样品	$K_a (M^{-1}s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
SAR114-N3	CLFA001	3.383E+6	7.725E-4	228
SAR114-N3	CLFA002	3.921E+6	10.41E-4	265
SAR114-N3	CLFA004	2.387E+6	7.558E-4	316
SAR114	CLFA001	3.911E+6	6.013E-5	15.4
SAR114	CLFA002	3.816E+6	1.821E-4	47.7
SAR114	CLFA004	2.968E+6	6.210E-5	20.9

[0141] 对1:1结合模型的动力学拟合是足够的。SAR114和SAR114-N3两者以相似亲和力结合到CLFA001、CLFA002和CLFA004。然而, SAR114对所有CLFA蛋白的结合 (K_D) 比SAR114-N3的结合强约10倍。SAR114-N3的较弱结合可归因于更快的解离速率。

[0142] 还评估SAR114-N3抑制纤维蛋白原结合的能力。在此等分析中, 在连续稀释 (200到0.5 $\mu g/ml$) 的SAR114、SAR114-N3或对照IgG抗体的存在下测定C1fA与纤维蛋白原的结合。结果显示于以下图7和表4中。

[0143] 表4. SAR-114和SAR114-N3对纤维蛋白原结合的抑制

[0144]

IC50 ($\mu g/ml$)	SAR114	SAR114-N3
C1fA001	2.576	2.134
C1fA002	2.910	3.108
C1fA004	1.720	2.516

[0145] 此等数据证实SAR114-N3抑制三个主要C1fA基因型与纤维蛋白原的结合。

[0146] 实例3

[0147] 所述实例描述SAR114-N3Y的产生, SAR114-N3Y具有比SAR114-N3改善的稳定性。

[0148] 然而, “N3”变体包含色胺酸 (W434), 其有助于增强FcRn亲和力, 但也导致光敏感性, 使得正常光照条件导致在一周内单体损失约20%, 及强光条件导致在相同时期内单体损失超过60%。用不可氧化的疏水性残基 (F、Y、L、I、V、A和S) 取代色胺酸 (W434), 并评价它们对SAR114半衰期、OPK和光敏感性的影响。就结合来说, F和Y取代与SAR114 N3最相似, 且两者具有与N3改变相似的半衰期延长 (参见图9, 上图)。对具有F (“N3F”; SEQ ID NO:20) 和Y (“N3Y”; SEQ ID NO:21) 改变的SAR114抗体进行光稳定性评估。在所述评估中, 于23 $^{\circ}C$ 下将mAb暴露于2kLux/hr (强度测量值) 的CWL (常规白光) 14天, 并将观察到的单体纯度概述于下

表5中。

[0149] 表5.SAR114-N3F和SAR114-N3Y稳定性

[0150]	纯系	在 T0 时的单体纯度	在 7 天时的单体纯度	在 14 天时的单体纯度
	N3F	95.9%	91.8%	86.2%
	N3Y	98.9%	97.6%	95.3%

[0151] 结果证实N3Y具有优异的光稳定性。凝集和纤维蛋白原效力分析还指示N3Y具有比N3F更佳的活性,如图8中所示。小鼠中抗体浓度的测定证实N3Y和N3F两者具有与N3突变体相似的pK值(图9,上图),且N3Y变体的OPK杀死未改变(图9,下图)。

[0152] 实例4

[0153] 所述实例描述单独或与抗 α 毒素(AT)单克隆抗体组合的SAR114或SAR114 N3Y抗C1fA单克隆抗体在鼠类菌血症模型中的作用。

[0154] 通过腹膜内(IP)注射同型对照IgG(c-IgG)、SAR114抗C1fA单克隆抗体和/或MEDI4893*抗AT单克隆抗体对成群10只6到8周龄雌性BALB/c小鼠(恩福哥(Envigo),英国剑桥亨廷顿郡(Huntingdon,Cambridgeshire,United Kingdom))进行被动免疫。24小时后通过静脉内(IV)注射LD₉₀的金黄色葡萄球菌临床分离株攻击小鼠。在两周内监测存活率。用对数秩(曼特尔考克斯)测试进行特异性抗葡萄球菌抗原与c-IgG的统计学分析。若 $p < 0.05$,则认为资料在统计学上不同。

[0155] 与同型对照IgG(c-IgG)相比,在用代表序列类型(ST)ST8、ST5或ST30(它们分别被证实编码C1fA基因型C1fA001、002和004)的金黄色葡萄球菌分离株攻击后,SAR114(15mg/kg (mpk))预防导致存活率增加,如图10中所示。与11H10和MEDI4893*抗体的组合相似地,在用所测试的所有品系攻击后,使用SAR114和MEDI4893*(各7.5mg/kg (mpk))的组合的预防相对于c-IgG显著增加存活率,并提供优于抗某些品系的对应单个单克隆抗体的益处(特卡奇克等人,同前述)。

[0156] 所述实验的结果证实抗C1fA SAR114单克隆抗体具有体内功能并表明SAR114与抗AT单克隆抗体的组合为金黄色葡萄球菌预防提供更广泛的品系覆盖。

[0157] 实例5

[0158] 所述实例描述单独或与抗 α 毒素(AT)单克隆抗体组合的SAR114抗-C1fA单克隆抗体在糖尿病鼠类致命性菌血症模型中的作用。

[0159] 通过腹膜内(IP)注射同型对照IgG(c-IgG)、SAR114抗C1fA单克隆抗体和/或MEDI4893*抗AT单克隆抗体对成群6周龄糖尿病BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J雄性小鼠进行免疫。24小时后通过静脉内(IV)注射LD₉₀(5e7CFU)的金黄色葡萄球菌临床分离株SF8300攻击小鼠。在两周内监测存活率。图11,上图。48小时后对十只动物实施安乐死,以在肾脏(图11,中间图)和肝脏(图11,下图)中进行细菌计数。用对数秩(曼特尔考克斯)测试进行特异性抗葡萄球菌抗原与c-IgG的统计学分析。若 $p < 0.05$,则认为资料在统计学上不同。

[0160] 与同型对照IgG(c-IgG)相比,在攻击后,SAR114(15mg/kg (mpk))预防导致存活率增加,及在攻击后,使用SAR114与MEDI4893*(各7.5mg/kg (mpk))的组合的预防相对于c-IgG显著增加存活率。图11,上图。SAR114和MEDI4893*(各7.5mg/kg (mpk))的组合还显著减少肾脏(图11,中间图)和肝脏(图11,下图)中的细菌。

[0161] 所述实验的结果证实抗C1fA SAR114单克隆抗体具有体内功能并表明SAR114与抗AT单克隆抗体的组合保护以防糖尿病db/db小鼠中的CA-MRSA SF8300诱导的致命性菌血症。

[0162] 实例6

[0163] 所述实例描述单独或与抗 α 毒素(AT)单克隆抗体组合的SAR114抗-C1fA单克隆抗体在鼠类菌血症模型中的促发炎症细胞介素浓度的作用。

[0164] 通过腹膜内(IP)注射同型对照IgG(c-IgG)、SAR114抗C1fA单克隆抗体和/或MEDI4893*抗AT单克隆抗体对成群6周龄糖尿病(db)BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J雄性小鼠(n=20)和非糖尿病C57/B6(B6)雄性小鼠(n=20)进行免疫。24小时后通过静脉内(IV)注射LD₉₀的金黄色葡萄球菌临床分离株SF8300攻击小鼠。每组十只动物在8小时或24小时后被安乐死,并从心脏穿刺收集血液。使用中尺度多重波(Mesoscale Multiplex)促发炎症细胞介素试剂盒从血浆测定促发炎症细胞介素。使用曼-惠特尼U(Mann-Whitney U)测试分析组间的统计学差异,且若p<0.05,则认为在统计学上不同。

[0165] 如表6中所示,在糖尿病db/db小鼠中,SAR114和MEDI4893*的组合在24小时时显著降低IL-6、TNF- α 和KC浓度。

[0166] 表6: SAR114和MEDI4893*减少促发炎症细胞介素

细胞介素	时间	小鼠	MEDI4893*	SAR114	MEDI4893* 和 SAR114
IL-6	8 h	B6		0.004	
IL-6	8 h	db			
IL-6	24 h	B6	0.0156	0.0041	0.008
IL-6	24 h	db	0.0034	0.043	0.011
TNF- α	8 h	B6		0.0017	0.0002
TNF- α	8 h	db	0.0503	0.076	0.0015
TNF- α	24 h	B6	0.028		0.0014
TNF- α	24 h	db		0.0055	0.038
KC	8 h	B6		<0.0001	
KC	8 h	db	0.032	0.0127	0.0008
KC	24 h	B6		0.0006	0.0002
KC	24 h	db	0.008	0.028	0.014

[0168] 资料代表三个独立的实验。

[0169] 在非糖尿病C57/B6小鼠中,所述组合在24小时时还显著降低IL-6、TNF- α 和KC浓度。

[0170] 实例7

[0171] 所述实例描述单独或与抗 α 毒素(AT)单克隆抗体组合的SAR114抗-C1fA单克隆抗体在糖尿病鼠类菌血症模型中对肝脏损伤的作用。

[0172] 通过腹膜内(IP)注射同型对照IgG(c-IgG)、SAR114抗C1fA单克隆抗体(15mg/kg(mpk))、MEDI4893*抗AT单克隆抗体(15mpk)、或SAR114+MEDI4893*(各15mpk)的组合对成群6周龄糖尿病BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J雄性小鼠(n=10)进行免疫。24小时后通过静脉内(IV)注射LD₉₀的金黄色葡萄球菌临床分离株SF8300攻击小鼠。感染后48h对小鼠实施安乐死,并收获肝脏。照相记录大体病理学(图12,左图),并在用10%福尔马林固定后用苏木精/曙红染色肝脏切片(图12,右图)。SAR114抗体、MEDI4893*抗体、和SAR114+MEDI4893*的组合均可预防暴露于金黄色葡萄球菌的糖尿病小鼠中的肝脏损伤。

[0173] 实例8

[0174] 所述实例描述单独或与抗 α 毒素(AT)单克隆抗体组合的SAR114抗-C1fA单克隆抗体在鼠类糖尿病性菌血症模型中的作用。

[0175] 通过腹膜内(IP)注射同型对照IgG(c-IgG)、SAR114抗C1fA单克隆抗体和/或MEDI4893*抗AT单克隆抗体对成群6周龄糖尿病BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J雄性小鼠(n=10)进行免疫。24小时后通过静脉内(IV)注射LD₉₀的金黄色葡萄球菌临床分离株攻击小鼠。在两周内监测存活率。图13。

[0176] SAR114和MEDI4893*(各7.5mg/kg (mpk))的组合相对于c-IgG在用所测试的大多数品系攻击后增加存活率,并还提供优于大多数品系中对应单个单克隆抗体的益处。

[0177] 所述实验的结果证实抗C1fA SAR114单克隆抗体具有体内功能并表明SAR114与抗AT单克隆抗体的组合为糖尿病小鼠中的金黄色葡萄球菌的预防提供更广泛的品系覆盖。

[0178] 实例9

[0179] 所述实例描述特异性结合到C1fA和AT二者的双特异性单克隆抗体的产生及其体外效力。

[0180] 因为使用抗C1fA单克隆抗体和抗AT单克隆抗体的组合的被动免疫为致命性菌血症的品系覆盖提供益处并保留在小鼠皮肤坏死和肺炎模型中的抗AT保护能力(特卡奇克等人,同前述),产生针对C1fA和AT的双特异性抗体(BiSAb)以确定此种双特异性抗体是否提供优于对应个体抗体的组合的益处。为此,如前面所述改造BiSAb(参见,例如,迪马斯(Dimasi)等人,分子生物学期刊,393:672-692(2009);及科洛马(Coloma,M.J.)与莫里森(S.L.Morrison),自然生物技术,15:159-163(1997))。简单地说,抗C1fA mAb 11H10或SAR114用作IgG支架,及MEDI4893*以scFv形式移植。MEDI4893*scFv以在轻可变域和重可变域的间具有20个氨基酸(GGGGSx4)连接体的VL-VH形式合成(金尔特(GeneArt),赛默飞世尔科技,马塞诸塞州沃尔瑟姆)。“BiS₂”抗体是通过将MEDI4893*scFv序列融合到11H10或SAR114抗C1fA IgG1的重链的N端来构筑。“BiS₃”构筑体是通过将MEDI4893*的连接体-scFv附加到11H10或SAR114的重链的C端来产生。BiS₂和BiS₃构筑体在图14中示意性地说明。BiS₂和BiS₃分子是通过在293细胞中瞬时转染表达,通过蛋白A亲和色谱法纯化,并通过尺寸排除色谱法进行精炼。每个分子的完整性是通过质谱分析及通过完整质量及肽图谱评估,以验证改造并具有内源性的二硫化物结合的正确形成。选择BiS₂和BiS₃形式,因为scFv位于IgG上的不同位置及确定一种形式是否具有优于另一形式的优点的唯一方法是根据经验测试它们的所关注的抗体特异性。

