



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114269381 A

(43) 申请公布日 2022.04.01

(21) 申请号 202080034142.3

(22) 申请日 2020.04.30

(30) 优先权数据

PCT/EP2019/061134 2019.04.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/062160 2020.04.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/221908 EN 2020.11.05

(71) 申请人 胡默波斯生物医学公司

地址 瑞士贝林佐纳

(72) 发明人 达维德·科尔蒂 法比奥·贝尼尼

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

代理人 回振海 王庆艳

(51) Int.Cl.

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书41页

序列表12页 附图28页

(54) 发明名称

用于治疗甲型流感感染的抗体和方法

(57) 摘要

本发明提供了中和甲型流感病毒感染的抗体。本发明还提供了编码这样的抗体的核酸及产生这样的抗体的无限增殖化B细胞和培养的浆细胞。另外,本发明提供了本发明的抗体在预防和治疗甲型流感感染中的用途。

1. 一种抗体,所述抗体包含分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所陈列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所陈列的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;及重链恒定区中的突变M428L和N434S。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体与甲型流感病毒的血凝素结合。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体中和甲型流感病毒的感染。

4. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述抗体以不超过用比较抗体中和甲型流感所需剂量的一半的剂量中和甲型流感感染,所述比较抗体与所述抗体的不同仅在于所述比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。

5. 根据权利要求4所述的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的三分之一。

6. 根据权利要求4或5所述的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的五分之一。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体中和H3 HA的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和/或HA2 N49T;和/或H1 HA的多态性N146D。

8. 根据权利要求7所述的抗体,其中所述抗体中和H3 HA的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和/或HA2 N49T;和/或H1 HA的多态性N146D,相对于野生型病毒的HA, IC_{50} 变化倍数 <2 。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中与比较抗体相比,所述抗体引发降低的抗药物抗体反应,所述比较抗体与所述抗体的不同仅在于所述比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中与比较抗体相比,所述抗体表现出较低的免疫原性,所述比较抗体与所述抗体的不同仅在于所述比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为人抗体。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是IgG型的。

14. 根据权利要求13所述的抗体,其中所述抗体是IgG1型的。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体的所述轻链为 κ 轻链。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少70%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少75%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少75%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少85%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:7中所陈列的氨基酸序列,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:8中所陈列的氨基酸序列,其中保留了如权利要求1中所定义的CDR序列。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体的CH3区不包含除M428L和N434S外的任何其他突变。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体的Fc区不包含除M428L和N434S外的任何其他突变。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含如SEQ ID NO:9中所陈列的氨基酸序列,所述轻链包含如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有由如SEQ ID NO:9中所陈列的氨基酸序列组成的重链和由如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列组成的轻链。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其用于甲型流感病毒感染的预防或治疗。

28. 根据权利要求27所述之用途的抗体,其中所述抗体预防性地施用。

29. 根据权利要求27或28所述之用途的抗体,其中所述抗体以不超过用比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的二分之一剂量施用,所述比较抗体与所述抗体的不同仅在于所述比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。

30. 根据权利要求29所述之用途的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的三分之一。

31. 根据权利要求29所述之用途的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的四分之一。

32. 根据权利要求29所述之用途的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的五分之一。

33. 根据权利要求29所述之用途的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的六分之一。

34. 根据权利要求29所述之用途的抗体,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的七分之一。

35. 根据权利要求29所述之用途的抗体, 其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的八分之一。

36. 根据权利要求29所述之用途的抗体, 其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的九分之一。

37. 根据权利要求29所述之用途的抗体, 其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的十分之一。

38. 根据权利要求27至37中任一项所述之用途的抗体, 其中待治疗的对象面临甲型流感感染的直接风险。

39. 根据权利要求27至38中任一项所述之用途的抗体, 其中待治疗的对象患有自身免疫疾病或过敏症; 或有患上自身免疫疾病或过敏症的风险。

40. 一种核酸分子, 所述核酸分子包含编码根据权利要求1至26中任一项所述的抗体的多核苷酸。

41. 根据权利要求40所述的核酸分子, 其中所述核酸分子包含

(i) 多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:12中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:12具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列; 和

(ii) 多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:13中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:13具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列。

42. 根据权利要求40或41所述的核酸分子, 其中所述核酸分子包含

(i) 多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:14中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:14具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列; 和

(ii) 多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:15中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:15具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列。

43. 一种第一核酸分子和第二核酸分子的组合, 其中所述第一核酸分子包含编码根据权利要求1至26中任一项所述的抗体的所述重链的多核苷酸; 而所述第二核酸分子包含编码同一抗体的相应轻链的多核苷酸。

