



(12) 发明专利

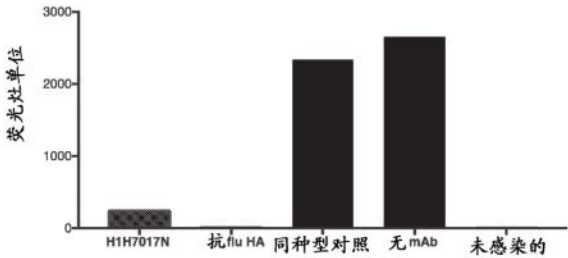
(10) 授权公告号 CN 111936517 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 18

(21) 申请号 201980021929.3	(72) 发明人 L·珀塞尔
(22) 申请日 2019.01.24	(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247 专利代理师 陈迎春 黄革生
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111936517 A	
(43) 申请公布日 2020.11.13	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(30) 优先权数据 62/622,292 2018.01.26 US	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.09.24	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2019/014978 2019.01.24	(56) 对比文件 CN 104244978 A,2014.12.24 WO 0204953 A2,2002.01.17
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/147831 EN 2019.08.01	审查员 顾瑜尉
(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司 地址 美国纽约州	权利要求书8页 说明书65页 序列表27页 附图4页

(54) 发明名称
抗TMPRSS2抗体和抗原结合片段

(57) 摘要
本发明包括与TMPRSS2特异性结合的抗体或其抗原结合片段和使用这类抗体和片段治疗或预防病毒性感染(例如,流感病毒感染)的方法。



1. 一种人抗原结合蛋白, 与人TMPRSS2特异性结合, 包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区:

所述免疫球蛋白重链可变区包含:

- (a) 由氨基酸序列G F T F S S Y G(SEQ ID NO:6)组成的CDR-H1,
- (b) 由氨基酸序列I W N D G S Y V(SEQ ID NO:8)组成的CDR-H2和
- (c) 由氨基酸序列A R E G E W V L Y Y F D Y(SEQ ID NO:10)组成的CDR-H3;和

所述免疫球蛋白轻链可变区包含:

- (a) 由氨基酸序列Q S I S S W(SEQ ID NO:12)组成的CDR-L1,
- (b) 由氨基酸序列K A S(SEQ ID NO:14)组成的CDR-L2和
- (c) 由氨基酸序列Q Q Y N S Y S Y T(SEQ ID NO:16)组成的CDR-L3。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 其是抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 包含:

(a) 免疫球蛋白重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列; 和

(b) 免疫球蛋白轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 包含:

(a) 免疫球蛋白重链, 其包含与SEQ ID NO:17或19中所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列; 和

(b) 免疫球蛋白轻链, 其包含与SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 包含:

- (a) 免疫球蛋白重链可变区, 其由SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列组成; 和
- (b) 免疫球蛋白轻链可变区, 其由SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 包含:

- (a) 由SEQ ID NO:17或19中所述的氨基酸序列组成的免疫球蛋白重链; 和
- (b) 由SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列组成的免疫球蛋白轻链。

7. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白, 其包含其免疫球蛋白链。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白, 其是多特异性的。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包含以下一个或多个特性:

- 抑制流感病毒在表达TMPRSS2的细胞中生长;
- 与表达TMPRSS2的细胞的表面结合;
- 不显著与不表达TMPRSS2的MDCK/Tet-on细胞结合;
- 在25°C以 2.81×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;
- 在37°C以 9.31×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;
- 在25°C以 5.60×10^{-8} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;
- 在37°C以 1.40×10^{-7} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;
- 在体外限制细胞的流感病毒感染扩散; 和/或
- 保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免于流感病毒感染所致的死亡。

10. 复合物, 包含与TMPRSS2多肽结合的根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白。

11. 编码根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链的多核苷酸。

12. 包含根据权利要求11所述的多核苷酸的载体。

13. 包含根据权利要求11所述的多核苷酸的宿主细胞。

14. 包含根据权利要求12所述的载体的宿主细胞。

15. 宿主细胞, 包括:

(a) 编码根据权利要求1所述的抗原结合蛋白的免疫球蛋白重链可变区的第一多核苷酸; 和

(b) 编码所述抗原结合蛋白的免疫球蛋白轻链可变区的第二多核苷酸。

16. 宿主细胞, 包括:

(a) 编码根据权利要求5所述的抗原结合蛋白的免疫球蛋白重链可变区的第一多核苷酸; 和

(b) 编码所述抗原结合蛋白的免疫球蛋白轻链可变区的第二多核苷酸。

17. 宿主细胞, 其包含:

(a) 编码根据权利要求6所述的抗原结合蛋白的免疫球蛋白重链的第一多核苷酸; 和

(b) 编码所述抗原结合蛋白的免疫球蛋白轻链的第二多核苷酸。

18. 产生特异性结合人TMPRSS2的抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链的方法, 包括:

(a) 在有利于表达所述一种或多种多核苷酸的条件下培养根据权利要求13-17中任一项所述的宿主细胞, 以生产抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链; 并且

(b) 任选地, 从所述宿主细胞和/或其中培育所述宿主细胞的培养基分离所述抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链。

19. 根据权利要求13-17中任一项所述的宿主细胞, 其中宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

21. 抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链, 其是根据权利要求18所述的方法的产物。

22. 组合物或套件, 包含与其他治疗剂联合的根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白。

23. 药物组合物, 包含根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白和可药用载体以及任选地其他治疗剂。

24. 根据权利要求22所述的组合物或套件, 其中所述其他治疗剂是抗病毒药物或疫苗。

25. 根据权利要求22所述的组合物或套件, 其中其他治疗剂是选自以下的成员: 雷迪帕韦、索非布韦、雷迪帕韦和索非布韦组合、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素- α 2b、干扰素- α 2a、抗癌药和与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

26. 根据权利要求25所述的组合物或套件, 其中所述与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段选自以下的抗体或其抗原结合片段:

H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N; H1H11704P;

H1H11711P;H1H11714P;H1H11717P;H1H11724P;H1H11727P;H1H11730P2;H1H11731P2;
H1H11734P2;H1H11736P2;H1H11742P2;H1H11744P2;H1H11745P2;H1H11747P2;H1H11748P2;
H1H17952B;H1H17953B;H1H17954B;H1H17955B;H1H17956B;H1H17957B;H1H17958B;
H1H17959B;H1H17960B;H1H17961B;H1H17962B;H1H17963B;H1H17964B;H1H17965B;
H1H17966B;H1H17967B;H1H17968B;H1H17969B;H1H17970B;H1H17971B;H1H17972B;
H1H17973B;H1H17974B;H1H17975B;H1H17976B;H1H17977B;H1H17978B;H1H17979B;
H1H17980B;H1H17981B;H1H17982B;H1H17983B;H1H17984B;H1H17985B;H1H17986B;
H1H17987B;H1H17988B;H1H17989B;H1H17990B;H1H17991B;H1H17992B;H1H17993B;
H1H17994B;H1H17995B;H1H17996B;H1H17997B;H1H17998B;H1H17999B;H1H18000B;
H1H18001B;H1H18002B;H1H18003B;H1H18004B;H1H18005B;H1H18006B;H1H18007B;
H1H18008B;H1H18009B;H1H18010B;H1H18011B;H1H18012B;H1H18013B;H1H18014B;
H1H18015B;H1H18016B;H1H18017B;H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;H1H18021B;
H1H18022B;H1H18023B;H1H18024B;H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;H1H18028B;
H1H18029B;H1H18030B;H1H18031B;H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;
H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;
H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;
H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;
H1H18059B;H1H18060B;

H1H18061B;H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;
H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;H1H18070B;
H1H18071B;H1H18072B;H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;
H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;H1H18080B;
H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;
H1H18086B;H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;
H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;H1H18094B;H1H18095B;
H1H18096B;H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;
H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;H1H18105B;
H1H18107B;H1H18108B;H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;
H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;H1H18116B;
H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;
H1H18122B;H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;
H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;H1H18130B;H1H18131B;
H1H18132B;H1H18133B;H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;
H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;H1H18141B;
H1H18142B;H1H18143B;H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;
H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;H1H18151B;
H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;
H1H18157B;H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;
H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;H1H18165B;H1H18166B;

H1H18167B;H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;
H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;H1H18176B;
H1H18177B;H1H18178B;H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;
H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;H1H18186B;
H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;
H1H18192B;H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;
H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;
H1H18202B;H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;
H1H18209B;H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;
H1H18217B;H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;
H1H18224B;H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;
H1H18231B;H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;
H1H18238B;H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;
H1H18245B;H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;
H1H18252B;H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;
H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;
H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;
H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;
H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;
H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;
H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;
H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;
H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;
H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;
H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;
H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B;和H1H18335B。

27. 根据权利要求23所述的药物组合物,其中所述其他治疗剂是抗病毒药物或疫苗。

28. 根据权利要求23所述的药物组合物,其中所述其他治疗剂是选自以下的成员:雷迪帕韦、索非布韦、雷迪帕韦和索非布韦组合、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素- α 2b、干扰素- α 2a、抗癌药和与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

29. 根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段选自以下的抗体或其抗原结合片段:H1H14611N2;H1H14612N2;H1H11723P;
H1H11729P;H1H11820N;H1H11829N;H1H11829N2;H2aM11829N;H2M11830N;H1H11830N2;
H1H11903N;H1H14571N;H2a14571N;H1H11704P;H1H11711P;H1H11714P;H1H11717P;
H1H11724P;H1H11727P;H1H11730P2;H1H11731P2;H1H11734P2;H1H11736P2;H1H11742P2;
H1H11744P2;H1H11745P2;H1H11747P2;H1H11748P2;H1H17952B;H1H17953B;H1H17954B;
H1H17955B;H1H17956B;H1H17957B;H1H17958B;H1H17959B;H1H17960B;H1H17961B;
H1H17962B;H1H17963B;H1H17964B;H1H17965B;H1H17966B;H1H17967B;H1H17968B;
H1H17969B;H1H17970B;H1H17971B;H1H17972B;H1H17973B;H1H17974B;H1H17975B;

H1H17976B;H1H17977B;H1H17978B;H1H17979B;H1H17980B;H1H17981B;H1H17982B;
H1H17983B;H1H17984B;H1H17985B;H1H17986B;H1H17987B;H1H17988B;H1H17989B;
H1H17990B;H1H17991B;H1H17992B;H1H17993B;H1H17994B;H1H17995B;H1H17996B;
H1H17997B;H1H17998B;H1H17999B;H1H18000B;H1H18001B;H1H18002B;H1H18003B;
H1H18004B;H1H18005B;H1H18006B;H1H18007B;H1H18008B;H1H18009B;H1H18010B;
H1H18011B;H1H18012B;H1H18013B;H1H18014B;H1H18015B;H1H18016B;H1H18017B;
H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;H1H18021B;H1H18022B;H1H18023B;H1H18024B;
H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;H1H18028B;H1H18029B;H1H18030B;H1H18031B;
H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;
H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;
H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;
H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;H1H18059B;H1H18060B;H1H18061B;
H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;
H1H18069B;H1H18070B;H1H18071B;H1H18072B;H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;
H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;H1H18080B;H1H18081B;H1H18082B;
H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;H1H18086B;H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;
H1H18090B;H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;H1H18094B;H1H18095B;H1H18096B;
H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;
H1H18104B;H1H18105B;H1H18107B;H1H18108B;H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;
H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;H1H18116B;H1H18117B;H1H18118B;
H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;H1H18122B;H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;
H1H18126B;H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;H1H18130B;H1H18131B;H1H18132B;
H1H18133B;H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;
H1H18140B;H1H18141B;H1H18142B;H1H18143B;H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;
H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;H1H18151B;H1H18152B;H1H18153B;
H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;H1H18157B;H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;
H1H18161B;H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;H1H18165B;H1H18166B;H1H18167B;
H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;
H1H18175B;H1H18176B;H1H18177B;H1H18178B;H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;
H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;H1H18186B;H1H18187B;H1H18188B;
H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;H1H18192B;H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;
H1H18196B;H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;
H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;
H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;
H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;
H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;
H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;
H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;
H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;

H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B;和H1H18335B。

30. 容器或注射装置, 包含根据权利要求1-7中任一项所述的抗原结合蛋白或其免疫球蛋白链。

31. 根据权利要求1-7任一项所述的抗原结合蛋白在制备用于治疗或预防有需求的受试者中流感病毒感染的药物中的用途。

32. 根据权利要求31所述的用途, 其中向受试者施用一种或多种其他治疗剂。

33. 根据权利要求32所述的用途, 其中一种或多种其他治疗剂是抗病毒药物或疫苗。

34. 根据权利要求31所述的用途, 其中向受试者施用一种或多种其他治疗剂, 所述其他治疗剂是选自以下的成员: 雷迪帕韦、索非布韦、雷迪帕韦和索非布韦组合、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素- α 2b、干扰素- α 2a和与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

35. 根据权利要求34所述的用途, 其中所述与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段选自以下的抗体或其抗原结合片段: H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2; H1H17952B; H1H17953B; H1H17954B; H1H17955B; H1H17956B; H1H17957B; H1H17958B; H1H17959B; H1H17960B; H1H17961B; H1H17962B; H1H17963B; H1H17964B; H1H17965B; H1H17966B; H1H17967B; H1H17968B; H1H17969B; H1H17970B; H1H17971B; H1H17972B; H1H17973B; H1H17974B; H1H17975B; H1H17976B; H1H17977B; H1H17978B; H1H17979B; H1H17980B; H1H17981B; H1H17982B; H1H17983B; H1H17984B; H1H17985B; H1H17986B; H1H17987B; H1H17988B; H1H17989B; H1H17990B; H1H17991B; H1H17992B; H1H17993B; H1H17994B; H1H17995B; H1H17996B; H1H17997B; H1H17998B; H1H17999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B; H1H18015B; H1H18016B; H1H18017B; H1H18018B; H1H18019B; H1H18020B; H1H18021B; H1H18022B; H1H18023B; H1H18024B; H1H18025B; H1H18026B; H1H18027B; H1H18028B; H1H18029B; H1H18030B; H1H18031B; H1H18032B;

H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;
H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;
H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;
H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;H1H18059B;H1H18060B;H1H18061B;H1H18062B;
H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;
H1H18070B;H1H18071B;H1H18072B;H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;H1H18076B;
H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;H1H18080B;H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;
H1H18084B;H1H18085B;H1H18086B;H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;
H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;H1H18094B;H1H18095B;H1H18096B;H1H18097B;
H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;
H1H18105B;H1H18107B;H1H18108B;H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;H1H18112B;
H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;H1H18116B;H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;
H1H18120B;H1H18121B;H1H18122B;H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;
H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;H1H18130B;H1H18131B;H1H18132B;H1H18133B;
H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;
H1H18141B;H1H18142B;H1H18143B;H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;H1H18147B;
H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;H1H18151B;H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;
H1H18155B;H1H18156B;H1H18157B;H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;
H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;H1H18165B;H1H18166B;H1H18167B;H1H18168B;
H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;
H1H18176B;H1H18177B;H1H18178B;H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;H1H18182B;
H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;H1H18186B;H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;
H1H18190B;H1H18191B;H1H18192B;H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;
H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;H1H18203B;
H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;H1H18210B;
H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;H1H18218B;
H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;H1H18225B;
H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;H1H18232B;
H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;H1H18239B;
H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;H1H18246B;
H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;H1H18253B;
H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;
H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;
H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;
H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;
H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;
H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;
H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;
H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;

H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;
H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;
H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;
H1H18334B;和H1H18335B。

抗TMPRSS2抗体和抗原结合片段

[0001] 本申请要求2018年1月26日提交的美国临时专利申请号62/622,292的权益,所述文献通过引用的方式完整并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及与TMPRSS2特异性结合的抗体和抗原结合片段和用所述抗体和片段治疗或预防病毒性感染的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 流感病毒已经对目前使用的靶向病毒神经氨酸酶(NA)或离子通道蛋白-基质蛋白2(M2)的药物获得性耐药。耐药的出现凸显形成新抗病毒策略的必要。宿主细胞打靶可以减少或避免逃逸突变体的出现,但可能因广泛表达而产生“陷阱”并带来对毒性的顾虑。已经显示多种呼吸道病毒融合蛋白需要受宿主蛋白酶剪切以激活(Shirato等人,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry,Journal of Virology,91,e01387-16(2017);Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2,PLoS ONE.12,e0179177(2017);Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry,Antiviral Research,116,76-84(2015);Zmora等人,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells,PLoS ONE.10,e0138380(2015)),包括流感(Zmor等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin,PLoS ONE.12,e0176597(2017); Böttcher-Friebertshäuser等人,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2,Journal of Virology,85,1554-1562(2011);Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells,Journal of Virology,84,10016-10025(2010);Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice,Journal of Virology,(2014),May;88(9):4744-51)。

[0005] 为了激活,甲型流感血凝素前体(HA0)需要借助宿主丝氨酸蛋白酶剪切成HA1和HA2。例如,跨膜丝氨酸蛋白酶2;TMPRSS2、TMPRSS4和TMPRSS11D以及人气道胰蛋白酶样蛋白酶(HAT)已经涉及HA剪切(Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells,Journal of Virology,84,10016-10025(2010);Bottcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium,Journal of Virology,2006Oct;80(19):9896-8;国际专利申请公开号W02017/151453)。另外,TMPRSS2是抗癌疗法的靶。参见,例如,W02008127347和W02002004953。TMPRSS2和ERG之间的融合(TMPRSS2:ERG)是已知主要驱动受ER α 触发并被ER β 阻遏的前列腺癌发生的基因融合。

Bonkhoff, Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression, Prostate 78(1):2-10 (2018)。

[0006] 发明简述

[0007] 尽管存在TMPRSS2的小分子抑制剂和例如可用于免疫组织化学的研究抗体,但本领域需要用于治疗或预防病毒性感染的中和性治疗用抗TMPRSS2抗体及其用途。参见,例如,Shen等人,Biochimie 142:1-10 (2017)、W02008127347;W02002004953;US9498529;从Abcam(Cambridge,MA)可获得的抗体ab92323或从Santa Cruz Biotech(Dallas,TX)可获得的抗体c-515727和c-101847。通过提供人抗人TMPRSS2抗体,如H1H7017N及其组合(例如,包括,抗流感HA抗体(例如,第I群HA或第II群HA))和使用其治理病毒性感染的方法,本发明部分地满足这种需求。

[0008] 本发明提供与人TMPRSS2特异性结合的中和性人抗原结合蛋白,例如,抗体或其抗原结合片段。例如,在本发明的一个实施方案中,抗原结合蛋白包含:(a)包含在SEQ ID NO:2、17或19中所述的氨基酸序列的免疫球蛋白重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;和/或

[0009] (b)包含在SEQ ID NO:4或18中所述的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在本发明的一个实施方案中,抗原结合蛋白包含:(a)轻链免疫球蛋白可变区,其包含与SEQ ID NO:4或18中所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;和/或(b)重链免疫球蛋白可变区,其包含与SEQ ID NO:2、17或19中所述的氨基酸序列具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中,本发明提供抗原结合蛋白,其包含:(a)轻链免疫球蛋白的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述轻链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:4或18中所述并且与SEQ ID NO:4或18中所述的氨基酸序列有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;和/或(b)重链免疫球蛋白的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述重链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:2、17或19中所述并且与SEQ ID NO:2、17或19中所述的氨基酸序列有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。例如,在本发明的一个实施方案中,抗原结合蛋白包含轻链免疫球蛋白可变区,所述轻链免疫球蛋白可变区包含了(a)包含氨基酸序列:G F T F S S Y G (SEQ ID NO:6)的CDR-H1;(b)包含氨基酸序列:I W N D G S Y V (SEQ ID NO:8)的CDR-H2;(c)包含氨基酸序列:A R E G E W V L Y Y F D Y (SEQ ID NO:10)的CDR-H3;和重链免疫球蛋白可变区,所述重链免疫球蛋白可变区包含了(a)包含氨基酸序列:Q S I S S W (SEQ ID NO:12)的CDR-L1;(b)包含氨基酸序列:K A S (SEQ ID NO:14)的CDR-L2;和/或(c)包含氨基酸序列:Q Q Y N S Y S Y T (SEQ ID NO:16)的CDR-L3。本发明还提供一种抗原结合蛋白,其包含:(a)重链免疫球蛋白,所述重链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:17或19中所述的氨基酸序列;和/或(b)轻链免疫球蛋白,所述轻链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列。

[0010] 本发明还提供与本文所述的任何抗原结合蛋白竞争结合于TMPRSS2(例如,如使用实时、无标签生物双层干涉测量分析,例如,在Octet RED384生物传感器(Pall ForteBio Corp.)上测定);或与本文所述的任何抗原结合蛋白结合在TMPRSS2(或其片段)上相同或重叠的表位的任何抗TMPRSS2抗原结合蛋白。

[0011] 本发明还提供与TMPRSS2和另一抗原结合或与TMPRSS2在不同表位结合的多特异性抗原结合蛋白。例如,多特异性分子包含(a)与TMPRSS2特异性结合的第一抗原结合结构域;和(b)与另一抗原或与TMPRSS2或与下述表位特异性结合的第二抗原结合结构域,所述

表位不同于第一抗原结合结构域的表位。

[0012] 本发明还提供包含以下一个或多个特性的任何抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段,例如,其包含本文所述的序列):

[0013] • 抑制流感病毒(例如,A/波多黎各/08/1934(H1N1))在表达TMPRSS2的细胞(例如,Calu-3细胞)中生长;

[0014] • 例如,以 EC_{50} 值440pM或1.06nM与表达TMPRSS2的细胞(例如,MDCK/Tet-on)的表面结合;

[0015] • 不显著与不表达TMPRSS2的MDCK/Tet-on细胞结合;

[0016] • 在约25°C以约 2.81×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;

[0017] • 在约37°C以约 9.31×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;

[0018] • 在约25°C以约 5.60×10^{-8} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;

[0019] • 在约37°C以约 1.40×10^{-7} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;

[0020] • 在体外限制细胞的流感病毒感染扩散;和/或

[0021] • 保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免于流感病毒感染所致的死亡。

[0022] 本发明还提供包含本文所述的任何抗原结合蛋白的复合物,所述抗原结合蛋白例如在体外或受试者体内与TMPRSS2多肽结合。

[0023] 本发明还提供一种用于产生本文所述的抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)或其免疫球蛋白链的方法,所述方法包括:(a)引入一种或多种编码所述抗原结合蛋白的免疫球蛋白轻链和/或重链的多核苷酸;(b)在有利于表达多核苷酸的条件培养宿主细胞(例如,CHO细胞,毕赤酵母属(*Pichia*)细胞或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞);和(c)任选地,从宿主细胞和/或其中培育宿主细胞的培养基分离抗原结合蛋白或免疫球蛋白链。作为这种方法的产物的抗原结合蛋白或免疫球蛋白链是本发明的部分。

[0024] 一种包含以下者的多肽(例如,免疫球蛋白)也形成本发明的部分:(a)包含在SEQ ID NO:2中所述氨基酸序列的免疫球蛋白链的 V_H 结构域的CDR1、CDR2和CDR3;或(b)包含在SEQ ID NO:4中所述氨基酸序列的免疫球蛋白链的 V_L 结构域的CDR1、CDR2和CDR3(例如,其中多肽在宿主细胞中)。

[0025] 本发明还提供编码本发明多肽的多核苷酸(例如,DNA或RNA)。在本发明的一个实施方案中,多核苷酸编码两条不同的免疫球蛋白链(例如,重链和轻链)。在本发明的一个实施方案中,一个多核苷酸编码免疫球蛋白轻链和另一个多核苷酸编码免疫球蛋白重链,例如,其中链在宿主细胞中或在容器中。例如,多核苷酸在载体(例如,质粒)中和/或整合入宿主细胞染色体。

[0026] 本发明的宿主细胞(例如,CHO细胞,毕赤酵母属细胞或巴斯德毕赤酵母细胞)可以包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)、其多肽或编码这种多肽的多核苷酸和/或包含这种多核苷酸的载体。

[0027] 本发明还提供组合物或套件,其包含与其他治疗剂(例如,抗病毒药物和/或疫苗)联合的本文所述的抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)。例如,组合物可以是包含抗原结合蛋白和可药用载体以及任选地其他治疗剂的药物组合物。其他治疗剂可以是雷迪帕韦(ledipasvir)、索非布韦、雷迪帕韦和索非布韦组合、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素- α 2b、干扰素- α 2a和/或与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在本发明的一