[0181] 为理解BiSAb是否保留对应单个单克隆抗体的功能活性,评估每种BiSAb抑制AT依赖性兔红血球(RBC)裂解及抑制纤维蛋白原结合到C1fA001、C1fA002和C1fA004的能力。兔RBC溶血分析是通过将BiS Ab和MEDI4893*的连续稀释液(500到1.7nM)与AT(0.1 μ g/ml=3nM)混合并在37°C下与50 μ l经洗涤的兔RBC(皮尔福瑞斯(Peel Freeze))一起培养1小时来进行。在一些分析中,用10M过量的C1fA(5 μ M)使BiSAb的抗AT scFv饱和。然后将板以1200rpm离心3分钟,并将50 μ l上清液转移到新板。非特异性人类IgG1 R347用作阴性对照(c-IgG)(参见,例如,特卡奇克等人,临床及疫苗免疫学,19:377-385(2012))。用分光亮度计(分子仪器公司(Molecular Devices),加利福尼亚州森尼维耳市(Sunnyvale,CA))测定OD450 nm。使用以下等式计算溶血的抑制:

[0182] $100 - (100 \times [\text{ODAT} + \text{mAb}] / [\text{ODAT}])$ 。

[0183] 对于纤维蛋白原结合分析,在4°C下将NUNC MAXISORP™板(赛默飞世尔科技,马塞诸塞州沃尔瑟姆)用2μg/ml人类纤维蛋白原(西格玛奥德里奇,密苏里州圣路易斯市)涂布过夜,用含有0.1%吐温(Tween)20的PBS(洗涤缓冲液)洗涤3次并在室温(RT)下用200μl/孔酪蛋白(赛默飞世尔科技,马塞诸塞州沃尔瑟姆)阻断1小时。洗涤3次后,在RT下将板与50μl Avi标签C1fA221-559(2μg/ml)和抗C1fA单克隆抗体或BiS抗体含在100μl最终体积PBS中的连续稀释液的混合物一起培养1小时。在一些分析中,用10M过量的AT(6.6mM)使BiSAb的抗C1fA IgG1饱和。洗涤后,使用辣根过氧化物酶(HRP)共轭链霉亲和素(1:20000,GE医疗集团(GE Healthcare),伊利诺伊州芝加哥市(Chicago, IL))和100μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)受质(KPL)检测结合的C1fA。10分钟后用100μl 0.2M H₂SO₄终止反应。在分光亮度计上在OD450 nm下读取板。使用以下公式计算C1fA结合到纤维蛋白原的抑制百分比: $100 - (100 \times [\text{OD}_{\text{C1fA} + \text{mAb}}] / [\text{OD}_{\text{C1fA, nomAb}}])$ 。

[0184] 在AT溶血分析中11H10-BiS₂和BiS₃抗体及SAR114-BiS₂抗体展示类似于MEDI4893*的IC₅₀值,而SAR114-BiS₃展示降低的AT中和活性,如图15A中所示。在纤维蛋白原结合抑制分析中11H10 BiSAb和SAR114 BiS₃Ab均展示类似于各个亲本抗C1fA IgG的IC₅₀值,而SAR114 BiS₂Ab失去一些抗C1fA002活性,但仍然优于11H10,如图15B、图16和表7中所示。BiSAb还介导与亲本抗C1fA IgG类似的调理吞噬细菌杀死(OPK),如图17中所示。重要地,在10M过量的AT存在下抗AT scFv的饱和在纤维蛋白原结合分析中不干扰抗C1fA活性,如图15C中所示。类似地,与10M过量的C1fA结合的C1fA的饱和在溶血分析中不降低BiSAb的AT中和活性,如图15D中所示。

[0185] 表7.纤维蛋白原结合分析中SAR114及11H10-BiS2和BiS3分子的IC₅₀

[0186]	IC₅₀(nM)	SAR114	BiS₂	BiS₃
	C1fA001	19.16	90.31	41.78
	C1fA002	14.26	40.48	27.52
	C1fA004	8.083	34.69	20.93
[0187]	IC₅₀ (nM)	11H10	BiS₂	BiS₃
	C1fA001	12.67	124.3	57.75
	C1fA002	493.7	3023	1530
	C1fA004	3.094	1.504	0.9786

[0188] 所述实例的结果证实抗C1fA/AT BiS分子保留在大多数情况下与亲本IgG相似的体外功能活性,且所述活性在10倍摩尔过量的通过BiSAb识别的另一抗原存在下不会减少。

[0189] 实例10

[0190] 所述实例描述抗C1fA/AT双特异性抗体在金黄色葡萄球菌致死性菌血症模型中的保护作用。

[0191] 用抗C1fA SAR114抗体和MEDI4893*单克隆抗体组合(各7.5mpk或1mpk)或等摩尔剂量的BiSAb(分别为9或1.2mpk)对小鼠进行被动免疫,24小时后,接着用金黄色葡萄球菌品系SF8300进行IV感染,如实例4中所述,并监测存活率14天。与各7.5mpk的单克隆抗体组合相比,9mpk的两种SAR114-BiSAb均展示降低但无显著差异的保护(对于BiS₂,p=0.234及对于BiS₃,p=0.412),如图18A中所示。1mpk的单克隆抗体组合(p=0.0051,相对于c-IgG)

及1.2mpk的SAR114-BiS₂ ($p=0.0336$, 相对于c-IgG) 相对于c-IgG显著增加存活率。与所观察到的体外AT中和活性的丧失一致(参见图15A), 当以1.2mpk给予时, SAR114-BiS₃未显著增加存活率 ($p=0.657$, 图18A)。当针对金黄色葡萄球菌品系3049057 (MRSA, ST8) (单独的单克隆抗体均不足以进行显著保护的品系(参见图10)) 进行测试时, 1.2mpk的SAR114-BiS分子相对于c-IgG未显著增加存活率 ($p=0.4310$), 而单克隆抗体组合的等摩尔浓度(1mpk) 确实增加存活率, 如图18B中所示 ($p=0.0348$, 相对于c-IgG)。所述结果表明SAR114-BiS₂ 抗体体内存在缺陷。有趣的是, 在两种测试剂量(9mpk和1.2mpk) 下, 用11H10-BiSAb进行被动免疫导致类似于单克隆组合的保护, 并相对于抗两种C1fA001表达品系SF8300和3049057 (如图18C和18D中所示) 的c-IgG提供显著存活率增加。

[0192] 所述实例的结果证实抗C1fA/AT BiSAb不提供优于对应单个抗体的组合的益处。相反, SAR114/MEDI4893*双特异性抗体在较低剂量下针对对应单个单克隆抗体不足以提供保护的品系展示保护性丧失。

[0193] 实例11

[0194] 所述实验描述检查SAR114/MEDI4893*双特异性抗体在致死性肺炎模型中的效力的实验。

[0195] 由于SAR114以比11H10高约1000倍的亲和力结合C1fA001 (表1), 因此假设SAR114结合到C1fA在细菌表面上隔离SAR114/MEDI4893*BiSAb, 导致AT在其被分泌时捕捉及中和较差。AT是金黄色葡萄球菌肺炎中的关键毒力因子(布贝克瓦尔登堡与施尼温德(O. Schneewind), 实验医学学报(J. Exp. Med.), 205:287-294(2008)), 及使用单独的抗AT单克隆抗体的被动免疫保护小鼠免受致命性金黄色葡萄球菌肺炎(福莱蒂等人, 分子生物学期刊, 425(10):1641-1654(2013); 华等人, 抗微生物制剂和化学疗法, 58:1108-1117(2014); 及拉格与布贝克瓦尔登堡, 传染与免疫, 77:2712-2718(2009))。此外, 抗C1fA单克隆抗体在肺炎模型中不影响存活率且抗C1fA和抗AT单克隆抗体的组合提供类似于单独的抗AT mAb的保护(特卡奇克等人, 同前述)。因此, 为确定在致死性菌血症模型中针对SAR114-BiS₂Ab观察到的降低的保护作用是否由AT中和不足引起, 对雌性C57/B6小鼠(美国杰克逊实验室(Jackson Laboratory), 美国缅因州(Bar Harbor, ME)) IP注射单独的MEDI4893*或与SAR114的组合或与SAR114 BiS₂或BiS₃分子的组合。如华等人(同前述) 中所述, 用SF8300($1e^8$ CFU) 鼻内感染来诱导肺炎。监测动物存活率, 历时6天。用对数秩(曼特尔考克斯) 测试进行相对于c-IgG的统计分析。若 $p<0.05$, 则认为资料在统计学上不同。

[0196] 使用单独MEDI4893*(15mpk) 或与SAR114的组合的被动免疫导致在用SF8300攻击后获得100%的保护。然而, 使用SAR114-BiS₂或BiS₃的被动免疫分别导致30%及0%存活率, 如图19A中所示。有趣的是, 使用11H10BiS₂ (其对C1fA的亲和力降低约1000倍(表1)) 的被动免疫提供100%存活率。此等结果支持以下结论: 结合到细菌表面上的C1fA隔离SAR114-BiSAb, 从而损害AT中和。为进一步测试所述假设, 用BiS₂分子对小鼠进行被动免疫, 接着用C1fA同基因突变体SF8300 Δ c1fa鼻内(IN) 感染。使用SAR114-BiSAb的预防提供抗SF8300 Δ c1fa的保护, 类似于MEDI4893*, 如图19B中所示。

[0197] 所述实例的结果进一步证明SAR114-BiSAb结合到表面定位的C1fA阻止可溶性AT的有效中和。

[0198] 实例12

[0199] 所述实验描述检查食蟹猕猴中SAR114抗体的药物动力学 (pK) 的实验。通过静脉内 (IV) 给予5mg/kg SAR114、SAR114 N3F或SAR114 N3Y处理猴,并在60天内测定血液中的抗体浓度。结果显示于图20中并报告于下表8中。

[0200] 表8:食蟹猕猴PK参数。

[0201]	Sar114构筑体	清除率 (mL/天/kg)	β 期 $t_{1/2}$ (天)	AUC _{最后} ($\mu\text{g} \times \text{天}/\text{ml}$)
	野生型	5.69 ± 0.27	10.1 ± 1.5	754 ± 21
	N3Y	2.14 ± 0.17	23.7 ± 2.4	1900 ± 170
	N3F	2.54 ± 0.46	20.3 ± 4.1	1690 ± 254

[0202] 上述资料证实SAR114的经修饰形式 (且特别是SAR114 N3Y) 在灵长类动物中展示增加的半衰期。上述资料与从人类FcRN转基因小鼠的半衰期延长研究预测的一致。灵长类动物半衰期的有效延长指示SAR114 N3Y的半衰期将适当地延长并对于正确给予、治疗及预防金黄色葡萄球菌相关疾病非常重要。

[0203] 实例13

[0204] 所述实例描述检查N3Y Fc的免疫原性的实验。

[0205] 治疗性蛋白质的免疫原性可引起问题,包括中和、加速治疗剂清除和/或不良事件。虽然人类蛋白质 (如抗体框架区) 大多数是非免疫原性的,但抗体的Fc区中的突变存在潜在免疫反应风险。由于辅助T细胞在免疫原性反应中的主要作用,因此使用人类CD4 T细胞的功能活化分析现被认为是免疫原性预测的标志。因此,分析IgG1的Fc区中的N3Y对T细胞活化的影响。

[0206] 在此等实验中,使用福客隆 (Ficoll) 梯度从39个人类全血收集物分离PMBC。然后使用阳性选择提取CD8细胞,并通过用5种不同肽库刺激及用IL-2体外扩增10天来富集细胞。然后用ELIspot板中的单个肽库再刺激细胞以用于CD4。显示于图21中的结果证实与野生型Fc区相比,NY3突变剂量不显著增加免疫原性。

[0207] 本文引用的所有参考文献 (包括公开案、专利申请和专利) 均以引用的方式并入本文中,其引用程度如同每个参考文献被单独且特定地指出以引用的方式并入并以其全文描述于本文中。

[0208] 除非另外于本文中指明或内容明显矛盾,否则,在描述本发明的情况中 (尤其在所附权利要求书情况中) 使用术语“一”和“一个”和“所述”和“至少一个”及类似指示是解释为包含单数和复数。除非另外于本文中指明或者内容明显矛盾,否则,使用术语“至少一个”连接一系列一个或多个条目 (例如,“A和B中的至少一者”) 是解释为表示选自所列条目中的一者 (A或B) 或所列条目中的两者或更多者的任何组合 (A和B)。除非另外注明,否则术语“包括”、“具有”、“包含”、和“含有”应解释为开放式术语 (也就是说表示“包括 (但不限于)”)。除非文中另有说明,否则文中叙述的数值范围仅是意欲作为个别提及介于所述范围内的各个个别数值的快捷方法,及将各个个别数值并入本说明书中如同其经个别引述于文中。除非于本文中另外指明或者前后文明显相冲突,否则述于本文中的所有方法可以任何适合的顺序进行。除非另有声明,否则本文中提供的任何及所有实例或例示性语言 (例如“如”) 的使用仅欲更佳地说明本发明而不对本发明范围造成限制。不应将本说明书中的语言理解为将任何非主张要素指示为实施本发明的必要条件。