44. 根据权利要求43所述的第一核酸分子和第二核酸分子的组合, 其中

(i) 所述第一核酸分子包含多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:12中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:12具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列; 和

(ii) 所述第二核酸分子包含多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:13中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:13具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列。

45. 根据权利要求43或44所述的第一核酸分子和第二核酸分子的组合, 其中

(i) 所述第一核酸分子包含多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:14中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:14具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列; 和

(ii) 所述第二核酸分子包含多核苷酸, 所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:15中所陈列的核苷酸序列; 或与SEQ ID NO:15具有70%或多于70%同一性的核苷酸序列。

46. 一种载体, 所述载体包含根据权利要求40至42中任一项所述的核酸分子。

47. 一种载体, 所述载体包含根据权利要求43至45中任一项所述的核酸分子的组合。

48. 一种细胞, 所述细胞表达根据权利要求1至26中任一项所述的抗体, 或包含根据权利要求46或47所述的载体。

49. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至26中任一项所述的抗体、根据权利要求40至42中任一项所述的核酸、根据权利要求43至45中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求46或47所述的载体或根据权利要求48所述的细胞和任选地药学上可接受的稀释剂或载剂。

50. 根据权利要求1至26中任一项所述的抗体、根据权利要求40至42中任一项所述的核酸、根据权利要求43至45中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求46或47所述的载体、根据权利要求48所述的细胞或根据权利要求49所述的药物组合物在制备用于预防、治疗或减弱甲型流感病毒感染的药物中的用途。

51. 根据权利要求1至26中任一项所述的抗体、根据权利要求40至42中任一项所述的核酸、根据权利要求43至45中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求46或47所述的载体、根据权利要求48所述的细胞或根据权利要求49所述的药物组合物,其用于甲型流感病毒感染的预防或治疗。

52. 根据权利要求51所述之用途的抗体、核酸、核酸的组合、载体、细胞或药物组合物,其中所述抗体、所述核酸、所述载体、所述细胞或所述药物组合物预防性地施用。

53. 根据权利要求51或权利要求52所述之用途的抗体、核酸、核酸的组合、载体、细胞或药物组合物,其中所述抗体、所述核酸、所述载体、所述细胞或所述药物组合物与抗病毒剂联合施用。

54. 根据权利要求53所述之用途的抗体、核酸、核酸的组合、载体、细胞或药物组合物,其中所述抗病毒剂选自神经氨酸酶抑制剂和流感聚合酶抑制剂。

55. 根据权利要求53或54所述之用途的抗体、核酸、核酸的组合、载体、细胞或药物组合物,其中所述抗病毒剂选自奥司他韦、扎那米韦和巴洛沙韦。

56. 根据权利要求51至55中任一项所述之用途的抗体、核酸、核酸的组合、载体、细胞或药物组合物,其中待治疗的对象患有自身免疫疾病或过敏症;或有患上自身免疫疾病或过敏症的风险。

57. 一种 (i) 根据权利要求1至26中任一项所述的抗体和 (ii) 抗病毒剂的组合。

58. 根据权利要求57所述的组合,其中所述抗病毒剂选自神经氨酸酶抑制剂和流感聚合酶抑制剂。

59. 根据权利要求57或58所述的组合,其中所述抗病毒剂选自奥司他韦、扎那米韦和巴洛沙韦。

60. 根据权利要求57至59中任一项所述的组合,其用于甲型流感病毒感染的预防或治疗。

61. 一种减少甲型流感病毒感染或降低甲型流感病毒感染风险的方法,所述方法包括:向有此需要的对象施用治疗有效量的根据权利要求1至26中任一项所述的抗体。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述抗体预防性地施用。

63. 根据权利要求61或62所述的方法,其中所述抗体以不超过用比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的一半的剂量施用,所述比较抗体与所述抗体的不同仅在于所述比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的三分之一。

65. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感所需剂量的五分之一。

66. 根据权利要求61至65中任一项所述的方法, 其中所述对象面临甲型流感感染的直接风险。

67. 根据权利要求61至66中任一项所述的方法, 其中所述抗体与抗病毒剂联合施用。

68. 一种降低抗体的免疫原性的方法, 所述抗体包含分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所陈列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所陈列的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列; 所述方法包括在所述抗体的重链恒定区中引入突变M428L和N434S的步骤。