个实施方案中,其他治疗剂是选自以下的抗体或其抗原结合片段:H1H14611N2; H1H14612N2;H1H11723P;H1H11729P;H1H11820N;H1H11829N;H1H11829N2;H2aM11829N; H2M11830N;H1H11830N2;H1H11903N;H1H14571N;H2a14571N;H1H11704P;H1H11711P; H1H11714P;H1H11717P;H1H11724P;H1H11727P;H1H11730P2;H1H11731P2;H1H11734P2; H1H11736P2;H1H11742P2;H1H11744P2;H1H11745P2;H1H11747P2;H1H11748P2;H1H17952B; H1H17953B;H1H17954B;H1H17955B;H1H17956B;H1H17957B;H1H17958B;H1H17959B; H1H17960B;H1H17961B;H1H17962B;H1H17963B;H1H17964B;H1H17965B;H1H17966B; H1H17967B;H1H17968B;H1H17969B;H1H17970B;H1H17971B;H1H17972B;H1H17973B; H1H17974B;H1H17975B;H1H17976B;H1H17977B;H1H17978B;H1H17979B;H1H17980B; H1H17981B;H1H17982B;H1H17983B;H1H17984B;H1H17985B;H1H17986B;H1H17987B; H1H17988B;H1H17989B;H1H17990B;H1H17991B;H1H17992B;H1H17993B;H1H17994B; H1H17995B;H1H17996B;H1H17997B;H1H17998B;H1H17999B;H1H18000B;H1H18001B; H1H18002B;H1H18003B;H1H18004B;H1H18005B;H1H18006B;H1H18007B;H1H18008B; H1H18009B;H1H18010B;H1H18011B;H1H18012B;H1H18013B;H1H18014B;H1H18015B; H1H18016B;H1H18017B;H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;H1H18021B;H1H18022B; H1H18023B;H1H18024B;H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;H1H18028B;H1H18029B; H1H18030B;H1H18031B;H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;H1H18037B; H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;H1H18044B; H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;H1H18052B; H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;H1H18059B; H1H18060B;H1H18061B;H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;H1H18066B; H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;H1H18070B;H1H18071B;H1H18072B;H1H18073B; H1H18074B;H1H18075B;H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;H1H18080B; H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;H1H18086B;H1H18087B; H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;H1H18094B; H1H18095B;H1H18096B;H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;H1H18101B; H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;H1H18105B;H1H18107B;H1H18108B;H1H18109B; H1H18110B;H1H18111B;H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;H1H18116B; H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;H1H18122B;H1H18123B; H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;H1H18130B; H1H18131B;H1H18132B;H1H18133B;H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;H1H18137B; H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;H1H18141B;H1H18142B;H1H18143B;H1H18144B; H1H18145B;H1H18146B;H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;H1H18151B; H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;H1H18157B;H1H18158B; H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;H1H18165B; H1H18166B;H1H18167B;H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;H1H18172B; H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;H1H18176B;H1H18177B;H1H18178B;H1H18179B; H1H18180B;H1H18181B;H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;H1H18186B; H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;H1H18192B;H1H18193B;

H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B;和H1H18335B。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,其他与抗TMPRSS2抗原结合蛋白联合提供的治疗剂是与流感第II群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H14611N2;或是包含H1H14611N2的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H14611N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:25-27)和包含H1H14611N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:29-31)。

[0029] 在本发明的一个实施方案中,其他与抗TMPRSS2抗原结合蛋白联合提供的治疗剂是与流感第II群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H14612N2;或是包含H1H14612N2的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H14612N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:41-43)和包含H1H14612N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:45-47)。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,其他与抗TMPRSS2抗原结合蛋白联合提供的治疗剂是与流感第I群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H11729P;或是包含H1H11729P的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H11729P的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:33-35)和包含H1H11729P的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:37-39)。

[0031] 本发明还提供包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)或其组合物(例如,药物组合物)的容器或注射装置。

[0032] 本发明还提供一种用于治疗或预防有需求的受试者中(例如,人)除流感病毒感染之外的病毒性感染的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文所述的抗TMPRSS2抗原结

合蛋白(例如,H1H7017N)。

[0033] 本发明还提供一种用于治疗或预防有需求的受试者中(例如,人)癌症(例如,前列腺癌)或感染(例如,病毒性感染,例如,流感病毒、冠状病毒、SARS-Co病毒、MERS-Co病毒、副流感病毒、人偏肺病毒或丙型肝炎病毒(HCV)感染)的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文所述的抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)。例如,抗原结合蛋白与一种或多种其他治疗剂(例如,抗病毒药物和/或疫苗)联合施用。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是选自以下的成员:雷迪帕韦、索非布韦、雷迪帕韦和索非布韦组合、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林和干扰素- α 2b、干扰素- α 2a或与流感HA特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是选自以下的抗体或其抗原结合片段:H1H14611N2;H1H14612N2;H1H11723P;H1H11729P;H1H11820N;H1H11829N;H1H11829N2;H2aM11829N;H2M11830N;H1H11830N2;H1H11903N;H1H14571N;H2a14571N;H1H11704P;H1H11711P;H1H11714P;H1H11717P;H1H11724P;H1H11727P;H1H11730P2;H1H11731P2;H1H11734P2;H1H11736P2;H1H11742P2;H1H11744P2;H1H11745P2;H1H11747P2;H1H11748P2;H1H17952B;H1H17953B;H1H17954B;H1H17955B;H1H17956B;H1H17957B;H1H17958B;H1H17959B;H1H17960B;H1H17961B;H1H17962B;H1H17963B;H1H17964B;H1H17965B;H1H17966B;H1H17967B;H1H17968B;H1H17969B;H1H17970B;H1H17971B;H1H17972B;H1H17973B;H1H17974B;H1H17975B;H1H17976B;H1H17977B;H1H17978B;H1H17979B;H1H17980B;H1H17981B;H1H17982B;H1H17983B;H1H17984B;H1H17985B;H1H17986B;H1H17987B;H1H17988B;H1H17989B;H1H17990B;H1H17991B;H1H17992B;H1H17993B;H1H17994B;H1H17995B;H1H17996B;H1H17997B;H1H17998B;H1H17999B;H1H18000B;H1H18001B;H1H18002B;H1H18003B;H1H18004B;H1H18005B;H1H18006B;H1H18007B;H1H18008B;H1H18009B;H1H18010B;H1H18011B;H1H18012B;H1H18013B;H1H18014B;H1H18015B;H1H18016B;H1H18017B;H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;H1H18021B;H1H18022B;H1H18023B;H1H18024B;H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;H1H18028B;H1H18029B;H1H18030B;H1H18031B;H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;H1H18059B;H1H18060B;H1H18061B;H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;H1H18070B;H1H18071B;H1H18072B;H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;H1H18080B;H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;H1H18086B;H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;H1H18094B;H1H18095B;H1H18096B;H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;H1H18105B;H1H18107B;H1H18108B;H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;H1H18116B;H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;H1H18122B;H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;H1H18130B;H1H18131B;H1H18132B;H1H18133B;

H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;H1H18141B;H1H18142B;H1H18143B;H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;H1H18151B;H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;H1H18157B;H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;H1H18165B;H1H18166B;H1H18167B;H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;H1H18176B;H1H18177B;H1H18178B;H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;H1H18186B;H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;H1H18192B;H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B和H1H18335B。

[0035] 本发明还提供一种将本文所述的抗TMRPSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N)施用于受试者(例如,人)身体的方法,所述方法包括将抗原结合蛋白按肠胃外方式(例如,皮下、静脉内或肌内)注射入受试者的身体。

[0036] 附图简述

[0037] 图1(A-B).外源胰蛋白酶不存在下,初始感染复数为0.01(A)或0.001(B)时,A/波多黎各/08/1934(H1N1)-GFP病毒在不同细胞系中扩散的进展。Calu3细胞(圆形)、A549细胞(正方形)、MDCK细胞(三角形)和HepG2细胞(倒三角形)。

[0038] 图2.与同种型对照抗体、无抗体、抗HA抗体和未感染对照相比,H1H7017N的施加在感染周期期间降低感染后72小时处A/波多黎各/08/1934(H1N1)的荧光灶单位(FFU)数。

[0039] 图3(A-B).抗TMRPSS2,H1H7017N,与细胞上表达的人和食蟹猴TMRPSS2结合。(A)

H1H7017N分别以460pM和1.06nM的 EC_{50} 值与MDCK/Tet-on/hTMPRSS2和MDCK/Tet-on/mfTMPRSS2结合并且没有显示与MDCK/Tet-on细胞显著结合。(B)对照mAb1,无关的同种型对照抗体,不显示与任何受检细胞系结合。

[0040] 图4.在注射后(PI)第-1天(倒三角形,短划线)或注射后第0天(圆形,实线)用5mg/kg H1H7017N处理的经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的生存曲线,在预防模型中显示对抗H1N1的保护作用。用同种型对照H1H1238N(三角形,实线)处理的小鼠未显示保护作用。

[0041] 图5.H1N1感染的用10mg/kg H1H7017N处理的经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的生存曲线,显示保护作用。在注射后第0天(菱形,点线)、第1天(圆形,实线)、第2天(倒三角形,实线)或第3天(正方形,短划线)处理小鼠。同种型对照H1H1238N(三角形,实线)具有部分保护作用,存活率为25%。

[0042] 图6.在注射后第1天(三角形)或注射后第2天(圆形)用10mg/kg H1H7017N处理的hTMPRSS2小鼠的生存曲线,显示对抗H3N2的保护作用。未处理的小鼠(正方形)显示无保护作用。

[0043] 图7(A-B).以150个PFU(三角形)、750个PFU(正方形)或1,500个PFU(圆形)的A/波多黎各/08/1934(H1N1)感染的野生型小鼠(A)或经工程化表达人TMPRSS2蛋白(B)的小鼠的生存曲线。对小鼠每日称重直至注射后第14天为止。

[0044] 图8.经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的生存曲线,所述小鼠用A/Aichi/2/68(HA,NA) x A/PR/8/34(H3N2)在第0天感染并且用各2.5mg/kg的H1H7017N和H1H14611N2(菱形)的组合、10mg/kg H1H7017N(三角形)、10mg/kg H1H14611N2(正方形)、各5mg/kg的H1H7017N和H1H14611N2每者、或10mg/kg hIgG1同种型对照(圆形)处理。对小鼠每日称重直至注射后第14天为止。

[0045] 图9.经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的生存曲线,所述小鼠用A/波多黎各/08/1934(H1N1)在第1天感染并且用1mg/kg H1H7017N和2mg/kg H1H11729P(圆形)组合、各2.5mg/kg的H1H7017N和H1H11729P(倒三角形)、5mg/kg H1H11729P(菱形)、5mg/kg H1H7017N(正方形)或5mg/kg hIgG1同种型对照(三角形)处理。对小鼠每日称重直至注射后第14天为止。

[0046] 发明详述

[0047] 在描述本发明的方法之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应该理解的是,文中使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,而不是意在限制,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0048] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料,这里描述了优选的方法和材料。本文中提到的全部出版物均通过引用方式完整并入本文。

[0049] 术语“流感血凝素”,也称作“流感HA”,是流感病毒粒表面上存在的三聚体糖蛋白,其介导病毒附着(借助HA1与 α -2,3-和 α -2,6-唾液酸结合)及进入(通过构象变化)宿主细胞。HA由两个结构域组成:含有受体结合位点(易遭受高频率抗原性突变)的球状头结构域和柄区域(流感病毒的各种毒株之间更保守)。流感HA作为前体(HA0)合成,所述前体经历蛋白酶解加工以产生两个彼此缔合以形成柄/球状头结构的亚单位(HA1和HA2)。病毒HA是病

毒上最可变的抗原并且柄(HA2)在每个群内部高度保守。

[0050] 术语“流感神经氨酸酶”,也称作“流感NA”,是一种切割唾液酸(N-乙酰神经氨酸)和毗邻糖残基之间 α -酮苷键的唾液酸外切酶(EC3.2.1.18)。

[0051] 全长流感HA的氨基酸序列由GenBank中作为登录号FJ966082.1提供的流感分离株H1N1 A/加利福尼亚/04/2009的氨基酸序列例举。术语“流感-HA”还包括从不同流感分离株分离的流感HA的蛋白质变体,例如,GQ149237.1、NC_002017、KM972981.1等。术语“流感-HA”还包括重组流感HA或其片段。本术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或信号序列偶联的流感HA或其片段。

[0052] 抗TMPRSS2“抗原结合蛋白”是与TMPRSS2多肽特异性结合的多肽或多于一种多肽的复合物(例如,四聚体IgG抗体),例如,抗TMPRSS2抗体或抗原结合片段,无论是否为单特异或多特异的。

[0053] TMPRSS2

[0054] TMPRSS2(跨膜丝氨酸蛋白酶2)是位于人第21号染色体上的蛋白质,其属于对流感病毒感染性重要的丝氨酸蛋白酶家族(II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP))。已经展示TMPRSS2介导流感病毒HA0剪切成HA1和HA2。

[0055] 人TMPRSS2基因编码锚定至胞质膜上的492个氨基酸的预测蛋白质。该蛋白质通过Arg255和Ile256之间的自催化剪切作用转化成其成熟形式。在剪切后,成熟的蛋白酶绝大部分膜结合,然而它们的一部分可以释放入胞外环境。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,人TMPRSS2(V160M)包含以下氨基酸序列:

```
MALNSGSPPAIGPYENHGYQPENPYPAQPTVVPVTVYEVHFAQYYPSPVPQYAPRVLTQASNPVVCTQPKSPSGTVC
TSKTKKALCITLTLGTFLVGAALAAGLLWKFMGSKCSNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDENRCVRLYGP
NFILQMYSSQQRKSWHPVCQDDWNNENYGRAACRDMGYKNNFYSSQGIVDDSGSTSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDAC
[0057] SSKAVVSLRCLACGVNLSSRQSRIVGGESALPGAWPWQVSLHVQNVHVC GGSIIITPEWIVTAAHCVEKPLNNPWHW
TAFAGILRQSFMYGAGYQVEKVISHPNYDSKTKNNDIALMKLQKPLTFNDLVKPVCLPNPGMMLQPEQLCWISGWG
ATEEKGKTSEVLNAAKVLLIETQRCNSRYVDNLITPAMICAGFLQGNVDSCQDSSGGPLVTSKNNIWWLIGDTSWG
SGCAKAYRPGVYGNVMVFTDWIYRQMRADG
```

[0058] (SEQ ID NO:22;呈粗体的甲硫氨酸160)。在本发明的一个实施方案中,TMPRSS2多肽不包V160M突变。还参见NM_005656.3。

[0059] 在本发明的一个实施方案中,猕猴(Macaca mulatta)TMPRSS2(S129L、N251S、I415V、R431Q、D492G)包含以下氨基酸序列:

```
MALNSGSPPGVGPYENHGYQPENPYPAQPTVAPNVYEVHFAQYYPSPVPQYTPRVLT HASNPAVCRQPKSPSGTVC
TSKTKKALCVTMTLGAVLVGAALAAGLLWKFMGSKCSDSGIECDSSGTCISLSNWCDGVSHCPNGEDENRCVRLYGP
NFILQVYSSQQRKSWHPVCRDDWNNENYARAACRDMGYKNSFYSSQGIVDNSGATSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDAC
[0060] SSKAVVSLRCLACGVRSNLSRQSRIVGGQNALLGAWPWQVSLHVQNIHVC GGSIIITPEWIVTAAHCVEKPLNSPWQW
TAFVGTLRQSSMFYEKGHRVEKVISHPNYDSKTKNNDIALMKLHTPLTFNEVVKPVCLPNPGMMLEPEQHCWISGWG
ATQEKGKTSDVLNAAAMVPLIEPRRCNNKYVYDGLITPAMICAGFLQGTVDSCQDSSGGPLVTLKNDVWWLIGDTSWG
SGCAQANRPGVYGNVTVFTDWIYRQMRADG
```

[0061] (SEQ ID NO:23)在本发明的一个实施方案中,TMPRSS2多肽不包含S129L、N251S、I415V、R431Q和/或D492G突变。

[0062] 在本发明的一个实施方案中,小家鼠(Mus musculus)TMPRSS2mRNA包含NM_015775.2中所述的核苷酸序列。

[0063] 病毒

[0064] 本发明包括用于治疗或预防受试者中病毒性感染的方法。术语“病毒”包括通过施用抗TMPRSS2抗体或其抗原结合片段可治疗或可预防其在受试者体内感染的任何病毒(例如,其中病毒的感染性至少部分依赖于TMPRSS2)。在本发明的一个实施方案中,“病毒”是表达HA0或表达TMPRSS2的另一底物的任何病毒,其中病毒针对宿主中细胞的完整感染性需要所述另一底物的蛋白酶剪切。术语“病毒”还包括TMPRSS2依赖性呼吸道病毒,所述病毒是感染受试者的呼吸系统组织(例如,上呼吸道和/或下呼吸道、气管、支气管、肺)并且通过施用抗TMPRSS2可治疗或可预防的病毒。例如,在本发明的一个实施方案中,病毒包括流感病毒、冠状病毒、SARS-Co病毒(严重急性呼吸综合征冠状病毒)、MERS-Co病毒(中东呼吸综合征(MERS)CoV)、副流感病毒、仙台病毒(SeV)、人偏肺病毒和/或丙型肝炎病毒(HCV)。“病毒性感染”指病毒在受试者体内侵入和增殖。本发明包括前提是“病毒”不包括流感病毒,例如,其中病毒性感染不包括流感病毒感染的多个实施方案。

[0065] 存在现在两个人副流感病毒(HPIV)属:呼吸道病毒属(respirovirus)(HPIV-1和HPIV-3)和腮腺炎病毒属(rubulavirus)(HPIV-2和HPIV-4)。两个属(副粘病毒)均可以在形态学上与流感病毒分离。

[0066] 仙台病毒,也称作鼠副流感病毒,是呼吸道病毒属中的模式种,该属还包含有以下物种:人副流感病毒3、牛副流感病毒3和人副流感病毒1。TMPRSS2是呼吸道副流感病毒如副流感病毒和仙台病毒(SeV)的活化性蛋白酶。参见Abe等人,J.Virol.87(21):11930-11935(2013)。

[0067] 人偏肺病毒(HMPV)分类为副粘病毒科(Paramyxoviridae)内部肺炎病毒亚科(Pneumovirinae s)中偏肺病毒属(Metapneumovirus)的首个人类成员。它是有包膜负义单链RNA病毒。RNA基因组包括编码9种不同蛋白质的8个基因。HMPV在基因顺序上同禽肺病毒(AMPV),后者也属于偏肺病毒属。TMPRSS2在人肺上皮中表达,高效切割HMPV F蛋白并支持HMPV增殖,并且可能涉及HMPV感染的患者中下呼吸道疾病的形成。参见Shirogane等人,J.Virol.82(17):8942-8946(2008)。

[0068] 丙型肝炎病毒(HCV)是人黄病毒科(Flaviviridae)的小型、有包膜正义单链RNA病毒。HCV,具有至少6个基因型和众多亚型,是丙型肝炎病毒属(hepacivirus)成员。TMPRSS2可以在结合后和进入阶段激活HCV感染。Esumi等人,Hepatology 61(2):437-446(2015)。

[0069] 流感病毒是人正粘病毒科(Orthomyxoviridae)的成员。该科代表其基因组具有分段负义单链RNA节段的包膜病毒。该科存在四个属:A型、B型、C型和托高土病毒属(Thogotovirus)。流感病毒类别甲型、乙型和丙型基于核心蛋白并且进一步分成由病毒包膜糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)决定的亚型(例如,亚型A/H1N1)。存在用来限定流感亚型的至少18个流感血凝素(“HA”)蛋白亚型(H1-H18或HA1-HA18)和至少11个流感神经氨酸酶(NA)蛋白亚型(N1-N11或NA1-NA11)。群1流感具有H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17和H18亚型及NA8、NA5、NA4和NA1亚型。群2具有H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型与NA6、NA9、NA7、NA2和NA3亚型。甲型流感病毒感染一系列哺乳动物和禽物种,而乙型和丙型感染主要限于人。甲型和乙型流感病毒的八个基因组节段由核蛋白松散地包入衣壳。

[0070] 冠状病毒病毒粒为球状,直径大约125nm。冠状病毒的最突出特征是源自病毒粒表面的棍形刺状突出物。这些刺突是病毒粒的限定性特征并且给予其日冕外观,提示了名称,

冠状病毒。在病毒粒的包膜内部是核衣壳。冠状病毒具有螺旋对称核衣壳,这在正义RNA病毒之间不常见,但对负义RNA病毒而言常见得多。MERS-CoV(中东呼吸综合征冠状病毒)和SARS-CoV(严重急性呼吸综合征冠状病毒)均属于冠状病毒科。病毒粒对宿主细胞的初始附着由S蛋白质和其受体之间的相互作用引发。冠状病毒S蛋白的S1区域内部受体结合结构域(RBD)的位点根据病毒变动,一些病毒在S1的C末端具有RBD。S-蛋白/受体相互作用是冠状病毒感染宿主物种的主要决定因素并且还决定病毒的组织嗜性。许多冠状病毒利用肽酶作为其细胞受体。在受体结合后,病毒接下来必须进入宿主细胞细胞溶胶。这通常按以下方式实现:组织蛋白酶、TMPRSS2或另一蛋白酶对S蛋白的酸依赖性蛋白酶剪切,随后病毒膜和细胞膜融合。

[0071] 抗TMPRSS2抗体和抗原结合片段

[0072] 本发明提供与TMPRSS2蛋白或其抗原性片段特异性结合的抗原结合蛋白,如抗体和其抗原结合片段。

[0073] 如本文所用,术语“抗体”指包含借助二硫键相互连接的两条重链(HC)和两条轻链(LC)共四条链的免疫球蛋白分子(即,“完整抗体分子”)以及其多聚体(例如IgM),例如H1H7017N。每条重链包含重链可变区(“HCVR”或“V_H”) (例如,SEQ ID NO 2)和重链恒定区(由结构域C_H1、C_H2和C_H3组成)。每条轻链由轻链可变区(“LCVR”或“V_L”) (例如,SEQ ID NO4)和轻链恒定区(C_L)组成。VH区和VL区可以进一步再划分为超变区,名为互补性决定区(CDR),其间插有更保守的区域,名为构架区(FR)。每个V_H和V_L包含按以下顺序从氨基端至羧基端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的FR与人种系序列相同,或经天然或人工修饰。

[0074] 一般,免疫球蛋白重链和轻链的可变结构域均包含三个位于相对保守的框架区(FR)内部的高变区,也称作互补决定区(CDR)。通常而言,从N末端至C末端,轻链可变结构域和重链可变结构域包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在本发明的一个实施方案中,根据Sequences of Proteins of Immunological Interest(有免疫学意义的蛋白质的序列)的定义(Kabat等人;美国国家卫生研究院,Bethesda,Md.;第5版;NIH Publ.No.91-3242(1991);Kabat(1978)Adv.Prot.Chem.32:1-75;Kabat等人,(1977)J.Biol.Chem.252:6609-6616;Chothia等人,(1987)J Mol.Biol.196:901-917或Chothia等人,(1989)Nature 342:878-883),将氨基酸归于每个结构域。

[0075] 本发明包括单克隆抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体和其抗原结合片段,以及包含多个分离的单克隆抗原结合蛋白的单克隆组合物。如本文所用,术语“单克隆抗体”指基本上同质的抗体群体,即,构成这个群体的抗体分子在氨基酸序列方面基本上相同,例外是可能少量存在的可能天然存在的突变。组合物中的“多个”这类单克隆抗体和片段涉及相同(即,如上文讨论,在氨基酸序列方面相同,不包括可以微量存在的可能的天然存在突变)抗体和片段的浓度,所述浓度高于自然界中(例如,宿主生物(如小鼠或人)的血液中)原本正常存在的浓度。

[0076] 在本发明的一个实施方案中,抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,包含例如IgA(例如,IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)或IgM型的重链恒定结构域。在本发明的一个实施方案中,抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,包含例如κ或λ型的轻链恒定结构域。

[0077] 如本文所用,术语“人”抗原结合蛋白,如抗体,包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体,无论所述人种系免疫球蛋白序列是否在人细胞中或移植入非人类细胞,例如,小鼠细胞。参见,例如US8502018、US6596541或US5789215。本发明的人mAb可以包括例如在CDR和尤其CDR3中包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变)。然而,如本文所用,术语“人mAb”不意在包括其中已经将从另一个哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系中衍生的CDR序列移植到人FR序列上的抗体。该术语包括在非人类哺乳动物中或非人类哺乳动物的细胞中重组产生的抗体。该术语不意在包括从人类受试者分离或在其中生成的抗体。参见下文。

[0078] 本发明包括抗TMPRSS2嵌合抗原结合蛋白,例如,抗体和其抗原结合片段,及其使用方法。如本文所用,“嵌合抗体”是具有来自第一抗体的可变结构域和来自第二抗体的恒定结构域的抗体,其中第一和第二抗体来自不同物种。(US4816567;和Morrison等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0079] 术语“重组”抗原结合蛋白,如抗体或其抗原结合片段,指通过本领域已知作为重组DNA技术的技术或方法产生、表达、分离或获得的这类分子,所述技术或方法例如包括DNA剪接和转基因表达。该术语包括在非人类哺乳动物(包括转基因非人类哺乳动物,例如,转基因小鼠)或细胞(例如,CHO细胞)表达系统中表达或从重组人抗体组合文库分离的抗体。

[0080] 本文公开的重组抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体和抗原结合片段,也可以在大肠杆菌(E.coli)/T7表达系统中产生。在这个实施方案中,可以将编码本发明抗TMPRSS2抗体免疫球蛋白分子(例如,H1H7017N)的核酸插入基于pET的质粒中并在大肠杆菌/T7系统中表达。例如,本发明包括在宿主细胞(例如,细菌宿主细胞如大肠杆菌如BL21或BL21DE3)中表达抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的方法,所述方法包括在还包含与T7启动子有效连接的编码免疫球蛋白链的多核苷酸的细胞中表达T7RNA聚合酶。例如,在本发明的一个实施方案中,细菌宿主细胞,如大肠杆菌,包含与lac启动子有效连接的编码T7RNA聚合酶基因的多核苷酸,并且通过将宿主细胞与IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷)温育,诱导聚合酶和链的表达。参见US4952496和US5693489或Studier和Moffatt,Use of bacteriophage T7RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes,J.Mol.Biol.1986May 5;189(1):113-30。