[0209] 本文描述本发明的优选实施例,包括本发明者已知用于进行本发明的最佳方式。

所属领域中的一般技术者在阅读上述说明后当可明了所述优选实施例的变化形式。本发明者预期熟习此项技艺者当能适当地使用所述变化形式,且本发明者意欲以除如本文所明确描述之外的方式实施本发明。因此,本发明包括为适用法律准许的本发明所附权利要求书中所列举目标的所有修改及等效物。此外,除非另外于本文中指明或前后文明显相冲突,否则本发明包含其所有可能变化形式中的上述要素的任何组合。

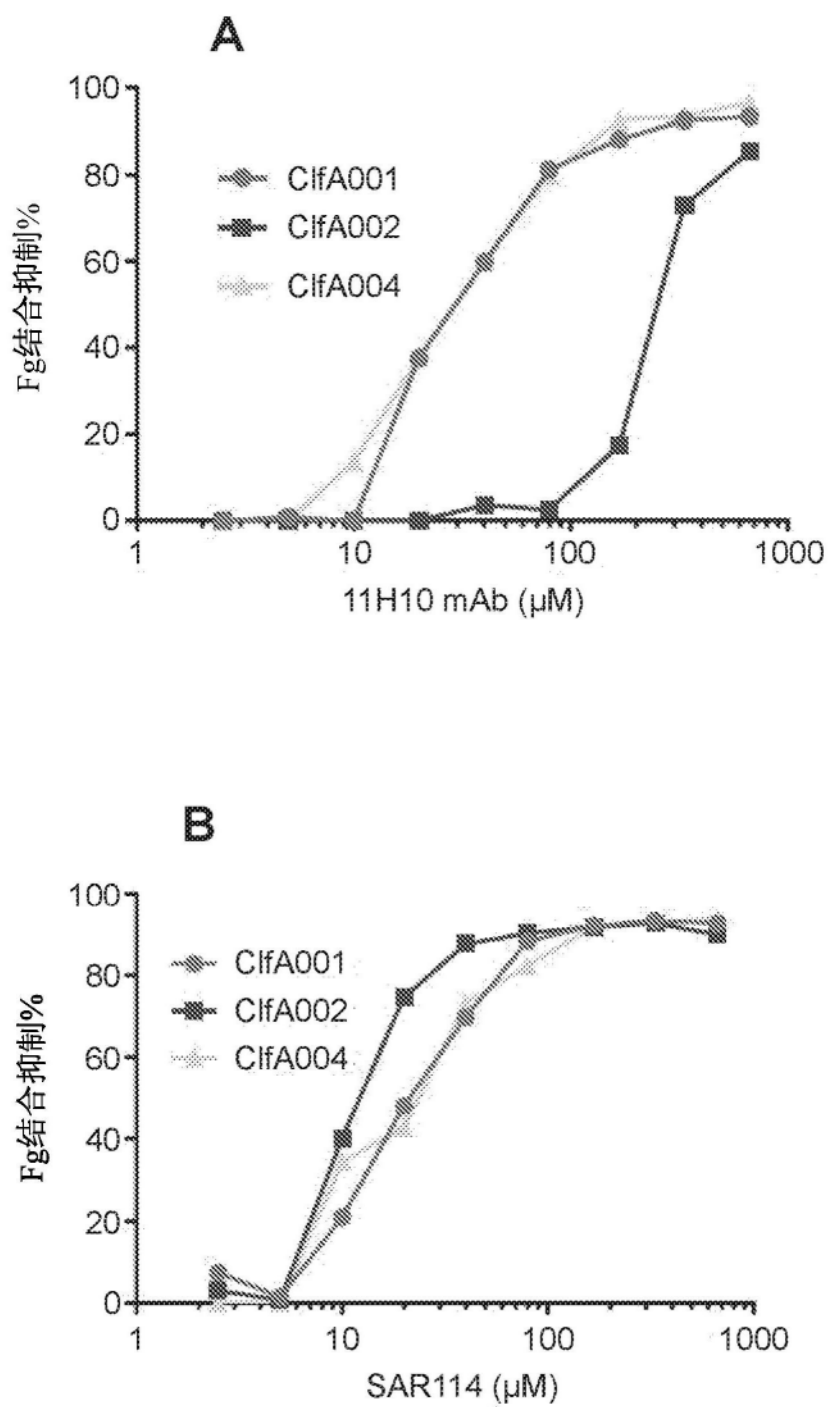


图1

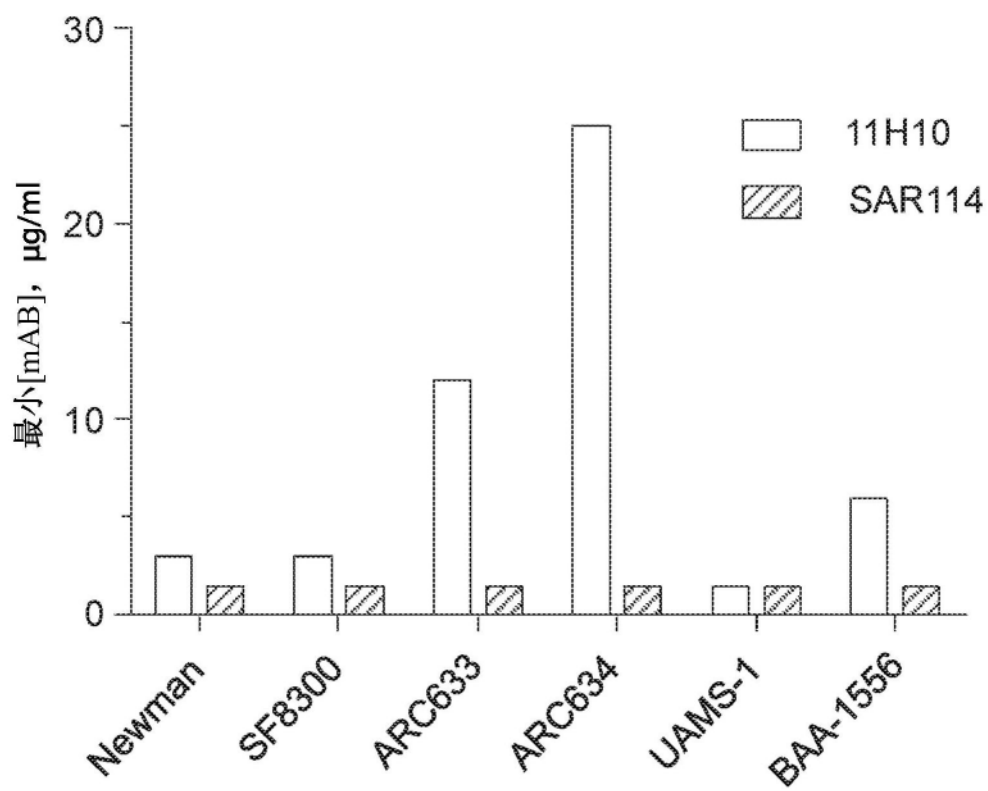


图2

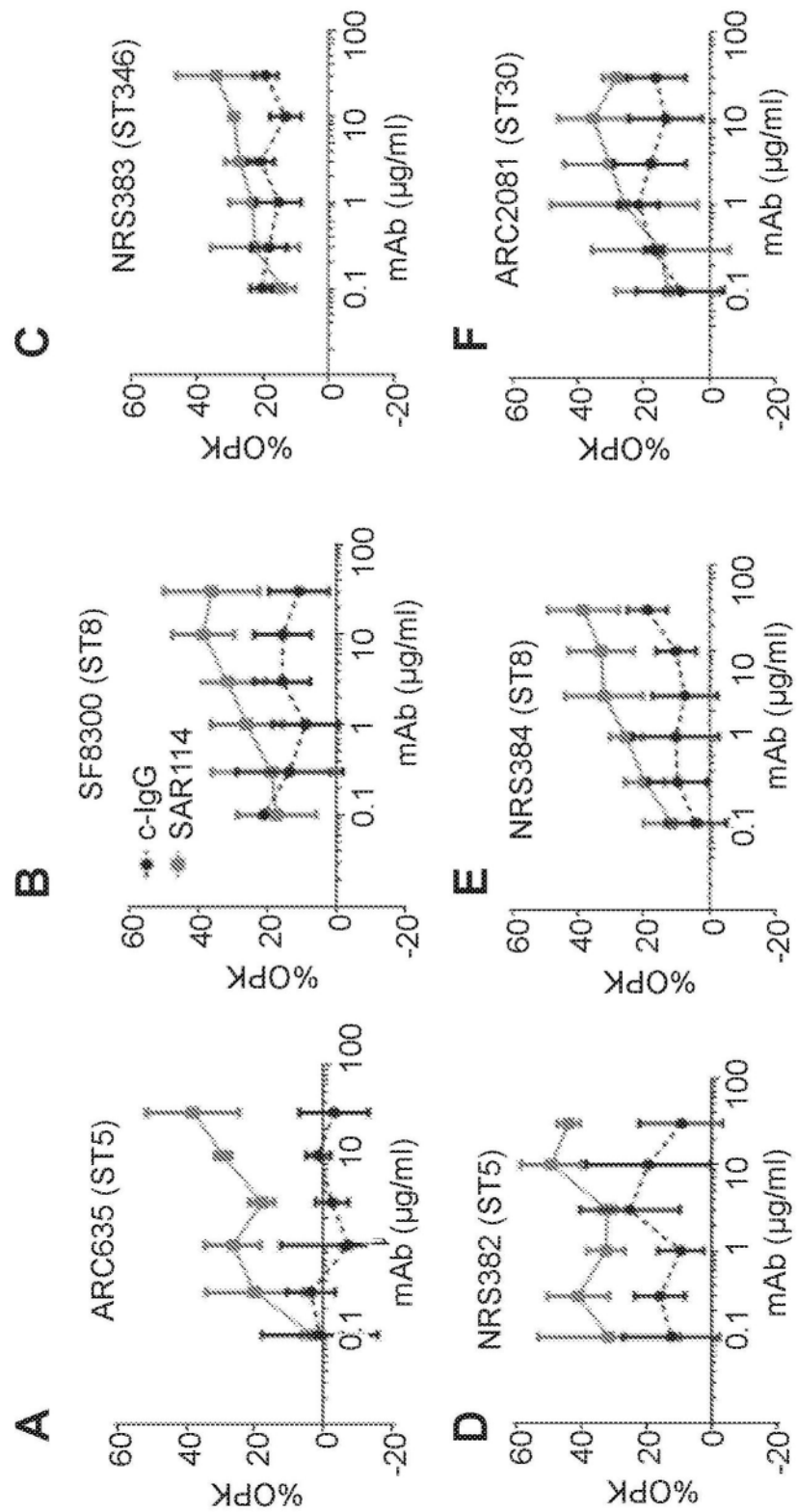


图3

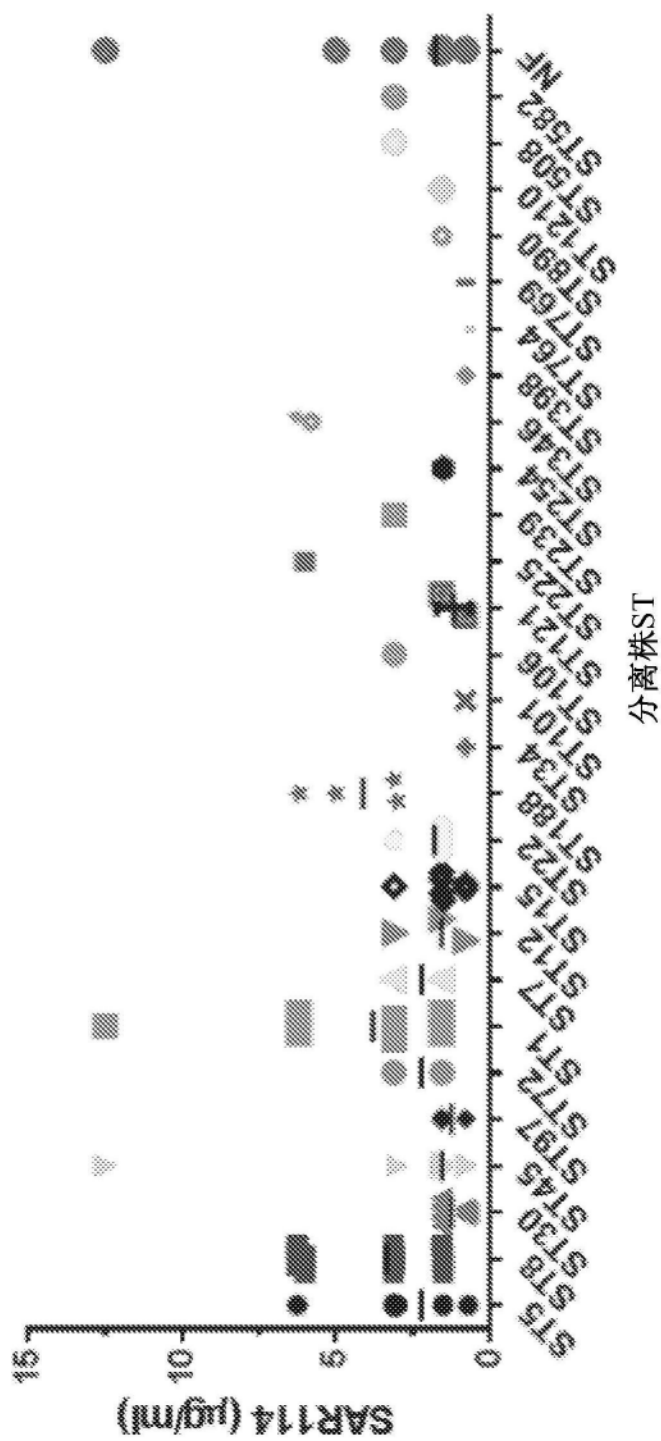


图4

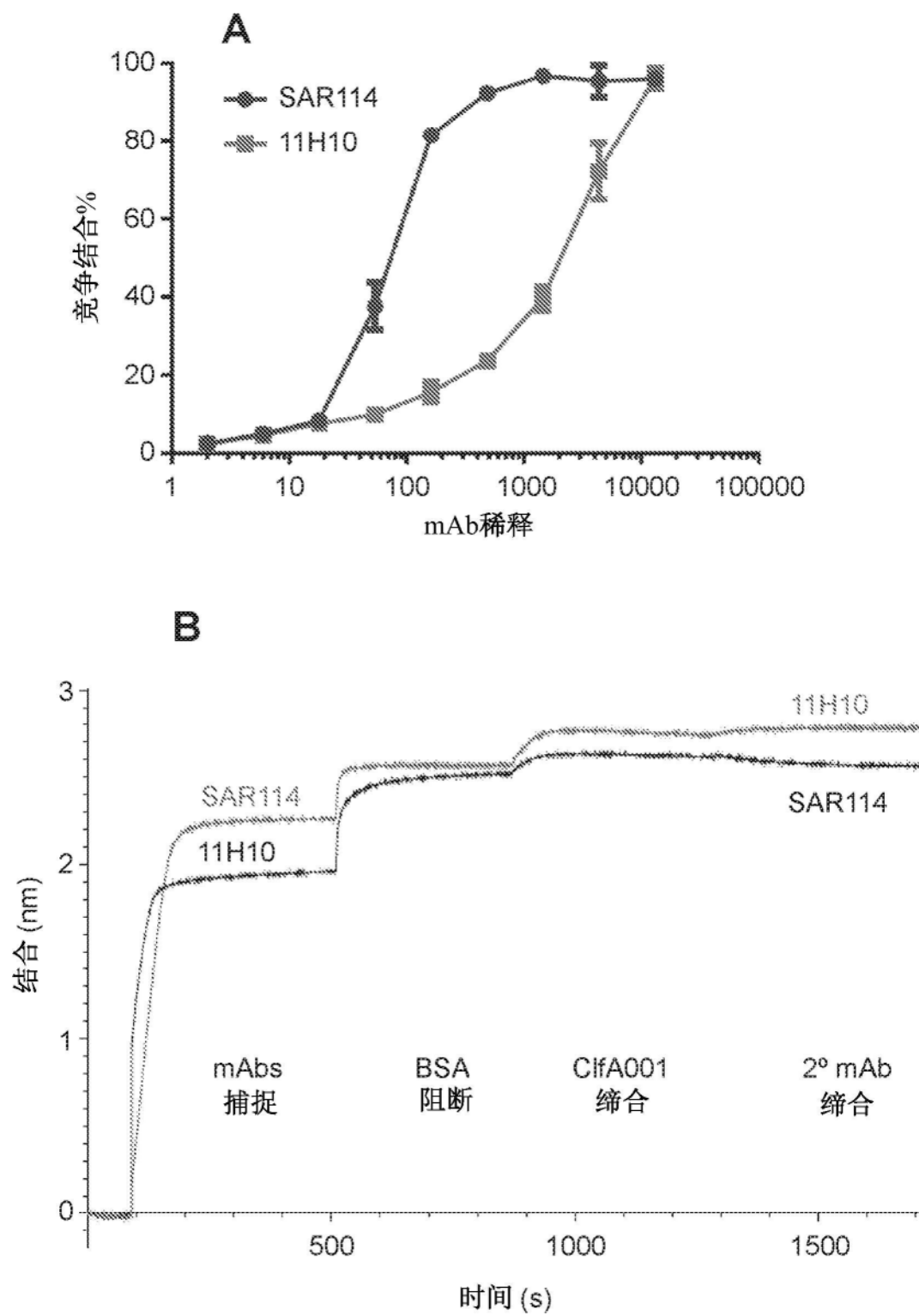