用于治疗甲型流感感染的抗体和方法

[0001] 本发明涉及有效减少甲型流感感染的抗体及此类抗体的用途。特别地,本发明涉及甲型流感感染的预防和治疗。

[0002] 流感是一种传染病,每年都会在全球各地爆发,导致每年约300万至500万例严重疾病和约290000至650000例呼吸道感染死亡(WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 2018年11月6日)。最常见的症状包括:突然发烧、咳嗽(通常干咳)、头痛、肌肉和关节疼痛、严重身体不适(感觉不舒服)、喉咙痛和流鼻涕。潜伏期从一天到四天不等,但通常在暴露于病毒后两天左右开始出现症状。流感的并发症可能包括肺炎、鼻窦感染及既往健康问题的恶化,如哮喘或心力衰竭、脓毒症或慢性基础疾病的加剧。

[0003] 流感由流感病毒引起,流感病毒是正粘病毒(Orthomyxoviridae)科的一组具有抗原性和遗传多样性的病毒,含有负义、单链、分段RNA基因组。在四种类型的流感病毒(甲型、乙型、丙型和丁型)中,三种类型(甲型、乙型和丙型)影响人类。甲型流感病毒是最致命的人类病原体并会导致最严重的疾病。甲型流感病毒可根据存在的主要表面蛋白的不同亚型进行分类:血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。存在至少18种由其血凝素(“HA”)蛋白定义的甲型流感亚型。HA可分为两组。组1包括H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16和H17亚型,组2包括H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型。虽然所有亚型均存在于鸟类中,但大多数H1、H2和H3亚型会导致人类患病。H5、H7和H9亚型正在导致人类散发性严重感染并可能引发新的大流行。甲型流感病毒不断进化产生新的变种,这种现象被称为抗原漂移。因此,针对过去的病毒产生的抗体对新的漂移病毒的保护作用很差或没有保护作用。结果是,每年必须针对预计会出现的H1和H3病毒生产新的疫苗,这一过程非常昂贵且并不总是有效。这同样适用于H5流感疫苗的生产。

[0004] HA是甲型流感病毒的主要表面蛋白,是感染或疫苗接种诱导的中和抗体的主要靶点。HA负责将病毒与膜上具有唾液酸的细胞结合,如上呼吸道中的细胞或红细胞。另外,在降低pH后,HA会介导病毒包膜与内体膜的融合。HA为同源三聚体整合膜糖蛋白。HA三聚体由三个相同的单体组成,每个单体由完整的HA0单多肽链形成,HA1区域和HA2区域通过2个二硫键连接。每个HA2区域呈现 α 螺旋卷曲螺旋结构并主要形成HA的“茎”或“茎干”区域,而HA1区域为含有 α/β 结构的混合物的小球状结构域(HA的“头部”区域)。球状HA头部区域介导与唾液酸受体的结合,而HA茎介导病毒和细胞膜之间的随后融合,该融合由低pH在内体中触发。虽然免疫显性HA球状头部结构域具有高度可塑性,不同的抗原位点发生恒定的抗原漂移,但HA茎区域在亚型中是相对保守的。目前的流感疫苗主要诱导针对免疫显性和可变HA头部区域的免疫反应,该区域比HA的茎区域进化得更快(Kirkpatrick E, Qiu X, Wilson PC, Bahl J, Krammer F. The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. Sci Rep. 2018 Jul 11; 8(1):10432)。因此,一种特定的流感疫苗通常只能提供不超过几年的保护,故而需要每年重新开发流感疫苗。

[0005] 为了克服这些问题,最近开发了新的一类靶向HA茎中的保守位点的流感中和抗体作为流感病毒治疗法。与靶向HA的头部区域的抗体相比,这些靶向HA的茎区域的抗体通常具有更广泛的中和作用。Corti D. and Lanzavecchia A., Broadly neutralizing

antiviral antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31:705-742中提供了对广泛中和甲型流感抗体的综述。Okuno等人用流感病毒A/Okuda/57 (H2N2) 使小鼠免疫并分离出一种单克隆抗体 (C179), 该抗体在动物模型中体外和体内与HA2中的保守构象表位结合并中和组1中的H2、H1和H5亚型甲型流感 (Okuno等人, 1993; Smirnov等人, 1999; Smirnov等人, 2000)。HA-茎区域靶向抗体的其他实例包括CR6261 (Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, Poon LLM, Alard P, Cornelissen L等人 (2008) Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM⁺ Memory B Cells. *PLoS ONE* 3 (12): e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>; Friesen RHE, Koudstaal W, Koldijk MH, Weverling GJ, Brakenhoff JPJ, Lenting PJ等人 (2010) New Class of Monoclonal Antibodies against Severe Influenza: Prophylactic and Therapeutic Efficacy in Ferrets. *PLoS ONE* 5 (2): e9106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009106>)、F10 (Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen LM, Santelli E, Stec B, Cadwell G, Ali M, Wan H, Murakami A, Yammanuru A, Han T, Cox NJ, Bankston LA, Donis RO, Liddington RC, Marasco WA (March 2009). "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses". *Nature Structural & Molecular Biology*. 16 (3): 265-73. doi:10.1038/nsmb.1566)、CR8020 (Ekiert DC, Friesen RHE, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M等人 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333 (6044): 843-50)、FI6 (Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A等人 2011. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333 (6044): 850-56) 和 CR9114 (Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdgheest D, Khayat R等人 2012. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337 (6100): 1343-48)。