[0081] 存在本领域已知的几种借以产生重组抗体的方法。US4816567中公开了用于重组产生抗体的方法的一个实例。

[0082] 可以通过向宿主细胞引入多核苷酸的任何已知方法来转化。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域熟知的并且包括葡聚糖介导的转染法、磷酸钙沉淀法、聚凝胺介导的转染法、原生质体融合法、电穿孔法、脂质体中多核苷酸的囊化法、生物射弹注射和向胞核直接微量注射DNA。此外,核酸分子可以由病毒载体引入哺乳动物细胞。转化细胞的方法是本领域熟知的。参见,例如,美国专利号4,399,216;4,912,040;4,740,461和4,959,455。

[0083] 因此,本发明包括用于产生抗TMPRSS2抗原结合蛋白(如本发明抗体或其抗原结合片段)或其免疫球蛋白链的重组方法,所述重组方法包括(i)引入一种或多种编码抗原结合蛋白(例如,H1H7017N或H4H7017N)的免疫球蛋白轻链和/或重链的多核苷酸(例如,包括在

SEQ ID NOs:1、3、5、7、9、11、13或15的任一者或多者中的核苷酸序列),例如,其中多核苷酸在载体中;和/或整合入宿主细胞染色体和/或与启动子有效连接;(ii)在有利于表达多核苷酸的条件下培养宿主细胞(例如,CHO或毕赤酵母属(*Pichia*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))和,(iii)任选地,从宿主细胞和/或其中培育宿主细胞的培养基分离抗原结合蛋白(例如,抗体或片段)或链。当产生包含多于一条免疫球蛋白链的抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段),例如,包含两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的抗体时,单个宿主细胞中链的共表达导致链缔合,例如,在细胞中或在细胞表面上或细胞外部缔合(如果这类链被分泌),从而形成抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)。这些方法包括其中仅表达免疫球蛋白重链或仅表达免疫球蛋白轻链(例如,本文中讨论的那些链的任一者,包括其成熟片段和/或可变结构域)的那些方法。这类链例如可用作表达包含这种链的抗体或抗原结合片段时的中间体。例如,本发明还包括这样的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,如抗体和其抗原结合片段,其包含由多核苷酸编码的重链免疫球蛋白(或其可变结构域或包含其CDR),所述多核苷酸包含在SEQ ID NO:1中所述的核苷酸序列,和由SEQ ID NO:3中所述的核苷酸序列编码的轻链免疫球蛋白(或其可变结构域或包含其CDR),所述抗原结合蛋白是这类生产方法的和任选地本文所述的纯化方法的产物。例如,在本发明的一个实施方案中,该方法的产物是一种作为抗体或片段的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,所述抗体或片段包含了包含在SEQ ID NO:2中所述氨基酸序列的V_H和包含在SEQ ID NO:4中所述氨基酸序列的V_L,或包含了包含在SEQ ID NO:17或19中所述氨基酸序列的HC和包含在SEQ ID NO:18中所述氨基酸序列的LC。

[0084] 真核宿主细胞和原核宿主细胞,包括哺乳动物细胞,可以用作表达抗TMPRSS2抗原结合蛋白的宿主。这类宿主细胞是本领域熟知的并且许多从美国典型培养物保藏中心(ATCC)可获得。这些宿主细胞尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞、3T3细胞、HEK-293细胞和众多其他细胞系。哺乳动物宿主细胞包括人细胞、小鼠细胞、大鼠细胞、犬细胞、猴细胞、猪细胞、山羊细胞、牛细胞、马细胞和仓鼠细胞。其他可以使用的细胞系是昆虫细胞系(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*))、两栖类细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞,例如包括,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、嗜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、*Pichia koclamae*、璞膜毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、微小毕赤酵母(*Pichia minuta*) (微小绪方酵母(*Ogataea minuta*))、*Pichia lindneri*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、松栎毕赤酵母(*Pichia guercuum*)、皮氏毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、具柄毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母属物种(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母属物种(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属物种(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、勒克瑙金孢(*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌属物种(*Fusarium sp.*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、镶片镰

刀菌 (*Fusarium venenatum*)、展叶剑叶藓 (*Physcomitrella patens*) 和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)。本发明包括分离的宿主细胞 (例如, CHO 细胞), 其包含抗原结合蛋白, 如 H1H7017N; 或编码这种多肽的多核苷酸。

[0085] 术语“特异性结合”指那些对抗原如 TMPRSS2 蛋白 (例如, 人 TMPRSS2) 具有表述为 K_D 的至少约 10^{-8} M (例如, 2.81×10^{-9} M; 9.31×10^{-9} M; 10^{-9} M; 10^{-10} M、 10^{-11} M 或 10^{-12} M) 的结合亲和力的抗原结合蛋白 (例如, mAb), 所述结合亲和力如通过实时、无标签生物双层干涉测量分析 (例如, 在 25°C 或 37°C, 例如, 通过 Octet® HTX 生物传感器) 或通过表面等离子体共振 (例如, BIACORE™) 或通过溶液亲和力 ELISA 所测量。本发明包括与 TMPRSS2 蛋白特异性结合的抗原结合蛋白。

[0086] 如本文所用, 术语抗体或抗原结合蛋白的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白, 其特异性结合抗原以形成复合物。抗原结合片段的非限制性实例包括: (i) Fab 片段; (ii) F(ab')₂ 片段; (iii) Fd 片段; (iv) Fv 片段; (v) 单链 Fv (scFv) 分子; (vi) dAb 片段; 和 (vii) 由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位 (例如, 独立的互补性决定区 (CDR) 如 CDR3 肽) 或受约束的 FR3-CDR3-FR4 肽。其他工程化的分子, 如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失的抗体、嵌合抗体、CDR 接枝抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体 (例如, 如 W008/020079 或 W009/138519 中所限定) (例如, 单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小的模块化免疫药物 (SMIP) 和鲨鱼可变 IgNAR 结构域, 也涵盖于本文所用的表述“抗原结合片段”范围内。在本发明的一个实施方案中, 抗原结合片段包含 H1H7017N 的三个或更多个 CDR (例如, CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3; 或 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)。

[0087] 在本发明的一个实施方案中, 抗体的抗原结合片段将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以是任何大小或氨基酸组成, 并且通常将包含至少一个 CDR, 其与一个或多个框架序列相邻或在相同阅读框内 (in frame)。在具有 V_H 结构域和相关的 V_L 结构域的抗原结合片段中, V_H 和 V_L 结构域可以以任何合适的排列相对于彼此进行定位。例如, 可变区可以是二聚体并含有 V_H-V_H、V_H-V_L 或 V_L-V_L 二聚体。或者, 抗体的抗原结合片段可含有单体 V_H 或 V_L 结构域。

[0088] 在某些实施方案中, 抗体的抗原结合片段可以含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可以在本发明抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-CL; (viii) V_L-CH1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 和 (xiv) V_L-C_L。在包括上面列出的任何示例性构型的可变结构域和恒定结构域的任何构型中, 可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可由至少 2 个 (例如, 5、10、15、20、40、60 个或更多个) 氨基酸组成, 其导致在单个多肽分子中相邻可变和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外, 本发明抗体的抗原结合片段可以包含上面列出的任何可变和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体 (或其他多聚体), 彼此非共价 (例如通过二硫键) 结合和/或与一个或多个单体 V_H 或 V_L 结构域非共价 (例如通过二硫键) 结合。

[0089] 抗原结合蛋白 (例如, 抗体和抗原结合片段) 可以是单特异性或多特异性的 (例如, 双特异性的)。本文进一步讨论多特异性抗原结合蛋白。

[0090] 在具体实施方案中,本发明的抗体或抗体片段可以缀合于某种部分,如配体或治疗用部分(“免疫缀合物”),如抗病毒药物、第二抗流感抗体,或任何其他可用于治疗病毒性感染(例如,流感病毒性感染)的治疗用部分。参见下文。

[0091] 本发明还提供复合物,所述复合物包含与TMPRSS2多肽或其抗原性片段和/或与特异性结合于抗TMPRSS2抗体或片段的第二抗体或其抗原结合片段(例如,可检测标记的第二抗体)复合的本文中讨论的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段。在本发明的一个实施方案中,抗体或片段在体外(例如,固定至固态基材)或在受试者体内。在本发明的一个实施方案中,TMPRSS2在体外(例如,固定至固态基材)或在细胞表面上或在受试者体内。与不溶性基质材料(例如,玻璃或多糖如琼脂糖或琼脂糖凝胶,例如,其珠或其他粒子)共价连接的固定化抗TMPRSS2抗体和其抗原结合片段也是本发明的部分;任选地,其中固定化抗体与TMPRSS2或其抗原性片段或第二抗体或其片段复合。

[0092] “分离”的抗原结合蛋白、抗体或其抗原结合片段、多肽、多核苷酸和载体,至少部分不含来自从中产生前者的细胞或细胞培养物的其他生物分子。这类生物分子包括核酸、蛋白质、其他抗体或抗原结合片段、脂质、糖或其他材料如细胞残片和生长培养基。分离的抗体或抗原结合片段还可以至少部分不含表达系统组分如来自宿主细胞或其生长培养基的生物分子。通常,术语“分离的”不意指完全不存在这类生物分子或不意指不存在水、缓冲剂或盐或不意指包含抗体或片段的药物制剂的组分。

[0093] 术语“表位”是指(例如,在TMPRSS2多肽上)与抗原结合蛋白的特定抗原结合位点(例如,抗体分子可变区)(称为互补位)相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个的表位。因此,不同抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物学效应。术语“表位”还指抗原上对B和/或T细胞响应的位点。它还指抗原的由抗体结合的区域。表位可以定义为结构表位或功能表位。功能表位通常是结构表位的子集并且具有直接有助于亲和力和相互作用的那些残基。表位可以是线性的或构象的,即,由非线性氨基酸组成。在某些实施方案中,表位可以包括决定簇,所述决定簇是化学活跃的分子表面基团,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构性特征,和/或特定的电荷特征。

[0094] 用于确定抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)的表位的方法,包括丙氨酸扫描法突变分析、肽印迹分析(Reineke(2004)Methods Mol.Biol.248:443-63)、肽剪切分析、结晶学研究和NMR分析。此外,可以使用诸如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰法等方法(Tomer(2000)Prot.Sci.9:487-496)。另一个可以用来鉴定多肽内部与抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)(例如,coversin)相互作用的氨基酸的方法是通过质谱法检测的氢/氘交换法。概括地,氢/氘交换方法涉及氘标记目的蛋白,随后使抗原结合蛋白,例如,抗体或片段或多肽,结合于氘标记的蛋白质。接下来,将TMPRSS2蛋白/抗原结合蛋白复合物转移至水并且氨基酸内部受抗体复合物保护的可互换质子按照比氨基酸内部不是界面组成部分的可互换质子更低的速率发生氘至氢复交换(back-exchange)。作为结果,形成蛋白质/抗原结合蛋白界面的部分的氨基酸可能保留氘并且因此与未纳入界面的氨基酸相比,显示相对较高的质量。在抗原结合蛋白(例如,抗体或片段或多肽)解离后,目标蛋白经受蛋白酶剪切和质谱分析,因而揭示与抗原结合蛋白相互作用的特定氨基酸对应的氘标记的残基。参见,例如,Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267:252-259;Engen和Smith

(2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

[0095] 如本文所用,术语“竞争”指与抗原(例如,TMPRSS2)结合并抑制或阻断另一抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)与抗原结合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。该术语还包括在两种抗原结合蛋白(例如,抗体)之间在两种取向上的竞争,即,第一抗体结合并阻断第二抗体的结合和反之亦然。在某些实施方案中,第一抗原结合蛋白(例如,抗体)和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以与相同表位结合。备选地,第一和第二抗原结合蛋白(例如,抗体)可以结合于不同的,但例如重叠性表位,其中一者的结合抑制或阻断第二抗体的结合,例如,借助空间位阻做到。可以通过本领域已知的方法,例如,通过实时、无标记物生物双层干涉测量分析,测量抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争。在本发明的一个实施方案中,通过测量固定的第一抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体)(起初未与TMPRSS2蛋白复合)与复合于第二抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体)的可溶性TMPRSS2蛋白的能力,确定第一和第二抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体)之间的竞争。相对于未复合的TMPRSS2蛋白,第一抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体)与复合的TMPRSS2蛋白结合的能力降低,表示第一和第二抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体)竞争。竞争程度可以表述为结合作用的降低百分数。可以使用实时、无标记物生物双层干涉测量分析(例如,在Octet RED384生物传感器(Pall ForteBio Corp.)上)、ELISA(酶联免疫吸附测定)或SPR(表面等离子体共振)测量这种竞争。

[0096] 可以使用实时、无标记物生物双层干涉测量分析在Octet RED384生物传感器(Pall ForteBio Corp.)上确定抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,单克隆抗体(mAbs))之间的结合竞争。例如,为了确定两种抗人TMPRSS2单克隆抗体之间的竞争,可以通过将抗hFc抗体包被的Octet生物传感器尖端(Pall ForteBio Corp., #18-5060)浸入抗人TMPRSS2 mAb(随后称作“mAb1”)的溶液,首先将抗TMPRSS2 mAb捕获到该尖端上。作为阻断作用的阳性对照,随后可以将捕获抗体的生物传感器尖端通过浸入已知的阻断性同种型对照mAb(随后称作“阻断性mAb”)的溶液中,用阻断性mAb饱和。为了确定mAb2是否与mAb1竞争,则可以将生物传感器尖端随后浸入人TMPRSS2多肽和第二抗人TMPRSS2 mAb(随后称作“mAb2”)的辅助复合溶液中,其中所述辅助复合溶液已经预温育一段时间,并且可以确定mAb1与TMPRSS2多肽的结合。生物传感器尖端可以在实验的每个步骤之间于缓冲液中洗涤。可以在实验期间监测实时结合响应并且可以记录每个步骤结束时的结合响应。

[0097] 例如,在本发明的一个实施方案中,竞争测定法在25°C和pH约7(例如,7.4)实施,例如,在缓冲剂、盐、表面活性剂和非特异性蛋白质(例如,牛血清白蛋白)存在下实施。

[0098] 一般,以某种方式被修饰的本发明抗体或抗原结合片段保留与TMPRSS2特异性结合的能力,例如,当活性基于摩尔表述时,保留至少10%的其TMPRSS2结合活性(与亲本抗体相比时)。优选地,本发明的抗体或抗原结合片段保留如同亲本抗体的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多TMPRSS2结合亲和力。还意在本发明的抗体或抗原结合片段可以包含基本上不改变其生物活性的保守性或非保守性氨基酸置换(称作抗体的“保守性变体”或“功能保守变体”)。

[0099] 多肽(如免疫球蛋白链(例如,H1H7017N V_H、V_L、HC或LC))的“变体”指包含与本文所述的参比的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2、4、17、18或19)至少约70-99.9%相同或相似(例如,70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、

97、98、99、99.5、99.9%)的氨基酸序列的多肽;此时通过BLAST算法进行比较,其中选择该算法的参数,旨在相应序列之间在相应参考序列的整个长度范围内产生最大匹配(例如,期望阈值:10;字长:3;查询范围内最大匹配:0;BLOSUM 62矩阵;空位代价:存在11,延伸1;条件性组成评分矩阵调整)。

[0100] 多核苷酸的“变体”指包含与本文所述的参比的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1或3)至少约70-99.9%相同(例如,70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9%)的核苷酸序列的多核苷酸;此时通过BLAST算法进行比较,其中选择该算法的参数,旨在相应序列之间在相应参考序列的整个长度范围内产生最大匹配(例如,期望阈值:10;字长:28;查询范围内最大匹配:0;匹配/错配评分:1,-2;空位代价:线性)。

[0101] 在本发明的一个实施方案中,抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体及其抗原结合片段,包含与SEQ ID NO:2、17或19中所述的氨基酸具有至少70%(例如,80%、85%、90%、95%、99%)氨基酸序列同一性的重链免疫球蛋白可变区和/或与SEQ ID NO:4或18中所述的氨基酸具有至少70%(例如,80%、85%、90%、95%、99%)氨基酸序列同一性的轻链免疫球蛋白可变区。

[0102] 此外,变异抗TMPRSS2抗原结合蛋白可以包括这样的多肽,其包含本文所述的氨基酸序列,例外是一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)突变,如,例如,错义突变(例如,保守性置换)、无意义突变、缺失、或插入。例如,本发明包括抗原结合蛋白,其包含免疫球蛋白轻链变体,所述免疫球蛋白轻链变体包含在SEQ ID NO:4或18中所述的氨基酸序列,但具有一个或多个这类突变,和/或免疫球蛋白重链变体,所述免疫球蛋白轻链变体包含在SEQ ID NO:2、17或19中所述的氨基酸序列,但具有一个或多个这类突变。在本发明的一个实施方案中,变异抗TMPRSS2抗原结合蛋白包括免疫球蛋白轻链变体和/或免疫球蛋白重链变体,所述免疫球蛋白轻链变体包含其中一个或多个(例如,1或2或3个)这类CDR具有一个或多个这类突变(例如,保守性置换)的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述免疫球蛋白重链变体包含其中一个或多个(例如,1或2或3个)这类CDR具有一个或多个这类突变(例如,保守性置换)的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0103] 本发明还提供变异抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或其抗原结合片段,其包含本文所述的与例如SEQ ID NO:12、14、16、6、8和/或10具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.9%序列同一性或相似性的一个或多个变异CDR(例如,CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3的任一者或多者)。

[0104] 本发明的实施方案还包括变异抗原结合蛋白,例如,抗TMPRSS2抗体和其抗原结合片段,所述变异抗原结合蛋白包含这样的免疫球蛋白V_H和V_L;或HC和LC,其包含与本文具体所述的相应V_H、V_L、HC或LC的氨基酸序列具有70%或更多(例如,80%、85%、90%、95%、97%或99%)总体氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列,但是其中这类免疫球蛋白的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3不是变体并且包含分别在SEQ ID NOs:12、14、16、6、8和10中所述的氨基酸序列。因此,在这类实施方案中,变异抗原结合蛋白内部的CDR本身不是变体。

[0105] 保守性修饰的变异抗TMPRSS2抗体和其抗原结合片段也是本发明的部分。“保守性修饰的变体”或“保守性置换”指这样的变体,其中存在特征(例如,电荷、侧链大小、疏水性/

亲水性、主链构象和刚度等)相似的其他氨基酸对多肽中氨基酸的一个或多个置换。往往可以在不显著破坏抗体或片段的生物学活性情况下产生这类变化。本领域技术人员认识到,通常,多肽非必需区中的单氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见,例如,Watson等人,(1987)Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页(第4版))。此外,对结构或功能相似的氨基酸的置换不太可能显著破坏生物学活性。

[0106] 具有相似化学特性的侧链的氨基酸群组的实例包括1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸和7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守性氨基酸置换群组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、和天冬酰胺-谷氨酰胺。备选地,保守性替换是在Gonnet等人,(1992)Science 256:144345中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。

[0107] 抗TMPRSS2抗体和其抗原结合片段的功能保守性变体也是本发明的部分。抗TMPRSS2抗体和其抗原结合片段(如本文中讨论)的任何变体可以是“功能保守性变体”。在一些情况下,这类功能保守性变体还可以表征作为保守性修饰的变体。如本文所用,“功能保守性变体”指抗TMPRSS2抗体或其抗原结合片段的变体,其中已经改变一个或多个氨基酸残基,同时并未显著改变抗体或片段的一个或多个功能特性。在本发明的一个实施方案中,本发明的抗TMPRSS2抗体或其抗原结合片段的功能保守性变体包含变异氨基酸序列并且显示出以下一个或多个功能特性:

[0108] • 抑制流感病毒(例如,A/波多黎各/08/1934(H1N1))在表达TMPRSS2的细胞(例如,Calu-3细胞)中生长;

[0109] • 例如,以 EC_{50} 值440pM或1.06nM分别与表达TMPRSS的细胞(例如,MDCK/Tet-on)的表面结合;

[0110] • 不显著与不表达TMPRSS2的MDCK/Tet-on细胞结合;

[0111] • 在约25°C以约 2.81×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;

[0112] • 在约37°C以约 9.31×10^{-9} M的 K_D 与人TMPRSS2结合;

[0113] • 在约25°C以约 5.60×10^{-8} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;

[0114] • 在约37°C以约 1.40×10^{-7} M的 K_D 与食蟹猴TMPRSS2结合;

[0115] • 在体外限制细胞(例如,Calu-3)的流感病毒感染(例如,H1_PR34;H1_CA09;H1_Bris;H9N2或H3N2流感病毒)扩散;和/或

[0116] • 任选地与抗HA抗体组合时,保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免于流感病毒感染(例如,H1N1或H3N2)所致的死亡,例如,其中小鼠被否则将是致死剂量的病毒感染。

[0117] 本发明包括经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠,所述小鼠在小鼠体内包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)如H1H7017N和H4H7017N。参见国际专利申请公开号W02017/151453。

[0118] “中和性”或“拮抗剂”抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,指这样的分子,其抑制TMPRSS2的活性至任何可检测程度,例如,抑制TMPRSS2例如对底物的蛋白酶活性,所述底物如是HA;Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC(Sigma),其中Cbz是苄氧羰基和AMC是7-氨

基-4-甲基香豆素;流感病毒HA0;冠状病毒S蛋白;或在Arg255和Ile256之间自催化切割的前体TMPRSS2,和/或抑制流感病毒进入细胞和/或抑制流感病毒在受试者体内繁殖。

[0119] “H1H7017N”和“H4H7017N”指这样的抗原结合蛋白,如抗体和其抗原结合片段,所述抗原结合蛋白包含如下文所述的重链或 V_H (或其变体)和轻链或 V_L (或其变体);或包含了包含其CDR(CDR-H1(或其变体)、CDR-H2(或其变体)和CDR-H3(或其变体))的 V_H 和包含其CDR(CDR-L1(或其变体)、CDR-L2(或其变体)和CDR-L3(或其变体))的 V_L ,例如,其中免疫球蛋白链、可变区和/或CDR包含下文描述的特定氨基酸序列。

[0120] 在本发明的一个实施方案中,“H1H7017N”或“H4H7017N”指一种抗体或其抗原结合片段,其包含了包含在SEQ ID NO:2、17或19中所述氨基酸序列的免疫球蛋白重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;和包含在SEQ ID NO:4或18中所述氨基酸序列的免疫球蛋白轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0121] 在本发明的一个实施方案中,“H1H7017N”或“H4H7017N”指一种抗体或其抗原结合片段,其包含了包含在SEQ ID NO:2中所述氨基酸序列的 V_H ;和包含在SEQ ID NO:4中所述氨基酸序列的 V_L 。

[0122] 在本发明的一个实施方案中,“H1H7017N”指一种包含重链免疫球蛋白和轻链免疫球蛋白的抗体或抗原结合片段,所述重链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:17中所述的氨基酸序列,所述轻链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列。

[0123] 在本发明的一个实施方案中,“H4H7017N”指一种包含重链免疫球蛋白和轻链免疫球蛋白的抗体或抗原结合片段,所述重链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:19中所述的氨基酸序列,所述轻链免疫球蛋白包含在SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列。术语“H4H7017N”还包括其中 V_H 与野生型IgG4融合(例如,其中残基108是S)的实施方案。

[0124] 抗TMRPS22抗体或抗原结合片段H1H7017N和H4H7017N

[0125] H1H7017N和H4H7017N重链可变区(DNA)

[0126] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGG
ATTCACCTTCAGTTCCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGCAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCAGTTATAT
GGAATGATGGAAGTTATGTATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATTTCCAAGAAC
ACGCTGTTTCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGGAGTGGGT
ACTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 1)

[0127] H1H7017N和H4H7017N重链可变区(多肽)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWN¹⁰¹DGSYVY¹⁰²ADSVKGRFTISRDISK¹⁰³N

[0128] TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGTIVTVSS
(SEQ ID NO: 2)

[0129] H1H7017N和H4H7017N轻链可变区(DNA)

[0130] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG
TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGT
CTACTTTAGAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTTCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAA
GCTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 3)