图5

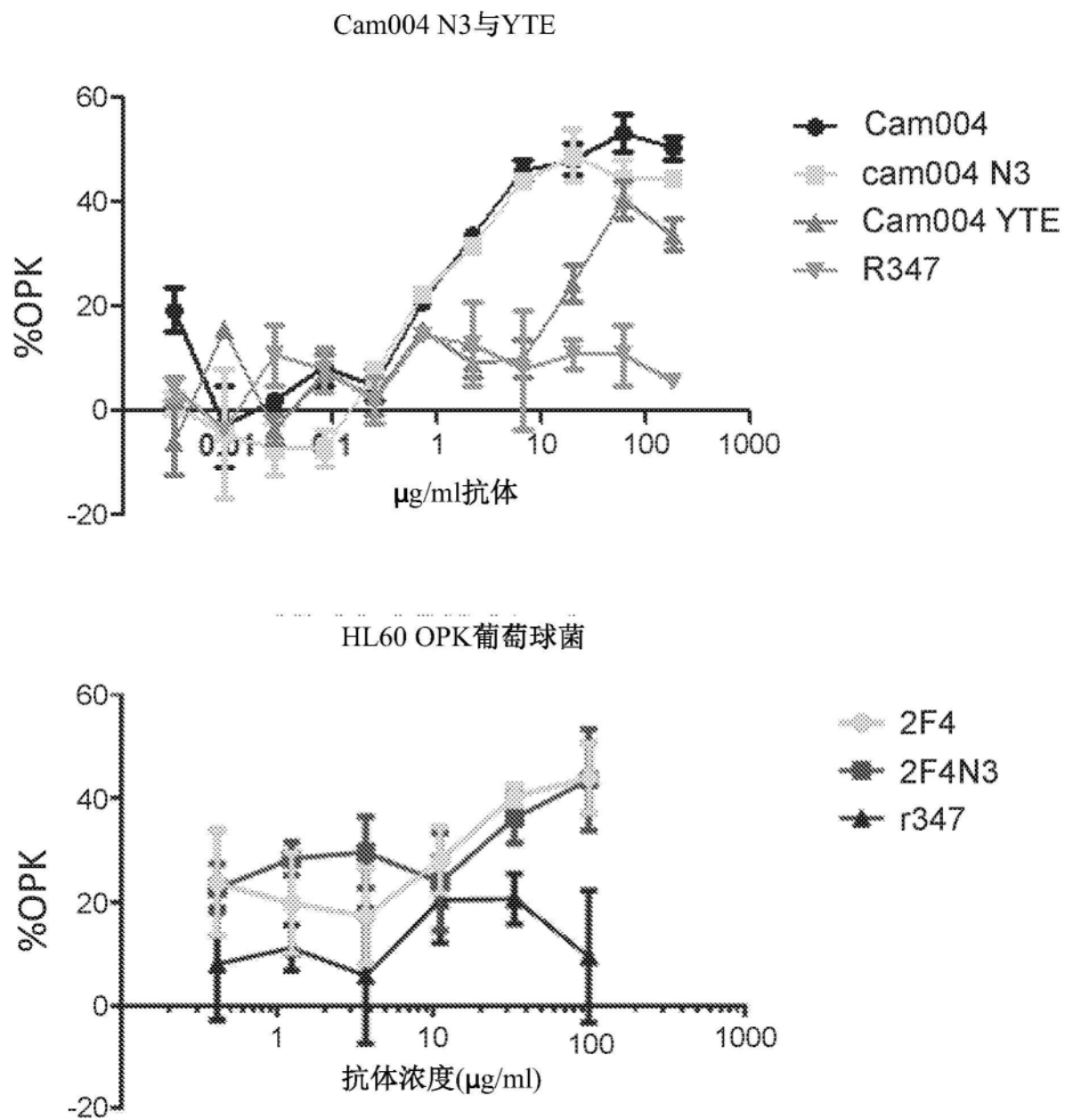


图6

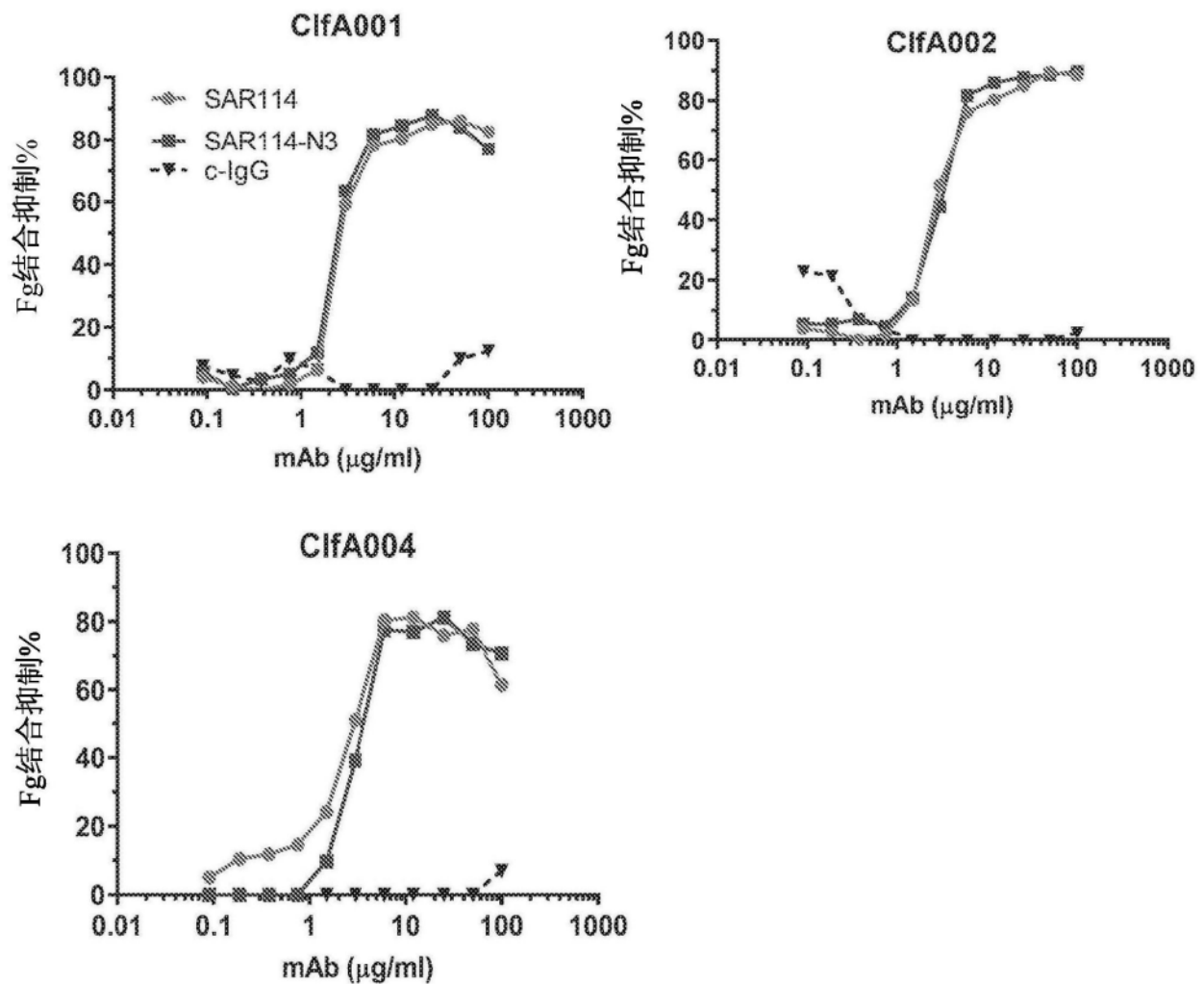


图7

		Fg IH		凝集 (ug/ml)		IC50 (μg/ml) 纤维蛋白原检定	
		IC50					
		(ug/ml)	SF8300	8989	8984		
N3F T0	A	9.946	2.5	0.6	0.6	N3F T0	9.946
N3Y T0	B	6.278	2.5	0.6	0.6	N3Y T0	6.278
N3F 1wk lux	C	19.89	2.5	0.6	0.6	1WK lux	19.89
N3Y 1WK lux	D	9.203	2.5	0.6	0.6	1WK lux	9.203
N3F 2wk lux	E	27.82	5	0.6	0.6	2WK lux	27.82
						2WK lux	12.69