[0006] 然而, 能够同时与组1和组2亚型的HA茎区域反应的抗体极为罕见并且通常不会完全覆盖所有亚型。最近, 有人描述了抗体MEDI8852, 其以前所未有的广度有效地中和组1和组2甲型流感病毒, 能够中和跨越>80年抗原进化的多种代表性病毒 (Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, et al. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*. 2016; 166 (3): 596-608; Paules, C.I.等人 The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Controls Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. *J Infect Dis* 216, 356-365, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix292> (2017))。MEDI8852显示为与高度保守的表位结合, 这与其他结构特征的茎反应性中和抗体显著不同 (Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, et al. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*. 2016; 166 (3): 596-608)。

[0007] 有鉴于此, 本发明的目的在于提供一种新型抗体, 即使在以非常低的剂量施用, 该抗体也广泛且有效地中和甲型流感病毒。

[0008] 该目的通过下文和附随的权利要求书中阐述的主题来实现。

[0009] 尽管下文详细描述了本发明, 但应理解, 本发明不限于本文描述的特定方法、方案

和试剂,因为这些是可变化的。还应理解,本文使用的术语无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅由附随的权利要求书限制。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0010] 下面将描述本发明的要素。这些要素与特定的实施方案一起列出,然而,应理解,它们可以任何方式和以任何数量组合而产生另外的实施方案。不同地描述的实例和实施方案不应解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。该描述应理解为支持并涵盖将明确描述的实施方案与任何数量的公开要素相组合的实施方案。此外,除非上下文另有指出,否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合均应认为是本申请的描述所公开的。

[0011] 贯穿本说明书和随后的权利要求书,除非上下文另有要求,否则术语“包含”应理解为指包括所述及的成员、整数或步骤但不排除任何其他未述及的成员、整数或步骤。术语“由……组成”是术语“包含”的一个特定实施方案,其中排除了任何其他未述及的成员、整数或步骤。在本发明的上下文中,术语“包含”涵盖术语“由……组成”。术语“包含”因此涵盖“包括”以及“由……组成”,例如,“包含X”的组合物可只由X组成或还可包括另外的东西,例如,X+Y。

[0012] 除非本文中另有指出或明显与上下文相矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其在权利要求书的上下文中)使用的术语“一(a/an)”和“所述”以及类似提及应解释为涵盖单数和复数两者。本文对值的范围的记载仅旨在用作一个一个单独地提及落入该范围内的每一个单独的值的简写方法。除非本文中另有指出,否则每一个单独的值都被并入到说明书中,就好像其在本文中被一个一个单独地记载一样。说明书中的任何语言均不应解释为指示对本发明的实践必不可少的任何未要求保护的要素。

[0013] “基本上”一词不排除“完全”,例如,“基本上不含”Y的组合物可完全不含Y。必要时,可从本发明的定义省略“基本上”一词。

[0014] 与数值x有关的术语“约”指的是 $x \pm 10\%$,例如, $x \pm 5\%$ 、或 $x \pm 7\%$ 、或 $x \pm 10\%$ 、或 $x \pm 12\%$ 、或 $x \pm 15\%$ 、或 $x \pm 20\%$ 。

[0015] 如本文所用,术语“疾病”旨在与术语“病症”和“病况”(如在医学状况中)大体同义并可互换使用,因为它们都反映了人体或动物体或者人体或动物体的部分之一损害正常功能的异常状况,通常表现为明显的体征和症状,并导致人或动物的寿命缩短或生活质量下降。

[0016] 如本文所用,提及对对象或患者的“治疗”旨在包括防止、预防、减弱、改善和医疗。术语“对象”或“患者”在本文中可互换使用以表示包括人类在内的所有哺乳动物。对象的实例包括人、牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。在一些实施方案中,患者为人。