- [0131] H1H7017N和H4H7017N轻链可变区(多肽)
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTSS
- [0132] LQPDDFATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 4)
- [0133] H1H7017N和H4H7017N CDR-H1 (DNA)
GGA TTC ACC TTC AGT TCC TAT GGC
- [0134] (SEQ ID NO: 5)
- [0135] H1H7017N和H4H7017N CDR-H1 (多肽)
- [0136] GFTFSSYG
- [0137] (SEQ ID NO:6(或其具有1、2、3或4个点突变和/或点缺失的变体))
- [0138] H1H7017N和H4H7017N CDR-H2 (DNA)
ATA TGG AAT GAT GGA AGT TAT GTA
- [0139] (SEQ ID NO: 7)
- [0140] H1H7017N和H4H7017N CDR-H2 (多肽)
- [0141] IWNDGSYV
- [0142] (SEQ ID NO:8(或其具有1、2、3或4个点突变和/或点缺失的变体))
- [0143] H1H7017N和H4H7017N CDR-H3 (DNA)
GCG AGA GAG GGG GAG TGG GTA CTT TAC TAC TTT GAC TAC
- [0144] (SEQ ID NO: 9)
- [0145] H1H7017N和H4H7017N CDR-H3 (多肽)
- [0146] AREGEWVLYYFDY
- [0147] (SEQ ID NO:10(或其具有1、2、3或4个点突变和/或点缺失的变体))
- [0148] H1H7017N和H4H7017N CDR-L1 (DNA)
CAG AGT ATT AGT AGC TGG
- [0149] (SEQ ID NO: 11)
- [0150] H1H7017N和H4H7017N CDR-L1 (多肽)
- [0151] QSISSW
- [0152] (SEQ ID NO:12(或其具有1、2、3或4个点突变和/或点缺失的变体))
- [0153] H1H7017N和H4H7017N CDR-L2 (DNA)
AAG GCG TCT
- [0154] (SEQ ID NO:13)
- [0155] H1H7017N和H4H7017N CDR-L2 (多肽)
- [0156] KAS
- [0157] (SEQ ID NO:14(或其具有点突变和/或点缺失的变体))
- [0158] H1H7017N和H4H7017N CDR-L3 (DNA)
CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCG TAC ACT
- [0159] (SEQ ID NO: 15)
- [0160] H1H7017N和H4H7017N CDR-L3 (多肽)

- [0162] QQYNSYSYT
- [0163] (SEQ ID NO: 16 (或其具有1、2、3或4个点突变和/或点缺失的变体))
- [0164] H1H7017N
- [0165] 全长重链-人IgG1
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWN DGSYVYYADSVKGRFTISRDISKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPP
[0166] CPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 17)
- [0167] 全长轻链-人K
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPDDEFATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
[0168] QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 18)
- [0169] H4H7017N
- [0170] 全长重链-人IgG4 (S108P)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWN DGSYVYYADSVKGRFTISRDISKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPA
[0171] PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK
(SEQ ID NO: 19)
- [0172] 全长轻链-人K
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPDDEFATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
[0173] QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 18)

[0174] 本发明的抗体和抗原结合片段包含这样的免疫球蛋白链,它们包含本文所述的氨基酸序列以及对抗体的细胞修饰和体外翻译后修饰。例如,本发明包括与TMPRSS2特异性结合的包含本文所述重链和/或轻链氨基酸序列(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3)的抗体和其抗原结合片段以及其中一个或多个氨基酸残基糖基化、一个或多个Asn残基脱酰胺化、一个或多个残基(例如, Met、Trp和/或His)氧化、N末端Gln是焦谷氨酸(pyroE)和/或C末端赖氨酸丢失的抗体和片段。

[0175] 本发明提供包含本发明抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H1H7017N或H4H7017N)的容器(例如,塑料或玻璃小瓶,例如,带盖或色谱柱、空心针或注射筒(syringe cylinder))。

[0176] 本发明还提供注射装置,包含一种或多种与TMPRSS2特异性结合的抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段)(例如,H4H7017N或H1H7017N)或其药物组合物。注射装置可以包装成套件。注射装置是借助肠胃外(例如,肌内、皮下或静脉内)途径,将物质引入受试者

身体中的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预填充以药物组合物,如自动注射器),所述注射器例如包括容纳待注射流体(例如,包含抗体或片段或其药物组合物)的筒或桶、刺穿皮肤和/或血管以注射流体的针头;和推动流体离开筒并穿过针孔的柱塞。在本发明的一个实施方案中,包含来自本发明组合的抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段或其药物组合物)的注射装置是静脉内(IV)注射装置。这种装置可以在可以与管接合的插管或套针/针中包含抗原结合蛋白或其药物组合物,其中所述的管可以与容纳流体(例如,盐水)的袋或储库接合,所述的流体通过插管或套针/针向受试者的身体引入。在本发明的一个实施方案中,一旦将套针和插管插入受试者的静脉中并且从插入的插管移除套针,则可以将抗体或其片段或药物组合物引入装置。可以将IV装置例如插入外周静脉(例如,手掌或臂中);上腔静脉或下腔静脉,或插在心脏右心房内部(例如,中央IV);或插入锁骨下静脉、颈内静脉或股静脉,并且例如向心脏推进直至它达到上腔静脉或右心房(例如,中央静脉导管)。在本发明的一个实施方案中,注射装置是自动注射器;射流注射器或外部输液泵。射流注射器使用液体的高压窄射流,所述射流穿透表皮以引入抗体或片段或其药物组合物至受试者的身体。外部输注泵是以受控量向受试者身体递送抗体或片段或其药物组合物的医疗器械。外部输注泵可以是电力或机械驱动的。不同泵以不同方式运行,例如,注射泵在注射器的储器中容纳流体,并且移动式柱塞控制流体递送,弹性体泵在可伸展球囊储器中容纳流体,并且来自球囊弹性壁的压力驱动流体递送。在蠕动泵中,一套辊沿柔性管路的长度渐变窄,推动流体前进。在多通道泵中,流体可以从多个储器按多个速率递送。

[0177] 本发明还提供施用本发明抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,H4H7017N或H1H7017N)的方法,所述方法包括向受试者(例如,人)的身体引入抗原结合蛋白。例如,该方法包括用注射器的针头穿刺受试者的身体并将抗原结合蛋白注射入受试者的身体,例如,注射至受试者的静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

[0178] 制备人抗体

[0179] 转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。任何这类已知方法可以在本发明的背景下用来产生与TMPRSS2特异性结合的人抗体。包含以下任一者的免疫原可以用来产生针对TMPRSS2的抗体。在本发明的某些实施方案中,本发明的抗体从小鼠获得,所述小鼠用全长、天然TMPRSS2或用活的致弱或灭活病毒或用蛋白质或其片段的DNA编码免疫接种。备选地,可以使用标准生物化学技术产生TMPRSS2蛋白或其片段并且修饰及使用其作为免疫原。在本发明的一个实施方案中,免疫原是重组产生的TMPRSS2蛋白或其片段。在本发明的某些实施方案中,免疫原可以是TMPRSS2多肽疫苗。在某些实施方案中,可以施用一次或多次增强注射。在某些实施方案中,免疫原可以是在大肠杆菌中或任何其他真核或哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达的重组TMPRSS2多肽。

[0180] 使用VELOCIMMUNETM技术(例如,参见US 6,596,541,Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®)或用于产生单克隆抗体的任何其他已知方法,最初分离了针对TMPRSS2的高亲和力嵌合抗体,其具有人类可变区和小鼠恒定区。VELOCIMMUNE®技术包括产生转基因小鼠,所述转基因小鼠具有包含与内源性小鼠恒定区基因座可操作连接的人重链和轻链可变区的基因组,使得所述小鼠产生响应于抗原刺激的包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。分离编码抗体重链和轻链可变区的DNA并可操作地连接到编码人重链和轻链恒定区的DNA上。然后在能够表达完整人抗体的细胞中表达DNA。

[0181] 通常,经目的抗原攻击 **VELOCIMMUNE®**小鼠,从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(如B细胞)。可以将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生的杂交瘤细胞系,筛选和选择这些杂交瘤细胞系以鉴定产生对目的抗原特异的抗体的杂交瘤细胞系。分离编码重链和轻链可变区的DNA并连接到期望的重链和轻链同种型恒定区。这样的抗体蛋白可以在细胞如CHO细胞中产生。或者,可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链的可变结构域的DNA。

[0182] 起初,分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如以下实验部分中,对抗体表征和选择期望的特征,包括亲和力、选择性、表位等。然后用期望的人恒定区置换小鼠恒定区以产生本发明的完整人抗体,例如野生型或修饰的IgG1或IgG4。虽然所选恒定区可根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0183] 包含Fc变体的抗TMPRSS2抗体

[0184] 根据本发明的某些实施方案,提供包含Fc结构域的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,所述Fc结构域包含一个或多个突变,例如,与中性pH相比,所述突变在酸性pH增强或削弱抗体与FcRn受体的结合。例如,本发明包括在Fc结构域的C_H2区或C_H3区包含突变的抗TMPRSS2抗体,其中所述突变增加酸性环境(例如,在其中pH范围从约5.5至约6.0的内体)下Fc结构域对FcRn的亲和力。这类突变可以导致施用至动物时抗体的血清半衰期增加。这类Fc修饰的非限制性实例包括例如以下位置处的修饰:250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)、和256(例如,S/R/Q/E/D或T);或以下位置处的修饰:428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或以下位置处的修饰:250和/或428;或以下位置处的修饰:307或308(例如,308F、V308F)、和434。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);和307和/或308修饰(例如,308F或308P)。在又一个实施方案中,修饰包括265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0185] 例如,本发明包括了包含Fc结构域的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,所述Fc结构域包含一对或多对或一或多组选自以下的突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);257I和311I(例如,P257I和Q311I);257I和434H(例如,P257I和N434H);376V和434H(例如,D376V和N434H);307A、380A和434A(例如,T307A、E380A和N434A);和433K和434F(例如,H433K和N434F)。

[0186] 本发明的范围内构思这样的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体和其抗原结合片段,其包含如本文所述的包含前述Fc结构域突变的任何可能组合的V_H和/或V_L。

[0187] 本发明还包括这样的抗TMPRSS2抗原结合蛋白、抗体或抗原结合片段,其包含本文所述的V_H和嵌合重链恒定(C_H)区,其中嵌合C_H区包含从多于一个免疫球蛋白同种型的C_H区衍生的区段。例如,本发明的抗体可以包含嵌合C_H区,所述嵌合C_H区包含从人IgG1、人IgG2或人IgG4分子衍生的C_H2结构域的部分或全部,所述部分或全部与从人IgG1、人IgG2或人IgG4分子衍生的C_H3结构域的部分或全部组合。根据某些实施方案,本发明的抗体包含具有嵌合铰链区的嵌合C_H区。例如,嵌合铰链区可以包含从人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区衍生的

“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号,从位置216至227的氨基酸残基),其与从人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区衍生的“下铰链”序列(根据EU编号,从位置228至236的氨基酸残基)组合。根据某些实施方案,嵌合铰链区包含从人IgG1或人IgG4上铰链衍生的氨基酸残基和从人IgG2下铰链衍生的氨基酸残基。在某些实施方案中,包含如本文所述的嵌合C_H区的抗体可以显示出修饰的Fc效应子功能,同时并未不利影响抗体的治疗特性或药代动力学特性。(参见,例如,W02014/022540)。

[0188] 免疫缀合物

[0189] 本发明涵盖抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,缀合于另一部分,例如,治疗用部分(“免疫缀合物”),如类毒素或抗病毒药物,以治疗流感病毒感染。在本发明的一个实施方案中,抗TMPRSS2抗体或片段缀合于本文所述的任何其他治疗剂。如本文所用,术语“免疫缀合物”指与放射性物质、细胞因子、干扰素、靶或报道分子部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物学连接的抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段。抗原结合蛋白可以在分子的任何位置连接至放射性物质、细胞因子、干扰素、靶或报道分子部分、酶、肽或治疗剂,只要它能够结合其靶(TMPRSS2)。免疫缀合物的实例包括抗体-药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在本发明的一个实施方案中,药剂可以是与TMPRSS2特异性结合的不同的第二抗体。可以与抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或片段)缀合的治疗用部分的类型将考虑待治疗的病状和待实现的所需治疗作用。参见,例如Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编著),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编著),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,Monoclonal Antibodies 1984:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编著),第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编著),第303-16页(Academic Press 1985)和Thorpe等人,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。

[0190] 多特异性抗体

[0191] 本发明包括抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体和其抗原结合片段,及其使用方法和产生这类抗原结合蛋白的方法。术语“抗TMPRSS2”抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段,包括多特异性(例如,双特异性或双互补位)分子,所述分子包含至少一个与TMPRSS2特异性结合的第一抗原结合结构域(例如,来自H1H7017N或H4H7017N的抗原结合结构域)和至少一个与不同抗原或与TMPRSS2中下述表位结合的第二抗原结合结构域,其中所述表位与第一抗原结合结构域的表位不同(例如,流感HA,如来自H1H14611N2、H1H14612N2或H1H11729P的抗原结合结构域)。在本发明的一个实施方案中,第一表位和第二表位重叠。在本发明的另一个实施方案中,第一表位和第二表位不重叠。例如,在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体是双特异性IgG抗体(例如,IgG1或IgG4),所述抗体包含与TMPRSS2特异性结合的第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包含H1H7017N或H4H7017N的免疫

球蛋白重链和轻链,和与流感HA特异性结合的第二抗原结合结构域(其包含如来自H1H14611N2、H1H14612N2或H1H11729P的不同免疫球蛋白轻链和重链)。

[0192] “H1H7017N”包括这样的多特异性分子,例如,抗体或抗原结合片段,其包含H1H7017N的HCDR和LCDR、 V_H 和 V_L 、或HC和LC(包括如本文中所述的其变体)。

[0193] “H4H7017N”包括这样的多特异性分子,例如,抗体或抗原结合片段,其包含H4H7017N的HCDR和LCDR、 V_H 和 V_L 、或HC和LC(包括如本文中所述的其变体)。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,可以纳入多特异性分子中的与TMPRSS特异性结合的抗原结合结构域包括:

[0195] (1)

[0196] (i) 重链可变结构域序列,其包含了包含在SEQ ID NO:6中所述氨基酸序列的CDR-H1、包含在SEQ ID NO:8中所述氨基酸序列的CDR-H2和包含在SEQ ID NO:10中所述氨基酸序列的CDR-H3,和

[0197] (ii) 轻链可变结构域序列,其包含了包含在SEQ ID NO:12中所述氨基酸序列的CDR-L1、包含在SEQ ID NO:14中所述氨基酸序列的CDR-L2和包含在SEQ ID NO:16中所述氨基酸序列的CDR-L3;

[0198] 或

[0199] (2)

[0200] (i) 包含在SEQ ID NO:2中所述的氨基酸序列的重链可变结构域序列,和;

[0201] (ii) 包含在SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列的轻链可变结构域序列;

[0202] 或

[0203] (3)

[0204] (i) 包含在SEQ ID NO:17或19中所述的氨基酸序列的重链免疫球蛋白序列,和

[0205] (ii) 包含在SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列的轻链免疫球蛋白序列。

[0206] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体或片段包括多于两种不同的结合特异性(例如,三特异性分子),例如,一个或多个与第一和/或第二抗原结合结构域相同或不同的额外抗原结合结构域。

[0207] 在本发明的一个实施方案中,除与TMPRSS2特异性结合的抗原结合位点之外,多特异性分子还包含从选自以下的抗体取得的与流感HA特异性结合的抗原结合位点:

[0208] H1H14611N2;H1H14612N2;H1H11723P;H1H11729P;H1H11820N;H1H11829N;H1H11829N2;H2aM11829N;H2M11830N;H1H11830N2;H1H11903N;H1H14571N;H2a14571N;H1H11704P;H1H11711P;H1H11714P;H1H11717P;H1H11724P;H1H11727P;H1H11730P2;H1H11731P2;H1H11734P2;H1H11736P2;H1H11742P2;H1H11744P2;H1H11745P2;H1H11747P2;H1H11748P2;H1H17952B;H1H17953B;H1H17954B;H1H17955B;H1H17956B;H1H17957B;H1H17958B;H1H17959B;H1H17960B;H1H17961B;H1H17962B;H1H17963B;H1H17964B;H1H17965B;H1H17966B;H1H17967B;H1H17968B;H1H17969B;H1H17970B;H1H17971B;H1H17972B;H1H17973B;H1H17974B;H1H17975B;H1H17976B;H1H17977B;H1H17978B;H1H17979B;H1H17980B;H1H17981B;H1H17982B;H1H17983B;H1H17984B;H1H17985B;H1H17986B;H1H17987B;H1H17988B;H1H17989B;H1H17990B;H1H17991B;H1H17992B;H1H17993B;H1H17994B;H1H17995B;H1H17996B;H1H17997B;H1H17998B;H1H17999B;

H1H18000B;H1H18001B;H1H18002B;H1H18003B;H1H18004B;H1H18005B;H1H18006B;
H1H18007B;H1H18008B;H1H18009B;H1H18010B;H1H18011B;H1H18012B;H1H18013B;
H1H18014B;H1H18015B;H1H18016B;H1H18017B;H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;
H1H18021B;H1H18022B;H1H18023B;H1H18024B;H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;
H1H18028B;H1H18029B;H1H18030B;H1H18031B;H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;
H1H18035B;H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;
H1H18043B;H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;
H1H18051B;H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;
H1H18058B;H1H18059B;H1H18060B;H1H18061B;H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;
H1H18065B;H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;H1H18070B;H1H18071B;
H1H18072B;H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;
H1H18079B;H1H18080B;H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;
H1H18086B;H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;H1H18091B;H1H18092B;
H1H18093B;H1H18094B;H1H18095B;H1H18096B;H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;
H1H18100B;H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;H1H18105B;H1H18107B;
H1H18108B;H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;
H1H18115B;H1H18116B;H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;
H1H18122B;H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;H1H18127B;H1H18128B;
H1H18129B;H1H18130B;H1H18131B;H1H18132B;H1H18133B;H1H18134B;H1H18135B;
H1H18136B;H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;H1H18141B;H1H18142B;
H1H18143B;H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;
H1H18150B;H1H18151B;H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;
H1H18157B;H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;H1H18162B;H1H18163B;
H1H18164B;H1H18165B;H1H18166B;H1H18167B;H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;
H1H18171B;H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;H1H18176B;H1H18177B;
H1H18178B;H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;
H1H18185B;H1H18186B;H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;
H1H18192B;H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;H1H18197B;H1H18198B;
H1H18199B;H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;
H1H18206B;H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;
H1H18213B;H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;
H1H18221B;H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;
H1H18228B;H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;
H1H18235B;H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;
H1H18242B;H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;
H1H18249B;H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;
H1H18256B;H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;
H1H18264B;H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;
H1H18271B;H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;

H1H18279B;H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B和H1H18335B;如国际专利申请公开号W02016/100807中所述(例如,其CDR-H、V_H或重链;和其CDR-L、V_L或轻链)。

[0209] 在本发明的一个实施方案中,除与TMPRSS2特异性结合的抗原结合位点之外,多特异性分子还包含了特异性结合流感第II群HA蛋白的抗原结合位点,例如,所述抗原结合位点包含H1H14611N2的V_H和V_L(例如,SEQ ID Nos:24和28);或包含H1H14611N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:25-27)和包含H1H14611N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:29-31)。

[0210] 在本发明的一个实施方案中,除与TMPRSS2特异性结合的抗原结合位点之外,多特异性分子还包含了特异性结合流感第II群HA蛋白的抗原结合位点,例如,所述抗原结合位点包含H1H14612N2的V_H和V_L(例如,SEQ ID Nos:40和44);或包含H1H14612N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:41-43)和包含H1H14612N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:45-47)。

[0211] 在本发明的一个实施方案中,除与TMPRSS2特异性结合的抗原结合位点之外,多特异性分子还包含了特异性结合流感第I群HA蛋白的抗原结合位点,例如,所述抗原结合位点包含H1H11729P的V_H和V_L(例如,SEQ ID Nos:32和36);或包含H1H11729P的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:33-35)和包含H1H11729P的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID Nos:37-39)。

[0212] 在本发明的一个实施方案中,双特异性抗原结合片段包含对第一表位(例如,TMPRSS2)具有结合特异性的第一scFv(例如,包含H1H7017N或H4H7017N的V_H和V_L)和对不同的第二表位具有结合特异性的第二scFv(例如,包含抗流感HA抗体的V_H和V_L)。例如,在本发明的一个实施方案中,第一和第二scFv以接头(例如,肽接头(例如,GS接头如(GGGGS)_n(SEQ ID NO:48),其中n例如是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10))系留。其他双特异性抗原结合片段包括双特异性IgG抗体的F(ab)₂,所述双特异性IgG抗体包含H1H7017N或H4H7017N的重链CDR和轻链CDR及与不同表位结合的另一抗体。

[0213] 治疗方法

[0214] 本发明提供通过向需要这种治疗或预防的受试者(例如,人)施用治疗有效量的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),治疗或预防病毒性感染或癌症(例如,前列腺癌)的方法。

[0215] 可以通过向受试者施用本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白,在受试者中治疗或预防流感病毒感染。流感病毒基于其核心蛋白分类成甲、乙、丙型。甲型流感病毒的亚型依据拥有血凝素(HA)或神经氨酸酶(NA)活性的包膜糖蛋白确定。存在几个HA亚型甲型流感病毒(例如,HA1、HA2、HA3、HA4、HA5、HA6、HA7、HA8、HA9、HA10、HA11、HA12、HA13、HA14、HA15、HA16、

HA17或HA18,这些亚型可以命名为H1、H2、H3等),和NA亚型甲型流感病毒(例如,NA1、NA2、NA3、NA4、NA5、NA6、NA7、NA8、NA9、NA10或NA11,这些亚型可以命名为N1、N2、N3等),其用来命名甲型流感亚型。例如,甲型流感病毒H1N1和H3N2是公知的人病原体。人通常被H1、H2或H3亚型和N1或N2亚型病毒感染。本发明包括用于治疗或预防本文讨论的流感病毒亚型感染的方法。在本发明的一个实施方案中,与TMPRSS2结合的多特异性抗体和其抗原结合片段还结合于(例如,本文所述亚型的)HA/和/或NA。

[0216] 抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))用于治疗或预防病毒性感染的有效剂量或治疗有效剂量指这样的抗体或片段量,其足以减轻受治疗个体中的一个或多个感染体征和/或症状,无论通过引起这类体征和/或症状消退或消除或通过抑制这类体征和/或症状进展做到。给药量可以根据待施用的受试者的年龄和体格、目标疾病状况、施用途径等变动。在本发明的一个实施方案中,(例如,在成人受试者中)治疗或预防病毒性感染的本发明抗体或其抗原结合片段的有效剂量或治疗有效剂量是约0.01至约200mg/kg,例如,高达约150mg/kg。在本发明的一个实施方案中,剂量高达约10.8或11克(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11克)。取决于感染的严重程度,可以调节治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,本发明的抗原结合蛋白可以按初始剂量施用,随后是一个或多个二级剂量。在某些实施方案中,初始剂量后可以是按可以大致等同于或少于初始剂量的量施用第二或多个后续剂量的抗体或其抗原结合片段,其中后续剂量相隔至少1天至3天;至少一周,至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0217] 如本文所用,术语“受试者”指例如需要防止和/或治疗疾病或病症如病毒性感染或癌症的哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、猫、犬、牛、羊、马、山羊、兔)、优选地人。受试者可以具有病毒性感染,例如,流感传染,或易于形成感染。易于形成感染的受试者或可能面临升高的接触感染(例如,流感病毒)风险的受试者包括免疫系统因自身免疫疾病而受损的受试者、接受免疫抑制疗法的受试者(例如,在器官移植后)、罹患人免疫缺陷综合征(HIV)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的受试者、患有损耗或摧毁白细胞的贫血形式的受试者、接受辐射或化疗的受试者或罹患炎症性疾病的受试者。另外,非常低幼(例如,5岁或更小)或老龄(例如,65岁或以上)的受试者面临增加的风险。另外,受试者可能因邻近于疾病的暴发(例如,受试者居住在人口稠密的城市或紧邻患有已确认或疑似感染病毒的受试者居住)或就业选择(例如,医院工作者、药物研究者、感染地区旅行者或飞行常客)而面临接触病毒性感染的风险。

[0218] “治疗”或“处置”意指向具有一个或多个疾病或感染(例病毒性感染)体征或症状的受试者施用抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),其中按有效或治疗有效量或剂量(如本文中讨论)向受试者时施用,抗原结合蛋白对所述受试者有效。

[0219] 本发明还涵盖向面临病毒性感染风险的受试者预防性施用抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),从而防止这类感染。基于抗体的被动免疫预防已经证明是防止受试者遭受病毒性感染的有效策略。参见,例如,Berry等人,Passive broad-spectrum influenza immunoprophylaxis,Influenza Res Treat.2014;2014:267594.Epub 2014Sep 22;和Jianqiang等人,Passive immune

neutralization strategies for prevention and control of influenza A infections, Immunotherapy. 2012 February; 4 (2) :175-186; Prabhu 等人, Antivir Ther. 2009; 14 (7) :911-21, Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 hemagglutinin against lethal H5N1 influenza. “防止”或“预防”意指向受试者施用抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或抗原结合片段(例如, H1H7017N或H4H7017N),以抑制受试者体内疾病或感染(例如,病毒性感染)的表现,其中按有效或治疗有效量或剂量(如本文中讨论)向受试者时施用,抗原结合蛋白对所述受试者有效。

[0220] 在本发明的一个实施方案中,受试者中病毒性感染的体征或症状是受试者体内病毒存活或增殖,例如通过病毒滴度分析(例如, 胚化鸡卵中的流感病毒增殖或流感病毒血凝分析)所测定。本文中讨论病毒性感染的其他体征和症状。

[0221] 本发明提供一种在有需求的受试者中(例如,人),通过以下方式治疗或预防病毒性感染(例如,流感病毒或冠状病毒感染)或引起至少一个如下的病毒性感染体征或症状消退或消除或抑制其进展的方法:

[0222] • 发热或感到发热/恶寒;

[0223] • 咳嗽;

[0224] • 咽喉痛;

[0225] • 鼻漏或鼻塞;

[0226] • 喷嚏

[0227] • 肌肉或身体疼痛;