图8

HFcRn小鼠中的血清抗体浓度

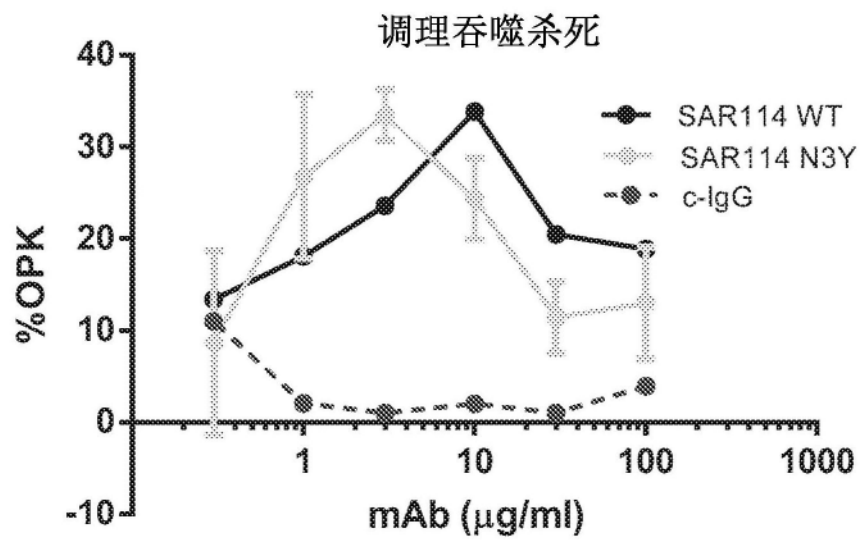
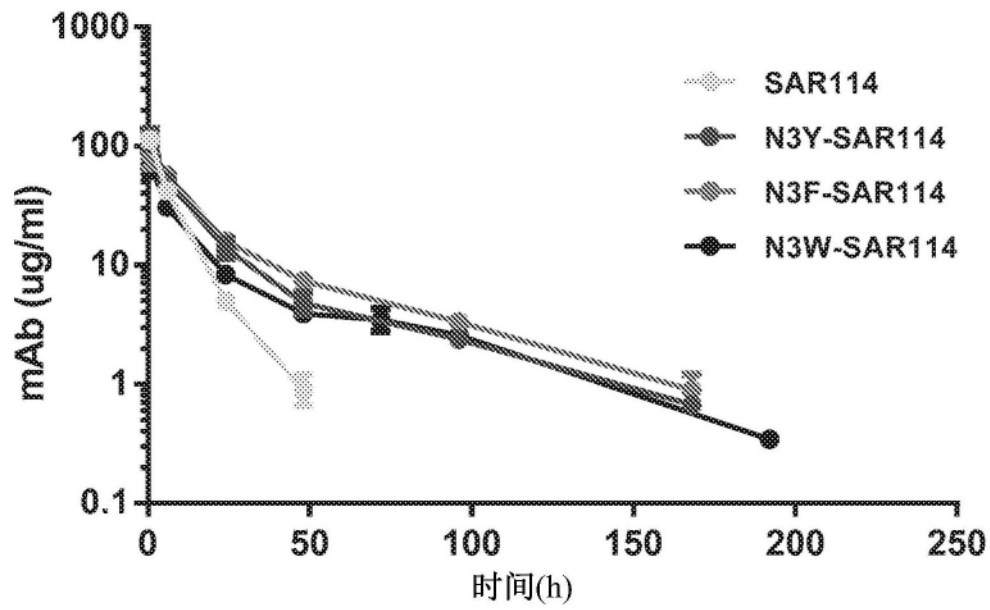


图9

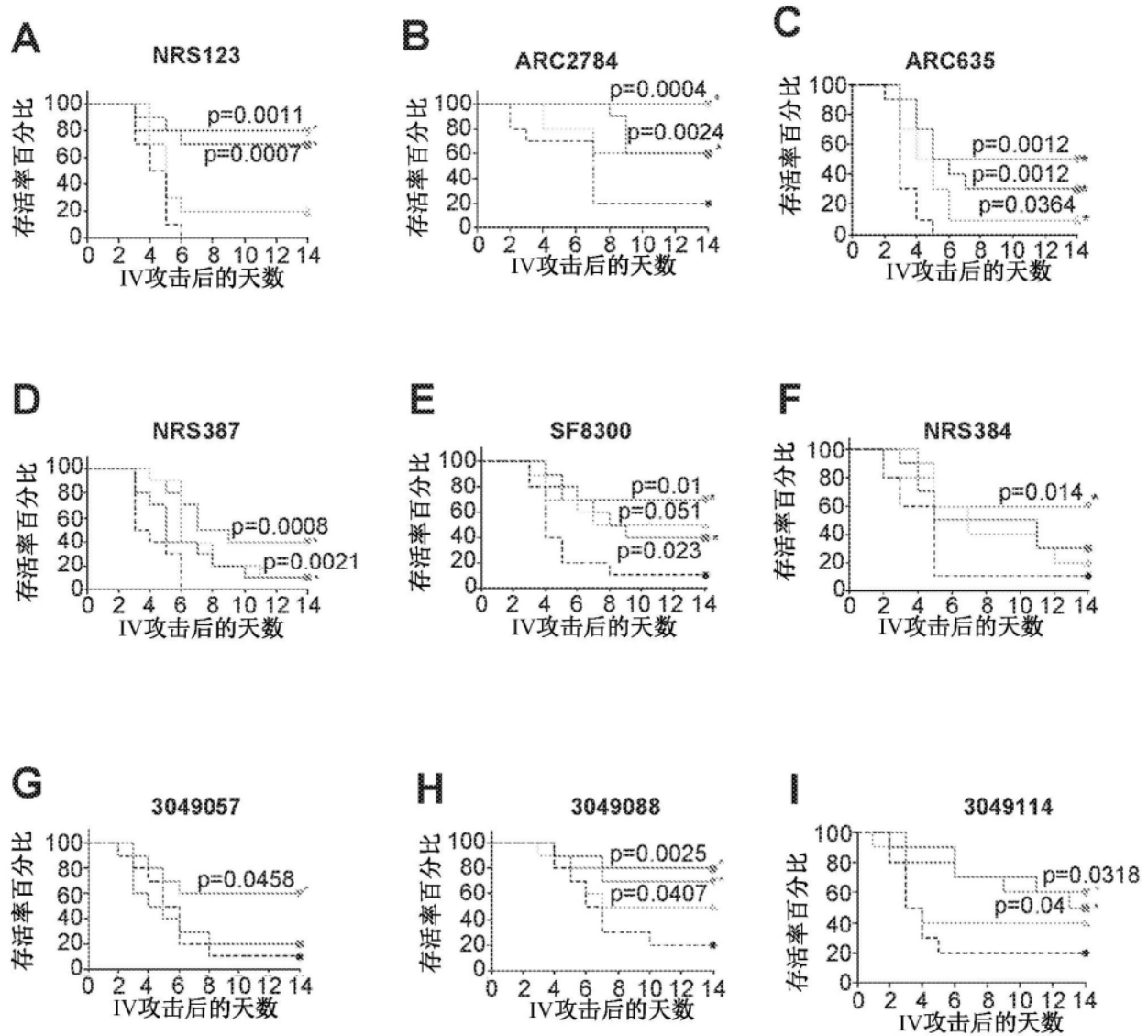


图10

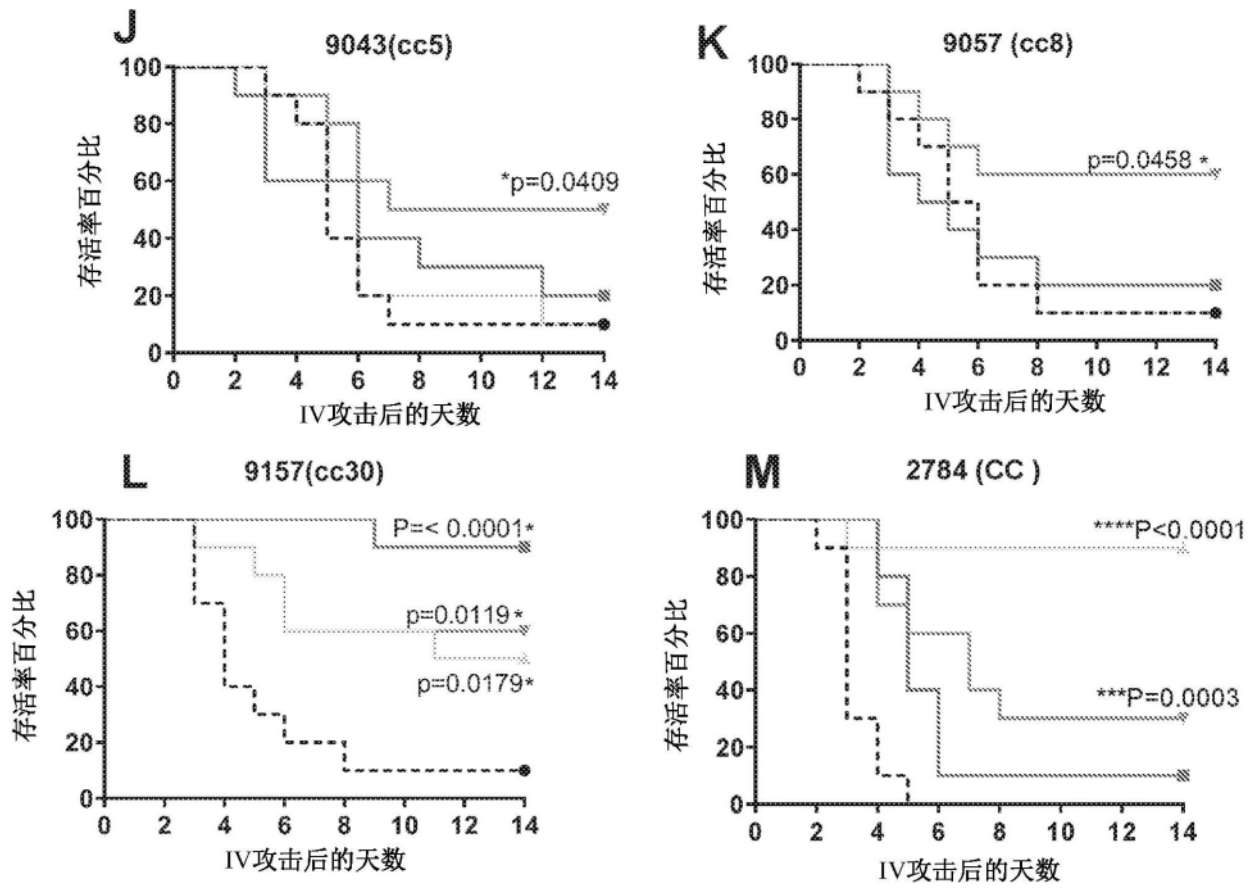


图10(续)