[0017] 剂量通常与体重相关地表达。因此,表达为[g、mg或其他单位]/kg(或g、mg等)的剂量通常是指[g、mg或其他单位]“每kg(或g、mg等)体重”,即使没有明确提到术语“体重”。

[0018] 术语“特异性结合”和类似提及不涵盖非特异性黏附。

[0019] 如本文所用,术语“抗体”涵盖各种形式的抗体,包括但不限于完整抗体、抗体片段、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体和基因工程抗体(变异或突变抗体),只要保留了根据本发明的特征性质即可。在一些实施方案中,抗体为人抗体。在一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。例如,抗体为人单克隆抗体。

[0020] 人抗体是现有技术中熟知的(van Dijk,M.A.,and van de Winkel,J.G.,

Curr.Opin.Chem.Biol.5 (2001) 368-374)。人抗体也可在转基因动物(例如,小鼠)中产生,所述动物在免疫后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的完整组库或集合。向这样的种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体(参见例如Jakobovits,A.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits,A.等人,Nature 362 (1993) 255-258;Bruggemann,M.等人,Year Immunol.7 (1993) 3340)。人抗体也可在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.,and Winter,G., J.Mol.Biol.227 (1992) 381-388;Marks,J.D.等人,J.Mol.Biol.222 (1991) 581-597)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77 (1985);和Boerner,P.等人, J.Immunol.147 (1991) 86-95)。在一些实施方案中,人单克隆抗体通过使用如Traggiai E, Becker S,Subbarao K,Kolesnikova L,Uematsu Y,Gismondo MR,Murphy BR,Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004):An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells:potent neutralization of SARS coronavirus.Nat Med.10 (8): 871-5中描述的改进的EBV-B细胞无限增殖化来制备。如本文所用,术语“可变区”(轻链可变区(V_L)、重链可变区(V_H))表示直接参与抗体与抗原的结合的轻链和重链对中的每一个。

[0021] 本发明的抗体可以是任何同种型的(例如,IgA、IgG、IgM,即 α 、 γ 或 μ 重链)。例如,抗体是IgG型的。在IgG同种型内,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类,例如IgG1。本发明的抗体可具有 κ 或 λ 轻链。在一些实施方案中,抗体是IgG1型的并具有 κ 轻链。

[0022] 根据本发明的抗体可以纯化形式提供。通常,抗体将存在于基本上不含其他多肽的组合物中,例如,其中小于90% (按重量计)、通常小于60%、更通常小于50%的组合物由其他多肽组成。

[0023] 根据本发明的抗体在人类和/或非人类(或异源)宿主例如小鼠中可以是免疫原性的。例如,抗体可具有在非人类宿主中具有免疫原性但在人类宿主中不具有免疫原性的独特位。本发明的人用抗体包括不能容易地从宿主如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等分离并且通常不能通过人源化或从异种小鼠获得的那些。

[0024] 如本文所用,“中和抗体”是可中和即防止、抑制、降低、阻碍或干扰病原体在宿主中引发和/或延续感染的能力的抗体。术语“中和抗体”和“起中和作用的抗体”在本文中可互换使用。这些抗体可单独或组合地使用,在适当配制时作为预防剂或治疗剂,与主动疫苗接种相结合,作为诊断工具,或作为如本文所述的生产工具。

[0025] 如本文所用,术语“突变”涉及与参考序列例如相应的基因组序列相比,核酸序列和/或氨基酸序列的变化。突变,例如与基因组序列相比,可以是例如(自然发生的)体细胞突变、自发突变、诱导突变,例如由酶、化学品或辐射诱导,或通过定点诱变(在核酸序列中和/或在氨基酸序列中进行特定且有意的改变的分子生物学方法)获得的突变。因此,术语“突变”应理解为还包括物理上进行突变,例如在核酸序列中或在氨基酸序列中。突变包括一个或多于一个核苷酸或氨基酸的置换、缺失和插入以及若干连续的核苷酸或氨基酸的倒位。为了在氨基酸序列中实现突变,可在编码所述氨基酸序列的核苷酸序列中引入突变以表达(重组)突变多肽。突变可例如通过改变(例如通过定点诱变)编码一个氨基酸的核酸分子的密码子以产生编码不同的氨基酸的密码子或者通过合成序列变体来实现,例如通过知道编码多肽的核酸分子的核苷酸序列并通过设计包含编码多肽变体的核苷酸序列的核酸

分子的合成而不需要使核酸分子的一个或多于一个核苷酸突变。

[0026] 在本说明书的全文中引用了若干文件。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、指南等),无论在上文还是下文,均通过全文引用并入本文。本文中的任何内容均不应解释为承认本发明无权因在先发明而先于此类公开。