[0228] • 各类头痛;

[0229] • 疲乏(疲劳);

[0230] • 呕吐;

[0231] • 腹泻;

[0232] • 呼吸道感染;

[0233] • 胸部不适;

[0234] • 气短;

[0235] • 支气管炎;和/或

[0236] • 肺炎,

[0237] 所述体征或症状继发于病毒性感染:向受试者施用治疗有效量的抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如, H1H7017N或H4H7017N),例如,将蛋白质注射入受试者的身体。

[0238] 本发明还包括在受试者中通过向受试者施用治疗有效量的TMPRSS2抗原结合蛋白(例如, H1H7017N或H4H7017N),例如将蛋白质注射入受试者的身体,治疗或预防癌症,例如,转移性癌症,例如,前列腺癌(例如,其以表达TMPRSS2:ERG融合物为特征)、结肠癌、肺癌、胰腺癌、尿路癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺腺癌、肾细胞癌、结直肠腺癌、肺部腺癌、肺鳞状细胞癌和/或胸膜间皮瘤的方法。在本发明的一个实施方案中,还向受试者施用与其他治疗剂(例如,抗癌治疗剂)联合的TMPRSS2抗原结合蛋白。在本发明的一个实施方案中,癌症是其细胞表达TMPRSS2或其变体的肿瘤。

[0239] 组合和药物组合物

[0240] 为了制备抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如抗体和其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))的药物组合物,将抗原结合蛋白与可药用载体或赋形剂混合。参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences和美国药典:国家处方集,Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1984);Hardman等人,(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,N.Y.;Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.;Avis等人(编著)(1993)Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编著)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY;Lieberman等人(编著)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY;Weiner和Kotkoskie(2000)Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.。在本发明的一个实施方案中,药物组合物是无菌的。这类组合物是本发明的部分。

[0241] 本发明的范围包括了包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))的脱水(例如冻干)组合物或其包含可药用载体但基本上缺失水的药物组合物。

[0242] 在本发明的又一个实施方案中,将与本文公开的抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))联合向受试者施用的其他治疗剂根据2003年医师案头参考(Thomson Healthcare;第57版(2002年11月1日))施用至受试者。

[0243] 施用模式可以变动。施用途径包括经口、直肠,透粘膜,肠,肠胃外;肌内,皮下,皮内,髓内,鞘内,直接心室内,静脉内,腹膜内,鼻内,眼内,吸入,吹入,局部,皮肤,透皮或动脉内。

[0244] 本发明提供用于施用抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))的方法,所述方法包括向受试者的身体引入蛋白质。例如,该方法包括用注射器的针头穿刺受试者的身体并将抗原结合蛋白注射入受试者的身体,例如,注射至受试者的静脉、动脉、肿瘤、肌肉组织或皮下组织。

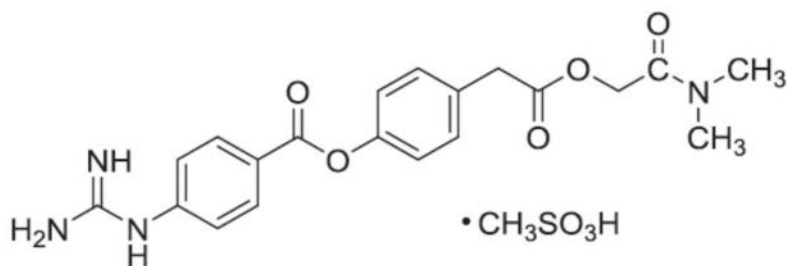
[0245] 本发明提供一种容器(例如,塑料或玻璃小瓶,例如,带盖或色谱柱、空心针或注射筒(syringe cylinder)),所述容器包含本文所述的任何抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N)、多肽(例如,H1H7017N或H4H7017N的HC、LC、V_H或V_L)或多核苷酸或载体或其包含可药用载体的药物组合物。

[0246] 在本发明的一个实施方案中,抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N))与一种或多种其他治疗剂联合。例如,在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是抗病毒药物和/或疫苗。如本文所用,术语“抗病毒药物”指用来治疗、预防或减轻受试者中病毒性感染的任何抗感染药物或疗法。术语“抗病毒药物”包括,但不限于阳离子类固醇抗微生物药、亮抑酶肽、抑蛋白酶肽、金刚烷胺(amantadine)、金刚乙胺、奥司他韦、扎那米韦、利巴韦林或干扰素- α 2b。在需要所述治疗或预防的受试者中通过与其他治疗剂联合施用H1H7017N或H4H7017N,治疗或预防病毒(例如,流感)感染的方法是本发明的部分。

[0247] 例如,在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是疫苗,例如,流感疫苗。在本发明的一个实施方案中,疫苗是灭活/杀死的病毒疫苗、减毒的活病毒疫苗或病毒亚单位疫苗。

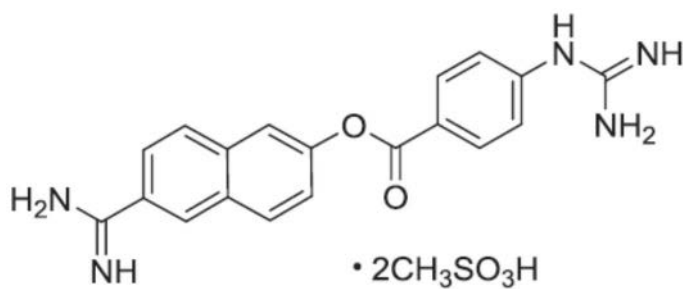
[0248] 例如,在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是:

[0249]



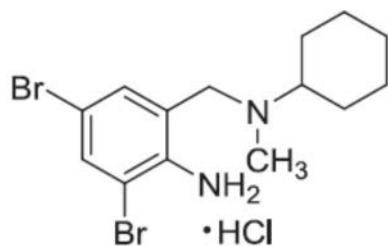
[0250] (甲磺酸卡莫司他);

[0251]



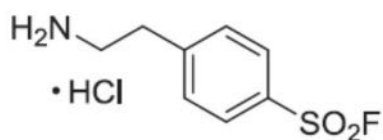
[0252] (甲磺酸奈莫司他);

[0253]

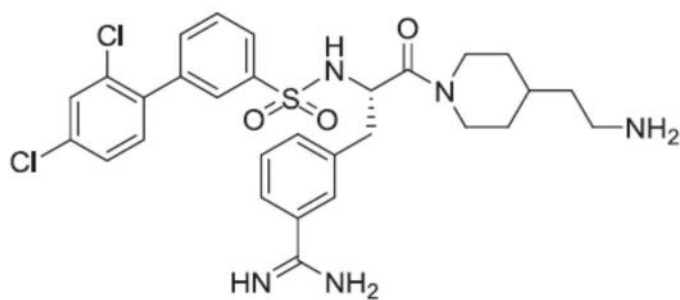


[0254] (盐酸溴已新 (BHH));

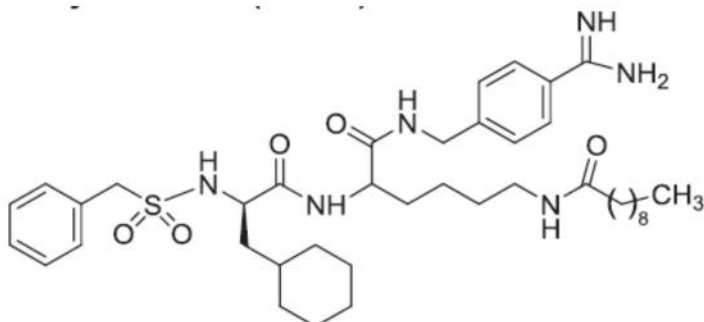
[0255]



[0256] (4-(2-氨基甲基)苯磺酰基氟盐酸盐 (AEBSF));

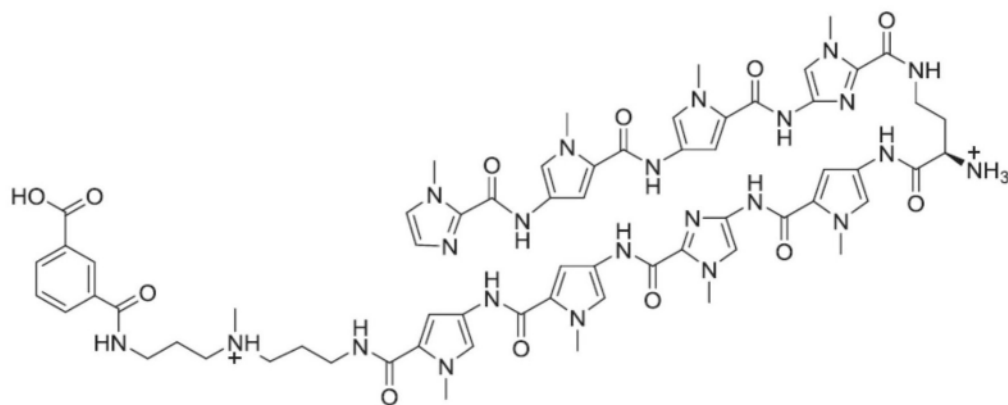


[0257]



; 或

[0258]



[0259] (聚酰胺)。参见Shen等人,Biochimie 142:1-10(2017)。

[0260] 在本发明的一个实施方案中,抗病毒药物是与流感病毒(例如,流感HA)特异性结合的抗体或抗原结合片段。例如,在本发明的一个实施方案中,抗HA抗体是以下任一者; H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2; H1H17952B; H1H17953B; H1H17954B; H1H17955B; H1H17956B; H1H17957B; H1H17958B; H1H17959B; H1H17960B; H1H17961B; H1H17962B; H1H17963B; H1H17964B; H1H17965B; H1H17966B; H1H17967B; H1H17968B; H1H17969B; H1H17970B; H1H17971B; H1H17972B; H1H17973B; H1H17974B; H1H17975B; H1H17976B; H1H17977B; H1H17978B; H1H17979B; H1H17980B; H1H17981B; H1H17982B; H1H17983B; H1H17984B; H1H17985B; H1H17986B; H1H17987B; H1H17988B; H1H17989B; H1H17990B; H1H17991B; H1H17992B; H1H17993B; H1H17994B; H1H17995B; H1H17996B; H1H17997B; H1H17998B; H1H17999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B;

H1H18015B;H1H18016B;H1H18017B;H1H18018B;H1H18019B;H1H18020B;H1H18021B;
H1H18022B;H1H18023B;H1H18024B;H1H18025B;H1H18026B;H1H18027B;H1H18028B;
H1H18029B;H1H18030B;H1H18031B;H1H18032B;H1H18033B;H1H18034B;H1H18035B;
H1H18037B;H1H18038B;H1H18039B;H1H18040B;H1H18041B;H1H18042B;H1H18043B;
H1H18044B;H1H18045B;H1H18046B;H1H18047B;H1H18048B;H1H18049B;H1H18051B;
H1H18052B;H1H18053B;H1H18054B;H1H18055B;H1H18056B;H1H18057B;H1H18058B;
H1H18059B;H1H18060B;H1H18061B;H1H18062B;H1H18063B;H1H18064B;H1H18065B;
H1H18066B;H1H18067B;H1H18068B;H1H18069B;H1H18070B;H1H18071B;H1H18072B;
H1H18073B;H1H18074B;H1H18075B;H1H18076B;H1H18077B;H1H18078B;H1H18079B;
H1H18080B;H1H18081B;H1H18082B;H1H18083B;H1H18084B;H1H18085B;H1H18086B;
H1H18087B;H1H18088B;H1H18089B;H1H18090B;H1H18091B;H1H18092B;H1H18093B;
H1H18094B;H1H18095B;H1H18096B;H1H18097B;H1H18098B;H1H18099B;H1H18100B;
H1H18101B;H1H18102B;H1H18103B;H1H18104B;H1H18105B;H1H18107B;H1H18108B;
H1H18109B;H1H18110B;H1H18111B;H1H18112B;H1H18113B;H1H18114B;H1H18115B;
H1H18116B;H1H18117B;H1H18118B;H1H18119B;H1H18120B;H1H18121B;H1H18122B;
H1H18123B;H1H18124B;H1H18125B;H1H18126B;H1H18127B;H1H18128B;H1H18129B;
H1H18130B;H1H18131B;H1H18132B;H1H18133B;H1H18134B;H1H18135B;H1H18136B;
H1H18137B;H1H18138B;H1H18139B;H1H18140B;H1H18141B;H1H18142B;H1H18143B;
H1H18144B;H1H18145B;H1H18146B;H1H18147B;H1H18148B;H1H18149B;H1H18150B;
H1H18151B;H1H18152B;H1H18153B;H1H18154B;H1H18155B;H1H18156B;H1H18157B;
H1H18158B;H1H18159B;H1H18160B;H1H18161B;H1H18162B;H1H18163B;H1H18164B;
H1H18165B;H1H18166B;H1H18167B;H1H18168B;H1H18169B;H1H18170B;H1H18171B;
H1H18172B;H1H18173B;H1H18174B;H1H18175B;H1H18176B;H1H18177B;H1H18178B;
H1H18179B;H1H18180B;H1H18181B;H1H18182B;H1H18183B;H1H18184B;H1H18185B;
H1H18186B;H1H18187B;H1H18188B;H1H18189B;H1H18190B;H1H18191B;H1H18192B;
H1H18193B;H1H18194B;H1H18195B;H1H18196B;H1H18197B;H1H18198B;H1H18199B;
H1H18200B;H1H18201B;H1H18202B;H1H18203B;H1H18204B;H1H18205B;H1H18206B;
H1H18207B;H1H18208B;H1H18209B;H1H18210B;H1H18211B;H1H18212B;H1H18213B;
H1H18214B;H1H18216B;H1H18217B;H1H18218B;H1H18219B;H1H18220B;H1H18221B;
H1H18222B;H1H18223B;H1H18224B;H1H18225B;H1H18226B;H1H18227B;H1H18228B;
H1H18229B;H1H18230B;H1H18231B;H1H18232B;H1H18233B;H1H18234B;H1H18235B;
H1H18236B;H1H18237B;H1H18238B;H1H18239B;H1H18240B;H1H18241B;H1H18242B;
H1H18243B;H1H18244B;H1H18245B;H1H18246B;H1H18247B;H1H18248B;H1H18249B;
H1H18250B;H1H18251B;H1H18252B;H1H18253B;H1H18254B;H1H18255B;H1H18256B;
H1H18257B;H1H18258B;H1H18259B;H1H18261B;H1H18262B;H1H18263B;H1H18264B;
H1H18265B;H1H18266B;H1H18267B;H1H18268B;H1H18269B;H1H18270B;H1H18271B;
H1H18272B;H1H18274B;H1H18275B;H1H18276B;H1H18277B;H1H18278B;H1H18279B;
H1H18280B;H1H18281B;H1H18282B;H1H18283B;H1H18284B;H1H18285B;H1H18286B;
H1H18287B;H1H18288B;H1H18289B;H1H18290B;H1H18291B;H1H18292B;H1H18293B;

H1H18294B;H1H18295B;H1H18297B;H1H18298B;H1H18299B;H1H18300B;H1H18301B;H1H18302B;H1H18303B;H1H18304B;H1H18305B;H1H18306B;H1H18307B;H1H18308B;H1H18309B;H1H18310B;H1H18311B;H1H18312B;H1H18313B;H1H18314B;H1H18315B;H1H18316B;H1H18317B;H1H18318B;H1H18319B;H1H18320B;H1H18321B;H1H18322B;H1H18323B;H1H18324B;H1H18325B;H1H18326B;H1H18327B;H1H18328B;H1H18329B;H1H18330B;H1H18331B;H1H18332B;H1H18333B;H1H18334B或H1H18335B;如国际专利申请公开号W02016/100807中所述;或其抗原结合片段,例如,其中抗体或片段包含了包含前述任一抗流感HA抗体的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3(例如,其V_L或轻链)的轻链免疫球蛋白that;和包含其CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3(例如,其V_H或重链)的重链。

[0261] 在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是与流感第II群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H14611N2;或是包含H1H14611N2的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H14611N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:25-27)和包含H1H14611N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:29-31)。“H1H14611N2”指包含这类序列的任何抗第II群HA抗体。

[0262] H1H14611N2

[0263] 重链可变区

EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTFSGFS}SMNWVRQVPGKLEWVSSISTSGNYMY^YADSVKGRFTISRDN^{AKK}
SFS^{LQ}MNSLRAEDSAIYYC^{ARGGGYNWNLFDY}WGQGS^LVT^{VSS} (SEQ ID NO: 24)

[0265] CDR-H1:GFTFSGFS (SEQ ID NO:25)

[0266] CDR-H2:ISTSGNYM (SEQ ID NO:26)

[0267] CDR-H3:ARGGGYNWNLFDY (SEQ ID NO:27)

[0268] 轻链可变区

EIVLTQSPG^TLSLSPGERATLSC^{RASQSLNSNY}LAWYQQKPGQAPRLLIY^GASSRATGIP

[0269] DRFSGSGSGTDFTLTITRLESEDFAVYYC^{QQYGNSPLT}FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 28)

[0270] CDR-L1:QSLNSNY (SEQ ID NO:29)

[0271] CDR-L2:GAS (SEQ ID NO:30)

[0272] CDR-L3:QQYGNSPLT (SEQ ID NO:31)

[0273] 在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是与流感第II群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H14612N2;或是包含H1H14612N2的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H14612N2的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:41-43)和包含H1H14612N2的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:45-47)。“H1H14612N2”指包含这类序列的任何抗第II群HA抗体。

[0274] H1H14612N2

[0275] 重链可变区

EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFSFSGFS}SMNWVRQAPGKLEWVSSISTSGNYMY^Y

[0276] ADSVKGRFTISRDN^{AKK}SFS^{LQ}MNSLRAEDSAIYYC^{ARGGGYNWNLFDY}WGQGS^LVT^{VSS} (SEQ ID NO: 40)

[0277] CDR-H1:GFSFSGFS (SEQ ID NO:41)

[0278] CDR-H2:ISTSGNYM (SEQ ID NO:42)

[0279] CDR-H3:ARGGGYNWNLFDY (SEQ ID NO:43)

[0280] 轻链可变区

[0281] EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASQ^SSLNSNY^LLAWYQQKPGQAPRL^LLYGASSRATGIP
DRFSGSGSGADFTLT^SISRLESEDFAVYYCQ^QYGN^SSPLTFGGG^TTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

[0282] CDR-L1:QSLNSNY (SEQ ID NO:45)

[0283] CDR-L2:GAS (SEQ ID NO:46)

[0284] CDR-L3:QQYGN^SSPLT (SEQ ID NO:47)

[0285] 在本发明的一个实施方案中,其他治疗剂是与流感第I群HA蛋白结合的抗体或抗原结合片段,如H1H11729P;或是包含H1H11729P的V_H和V_L的抗体或片段;或是包含H1H11729P的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的重链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:33-35)和包含H1H11729P的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的轻链免疫球蛋白(例如,SEQ ID NOs:37-39)。“H1H11729P”指包含这类序列的任何抗第I群HA抗体。

[0286] H1H11729P

[0287] 重链可变区

[0288] QVQLVQSGAEVKK^SSGSSVK^SVCKASG^GTFSSYA^IISWVRQAPGQGLEWMGG^IIPIFGTPSY
AQKFQDRVTIT^TDESTSTVYME^LSSLRSEDTAVYYC^ARQQP^VVYQYNMDV^WCGQT^TTVTVSS (SEQ ID NO: 32)

[0289] CDR-H1:GGTFSSYA (SEQ ID NO:33)

[0290] CDR-H2:IIPTFGTP (SEQ ID NO:34)

[0291] CDR-H3:ARQQP^VVYQYNMDV (SEQ ID NO:35)

[0292] 轻链可变区

[0293] DIQMTQSPSSLSASVGD^RVTIT^TCRASQ^GGIRN^NLGWYQQK^PLKAPKRLI^YAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLT^SISSLPEDFATYYC^LQYNNYPWT^FFGG^TTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

[0294] CDH-L1:QGIRNN (SEQ ID NO:37)

[0295] CDR-L2:AAS (SEQ ID NO:38)

[0296] CDR-L3:LQYNNYPWT (SEQ ID NO:39)

[0297] 在本发明的某个实施方案中,其他治疗剂不是金刚烷胺、金刚乙胺、奥司他韦、扎那米韦、抑蛋白酶肽、亮肽素、阳离子类固醇抗微生物药、流感疫苗(例如,杀死的、活的、减毒的完整病毒或亚单位疫苗)或针对流感病毒的抗体(例如,抗血凝素抗体)。

[0298] 术语“与联合”表示可以将组分(抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段)连同另一治疗剂(如奥司他韦)配制成单一组合物,例如,用于同时递送,或分别配制成两种或更多种组合物(例如,套件)。每种组分可以在不同于施用另一组分时的时间施用;例如,可以按间隔时间在给定时间段内非同时地(例如,分别地或依次)给予每种施用。另外,可以将独立的组分通过相同或通过不同途径施用至受试者(例如,其中抗TMPRSS2抗体或其抗原结合片段)。

[0299] 套件

[0300] 进一步提供是包含与一种或多种额外组分联合的一种或多种组分的套件,所述组分包括但不限于,抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,如本文中讨论的抗体或抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),所述额外组分包括但不限于如本文中讨论的其他治疗剂。可以

将抗原结合蛋白和/或其他治疗剂作为单一组合物配制或分别配制于两种或更多种组合物中,例如用可药用载体,配制于药物组合物中。

[0301] 在本发明的一个实施方案中,套件在一个容器中(例如,无菌玻璃或塑料小瓶中)包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N)或其药物组合物并且在另一容器中(例如,无菌玻璃或塑料小瓶中)包含其他治疗剂。

[0302] 在另一个实施方案中,套件在单个、常见的容器中包含本发明的组合,所述组合包含抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),或其药物组合物与一种或多种其他治疗剂组合配制在一起,任选地在药物组合物中配制。

[0303] 如果套件包含肠胃外施用至受试者的药物组合物,则套件可以包括进行这类施用的装置(例如,注射装置)。例如,套件可以包括一个或多个皮下注射针或如上文讨论的其他注射装置,所述其他注射装置含有抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N)。

[0304] 套件可以包括药品说明书,所述药品说明书包含涉及套件中药物组合物和剂型的信息。通常,这种信息辅助患者和医师有效和安全地使用所包含的药物组合物和剂型。例如,可以在说明书中提供以下关于本发明组合的信息:药代动力学、药效动力学、临床研究、功效参数、适应症和利用率、禁忌症、警示、注意事项、不良反应、过量用药、恰当的剂量和施用、如何供给、恰当的储存条件、参考文献、生产商/分销商信息和专利信息。

[0305] 抗体的诊断性用途

[0306] 抗TMPRSS2抗原结合蛋白,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段(例如,H1H7017N或H4H7017N),可以用来检测和/或测量样品中的TMPRSS2。示例性TMPRSS2测定法可以包括,例如使样品与本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触,其中抗TMPRSS2抗原结合蛋白用可检测标记物或报道分子标记或被用作为捕获配体以选择性地从样品分离TMPRSS2。存在与TMPRSS2复合的抗TMPRSS2抗原结合蛋白表示样品中存在TMPRSS2。备选地,未标记的抗TMPRSS2抗体可以与本身经可检测标记的第二抗体组合使用。可检测标记物或报道分子可以是放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、或¹²⁵I;荧光部分或化学发光部分如异硫氰酸荧光素,或罗丹明;或酶如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、或萤光素酶。可以用来检测或测量样品中TMPRSS2的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选法(FACS)。因此,本发明包括一种检测TMPRSS2多肽在样品中存在的方法,所述方法包括使样品与抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触并且检测TMPRSS/抗TMPRSS2抗原结合蛋白的存在,其中复合物的存在表示TMPRSS2存在。

[0307] 本发明包括基于细胞的ELISA方法,所述方法使用抗TMPRSS2抗原结合蛋白(例如,本发明的抗体及其抗原结合片段(例如,H1H7017N))检测细胞上TMPRSS2的存在。在本发明的一个实施方案中,该方法包括步骤:

[0308] (i) 使固定于固态表面(例如,微量平板)的待测试TMPRSS2蛋白存在情况的细胞与本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触;

[0309] (ii) 任选地洗涤混合物以移除未结合的抗TMPRSS2抗原结合蛋白;

[0310] (iii) 使抗TMPRSS2抗原结合蛋白与结合于抗TMPRSS2抗原结合蛋白的标记的第二

抗体或其抗原结合片段接触；

[0311] (iv) 任选地洗涤复合物以移除未结合的抗原结合蛋白；并且

[0312] (v) 检测第二抗体或片段上标记物的存在，其中检测到标记物表示细胞含有TMPRSS2。例如，本发明包括这类鉴定样品中TMPRSS2⁺细胞的基于细胞的ELISA方法。

[0313] 本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白（例如，H1H7017N或H4H7017N）可以用于检测样品中TMPRSS2或其片段存在情况的蛋白质印迹或免疫-蛋白质印迹法中。这种方法形成本发明的部分并且例如包括步骤：

[0314] (1) 提供膜或其他固态基材，其包含待检验TMPRSS2存在情况的样品，例如，任选地包括步骤：使用本领域已知的一种方法（例如，半干式印迹或槽式印迹法），将来自待检验TMPRSS2存在情况的样品（例如，从样品中蛋白质的PAGE或SDS-PAGE电泳分离）的蛋白质转移到膜或其他固态基材上；并且使待检验TMPRSS2或其片段存在情况的膜或其他固态基材与本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触。