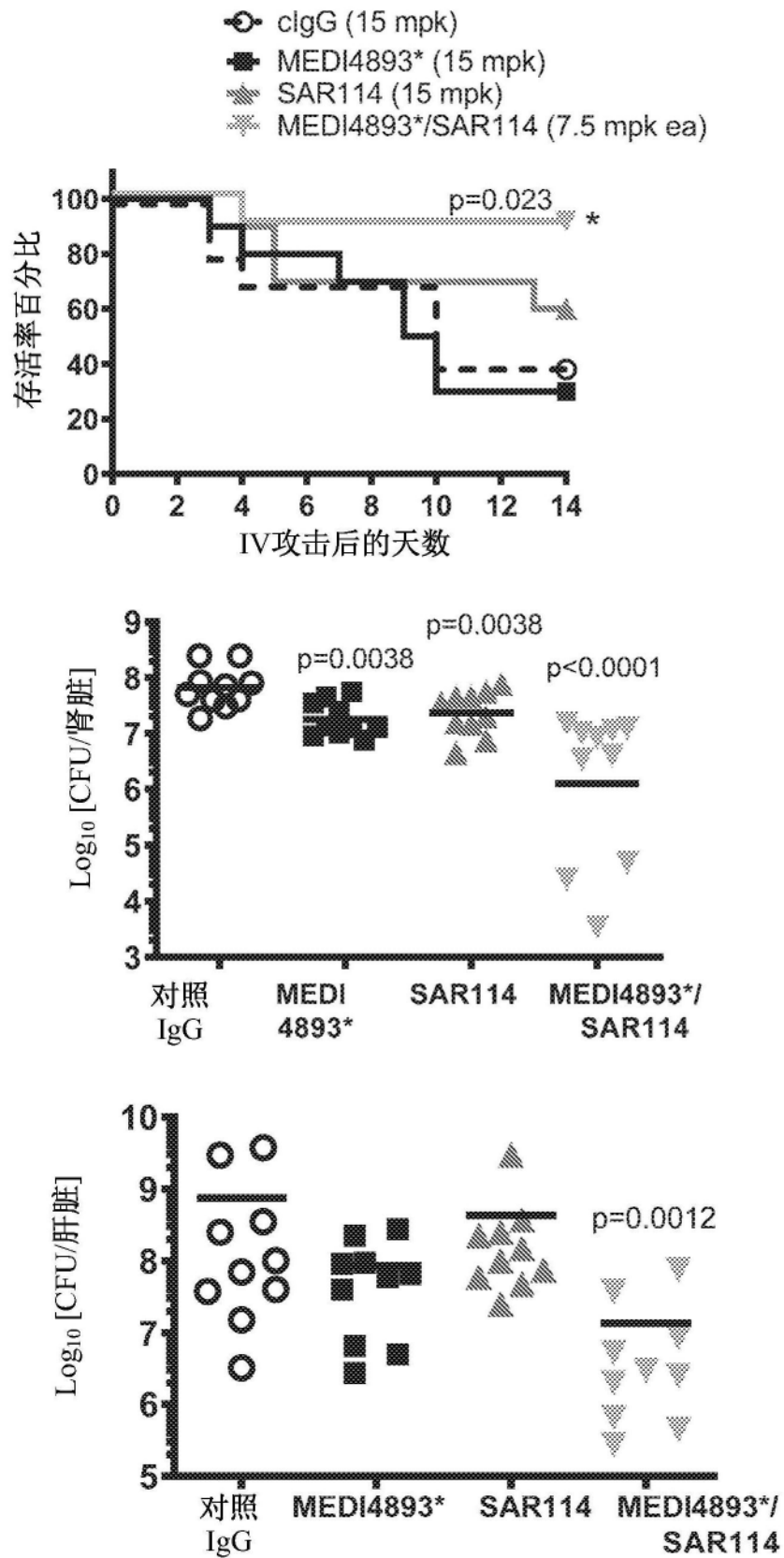


图11

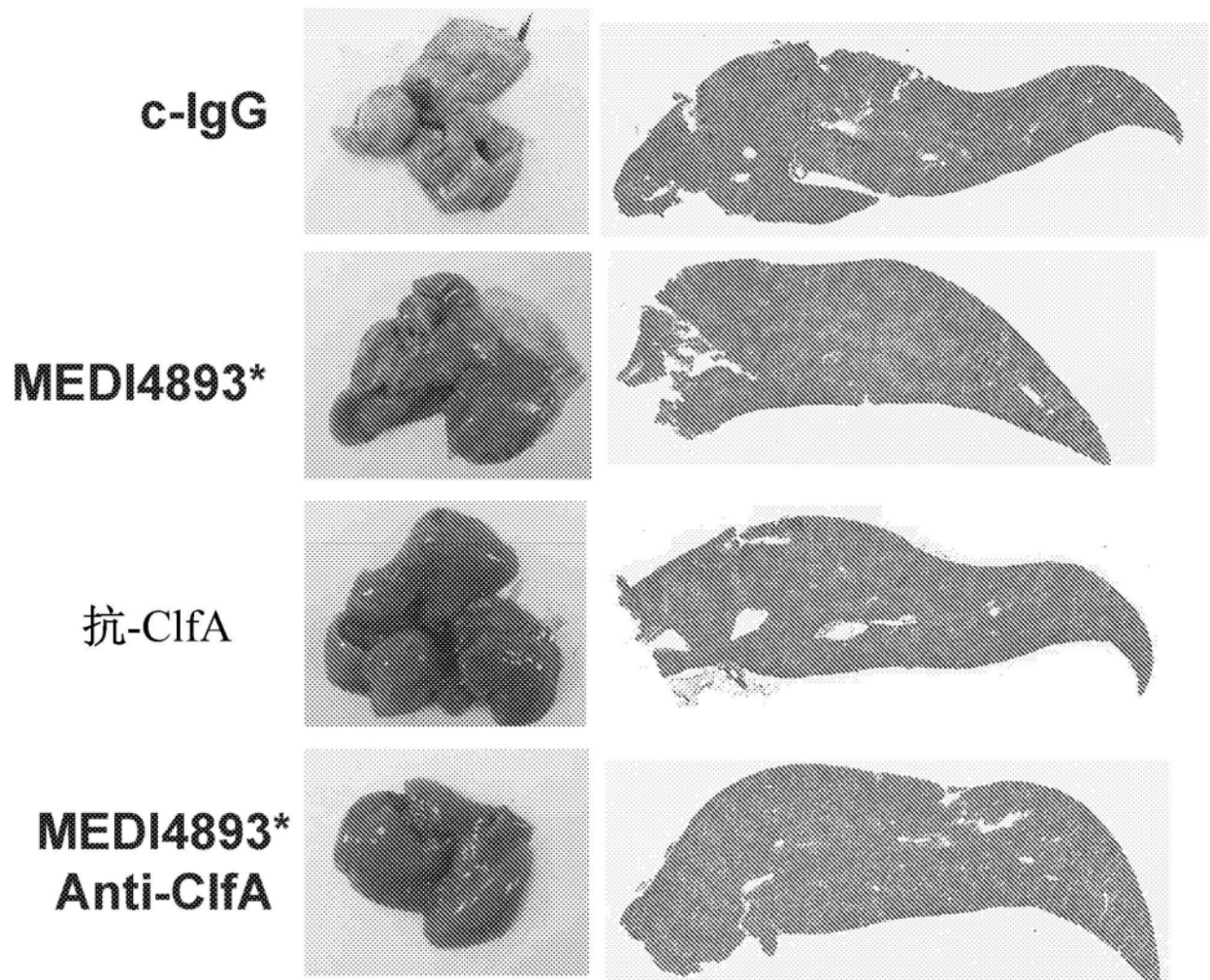


图12

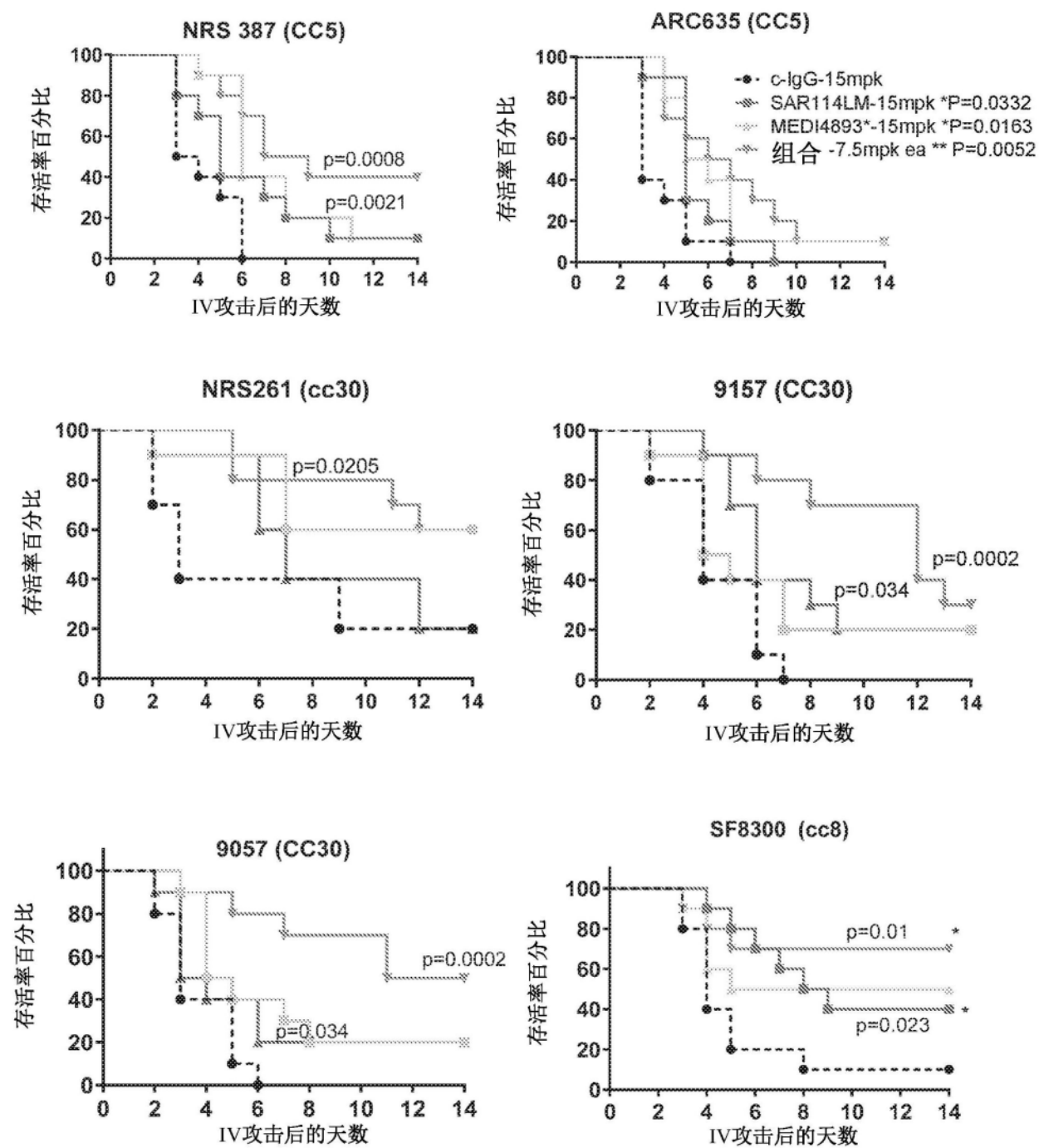


图13

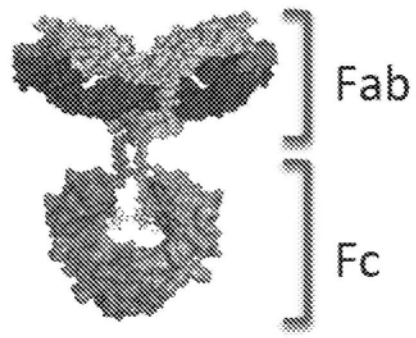
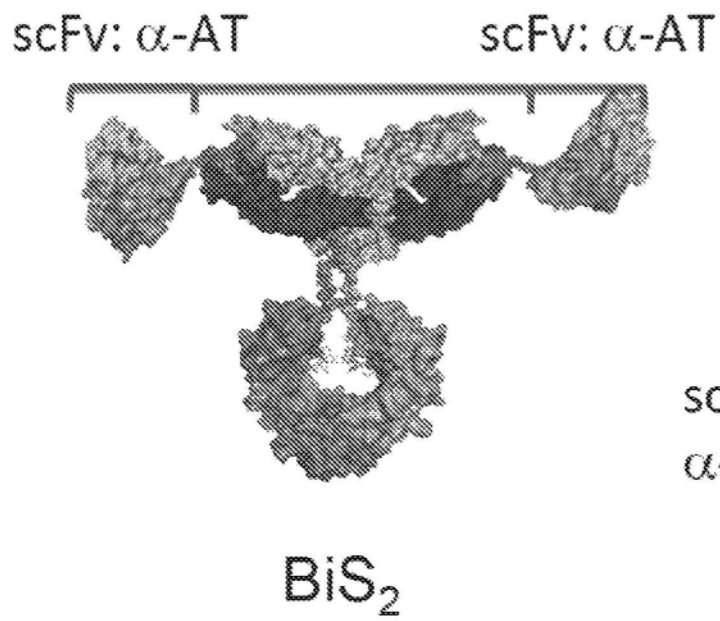
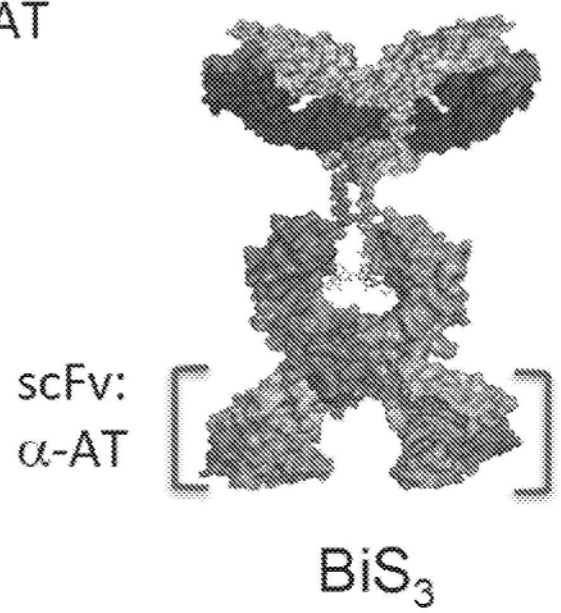
AIgG1 : α -ClfA**B****C**