[0027] 应理解,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为这些是可变化的。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅由附随的权利要求书限制。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0028] 抗体

[0029] 本发明的基础是,在其他发现的基础上鉴定出抗体,这些抗体即使在以非常低的剂量施用时也有效减少甲型流感感染。另外,本发明的抗体显示出增长的半衰期。不受任何理论的束缚,发明人认为本发明的抗体提高的效力与增长的半衰期无关。例如,与比较抗体相比,尽管抗体的血浆浓度相似,但本发明的抗体显示出提高的效力。而且,与在重链恒定区中没有突变M428L和N434S的亲本抗体相比,本发明的抗体出人意料地显示出降低的免疫原性。

[0030] 在第一个方面,本发明提供了一种(经分离的)抗体,其包含分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所陈列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所陈列的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;及重链恒定区中的突变M428L和N434S。

[0031] 一般而言,根据本发明的抗体通常在重链上包含(至少)三个互补决定区(CDR)并在轻链上包含(至少)三个CDR。通常,互补决定区(CDR)是存在于重链可变结构域和轻链可变结构域中的高变区。典型的是,抗体的重链和连接的轻链的CDR一起形成抗原受体。一般地,三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)在可变结构域中不连续地排列。由于抗原受体通常由两个可变结构域(在两条不同的多肽链即重链和轻链上)组成,故每个抗原受体有六个CDR(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。单个抗体分子常常具有两个抗原受体并因此含有十二个CDR。重链和/或轻链上的CDR可由框架区隔开,由此框架区(FR)为可变结构域中比CDR较不“可变”的区域。例如,一条链(或分别地,每条链)可由四个框架区组成,这四个框架区由三个CDR隔开。

[0032] 确定了本发明的示例性抗体的重链和轻链的序列,所述抗体在重链上包含三个不同的CDR并在轻链上包含三个不同的CDR。CDR氨基酸的位置根据IMGT编号系统定义(IMGT: <http://www.imgt.org/>;参见Lefranc,M.-P.等人(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)。

[0033] 通常,本发明的抗体与甲型流感病毒的血凝素结合。因此,本发明的抗体可中和甲型流感病毒的感染。凭借如上定义的六个CDR序列,根据本发明的抗体结合到与MEDI8852相同的甲型流感病毒血凝素(IAV HA)茎区域表位(Kallewaard NL,Corti D,Collins PJ等人 Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes.Cell.2016;166(3):596-608),从而提供针对所有甲型流感亚型的各种甲型流感血清型同样广泛的保护。

[0034] 另外,本发明的抗体在重链恒定区(CH3区)中包括两个突变:M428L和N434S。在此

上下文中,氨基酸位置根据本领域公认的EU编号系统编号。EU索引或如Kabat中的EU索引或EU编号是指EU抗体的编号(Edelman GM,Cunningham BA,Gall WE,Gottlieb PD,Rutishauser U,Waxdal MJ.The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule.Proc Natl Acad Sci U S A.1969;63(1):78-85;Kabat E.A., National Institutes of Health(U.S.)Office of the Director,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,5th edition,Bethesda,MD;U.S.Dept.of Health and Human Services,Public Health Service,National Institutes of Health,1991,在此通过引用全文并入本文)。

[0035] 在一些实施方案中,本发明的抗体以不超过用比较抗体中和甲型流感所需剂量的二分之一剂量中和甲型流感感染,比较抗体与所述抗体的不同仅在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的三分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的四分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的五分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的六分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的七分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的八分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的九分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体中和甲型流感所需剂量的十分之一。应理解,对于这样的比较测试,使用相当的中和测定法(类似的测试测定法、测试条件等)。例如,可使用相同的测试(仅在待测抗体方面不同)来确定用于中和甲型流感的本发明抗体的剂量和确定用于中和甲型流感的比较抗体的剂量。

[0036] 为了在实验室中研究和定量病毒感染性(或“中和”),本领域技术人员知道各种标准的“中和测定法”。对于中和测定法,通常让动物病毒在细胞和/或细胞系中繁殖。例如,在中和测定法中,培养的细胞可在存在(或不存在)待测抗体的情况下与固定量的甲型流感病毒(IAV)一起孵育。作为读数方法,例如可以使用流式细胞术。或者,也可想到其他读数方法。