[0315] 这种膜可以采取例如硝酸纤维素膜或基于乙烯基（例如，聚偏氟乙烯（PVDF））的膜形式，其中已经将非变性PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）凝胶或SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）凝胶中（例如，在凝胶中电泳分离后）向所述膜转移待检验TMPRSS2存在情况的蛋白质。在使膜与抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触之前，任选地（例如用脱脂乳等）封闭膜，从而结合膜上的非特异性蛋白质结合位点。

[0316] (2) 洗涤膜一次或多次，以移除未结合的抗TMPRSS2抗原结合蛋白和其他未结合的物质；并且

[0317] (3) 检测结合的抗TMPRSS2抗原结合蛋白。

[0318] 检测到结合的抗原结合蛋白表示TMPRSS2蛋白存在于膜或基材上及样品中。可以通过以下方式检测结合的抗原结合蛋白：用可检测方式标记的第二抗体（抗免疫球蛋白抗体）结合抗原结合蛋白以并且随后检测第二抗体标记物的存在。

[0319] 本文公开的抗TMPRSS2抗原结合蛋白（例如，抗体和抗原结合片段（例如，H1H7017N或H4H7017N））也可以用于免疫组织化学。这种方法形成本发明的部分并且例如包括，

[0320] (1) 使待测试TMPRSS2蛋白存在情况的组织与本发明的抗TMPRSS2抗原结合蛋白接触；并且

[0321] (2) 检测在组织上或其中的抗原结合蛋白。

[0322] 如果抗原结合蛋白本身经可检测标记，则可以直接检出它。备选地，抗原结合蛋白可以由可检测标记的第二抗体结合，其中随后检出标记物。

实施例

[0323] 提供以下实施例从而为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明方法和组合物的完整公开和描述，并且不意图限制本发明人视为其发明的范围。已经作出努力以确保所用数字（例如量、温度等）的准确度，但是应当考虑一些实验性误差和偏差。除非另外指明，否则份数是以重量计的份数，分子量是平均分子量，温度是摄氏度，室温是约25℃，并且压力是在大气压或接近大气压。

[0324] 实施例1：体外多周期复制。

[0325] 评估了流感病毒A/波多黎各/08/1934 (H1N1) -GFP在Calu3、A549、MDCK和HepG2细

胞中复制的能力。

[0326] 表1所用试剂。

[0327]

描述	供应商
Calu-3细胞	美国典型培养物保藏中心 (ATCC)
A549细胞	美国典型培养物保藏中心 (ATCC)
MDCK (伦敦) 细胞	IRR
HepG2细胞	美国典型培养物保藏中心 (ATCC)
A/波多黎各/08/1934 (H1N1) -GFP	N/A
DMEM	Gibco
F12	Gibco
青/链霉素	Gibco
低IgG BSA	Sigma
PBS	Life Technologies
胎牛血清	Life Technologies

[0328] 实验方法

[0329] 在96孔板中,将Calu-3细胞(ATCC HTB55)、A549细胞(ATCC CCL-185)、MDCK细胞(IRR FR-58)和HepG2细胞(ATCC HB-8065)在含5%FBS的DMEM:F12培养基中稀释至40,000个细胞/孔。次日,三次洗涤后,将在NS区段中携带GFP报道基因的A/波多黎各/08/1934 (H1N1) (B.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus,Proc Natl Acad Sci U S A.2010Jun 22;107(25):11531-6)在含低IgG BSA的DMEM:F12中按0.1和0.01的MOI(感染复数)配制。将病毒在细胞上于37°C温育1小时,此后移除病毒并将孔洗涤另外三次。感染细胞数目在感染后24、48、72和142小时在**CTL-ImmunoSpot®** S6通用分析仪(Cellular Technology Limited,Cleveland,OH)上定量。

[0330] 结果总结与结论

[0331] Calu-3是已经显示在外源胰蛋白酶不存在下允许人流感病毒多周期复制的永生化人气道上皮细胞系(Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type i interferon response in polarized human bronchial epithelial cells,Journal of Virology,81,12439-12449(2007))。此外,已经显示Calu-3细胞至少在mRNA水平表达TMPRSS2和TMPRSS4,但不表达TMPRSS11D (HAT) (**Böttcher-Friebertshäuser** 等人,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2,Journal of Virology,85,1554-1562(2011))。为了证实Calu-3细胞可以支持蛋白酶解性激活拥有含一价剪切位点的血凝素的流感病毒,分析Calu-3细胞中H1N1 GFP报道分子病毒的生长并且比较在胰蛋白酶不存在下,随时间推移采用A549(人肺泡基底上皮)、MDCK(Madin Darby犬肾)和HepG2(人肝脏癌)细胞的复制。将细胞按低MOI感染,并且在所指示的时间点,通过计数荧光灶斑点确定病毒滴度。表2和图1显示在A549、MDCK和HepG2细胞中的低水平感染,而Calu-

3细胞显示在每个时间点显著增加滴度。尽管已经显示Calu-3细胞至少在mRNA水平表达TMPRSS2和TMPRSS4,但敲减TMPRSS2降低流感病毒滴度100至1,000倍(Böttcher-Friebertshäuser等人, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2, Journal of Virology, 85, 1554-1562 (2011))。在胰蛋白酶不存在下A549、MDCK和HepG2细胞中的低病毒滴度水平可能归因于添加切割的病毒(从胚化鸡蛋或从MDCK培养物用胰蛋白酶收获),但是存在另一种HA激活性蛋白酶可能是一个解释。

[0332] 表2. 在A/波多黎各/08/1934 (H1N1) -GFP感染后不同细胞类型中,以MOI 0.1或0.01感染后的不同天由荧光灶单位 (FFU) 代表的感染细胞数目。

细胞系	感染后天数	MOI 0.1	MOI 0.01
		FFU	FFU
Calu3	1	697	54
	2	1167	201
	3	1644	376
	4	1530	500
A549	1	238	35
	2	238	46
	3	258	53
	4	228	52
MDCK	1	740	77
	2	750	60
	3	879	58
	4	796	53
HepG2	1	3	1
	2	14	9
	3	20	13
	4	21	20

[0334] 参考文献

[0335] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株

绕过内体以进入细胞), *Journal of Virology* (病毒学杂志) .91,e01387-16(2017) .PMID: 27733646。

[0336] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活), *PLoS ONE*.12,e0179177(2017) .PMID:27733646。

[0337] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry (靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂), *Antiviral Research* (抗病毒研究), 116,76-84(2015) .PMID:25666761。

[0338] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. **Pöhlmann**,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells (TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达), *PLoS ONE*.10,e0138380(2015) .PMID:26379044。

[0339] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素), *PLoS ONE*.12,e0176597(2017) .PMID:28493964。

[0340] 6.E. **Böttcher-Friebertshäuser**,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2(通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染), *Journal of Virology*,85,1554-1562(2011) .) .PMID:21123387。

[0341] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散), *Journal of Virology*,84,10016-10025(2010) .PMID: 20631123。

[0342] 8.C.Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice(TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子), *Journal of Virology* (病毒学杂志) (2014) ,May;88(9):4744-51.doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0343] 9.E.Bottcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium(通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活), *Journal of Virology* (病毒学杂志) .2006Oct;80(19):9896-8.PMID:16973594。

[0344] 10.B.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus(使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析), *Proc Natl Acad Sci U S A*.2010Jun 22;107(25):11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107.PMID:20534532。

[0345] 11.H.Zeng等人, Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells (高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应), Journal of Virology (病毒学杂志). 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549。

[0346] 实施例2: 抗TMPRSS2抗体H1H7017N在体外阻断流感扩散。

[0347] 评估了多种抗体在Calu-3细胞中降低流感病毒A/波多黎各/08/1934 (H1N1) 滴度的能力。

[0348] 表3. 所有试剂。

描述	供应商
Calu-3 细胞	ATCC
F12	Gibco
FBS	Life Technologies
A/波多黎各/08/1934 (H1N1)	ATCC
DMEM	Gibco
青/链霉素	Gibco
低 IgG BSA	Sigma
PBS	Life Technologies
多聚甲醛(16% w/v aq.)	Alfa Aesar
Triton X-100	EMD
抗 NP 抗体 抗甲型流感抗体, 核蛋白, 克隆 A1、A3 掺合物	Millipore
AF488 缀合的山羊抗小鼠 IgG	Life Technologies

[0351] 实验方法

[0352] 在96孔板中, 将Calu-3细胞(ATCC HTB55)在含5%FBS的DMEM:F12培养基稀释至40,000个细胞/孔。次日, 将单克隆抗体在含低IgG BSA的DMEM:F12中稀释至166.7nM添加至细胞并在37°C和5%CO₂持续3小时。移除mAb溶液并将细胞用A/波多黎各/08/1934 (H1N1) 按MOI 0.001感染。将病毒在细胞上于37°C在5%CO₂下温育1小时, 此后移除病毒并将培养基替换为含有166.7nM mAb的DMEM:F12。在24小时和48小时后, 将培养基替换为含有mAb的新鲜培养基并且将细胞在72小时用PBS洗涤两次。随后将细胞用PBS中的4%多聚甲醛固定并且使用稀释度1:1000的抗NP第一抗体, 检测病毒。将细胞温育1小时并且随后洗涤并且添加稀释度1:2000的第二抗体。感染细胞数目在CTL-ImmunoSpot® S6通用分析仪(Cellular Technology Limited, Cleveland, OH)上定量。

[0353] 结果总结与结论

[0354] Calu-3是已经显示在外源胰蛋白酶不存在下允许人流感病毒多周期复制的永生化人气道上皮细胞系(Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells,Journal of Virology,2007Nov;81(22):12439-49)。此外,已经显示Calu-3细胞至少在mRNA水平表达TMPRSS2和TMPRSS4,但不表达TMPRSS11D(HAT)(Böttcher-Friebertshäuser等人,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2,Journal of Virology,85,1554-1562(2011))。先前已经显示,Calu-3细胞支持蛋白酶解性激活流感病毒—但本文使用TMPRSS2特异性单克隆抗体H1H7017N,检验对TMPRSS2的抑制。分析了用166.7nM H1H7017N处理细胞后,72小时范围内A/波多黎各/08/1934(H1N1)的生长。通过计数荧光灶斑点确定病毒滴度。表4和图2显示抗体H1H7017N处理后滴度降低。尽管已经显示Calu-3细胞至少在mRNA水平表达TMPRSS2和TMPRSS4,但敲减TMPRSS2降低流感病毒滴度100至1,000倍(Böttcher-Friebertshäuser等人,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2,Journal of Virology(病毒学杂志).85,1554-1562(2011))。在mAb不存在下的低病毒滴度水平可能归因于添加切割的病毒(从胚化鸡蛋或从MDCK培养物用胰蛋白酶收获),但存在另一种HA激活性蛋白酶也可能解释病毒的存在,即便经抗TMPRSS2 mAb处理。

[0355] 表4. 在感染周期期间施加H1H7017N降低感染后72小时A/波多黎各/08/1934(H1N1)的荧光灶单位(FFU)数。

	治疗	描述	FFU
	H1H7017N	抗 TMPRSS2 mAb	259
	H1H11729P	抗甲型流感第 1 群阳性对照	18
[0356]	带小鼠 IgG2a Fc 的抗 hIgG4	IgG1 同种型对照	2338
	无 mAb	感染对照	2656
	未感染	背景对照	6

[0357] 参考文献

[0358] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017).PMID:27733646。

[0359] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV

纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活), PLoS ONE.12,e0179177(2017). PMID:27733646。

[0360] 3.Y.Zhou等人, Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry (靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂), Antiviral Research, 116, 76-84 (2015). PMID:25666761。

[0361] 4.P.Zmora, A.-S.Moldenhauer, H.Hofmann-Winkler, S. **Pöhlmann**, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells (TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达), PLoS ONE.10,e0138380 (2015). PMID:26379044。

[0362] 5.P.Zmora等人, Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin (TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素), PLoS ONE.12,e0176597(2017). PMID:28493964。

[0363] 6.E. **Böttcher-Friebertshäuser**, D.A.Stein, H.-D.Klenk, W.Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2 (通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染), Journal of Virology (病毒学杂志). 85, 1554-1562 (2011). PMID:21123387。

[0364] 7.S.Bertram等人, TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells (TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散), Journal of Virology (病毒学杂志), 84, 10016-10025 (2010). PMID:20631123。

[0365] 8.C.Tarnow等人, TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice (TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子), Journal of Virology (病毒学杂志) (2014), May; 88(9):4744-51. doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID:24522916。

[0366] 9.E.Böttcher等人, Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium (通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活), Journal of Virology (病毒学杂志). 2006 Oct; 80(19):9896-8. PMID:16973594。

[0367] 10.B.Manicassamy等人, Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus (使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析), Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 22; 107(25):11531-6. doi:10.1073/pnas.0914994107. PMID:20534532。

[0368] 11.H.Zeng等人, Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells (高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应), Journal of Virology (病毒学杂志). 81, 12439-12449 (2007). PMID:

17855549。

[0369] 实施例3:采用MDCK/Tet-on、MDCK/Tet-on/hTMPRSS2和MDCK/Tet-on/MfTMPRSS2细胞的FACS分析。

[0370] 评估了抗TMPRSS2抗体H1H7017N与表达TMPRSS2或不表达TMPRSS2的MDCK细胞结合的能力。

[0371] 表5.所有试剂。

[0372]	试剂	来源
--------	----	----

[0373]

MDCK	ATCC
pLVX-EF1 α -Tet3G	Clontech
pLVX Tight hTMPRSS2 Puro	
pLVX Tight MfTMPRSS2 Puro	
DMEM	Irvine Scientific
FBS	Seradigm
青/链霉素/谷氨酰胺	Invitrogen
丙酮酸钠 100 mM (100X)	Specialty Media
Geneticin™ 选择性抗生素 (硫酸 G418)	Invitrogen
嘌呤霉素	Sigma
多西环素	Sigma
无 Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺ 的 PBS	Irvine Scientific
Accutase	Millipore
96 孔滤板	Pall
BD CytoFix™	Becton Dickinson
别藻蓝蛋白 (APC) AffiniPure F(ab') ₂ 片段山羊抗人 IgG, Fc γ 片段特异性	Jackson Immuno
对照 mAb1 (hIgG1 同种型对照)	
Cytoflex	Beckman Coulter
FlowJo 10.1r5	FlowJo
Prism 7	Graphpad

[0374] 实验方法

[0375] 开发了多西环素诱导时MDCK (Madin Darby犬肾) 细胞表达人和食蟹猴TMPRSS2 (hTMPRSS2和mfTMPRSS2) 的细胞系。转导MDCK细胞以稳定表达修饰的四环素控制型反式激活因子蛋白(Clontech) 并且将所得的细胞系称作MDCK/Tet-on细胞系。将MDCK/Tet-on细胞系用构建体转导, 所述构建体含有诱导型启动子控制下的hTMPRSS2 (具有V160M的NP_005647.3) 或mfTMPRSS2 (Ref seq XP_015302311.1, 具有S129L、N251S、I415V、R431Q、D492G) 并且将细胞系称作MDCK/Tet-on/hTMPRSS2和MDCK/Tet-on/mfTMPRSS2。将稳定的细

胞系在生长培养基中维持,所述生长培养基含有补充了10%FBS、丙酮酸钠,青霉素/链霉素/谷氨酰胺,500 μ g/mL G418的DMEM,具有或没有2 μ g/mL嘌呤霉素。

[0376] 对于通过流式细胞术进行细胞结合分析,将细胞铺种于生长培养基中并且与1 μ g/mL的多西环素温育16小时以诱导TMPRSS2表达。使用Accutase,使细胞脱离并重悬于PBS中的1%FBS内。将抗体从500nM连续稀释至25pM并将每个浓度的抗体与1 $\times 10^6$ 个细胞在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。纳入其中不向细胞添加抗体的条件。与第一抗体温育后,将细胞用别藻蓝蛋白缀合的抗人IgG第二抗体按1:1000在4 $^{\circ}$ C染色30分钟。使用BD CytoFixTM固定细胞并使用CytoFLEX流式细胞仪分析。对于全部细胞系,还纳入未染色对照和第二抗体单独对照。使用FlowJo软件测定活细胞的荧光几何平均数值,并且使用非线性回归(4-参数对数)兼Prism7软件(GraphPad)分析结果,以获得抗体结合细胞的EC₅₀值。

[0377] 如图3中所示,本发明的抗hTMPRSS2抗体H1H7017N分别以460pM和1.06nM的EC₅₀值与MDCK/Tet-on/hTMPRSS2和MDCK/Tet-on/mfTMPRSS2结合。H1H7017N没有显示与MDCK/Tet-on细胞显著结合。对照mAb1,无关的同种型对照抗体,不显示与任何受检细胞系结合。

[0378] 实施例4:在25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C测量的抗TMPRSS2单克隆抗体与不同TMPRSS2试剂结合的Biacore结合动力学。

[0379] 用基于实时表面等离子体共振的Biacore4000生物传感器,测定不同TMPRSS2试剂与纯化的抗TMPRSS2单克隆抗体结合的平衡解离常数(K_D)。全部结合研究均在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%v/v表面活性剂Tween-20,pH 7.4(HBS-ET)运行缓冲液中,于25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C进行。首先通过胺偶联法用兔抗小鼠Fc特异性多克隆抗体(GE Healthcare目录号BR100838)衍生化Biacore CM5传感芯片表面,以捕获抗TMPRSS2单克隆抗体。对带有C末端myc-myc-六组氨酸标签表达的人TMPRSS2胞外结构域(hTMPRSS2.mmh)、和带有C末端myc-myc-六组氨酸标签表达的猴TMPRSS2胞外结构域(mfTMPRSS2.mmh)进行结合研究。首先在HBS-ET运行缓冲液中配制不同浓度的HMM-hTMPRSS2和HMM-mfTMPRSS2(100nM-6.25nM;4倍连续稀释物)并且按流速30 μ L/分钟于抗小鼠Fc捕获的抗TMPRSS2单克隆抗体表面上注射2.5分钟,同时在HBS-ET运行缓冲液中监测单克隆抗体结合的TMPRSS2试剂解离7分钟。使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件,通过针对1:1结合模型用传质限制拟合实时结合传感图,确定缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。从动力学速率计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期(t_{1/2})为:

$$[0380] \quad K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 和 } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0381] 表6至表9中显示在25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C时HMM-hTMPRSS2或HMM-mfTMPRSS2与本发明的不同抗TMPRSS2单克隆抗体结合的结合动力学参数。

[0382] 在25 $^{\circ}$ C,抗TMPRSS2单克隆抗体以2.81nM的K_D值与HMM-hTMPRSS2结合,如表6中所示。在37 $^{\circ}$ C,抗HMM-hTMPRSS2单克隆抗体以9.31nM的K_D值与HMM-hTMPRSS2结合,如表7中所示。

[0383] 在25 $^{\circ}$ C,抗TMPRSS2单克隆抗体以56.0nM的K_D值与HMM-mfTMPRSS2结合,如表8中所示。在37 $^{\circ}$ C,抗TMPRSS2单克隆抗体以140nM的K_D值与HMM-mfTMPRSS2结合,如表9中所示。

[0384] TMPRSS2蛋白

[0385] hTMPRSS2 knob_mmh(W106-R255).mmh:

[0386] 氨基酸1-150:人TMPRSS2的氨基酸106至255(登录号NP_005647.3,具有V160M)

[0387] 氨基酸:151-178:myc-myc-六组氨酸标签

WKFMGSKCSNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDENRCVRLYGPNFILQMYSSQKRSWHPVCQDDWNENYGR
AACRDMGYKNNFYSSQGIVDDSGSTSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDACSSKAVVSLRCLACGVNLNSSRQSRQKL
ISEEDLGGEQKLI SEEDLHHHHHH

[0389] (SEQ ID NO:20;myc标签加下划线,His6标签加双下划线)

[0390] mfTMPRSS2 knob_mmh(W106-R255).mmh:

[0391] 氨基酸1-150:猴TMPRSS2的氨基酸106-255(登录号XP_005548700.1,具有S129L、N251S)

[0392] 氨基酸151-178:myc-myc-六组氨酸标签

WKFMGSKCSDSGIECDSSGTCISLSNWCDGVSHCPNGEDENRCVRLYGPNFILQVYSSQKRSWHPVCRDDWNENYAR
AACRDMGYKNSFYSSQGIVDNSGATSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDACSSKAVVSLRCLACGVRSNLSRQSRQKL
ISEEDLGGEQKLI SEEDLHHHHHH

[0394] (SEQ ID NO:21;myc标签加下划线,His6标签加双下划线)

[0395] 结果

[0396] 表6.HMM-hTMPRSS2在25℃与TMPRSS2单克隆抗体结合的结合动力学参数。

捕获的 mAb	mAb 捕获水平 (RU)	100 nM Ag 结合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H2aM7017N	510 ± 5.3	103	2.65E+05	7.45E-04	2.81E-09	15.5

[0398] *H2aM7017N是具有本文所述的H1H7017N可变结构域和小鼠IgG2a Fc的抗体。

[0399] 表7.HMM-hTMPRSS2在37℃与TMPRSS2单克隆抗体结合的结合动力学参数。

捕获的 mAb	mAb 捕获水平 (RU)	100 nM Ag 结合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H2aM7017N	587 ± 4.5	117	3.47E+05	3.23E-03	9.31E-09	3.6

[0401] 表8.HMM-mfTMPRSS2在25℃与TMPRSS2单克隆抗体结合的结合动力学参数。

捕获的 mAb	mAb 捕获水平 (RU)	100 nM Ag 结合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H2aM7017N	484 ± 1.8	67	2.80E+05	1.57E-02	5.60E-08	0.7

[0403] 表9.HMM-mfTMPRSS2在37℃与MSR1单克隆抗体结合的结合动力学参数。

[0404]

捕获的 mAb	mAb 捕获水平 (RU)	100 nM Ag 结合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H2aM7017N	569 ± 1.6	48	3.66E+05	5.12E-02	1.40E-07	0.2

[0405] 实施例5:流感H1、H3、和FluB毒株的体外流感扩散。

[0406] 在这个实施例中,确定了各种类型流感跨Calu-3细胞体外培养物扩散的能力及抗TMPRSS2抗体对这种扩散的影响。

[0407] 表10.所用试剂和批号。

[0408]

目录号	描述	供应商
HTB55	Calu-3 细胞	ATCC (美国典型培养物保藏中心)
11995-073	DMEM	Gibco
211703	F12	Gibco
15140-122	青/链霉素	Gibco
A033650 ML	低 IgG BSA	Sigma
10010-023	PBS	Life Technologies

[0409]

26140079	胎牛血清	Life Technologies
VR-1469	甲型流感 A/波多黎各 /08/1934 (H1_PR34)	ATCC
NR-13658	H1N1 A/加利福尼亚 A/04/2009 (H1_CA09)	BEI 资源
FR-28	甲型流感/布里斯班 /59/2007 (H1_Bris)	流感试剂资源
FR-1068	甲型流感/中国香港 /38982/2009 (H9N2)	流感试剂资源
3483	甲型流感 H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, 重配 X-31	BEI 资源
NR-41795	乙型流感/佛罗里达 /04/2006 (佛罗里达)	ATCC
NR-12280	乙型流感马来西亚(马来 西亚)	ATCC
MAB8251	抗甲型流感抗体, 核蛋 白, 克隆 A1、A3 掺合物	Millipore
Ab20711	抗乙型流感病毒核蛋白 抗体[B017]	Abcam
A-11001	山羊抗小鼠 IgG (H+L)交 叉吸附型第二抗体, Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific

[0410] 实验方法

[0411] 在96孔板中,将Calu-3细胞在含5%FBS的DMEM:F12培养基接种至40,000个细胞/孔。次日,将流感病毒株稀释至事先确定的MOI(参见表11)并将抗体稀释至100 μ g/mL。在这些实验中,抗HA和抗TMPRSS2抗体具有不同的作用机制,因此,这些抗体的实验方法不同,以恰当检测它们。将抗HA抗体在独立的平板中与独自的流感病毒株在37 $^{\circ}$ C预温育一小时。在

预温育阶段后,将抗体/病毒混合物添加至Calu-3细胞一小时。将抗TMPRSS2抗体与未感染的Calu-3细胞在37°C预温育三小时。在预温育阶段后,将病毒添加至与抗TMPRSS2抗体预温育一小时的Calu-3细胞。在一小时感染后,将细胞用PBS洗涤三次并且将新鲜抗体连同新培养基一起添加至每个孔。在感染后24小时和48小时添加额外抗体。在感染后72小时,将细胞用抗NP染色并且在 CTL-ImmunoSpot® S6通用分析仪 (Cellular Technology Limited,Cleveland,OH) 上定量。

[0412] 表11A. 实验1.

[0413]	流感毒株	最终MOI
	H1_PR34	0.001
	H1_CA09	0.001
	H1_Bris	0.001
	H9N2	0.01
	H3N2	0.001

[0414] 表11B. 实验2.