图14

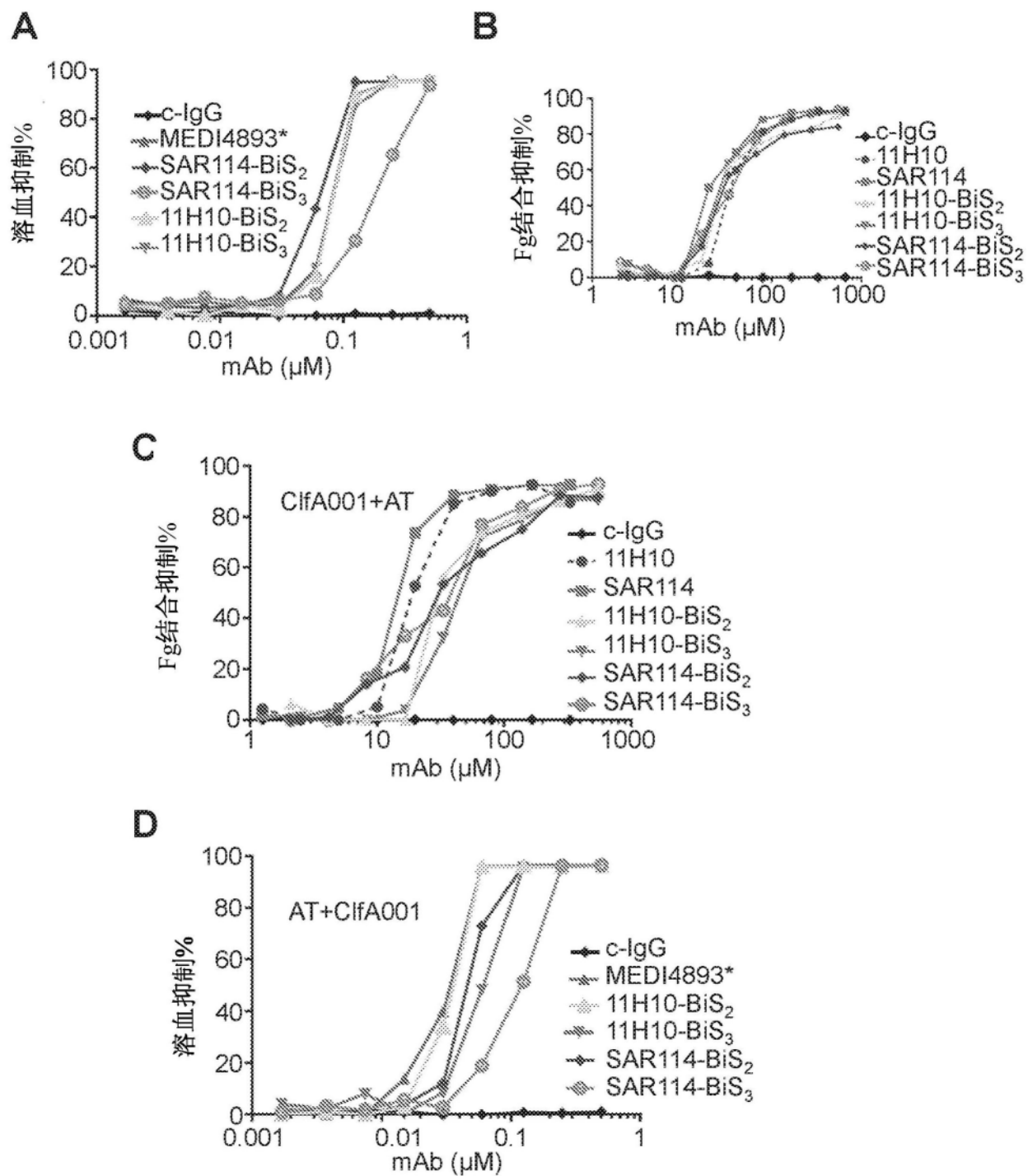


图15

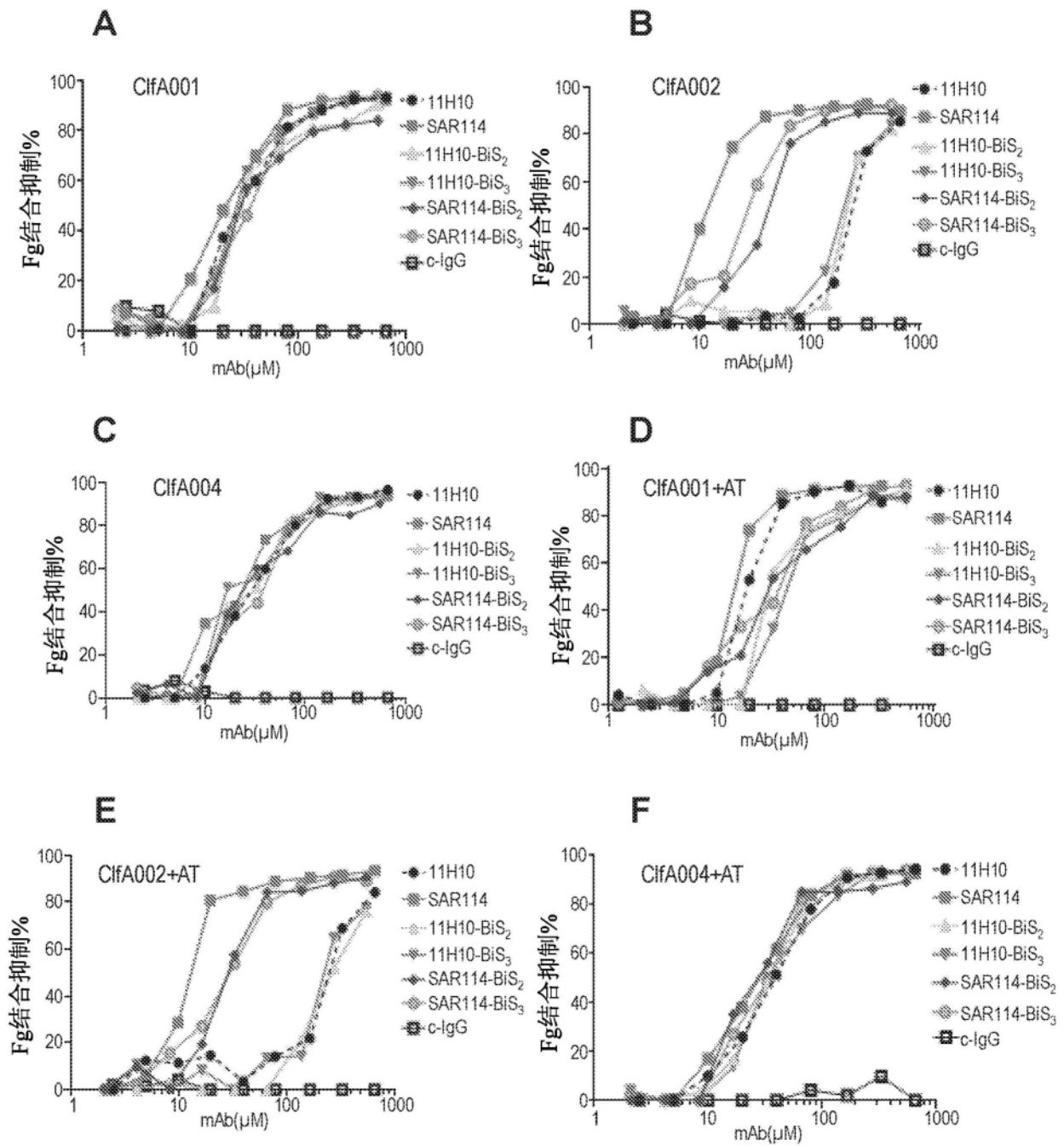


图16

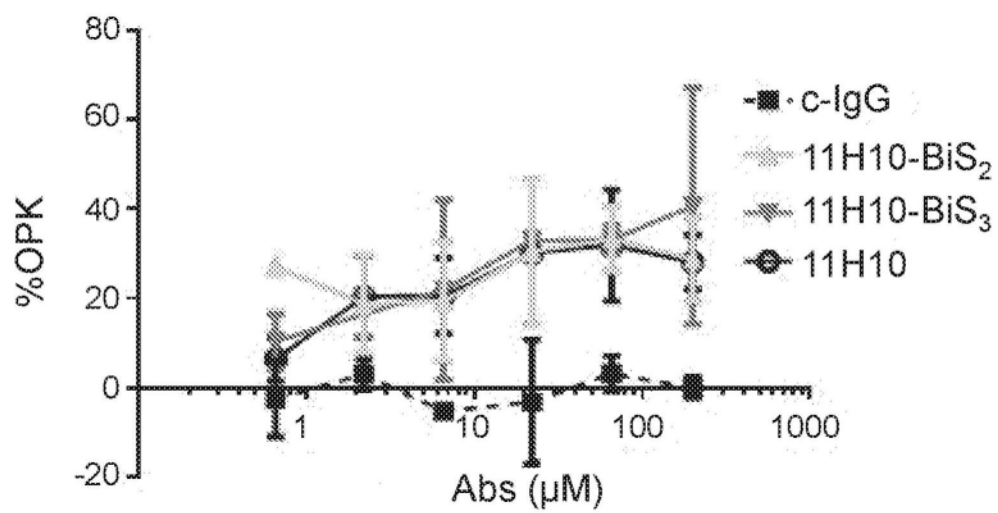
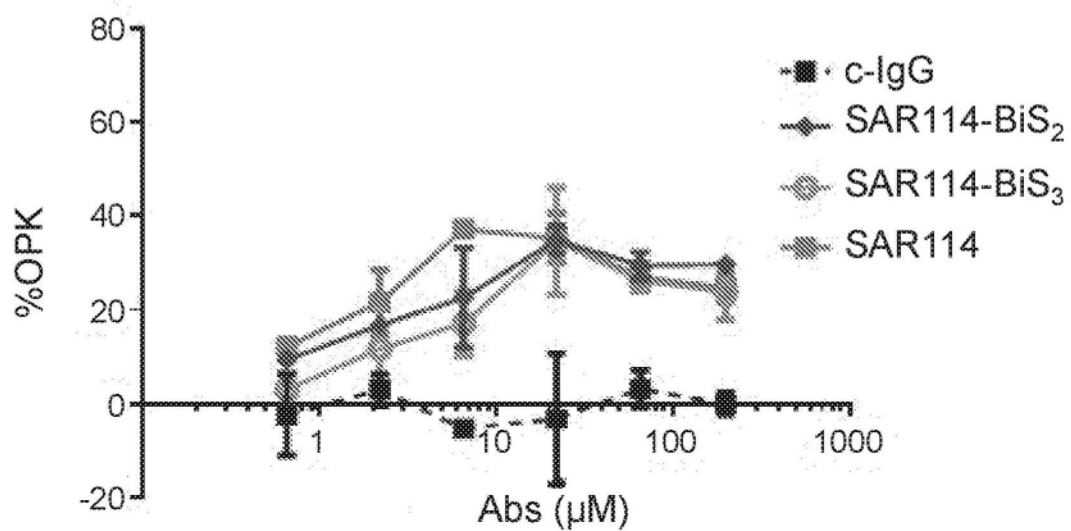
A**B**