[0037] 在某些实施方案中,抗体中和编码H3N2血凝素(H3 HA)的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和/或HA2 N49T的病毒;和/或编码H1N1血凝素(H1 HA)的多态性N146D的病毒。例如,抗体可中和H3 HA的HA1 P11S、HA2 D46N或HA2 N49T中的一种或两种多态性。特别地,抗体可中和H3 HA的所有三种多态性HA1 P11S、HA2 D46N和HA2 N49T。而且,抗体可中和H1 HA的多态性N146D。在一些实施方案中,抗体中和H3 HA的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和HA2 N49T;和H1 HA的多态性N146D。对于所述多态性,H1N1的参考是A/California/07/2009,而H3N2的参考是A/Perth/16/2009。

[0038] 在某些情况下,抗体中和H3 HA的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和/或HA2 N49T;和/或H1 HA的多态性N146D,相对于野生型病毒的HA,IC₅₀变化倍数<2,特别是在与野生型病毒的并排比较中。例如,抗体可中和H3 HA的HA1 P11S、HA2 D46N或HA2 N49T中的一种或两种多态性,相对于野生型病毒的HA,IC₅₀变化倍数<2,特别是在与野生型病毒的并排比较中。特别地,抗体可中和H3 HA的所有三种多态性HA1 P11S、HA2 D46N和HA2 N49T,相对于野生

型病毒的HA, IC₅₀变化倍数<2,特别是在与野生型病毒的并排比较中。而且,抗体可中和H1 HA的多态性N146D,相对于野生型病毒的HA, IC₅₀变化倍数<2,特别是在与野生型病毒的并排比较中。在一些实施方案中,抗体中和H3 HA的多态性HA1 P11S、HA2 D46N和HA2 N49T;和H1 HA的多态性N146D,相对于野生型病毒的HA,各自的IC₅₀变化倍数<2,特别是在与野生型病毒的并排比较中。

[0039] 在一些实施方案中,与比较抗体相比,所述抗体引发降低的抗药物抗体(ADA)反应,比较抗体与所述抗体的不同仅在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。特别地,与比较抗体相比,所述抗体可表现出较低的免疫原性,比较抗体与所述抗体的不同仅在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。如本说明书的实施例所示,与无M428L/N434S突变的抗体相比,本发明的抗体出人意料地引发抗药物抗体(ADA)反应降低,因此免疫原性较低。为了评估抗药物抗体(ADA)反应/免疫原性,技术人员清楚适当的测试。只要本发明的抗体和无M428L/N434S突变的比较抗体被并排测试而能够直接比较,就可选择任何这样的测试。本说明书的实施例9和实施例10中描述了示例性测试。

[0040] 在一些实施方案中,本发明的抗体为人抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体为单克隆抗体。例如,本发明的抗体为人单克隆抗体。

[0041] 本发明的抗体可以是任何同种型的(例如,IgA、IgG、IgM,即 α 、 γ 或 μ 重链)。例如,抗体是IgG型的。在IgG同种型内,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类,例如IgG1。本发明的抗体可具有 κ 或 λ 轻链。在一些实施方案中,抗体具有 κ 轻链。在一些实施方案中,抗体是IgG1型的并具有 κ 轻链。

[0042] 在一些实施方案中,抗体是人IgG1类型的。抗体可以是任何同种异型的。术语“同种异型”是指在IgG亚类中发现的等位基因变异。例如,抗体可以是G1m1(或G1m(a))同种异型的、G1m2(或G1m(x))同种异型的、G1m3(或G1m(f))同种异型的和/或G1m17(或Gm(z))同种异型的。G1m3和G1m17同种异型位于CH1结构域中的相同位置(根据EU编号,位置214)处。G1m3对应于R214(EU),而G1m17对应于K214(EU)。G1m1同种异型位于CH3结构域中(位置356和358(EU)处)并且是指替代E356D和M358L。G1m2同种异型是指由甘氨酸替代位置431(EU)中的丙氨酸。G1m1同种异型可与例如G1m3或G1m17同种异型组合。在一些实施方案中,抗体是同种异型G1m3的而没有G1m1(G1m3,-1)。在一些实施方案中,抗体是G1m17,1同种异型的。在一些实施方案中,抗体是G1m3,1同种异型的。在一些实施方案中,抗体是同种异型G1m17的而没有G1m1(G1m17,-1)。任选地,这些同种异型可与G1m2、G1m27或G1m28同种异型组合(或不组合)。例如,抗体可以是G1m17,1,2同种异型的。

[0043] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所陈列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;及分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所陈列的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)。

[0044] 序列同一性通常根据参考序列(即,申请中记载的序列)的全长计算。如本文所提

及的同一性百分数可例如使用BLAST使用NCBI(国家生物技术信息中心;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)指定的默认参数来确定[Blosum 62矩阵;空位开放罚分=11,空位延长罚分=1]。