[0415]	流感毒株	最终MOI
	H1_PR34	0.01
	佛罗里达	0.01
	马来西亚	0.001

[0416] 结果总结与结论

[0417] Calu-3是已经显示在外源胰蛋白酶不存在下允许人流感病毒多周期复制的永生化人气道上皮细胞系 (Zeng等人, Journal of Virology, 81:12439-12449 (2007))。此外,已经显示Calu-3细胞表达TMPRSS2 (*Böttcher-Friebertshäuser* 等人, Journal of Virology 85:1554-1562 (2011)), 对于这些实验,前者为必需,原因是正在检验抗TMPRSS2抗体。在这些实验中,研究了H1H7017N (抗TMPRSS2抗体) 是否可以防止不同流感毒株扩散。此外,运行不同毒株的相应抗HA抗体作为阳性对照。如预期,在抗TMPRSS2抗体存在下,存在初始感染,但H1H7017N成功地防止H1_PR34、H1_CA09、H1_Bris、H9N2和H3N2的感染扩散。可以通过检查抗TMPRSS2处理的细胞和感染对照之间感染细胞数目的差异,观测到这点 (表12)。得出结论:抗TMPRSS2抗体不能够防止任一个乙型流感毒株扩散,因为对照孔和处理孔中感染细胞的数目相同。在对比中,抗HA抗体与病毒预温育并防止初始感染。也可以通过比较感染细胞的数目看到这点。在CTL仪上计数感染的细胞并在下表中报告。

[0418] 表12A. 实验1.

	流感毒株	未感染的对照	感染的对照	用群特异性HA抗体处理的感染细胞	用 H1H7017N 抗TMPRSS2 抗体处理的感染细胞
[0419]	H1_PR34	10	3847.5	3	1496
	H1_CA09	3.5	4645.4	1.5	17
	H1_Bris	15.5	3882	0.5	1005
	H9N2	4.5	4172	4.5	196.5
	H3N2	7.5	3922	9	754.5

[0420] 表12B. 实验2.

	流感毒株	未感染的对照	感染的对照	用群特异性HA抗体处理的感染细胞	用 H1H7017N 抗TMPRSS2 抗体处理的感染细胞
[0421]	H1_PR34	1	2848	18	60
	佛罗里达	4	1339	229	1234
	马来西亚	10	1184	758	1451

[0422] 参考文献

[0423] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017).PMID:27733646。

[0424] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS ONE.12,e0179177(2017).PMID:28636671。

[0425] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry(靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84(2015).PMID:25666761。

[0426] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. Pöhlmann,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells(TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380(2015).PMID:26379044。

[0427] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017).PMID:28493964。

[0428] 6.E. Böttcher-Friebertshäuser, D.A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2 (通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染), Journal of Virology (病毒学杂志), 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387。

[0429] 7.S. Bertram等人, TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells (TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散), Journal of Virology (病毒学杂志), 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123。

[0430] 8.C. Tarnow等人, TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice (TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子), Journal of Virology (病毒学杂志) (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916。

[0431] 9.E. Bottcher等人, Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium (通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活), Journal of Virology (病毒学杂志), 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594。

[0432] 10. Manicassamy等人, Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus (使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析), Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 22; 107 (25): 11531-6. doi:10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 Jun 7. PMID: 20534532。

[0433] 11.H. Zeng等人, Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells (高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应), Journal of Virology (病毒学杂志), 81, 12439-12449 (2007), PMID: 17855549。

[0434] 实施例6: TMPRSS2人源化小鼠中单用H1H7017N处理的效果。

[0435] 评估了抗TMPRSS2抗体保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免遭H1N1流感病毒感染的能力。

[0436] 表13. 所用试剂和批号。

[0437]

目录号	描述	供应商
-----	----	-----

[0438]

VR-1469	甲型流感 A/波多黎各/08/1934 (H1N1)	ATCC
20012-043	PBS	Gibco
	氯胺酮:赛拉嗪	

[0439] 表14.mAb克隆ID.

[0440]

AbPID	描述
H1H7017N	抗TPRSS2 mAb
H1H1238N	IgG1同种型对照

[0441] 实验方法

[0442] 这些实验在经工程化以表达人TPRSS2蛋白的5-8周龄雄性和雌性小鼠中进行。用150个蚀斑形成单位(PFU)的H1N1攻击小鼠。将小鼠通过腹膜内注射用200 μ L氯胺酮:赛拉嗪(12mg/ml:0.5mg/ml)镇静并且随后经20 μ L病毒鼻内感染。将抗体在感染前一天皮下(SC)或在感染后(PI)几天静脉内(IV)递送。抗体给药方案在实验间各异(表15)。每日采集体重直至PI第14天,并且在小鼠丢失其初始体重的20%时,处死它们。结果报告为存活百分数。

[0443] 表15A.抗体给药(实验1)。

[0444]

抗体	PI天数	剂量	递送
H1H1238N	-1	5mg/kg	SC
H1H7017N	-1,0	5mg/kg	SC、IV

[0445] 表15B.抗体给药(实验2)。

[0446]

抗体	PI天数	剂量	递送
H1H1238N	0	10mg/kg	IV
H1H7017N	0,1,2,3	10mg/kg	IV

[0447] 结果总结与结论

[0448] 已经显示经工程化以表达人TPRSS2蛋白的小鼠可以被致死剂量的流感病毒感染。这些实验的目的是显示H1H7017N可以保护经工程化以表达人TPRSS2蛋白的小鼠对抗甲型流感第1群。抗体以预防模式和治疗模式检验。在两个试验中,H1H7017N处理导致相比同种型对照(H1H1238N)处理的小鼠更高的存活率(图4和图5)。在预防实验中,H1H1238N处理的小鼠的存活率是0%,在PI第-1天处理的小鼠的存活率是85.7%,和在PI第0天H1H7017N处理的小鼠的存活率是100%。对于治疗模式,H1H1238N处理组产生25%存活率,而H1H7017N在PI第0-3天处理的组产生100%存活率。表16中总结了数据。H1H7017N在经工程化以表达人TPRSS2蛋白的小鼠中显示有效性。

[0449] 表16A.表格化数据总结(实验1)

	组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
[0450]	H1H1238N, PI 第-1 天, SC	4	0 (0/4)
	H1H7017N, PI 第-1 天, SC	7	85.7 (6/7)
	H1H7017N, PI 第 0 天, IV	6	100 (6/6)

[0451] 表16B. 表格化数据总结 (实验2)

	组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
[0452]	H1H1238N, PI 第 0 天, IV	4	25 (1/4)
	H1H7017N, PI 第 0 天, IV	5	100 (5/5)
	H1H7017N, PI 第 1 天, IV	5	100 (5/5)
	H1H7017N, PI 第 2 天, IV	5	100 (5/5)
	H1H7017N, PI 第 3 天, IV	5	100 (5/5)

[0453] 参考文献

[0454] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017),PMID:27733646。

[0455] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS ONE.12,e0179177(2017),PMID:28636671。

[0456] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry(靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84(2015).PMID:25666761。

[0457] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. Pöhlmann,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells(TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380(2015),PMID:26379044。

[0458] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017).PMID:28493964。

[0459] 6.E. Böttcher-Friebertshäuser,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-

activating protease TMPRSS2(通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染),Journal of Virology (病毒学杂志),85,1554-1562(2011),PMID:21123387。

[0460] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散),Journal of Virology (病毒学杂志).84,10016-10025 (2010).PMID:20631123。

[0461] 8.C.Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice(TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子),Journal of Virology (病毒学杂志) (2014),doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0462] 9.E.Bottcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium(通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活),Journal of Virology (病毒学杂志),80,9896-9898(2006).PMID:16973594。

[0463] 10.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus(使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析),Proc Natl Acad Sci U S A.2010Jun 22;107(25):11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107.Epub 2010Jun7.PMID:20534532。

[0464] 11.H.Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type i interferon response in polarized human bronchial epithelial cells(高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的i型干扰素反应),Journal of Virology (病毒学杂志),81,12439-12449(2007),PMID:17855549。

[0465] 实施例7:抗TMPRSS2 mAb(H1H7017N)在TMPRSS2人源化小鼠模型中的活性。

[0466] 评估了抗TMPRSS2抗体保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免遭H3N2流感病毒感染的能力。

[0467] 表17.mAb克隆ID.

[0468]	AbPID	描述
	H1H7017N	抗TMPRSS2抗体

[0469] 表18:所用试剂和批号。

目录号	描述	供应商
[0470] 3483	甲型流感 H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, 重配 X-31	BEI 资源
20012-043	PBS	Gibco
	氯胺酮:赛拉嗪	

[0471] 实验方法

[0472] 用20,000个蚀斑形成单位 (PFU) 的H3N2攻击经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的十一周龄雄性和雌性小鼠。将小鼠通过腹膜内注射用200 μ L氯胺酮:赛拉嗪 (12mg/ml:0.5mg/ml) 镇静并且随后经20 μ L病毒鼻内感染。在感染后 (PI) 第1天或第2天,小鼠经静脉内注射抗体。对小鼠称重并且每日观测直至感染后 (PI) 第14天。当小鼠丢失其初始体重的25%时,处死它们。

[0473] 结果总结与结论

[0474] 当考虑流感疗法时,宽度 (breadth) 是重要品质。已经显示抗TMPRSS2抗体H1H7017N有效对抗甲型流感第1群。这个实验的目的是显示H1H7017N可以保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠对抗甲型流感第2群。经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠被致死剂量的H3N2感染并且在PI第1天或第2天接受处理。两个处理组具有相比感染对照更高的存活率。在PI第1天处理的小鼠具有100%存活率,其高于PI第2天处理的具有50%存活率的组,而未处理的小鼠具有0%存活率。全部小鼠均在PI第5-6天之间死亡。图6中显示存活曲线并且表19中总结存活%。这些结果显示,H1H7017改善了H3N2致死模型中的结局。

[0475] 表19. 表格化数据总结。

组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
[0476] 未处理	5	0 (0/5)
H1H7017N, PI 第 1 天	5	100 (5/5)
H1H7017N, PI 第 0 天, IV	4	50 (2/4)

[0477] 参考文献

[0478] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry (人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology (病毒学杂志).91,e01387-16(2017).PMID: 27733646。

[0479] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2 (SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS

ONE.12,e0179177(2017).PMID:28636671。

[0480] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry (靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84 (2015),PMID:25666761。

[0481] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. **Pöhlmann**,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells (TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380 (2015).PMID:26379044。

[0482] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017).PMID:28493964。

[0483] 6.E. **Böttcher-Friebertshäuser**,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2 (通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染),Journal of Virology (病毒学杂志),85,1554-1562(2011).PMID:21123387。

[0484] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散),Journal of Virology (病毒学杂志),84,10016-10025 (2010).PMID:20631123。

[0485] 8.C.Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice(TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子),Journal of Virology (病毒学杂志) (2014),doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0486] 9.E.Bottcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium (通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活),Journal of Virology (病毒学杂志).80,9896-9898(2006).PMID:16973594。

[0487] 10.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus (使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析),Proc Natl Acad Sci U S A.2010Jun 22;107(25):11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107.Epub 2010Jun7.PMID:20534532。

[0488] 11.H.Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells (高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应),Journal of Virology (病毒学杂志).81,12439-12449(2007).PMID:17855549。

- [0489] 实施例8:经工程化表达人TMPRSS2蛋白的小鼠(相对于WT)的感染。
- [0490] 评估了H1N1流感病毒感染的经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的存活率并将其与野生型(WT)小鼠比较。
- [0491] 表20:所用试剂和批号。

[0492]	目录号	描述	供应商
	VR-1469	甲型流感 A/波多黎各/08/1934 (H1N1)	ATCC
	20012-043	PBS	Gibco
		氯胺酮:赛拉嗪	

- [0493] 实验方法
- [0494] 实验在经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的7.5-8周龄雄性和雌性小鼠或野生型同窝仔中进行。用150、750或1,500个蚀斑形成单位(PFU)的A/波多黎各/08/1934(H1N1)攻击小鼠。将小鼠通过腹膜内注射用200μL氯胺酮:赛拉嗪(12mg/ml:0.5mg/ml)镇静并且随后经20μL病毒鼻内感染。每日采集体重直至PI第14天,并且在小鼠丢失其初始体重的20%时,处死它们。结果报告为存活百分数(图7)。
- [0495] 结果总结与结论
- [0496] 产生经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠,以测试抗TMPRSS2抗体在流感体内模型中的治疗有效性。在这个实验中,比较了150、750或1,500PFU的H1N1历史毒株感染的经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠和野生型小鼠的存活率。在全部三个感染组中,经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠和野生型小鼠的存活率均为0%。全部小鼠均在PI第5天和第8天之间死亡,那些接受较高病毒剂量的小鼠比接受较低病毒剂量的小鼠更快濒死。经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠的存活模式类似于野生型小鼠。这显示经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠可以用作流感体内模型来评估TMPRSS2特异性抗体的有效性。参见表21。
- [0497] 表21.表格化数据总结。

组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
野生型; 150 PFUs H1N1	4	0 (0/4)
野生型; 750 PFUs H1N1	4	0 (0/4)
野生型; 1,500 PFUs H1N1	3	0 (0/3)
[0498] 经工程化以表达人 TMPRSS2 蛋白的小鼠; 150 PFU H1N1	4	0 (0/4)
经工程化以表达人 TMPRSS2 蛋白的小鼠; 750 PFU H1N1	3	0 (0/3)
经工程化以表达人 TMPRSS2 蛋白的小鼠; 1,500 PFU H1N1	3	0 (0/3)

[0499] 参考文献

[0500] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017).PMID:27733646。

[0501] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS ONE.12,e0179177(2017).PMID:28636671。

[0502] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry(靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84(2015).PMID:25666761。

[0503] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. **Pöhlmann**,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells(TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380(2015),PMID:26379044。

[0504] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017),PMID:28493964。

[0505] 6.E. **Böttcher-Friebertshäuser**,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2(通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染),Journal of Virology(病毒学杂

志).85,1554-1562(2011).PMID:21123387。

[0506] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散)。Journal of Virology(病毒学杂志),84,10016-10025(2010),PMID:20631123。

[0507] 8.C.Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice(TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子),Journal of Virology(病毒学杂志)(2014),doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0508] 9.E.Bottcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium(通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活),Journal of Virology(病毒学杂志),80,9896-9898(2006),PMID:16973594。

[0509] 10.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus(使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染体内动力学分析),Proc Natl Acad Sci U S A.2010Jun 22;107(25):11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107,Epub 2010Jun 7,PMID:20534532。

[0510] 11.H.Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells(高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应),Journal of Virology(病毒学杂志),81,12439-12449(2007),PMID:17855549。

[0511] 实施例9:H3N2感染后小鼠中H1H14611N2和H1H7017N组合的治疗效果。

[0512] 评估了抗TMPRSS2和抗流感抗体组合保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免遭H3N2流感病毒感染的能力。

[0513] 表22.mAb克隆ID。

[0514]	AbPID	描述
	H1H7017N	抗TMPRSS2抗体
	H1H14611N2	抗甲型流感第2群抗体
	H1H1238N	IgG1同种型对照

[0515] 表23.所用试剂和批号。

[0516]	描述	供应商
	甲型流感 H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, 重配 X-31	BEI 资源
	PBS	Gibco
	氯胺酮:赛拉嗪	

[0517] 实验方法

[0518] 用20,000个蚀斑形成单位(PFU)的A/Aichi/2/68(HA,NA) x A/PR/8/34,Re*重配X-31(H3N2)攻击经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的八周龄雄性和雌性小鼠。将小鼠通过腹膜内注射用200 μ L氯胺酮:赛拉嗪(12mg/ml:0.5mg/ml)镇静并且随后经20 μ L病毒鼻内感染。在感染后(PI)第4天,小鼠经静脉内注射抗体。每日采集体重直至PI第14天,并且在小鼠丢失其初始体重的25%时,处死它们。结果报告为存活百分数。

[0519] 结果总结与结论

[0520] 已经显示,TMPRSS2抗体H1H7017N和广谱甲型流感第2群抗体H1H14611N2分别具有对抗H3N2历史毒株对小鼠致死性攻击的治疗有效性。还已经显示,借助H1H7017N和广谱甲型流感第1群抗体H1H11729P的组合,相比任一者单用,在较少的总抗体处理后,经致死性H1N1攻毒感染的小鼠的存活率可以显著地升高。这个实验的目的是评价H1H7017N和H1H14611N2组合时的协同效应。如图8中所示,4只在PI第4天用hIgG1同种型对照抗体处理的小鼠中3只截止PI第7天死亡。当10mg/kg H1H14611N2给药时5只动物中3只存活,并且当10mg/kg H1H7017N给药时5只动物中4只存活。当H1H14611N2和H1H7017N每种抗体5mg/kg组合给药时,存在40%存活率。攻毒后经H1H14611N2和H1H7017N每种抗体2.5mg/kg组合处理的小鼠百分之百存活。与较高浓度的联用抗体或任意单用抗体相比,借助较低浓度H1H7017N和H1H14611N2的组合,经致死性H3N2攻毒感染的小鼠的存活率升高。表24中总结了存活百分数。

[0521] 表24.表格化数据总结。

	组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
	10 mg/kg hIgG1 同种型对照	5	20 (1/5)
[0522]	10 mg/kg H1H14611N2	5	60 (3/5)
	10 mg/kg H1H7017N	5	80 (4/5)
	5 mg/kg H1H7017N + 5 mg/kg H1H14611N2	5	40 (2/5)
[0523]	2.5 mg/kg H1H7017N + 2.5 mg/kg H1H14611N2	5	100 (5/5)

[0524] 参考文献

[0525] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017),PMID:27733646。

[0526] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS

ONE.12,e0179177(2017).PMID:28636671。

[0527] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry(靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84(2015).PMID:25666761。

[0528] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S.**Pöhlmann**,TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells (TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380(2015).PMID:26379044。

[0529] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017).PMID:28493964。

[0530] 6.E.**Böttcher-Friebertshäuser**,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2(通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染),Journal of Virology(病毒学杂志).85,1554-1562(2011),PMID:21123387。

[0531] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散),Journal of Virology(病毒学杂志),84,10016-10025(2010).PMID:20631123。

[0532] 8.C.Tarnow等人,TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice(TMPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子),Journal of Virology(病毒学杂志)(2014),doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0533] 9.E.Böttcher等人,Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium(通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活),Journal of Virology(病毒学杂志).80,9896-9898(2006).PMID:16973594。

[0534] 10.Manicassamy等人,Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus(使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染的体内动力学分析),Proc Natl Acad Sci U S A.2010Jun 22;107(25):11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107.Epub 2010Jun7.PMID:20534532。

[0535] 11.H.Zeng等人,Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells(高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应),Journal of Virology(病毒学杂志).81,12439-12449(2007).PMID:17855549。

[0536] 实施例10:H1N1感染后小鼠中H1H11729P和H1H7017N组合的治疗效果。

[0537] 评估了抗TMPRSS2和抗流感抗体组合保护经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的小鼠免遭H1N1流感病毒感染的的能力。

[0538] 表25.mAb克隆ID.

[0539]	AbPID	描述
	H1H7017N	抗TMPRSS2抗体
	H1H11729P	抗甲型流感第1群抗体
	H1H1238N	IgG1同种型对照

[0540] 表26.所用试剂和批号。

[0541]	目录号	描述	供应商
	VR-1469	甲型流感 A/波多黎各 /08/1934 (H1N1)	ATCC
	20012-043	PBS	Gibco
		氯胺酮:赛拉嗪	

[0542] 实验方法

[0543] 用1,500个蚀斑形成单位(PFU)的H1N1攻击经工程化以表达人TMPRSS2蛋白的五周龄雄性和雌性小鼠。通过用200 μ L氯胺酮:赛拉嗪(12mg/ml:0.5mg/ml)镇静小鼠并鼻内递送20 μ L病毒,递送病毒。在感染后(PI)第3天,小鼠经静脉内注射抗体。每日采集体重直至PI第14天,并且在小鼠丢失其初始体重的25%时,处死它们。

[0544] 结果总结与结论

[0545] 已经显示,TMPRSS2抗体H1H7017N和广谱甲型流感第1群抗体H1H11729P分别具有对抗H1N1历史毒株致死性攻击小鼠的治疗有效性。然而,这个实验的目的是评价联用时抗体的协同效应。截止PI第6天,在PI第3天用hIgG1同种型对照抗体处理的全部小鼠均死亡。当动物接受5mg/kg H1H11729P或H1H7017N时,40%和0%的动物分别在感染后存活。但是,H1H11729P和H1H7017N每种抗体2.5mg/kg组合导致60%存活率。攻毒后百分之八十经1mg/kg H1H7017N和2mg/kg H1H11729P组合(总计3mg/kg)处理的小鼠存活。借助H1H7017N和H1H11729P的组合,相比任一者单用,在较少的总抗体处理后,经致死性H1N1攻毒感染的小鼠的存活率显著地升高(参见图9和表27)。

[0546] 表27.表格化数据总结。

[0547]	组 ID	每组小鼠数	存活百分数(存活小鼠数/组中小鼠总数)
	5 mg/kg hIgG1 同种型对照	3	0 (0/3)
	5 mg/kg H1H11729P	5	40 (2/5)
	5 mg/kg H1H7017N	5	0 (0/5)
	2.5 mg/kg H1H7017N + 2.5 mg/kg H1H11729P	5	60 (3/5)
	1 mg/kg H1H7017N + 2 mg/kg H1H11729P	5	80 (4/5)

[0548] 参考文献

[0549] 1.K.Shirato,K.Kanou,M.Kawase,S.Matsuyama,Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry(人冠状病毒229E临床分离株绕过内体以进入细胞),Journal of Virology(病毒学杂志).91,e01387-16(2017).PMID:27733646。

[0550] 2.L.M.Reinke等人,Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2(SARS-CoV 纤突蛋白中的不同残基决定借助宿主细胞蛋白酶TMPRSS2的剪切作用和激活),PLoS ONE.12,e0179177(2017).PMID:28636671。

[0551] 3.Y.Zhou等人,Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry(靶向冠状病毒和丝状病毒进入的蛋白酶抑制剂),Antiviral Research,116,76-84(2015).PMID:25666761。

[0552] 4.P.Zmora,A.-S.Moldenhauer,H.Hofmann-Winkler,S. **Pöhlmann**,TMPRSS2 Isoform 1Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells(TMPRSS2同工型1激活呼吸道病毒并在病毒靶细胞中表达),PLoS ONE.10,e0138380(2015).PMID:26379044。

[0553] 5.P.Zmora等人,Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin(TMPRSS2的非人灵长类直向同源物切割并激活流感病毒血凝素),PLoS ONE.12,e0176597(2017),PMID:28493964。

[0554] 6.E. **Böttcher-Friebertshäuser**,D.A.Stein,H.-D.Klenk,W.Garten,Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2(通过靶向血凝素活化性蛋白酶TMPRSS2的反义肽缀合型吗啉代寡聚物抑制人气道细胞培养物中的流感病毒感染),Journal of Virology(病毒学杂志),85,1554-1562(2011).PMID:21123387。

[0555] 7.S.Bertram等人,TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2cells(TMPRSS2和TMPRSS4促进流感病毒在Caco-2

细胞中的胰蛋白酶非依赖性扩散), *Journal of Virology* (病毒学杂志) .84,10016-10025 (2010) .PMID:20631123。

[0556] 8.C.Tarnow等人, *TPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice* (TPRSS2是小鼠中H7N9甲型流感病毒亲肺性和致病性必需的宿主因子), *Journal of Virology* (病毒学杂志) (2014) ,doi:10.1128/JVI.03799-13.PMID:24522916。

[0557] 9.E.Bottcher等人, *Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium* (通过来自人气道上皮的丝氨酸蛋白酶TPRSS2和HAT对流感病毒的蛋白酶解性激活), *Journal of Virology* (病毒学杂志) .80,9896-9898 (2006) .PMID:16973594。

[0558] 10.Manicassamy等人, *Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus* (使用GFP报道子病毒时小鼠中流感病毒感染体内动力学分析), *Proc Natl Acad Sci U S A* .2010Jun 22;107 (25) :11531-6.doi:10.1073/pnas.0914994107.Epub 2010Jun7.PMID:20534532。

[0559] 11.H.Zeng等人, *Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells* (高致病性禽流感H5N1病毒激发在极化的人支气管上皮细胞中衰减的I型干扰素反应), *Journal of Virology* (病毒学杂志) .81,12439-12449 (2007) .PMID:17855549。

[0560] *****

[0561] 本文援引的全部参考文献均通过引用方式以相同程度并入本文,如同通过引用方式专门且独自地并入每份单独的出版物、数据库项(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利。申请人的这份通过引用方式并入声明意在提到每个和每份单独出版物、数据库项(例如,Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利,即便这种援引并非紧邻于专用的通过引用方式并入声明。本说明书范围内纳入专用的通过引用方式并入声明(若有)不以任何方式削弱通过引用方式并入的这种总体状态。本文对参考文献的援引不意在承认该参考文献是相关的现有技术,它也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。

序列表

	<110>	瑞泽恩制药公司	
	<120>	抗 TMPRSS2 抗体和抗原结合片段	
	<130>	10378-W0	
	<140>	待指派	
	<141>	2019-01-24	
	<150>	62/622, 292	
	<151>	2018-01-26	
	<160>	48	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	360	
	<212>	DNA	
[0001]	<213>	智人	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(360)	
	<400>	1	
		cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
		Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
		1 5 10 15	
		tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt tcc tat	96
		Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
		20 25 30	
		ggc atg cac tgg gtc cgc cag tct cca ggc aag ggg ctc gag tgg gtg	144
		Gly Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
		35 40 45	
		gca gtt ata tgg aat gat gga agt tat gta tac tat gca gac tcc gtg	192
		Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
		50 55 60	