图17

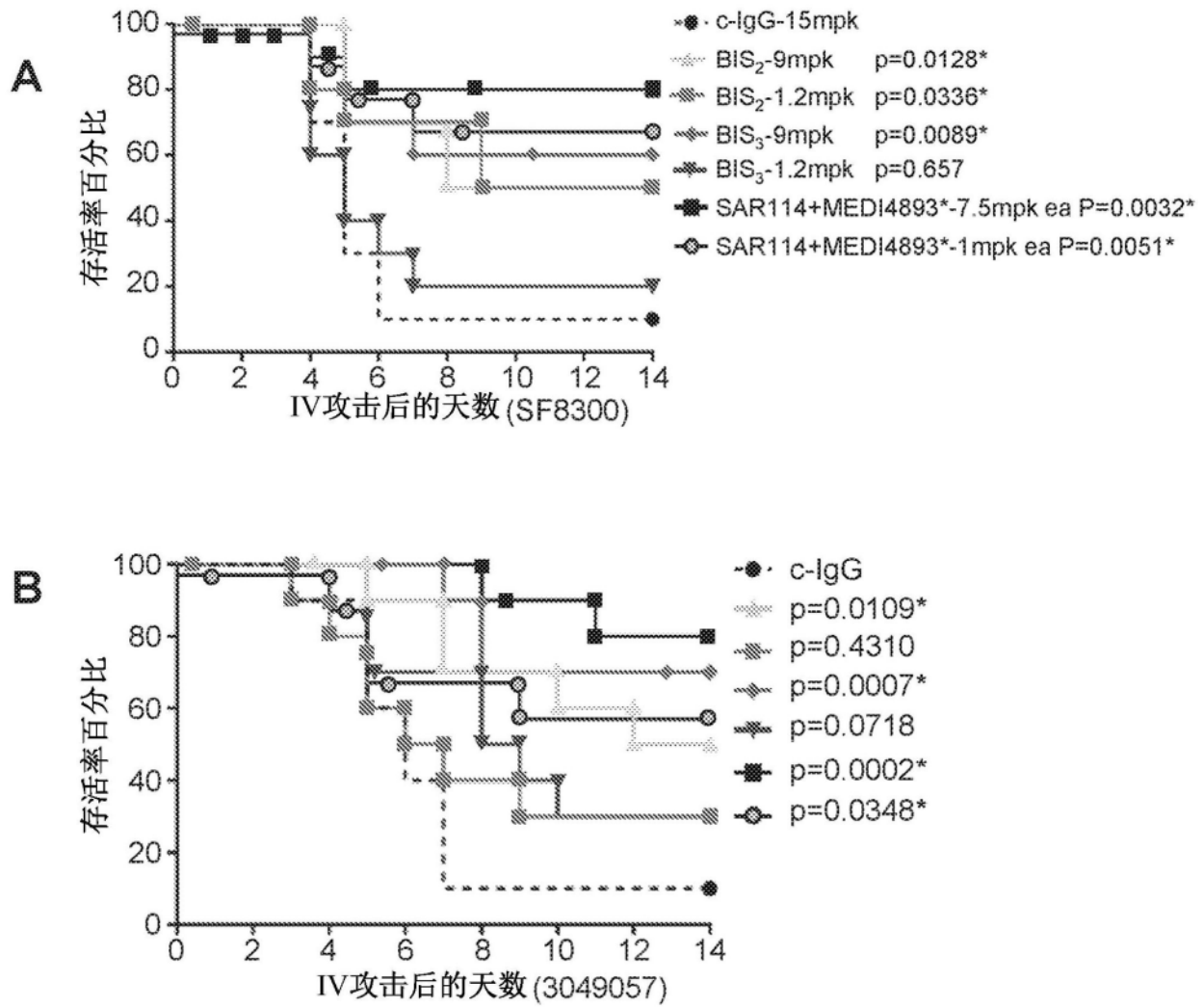


图18

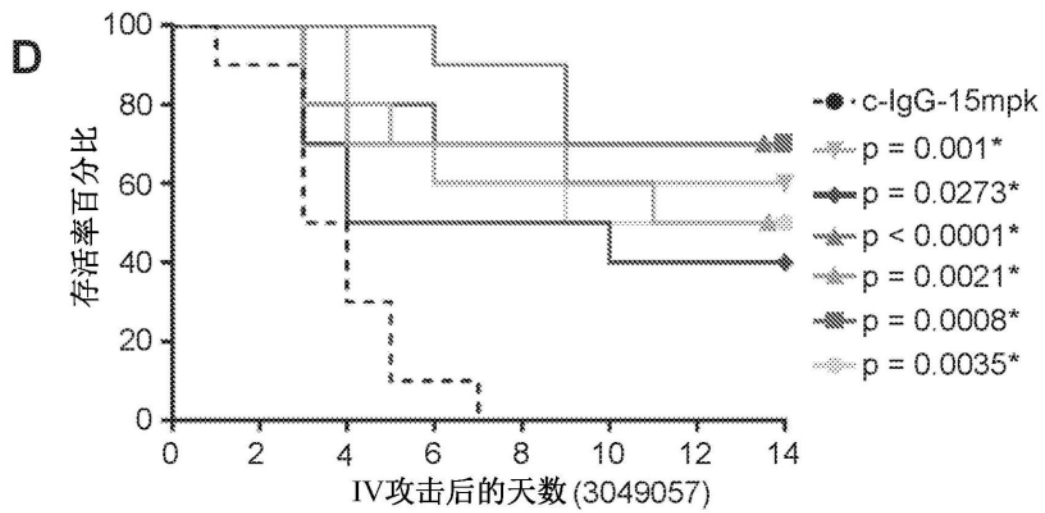
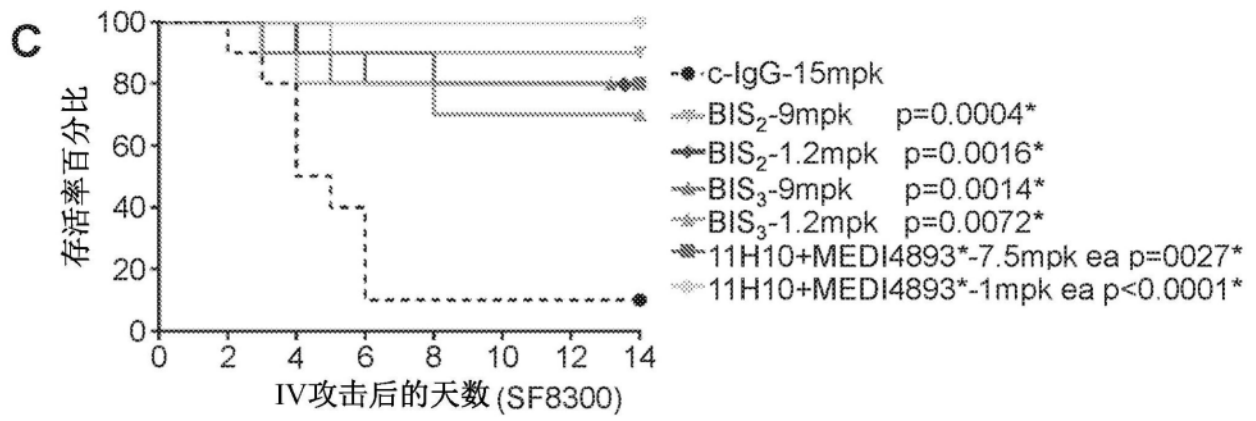


图18(续)

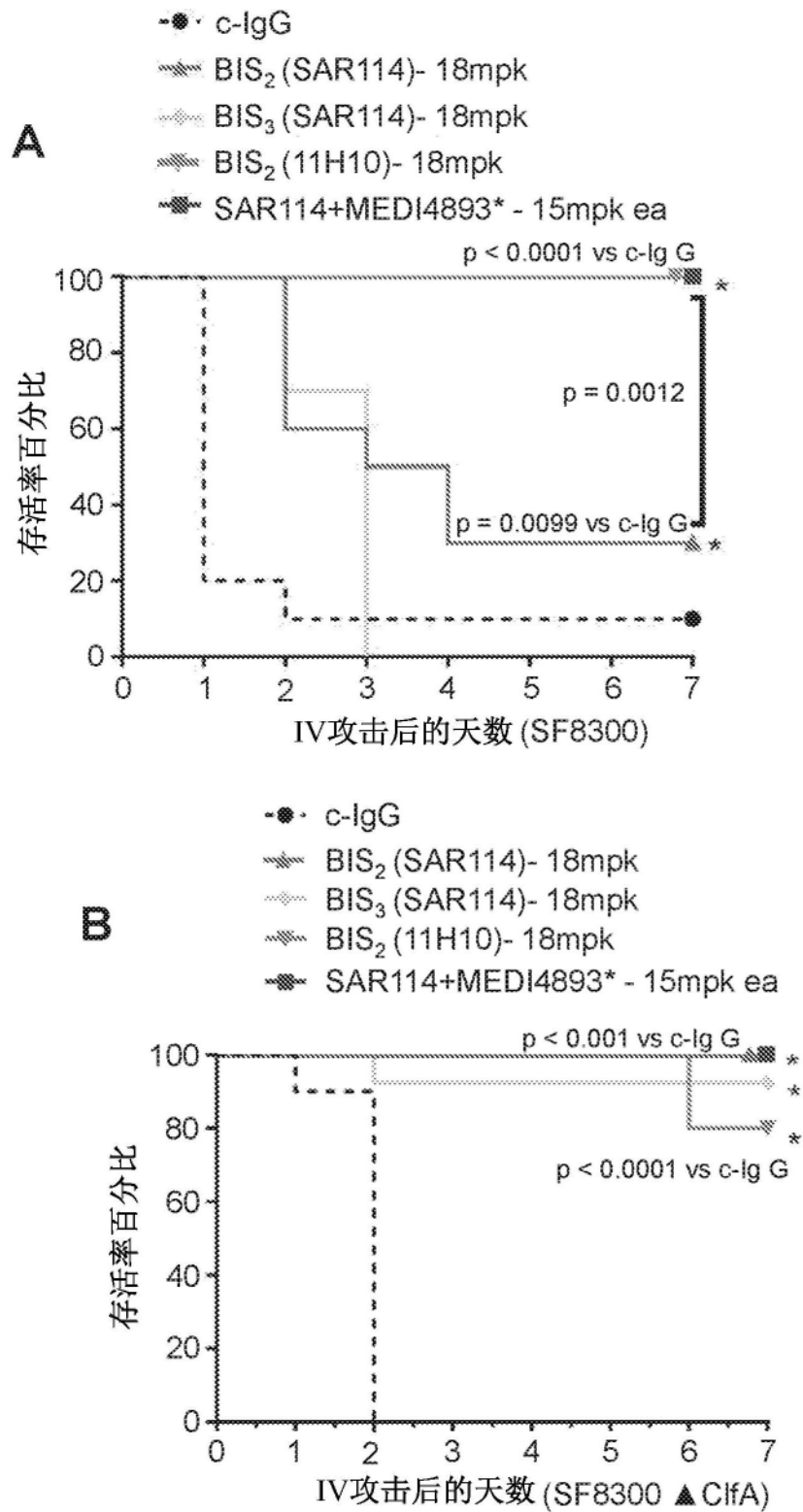


图19

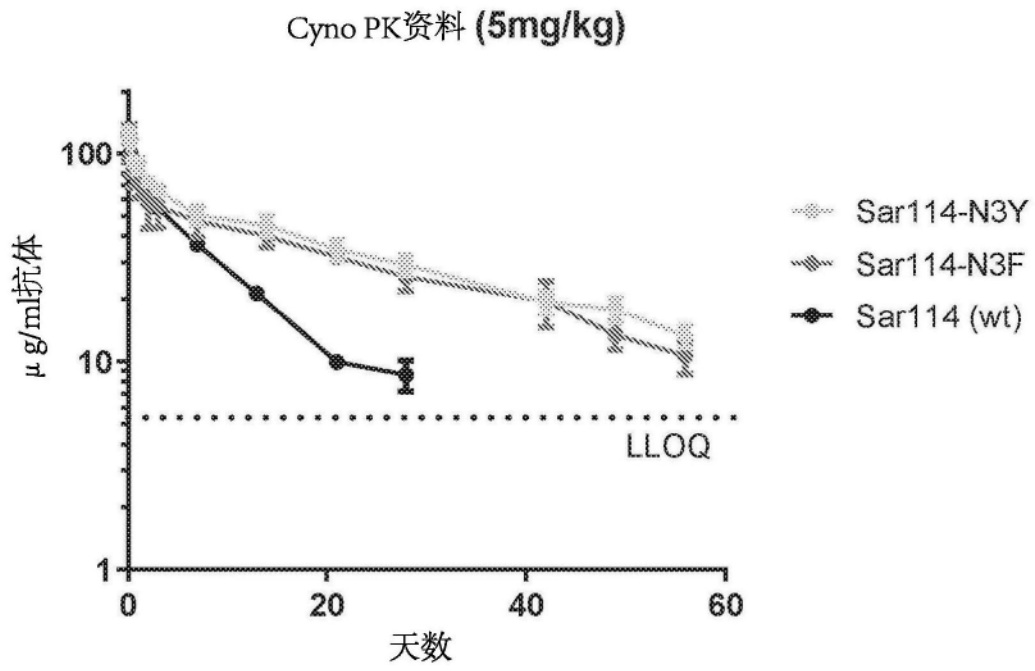


图20

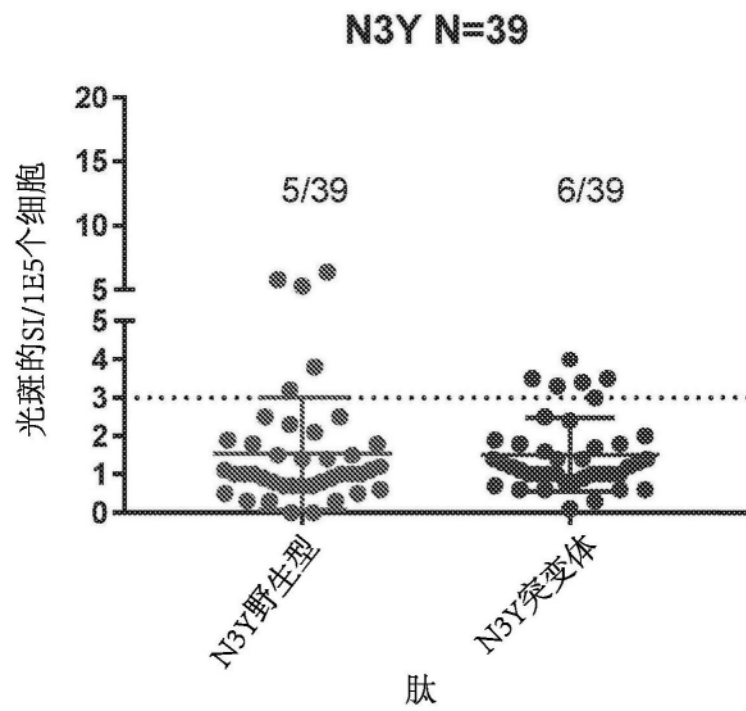


图21