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac att tcc aag aac acg ctg ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gag ggg gag tgg gta ctt tac tac ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人

[0002] <400> 2

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

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

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

Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 3	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).. (321)	
	<400> 3	
	gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gtt gga	48
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg	96
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp	
	20 25 30	
[0003]	ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc	144
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	tat aag gcg tct act tta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
	Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tat tcg tac	288
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr	
	85 90 95	
	act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa	321
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	100 105	
	<210> 4	
	<211> 107	
	<212> PRT	

<213> 智人

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
85 90 95

[0004]

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

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<400> 5

gga ttc acc ttc agt tcc tat ggc
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

	<400> 6	
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).. (24)	
	<400> 7	
	ata tgg aat gat gga agt tat gta	24
	Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val	
	1 5	
	<210> 8	
	<211> 8	
[0005]	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 8	
	Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val	
	1 5	
	<210> 9	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).. (39)	
	<400> 9	
	gcg aga gag ggg gag tgg gta ctt tac tac ttt gac tac	39
	Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
	1 5 10	
	<210> 10	

<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 11
cag agt att agt agc tgg
Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

18

[0006]

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
aaggcgtct

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT

	<213>	智人	
	<400>	14	
	Lys Ala Ser		
	1		
	<210>	15	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	智人	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(27)	
	<400>	15	
	caa cag tat aat agt tat tcg tac act		27
	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr		
	1 5		
[0007]	<210>	16	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	16	
	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr		
	1 5		
	<210>	17	
	<211>	450	
	<212>	PRT	
	<213>	智人	
	<400>	17	
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20 25 30		

	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35						40					45				
	Ala	Val	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ser	Tyr	Val	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	
	65					70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
[0008]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155				160		
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195						200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225				230					235					240		
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255			
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

[0009]

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp
				20					25						30	
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35						40					45		
	Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55						60			
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	Tyr
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110		
[0010]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125			
	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130					135					140				
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145					150					155				160	
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165						170					175	
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180					185					190		
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			195					200						205		
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
			210													
<210>	19															
<211>	447															

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

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

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

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

Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

[0011] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	
	210						215					220					
	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
	225					230					235					240	
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
					245					250					255		
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	
				260					265					270			
	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
		275						280					285				
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
		290						295					300				
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
	305					310					315					320	
[0012]	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
					325					330					335		
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
				340					345					350			
	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
			355					360					365				
	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
		370						375				380					
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
	385					390					395				400		
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
				405						410					415		
	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				420					425					430			
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		
		435						440					445				

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys Cys Ser Asn Ser Gly Ile Glu Cys Asp
1 5 10 15

Ser Ser Gly Thr Cys Ile Asn Pro Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser
20 25 30

His Cys Pro Gly Gly Glu Asp Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly
35 40 45

Pro Asn Phe Ile Leu Gln Met Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His
50 55 60

[0013] Pro Val Cys Gln Asp Asp Trp Asn Glu Asn Tyr Gly Arg Ala Ala Cys
65 70 75 80

Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val
85 90 95

Asp Asp Ser Gly Ser Thr Ser Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly
100 105 110

Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser
115 120 125

Lys Ala Val Val Ser Leu Arg Cys Ile Ala Cys Gly Val Asn Leu Asn
130 135 140

Ser Ser Arg Gln Ser Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
145 150 155 160

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
165 170 175

His His

<210> 21
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 猕猴 (Macaca fascicularis)

<400> 21

Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys Cys Ser Asp Ser Gly Ile Glu Cys Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Thr Cys Ile Ser Leu Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser
 20 25 30

His Cys Pro Asn Gly Glu Asp Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly
 35 40 45

Pro Asn Phe Ile Leu Gln Val Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His
 50 55 60

Pro Val Cys Arg Asp Asp Trp Asn Glu Asn Tyr Ala Arg Ala Ala Cys
 65 70 75 80

[0014]

Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn Ser Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val
 85 90 95

Asp Asn Ser Gly Ala Thr Ser Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly
 100 105 110

Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser
 115 120 125

Lys Ala Val Val Ser Leu Arg Cys Ile Ala Cys Gly Val Arg Ser Asn
 130 135 140

Leu Ser Arg Gln Ser Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 145 150 155 160

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
 165 170 175

His His

<210> 22

<211> 492
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22

Met Ala Leu Asn Ser Gly Ser Pro Pro Ala Ile Gly Pro Tyr Tyr Glu
 1 5 10 15

Asn His Gly Tyr Gln Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Val
 20 25 30

Val Pro Thr Val Tyr Glu Val His Pro Ala Gln Tyr Tyr Pro Ser Pro
 35 40 45

Val Pro Gln Tyr Ala Pro Arg Val Leu Thr Gln Ala Ser Asn Pro Val
 50 55 60

Val Cys Thr Gln Pro Lys Ser Pro Ser Gly Thr Val Cys Thr Ser Lys
 65 70 75 80

[0015]

Thr Lys Lys Ala Leu Cys Ile Thr Leu Thr Leu Gly Thr Phe Leu Val
 85 90 95

Gly Ala Ala Leu Ala Ala Gly Leu Leu Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys
 100 105 110

Cys Ser Asn Ser Gly Ile Glu Cys Asp Ser Ser Gly Thr Cys Ile Asn
 115 120 125

Pro Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser His Cys Pro Gly Gly Glu Asp
 130 135 140

Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly Pro Asn Phe Ile Leu Gln Met
 145 150 155 160

Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His Pro Val Cys Gln Asp Asp Trp
 165 170 175

Asn Glu Asn Tyr Gly Arg Ala Ala Cys Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn
 180 185 190

Asn Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val Asp Asp Ser Gly Ser Thr Ser
 195 200 205

	Phe	Met	Lys	Leu	Asn	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Asp	Ile	Tyr	Lys	Lys	
	210						215					220					
	Leu	Tyr	His	Ser	Asp	Ala	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Arg	
	225					230				235						240	
	Cys	Ile	Ala	Cys	Gly	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Ser	Arg	Gln	Ser	Arg	Ile	
					245					250						255	
	Val	Gly	Gly	Glu	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	
					260					265					270		
	Leu	His	Val	Gln	Asn	Val	His	Val	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Thr	Pro	
					275					280					285		
	Glu	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Asn	Asn	
					290					295					300		
	Pro	Trp	His	Trp	Thr	Ala	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Gln	Ser	Phe	Met	
	305					310					315					320	
[0016]	Phe	Tyr	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gln	Val	Glu	Lys	Val	Ile	Ser	His	Pro	Asn	
					325					330						335	
	Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Gln	
					340					345					350		
	Lys	Pro	Leu	Thr	Phe	Asn	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asn	
					355					360					365		
	Pro	Gly	Met	Met	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Cys	Trp	Ile	Ser	Gly	Trp	
					370					375					380		
	Gly	Ala	Thr	Glu	Glu	Lys	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	
	385					390					395					400	
	Lys	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Thr	Gln	Arg	Cys	Asn	Ser	Arg	Tyr	Val	Tyr	
					405					410						415	
	Asp	Asn	Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Met	Ile	Cys	Ala	Gly	Phe	Leu	Gln	Gly	
					420					425					430		
	Asn	Val	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Thr	Ser	

	435	440	445
	Lys Asn Asn Ile Trp Trp Leu Ile Gly Asp Thr Ser Trp Gly Ser Gly		
	450	455	460
	Cys Ala Lys Ala Tyr Arg Pro Gly Val Tyr Gly Asn Val Met Val Phe		
	465	470	475 480
	Thr Asp Trp Ile Tyr Arg Gln Met Arg Ala Asp Gly		
	485	490	
	<210> 23		
	<211> 492		
	<212> PRT		
	<213> 恒河猴 (Macaca mulatta)		
	<400> 23		
	Met Ala Leu Asn Ser Gly Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Tyr Tyr Glu		
	1	5	10 15
[0017]	Asn His Gly Tyr Gln Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Val		
	20	25	30
	Ala Pro Asn Val Tyr Glu Val His Pro Ala Gln Tyr Tyr Pro Ser Pro		
	35	40	45
	Val Pro Gln Tyr Thr Pro Arg Val Leu Thr His Ala Ser Asn Pro Ala		
	50	55	60
	Val Cys Arg Gln Pro Lys Ser Pro Ser Gly Thr Val Cys Thr Ser Lys		
	65	70	75 80
	Thr Lys Lys Ala Leu Cys Val Thr Met Thr Leu Gly Ala Val Leu Val		
	85	90	95
	Gly Ala Ala Leu Ala Ala Gly Leu Leu Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys		
	100	105	110
	Cys Ser Asp Ser Gly Ile Glu Cys Asp Ser Ser Gly Thr Cys Ile Ser		
	115	120	125
	Leu Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser His Cys Pro Asn Gly Glu Asp		
	130	135	140

	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Arg	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asn	Phe	Ile	Leu	Gln	Val	
	145					150				155					160		
	Tyr	Ser	Ser	Gln	Arg	Lys	Ser	Trp	His	Pro	Val	Cys	Arg	Asp	Asp	Trp	
				165					170						175		
	Asn	Glu	Asn	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Met	Gly	Tyr	Lys	Asn	
				180					185						190		
	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Gln	Gly	Ile	Val	Asp	Asn	Ser	Gly	Ala	Thr	Ser	
			195					200					205				
	Phe	Met	Lys	Leu	Asn	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Asp	Ile	Tyr	Lys	Lys	
	210						215					220					
	Leu	Tyr	His	Ser	Asp	Ala	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Arg	
	225					230					235				240		
	Cys	Ile	Ala	Cys	Gly	Val	Arg	Ser	Asn	Leu	Ser	Arg	Gln	Ser	Arg	Ile	
				245						250					255		
[0018]	Val	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	
				260						265					270		
	Leu	His	Val	Gln	Asn	Ile	His	Val	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Thr	Pro	
			275						280						285		
	Glu	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Asn	Ser	
	290							295					300				
	Pro	Trp	Gln	Trp	Thr	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Leu	Arg	Gln	Ser	Ser	Met	
	305					310					315				320		
	Phe	Tyr	Glu	Lys	Gly	His	Arg	Val	Glu	Lys	Val	Ile	Ser	His	Pro	Asn	
				325						330					335		
	Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	His	
				340						345					350		
	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Asn	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asn	
			355					360					365				
	Pro	Gly	Met	Met	Leu	Glu	Pro	Glu	Gln	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Gly	Trp	

370	375	380	
Gly Ala Thr Gln Glu Lys Gly Lys Thr Ser Asp Val Leu Asn Ala Ala			
385	390	395	400
Met Val Pro Leu Ile Glu Pro Arg Arg Cys Asn Asn Lys Tyr Val Tyr			
	405	410	415
Asp Gly Leu Ile Thr Pro Ala Met Ile Cys Ala Gly Phe Leu Gln Gly			
	420	425	430
Thr Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Leu			
	435	440	445
Lys Asn Asp Val Trp Trp Leu Ile Gly Asp Thr Ser Trp Gly Ser Gly			
	450	455	460
Cys Ala Gln Ala Asn Arg Pro Gly Val Tyr Gly Asn Val Thr Val Phe			
	465	470	475
			480
Thr Asp Trp Ile Tyr Arg Gln Met Arg Ala Asp Gly			
	485	490	
[0019]			
<210>	24		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	24		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe			
	20	25	30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Ser Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Phe Ser			
	65	70	75
			80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe Ser
1 5

[0020]

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met
1 5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

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

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

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

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

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

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

[0021] Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr
1 5

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Gly Ala Ser
1

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 32
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

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

[0022]

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 8

<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

[0023]

<400> 35

Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val
1 5 10

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Gln Gly Ile Arg Asn Asn
1 5

[0024]

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Ala Ala Ser
1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 39

Leu Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

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

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

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

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

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

[0025] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Gly Phe Ser Phe Ser Gly Phe Ser
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met
1 5

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

[0026]

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr
1 5

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Gly Ala Ser
1

[0027] <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GS 接头

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

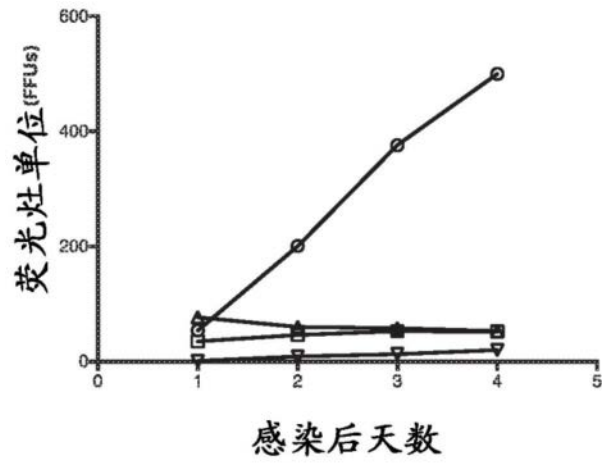


图1A

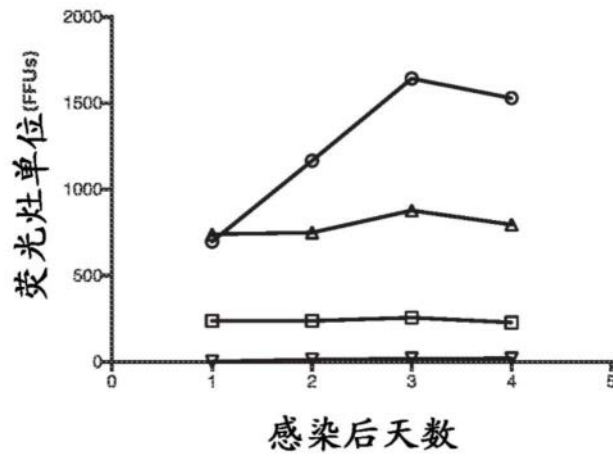


图1B

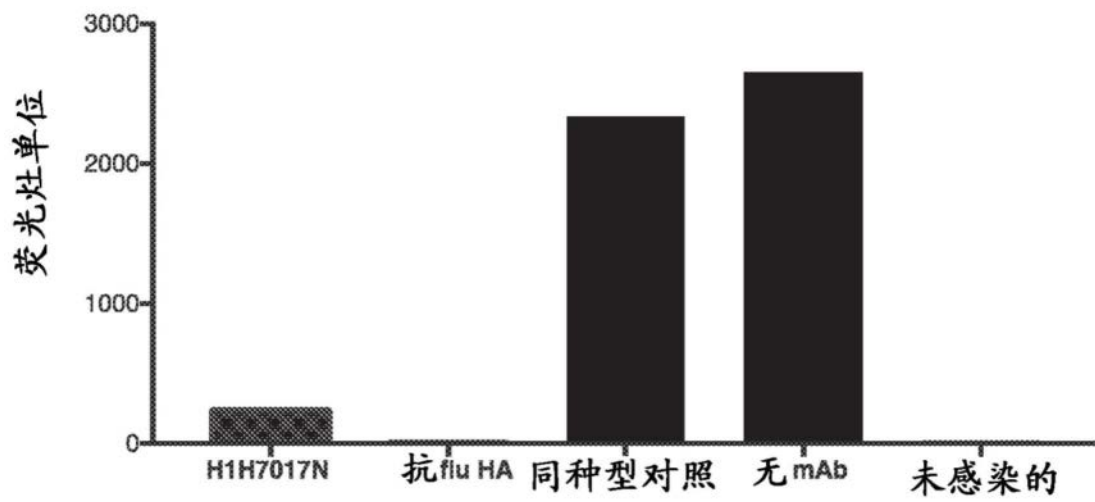


图2

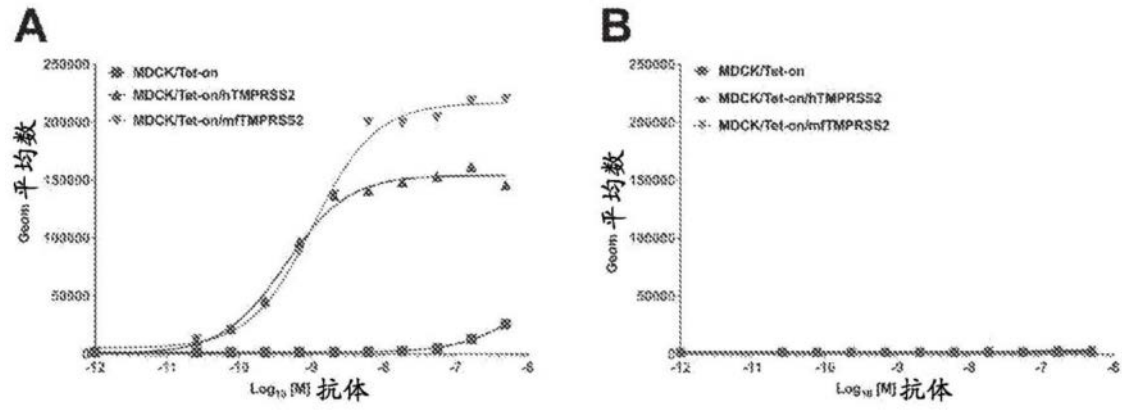


图3

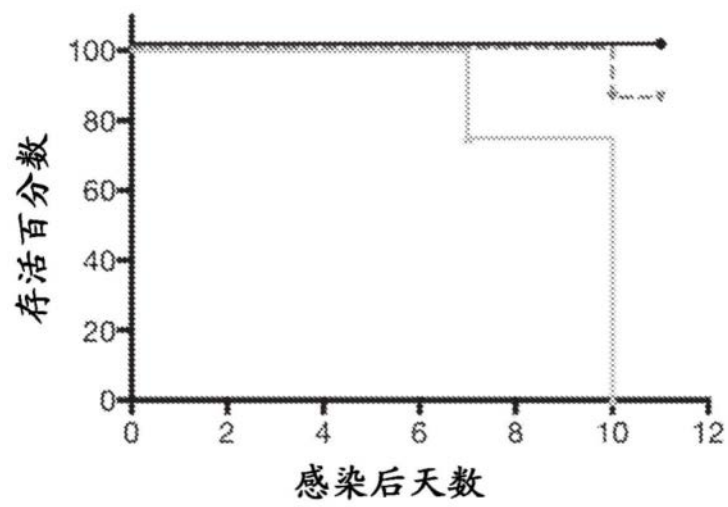


图4

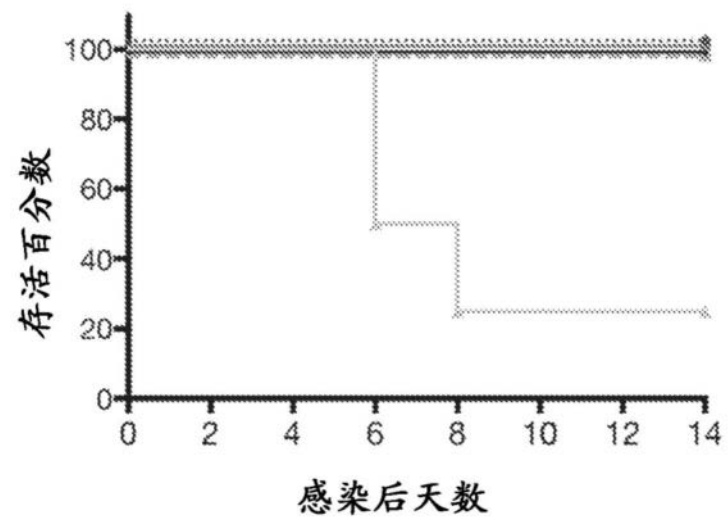


图5

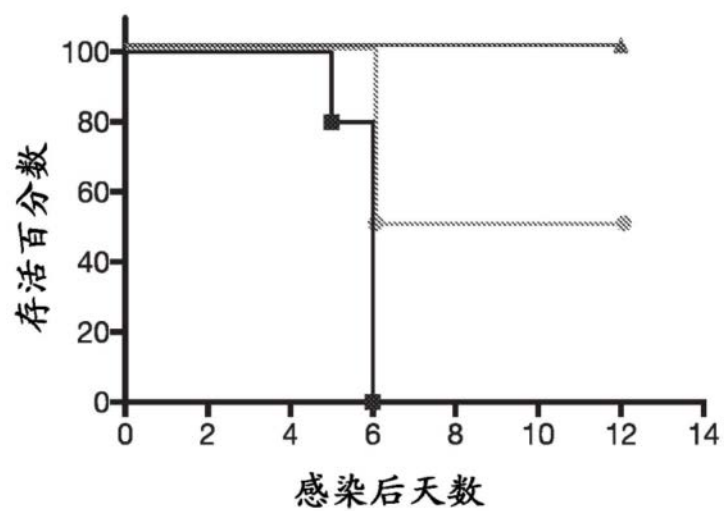


图6

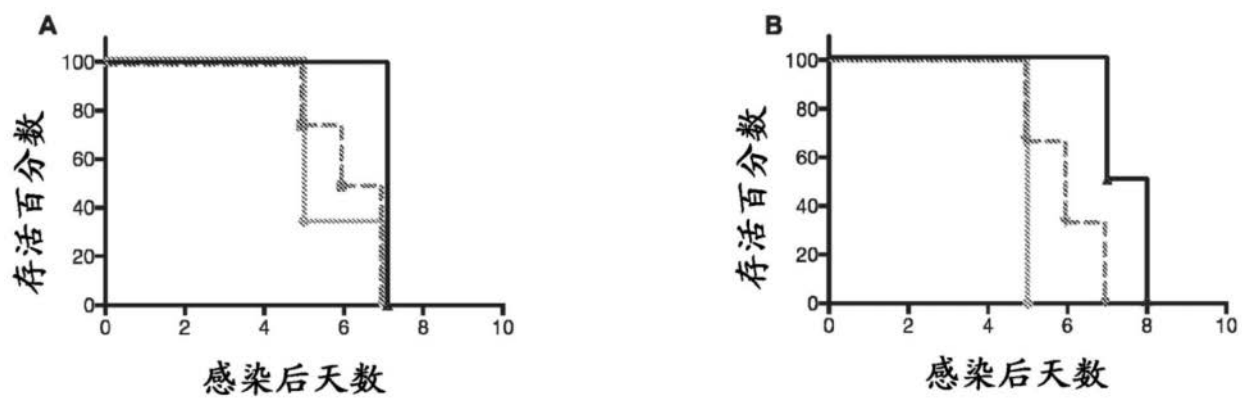


图7

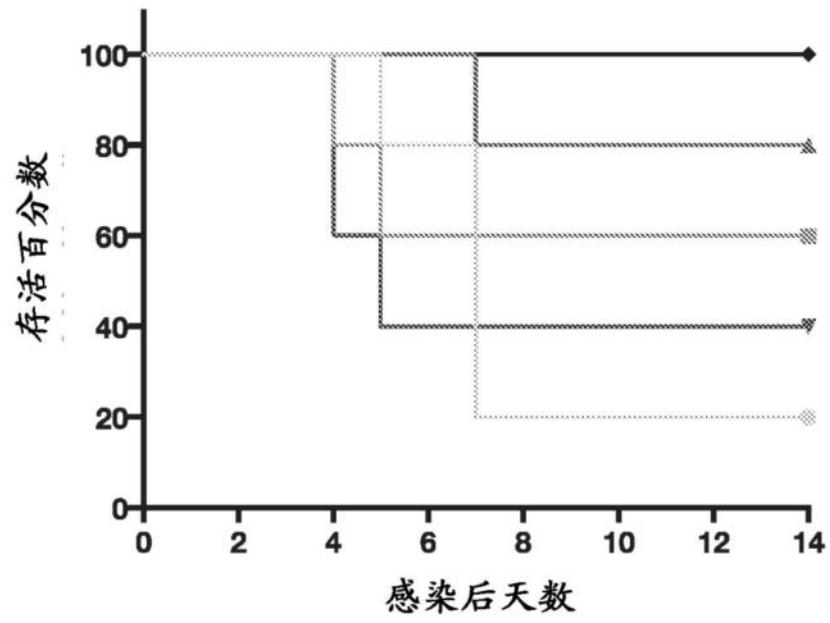


图8

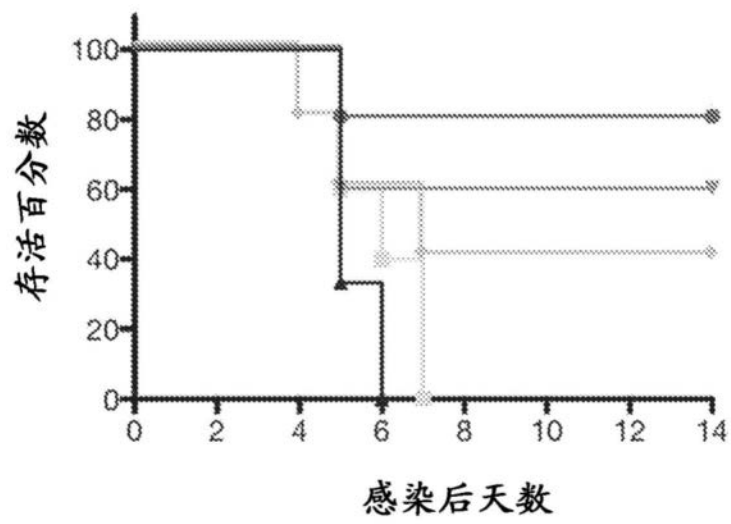


图9