[0045] “序列变体”具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个氨基酸被删除或置换,和/或一个或多个氨基酸被插入到参考氨基酸序列的序列中。作为改变的结果,氨基酸序列变体具有与参考序列至少70%相同的氨基酸序列。至少70%相同的变体序列在参考序列的每100个氨基酸中具有不超过30个改变,即缺失、插入或置换的任何组合。

[0046] 一般而言,虽然可以有非保守氨基酸置换,但所述置换通常为保守氨基酸置换,其中被置换的氨基酸具有与参考序列中的相应氨基酸相似的结构或化学性质。举例来说,保守氨基酸置换涉及用另一种置换一种脂肪族或疏水性氨基酸,例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;用另一种置换一种含羟基的氨基酸,例如丝氨酸和苏氨酸;用另一种置换一种酸性残基,例如谷氨酸或天冬氨酸;用另一种替换一种含酰胺的残基,例如天冬酰胺和谷氨酰胺;用另一种替换一种芳族残基,例如苯丙氨酸和酪氨酸;用另一种替换一种碱性残基,例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;和用另一种替换一种小氨基酸,例如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和甘氨酸。

[0047] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基到含有一百个或多于一百个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括将氨基酸序列的N-或C-末端与报道分子或酶融合。

[0048] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有75%或多于75%(即,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少75%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有80%或多于80%(即,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,重链可变区所述包含与SEQ ID NO:7具有85%或多于85%(即,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有90%或多于90%(即,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7具有95%或多于95%(即,96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。

[0049] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:7中所陈列的氨基酸序列,和轻链可变区,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:8中所陈列的氨基酸序列,其中保留了如上所定义的CDR序列。

[0050] 一般而言,本发明的抗体可以在Fc区中(例如,在CH2或CH3区中)包含一个或多个其他突变(除M428L和N434S外)。然而,在一些实施方案中,本发明的抗体在其CH3区中不包含除M428L和N434S外的任何其他突变(与相应的野生型CH3区相比)。在一些实施方案中,本发明的抗体在其Fc区中不包含除M428L和N434S外的任何其他突变(与相应的野生型Fc区相比)。如本文所用,术语“野生型”是指参考序列,例如自然界中存在的。作为一个具体的实例,术语“野生型”可指自然界中存在的发生率最高的序列。

[0051] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链,所述重链包含如SEQ ID NO:9中所陈列的氨基酸序列,和轻链,所述轻链包含如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列。例如,本发明的抗体可具有由如SEQ ID NO:9中所陈列的氨基酸序列组成的重链和由如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列组成的轻链。

[0052] 本发明的抗体还包括杂交抗体分子,其包含来自如上所定义的本发明抗体的六个CDR和来自针对相同或不同表位或抗原的另一抗体的一个或多个CDR。在一些实施方案中,这样的杂交抗体包含来自本发明抗体的六个CDR和来自针对不同表位或抗原的另一抗体的六个CDR。

[0053] 变体抗体也包括在本发明的范围内。因此,本申请中记载的序列的变体也包括在本发明的范围内。这样的变体包括在免疫应答过程中体内体细胞突变生成或在培养无限增殖化B细胞克隆时体外生成的天然变体。或者,变体可能是由于遗传密码的简并性而产生的,也可能是由于转录或翻译中的错误而产生的。

[0054] 本发明的抗体可以纯化形式提供。通常,抗体将存在于基本上不含其他多肽的组合物中,例如,其中小于90重量%、通常小于60重量%、更通常小于50重量%的组合物由其他多肽组成。

[0055] 本发明的抗体在非人类(或异源)宿主例如小鼠中可以是免疫原性的。特别地,抗体可具有在非人类宿主中具有免疫原性但在人类宿主中不具有免疫原性的独特位。特别地,本发明的人用抗体包括不能容易地从宿主如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等分离并且通常不能通过人源化或从异种小鼠获得的那些。

[0056] 核酸

[0057] 在另一个方面,本发明还提供了一种核酸分子,其包含编码如上所述根据本发明的抗体的多核苷酸。

[0058] 在某些实施方案中,核酸分子包含

[0059] (i) 包含如SEQ ID NO:12中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:12具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同一性的核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列;和

[0060] (ii) 包含如SEQ ID NO:13中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:13具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、

83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列。

[0061] 在一些实施方案中,核酸分子包含

[0062] (ii) 包含如SEQ ID NO:14中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:14具有70%或更多于70% (即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列及恒定区中的M428L和N434S突变;和

[0063] (ii) 包含如SEQ ID NO:15中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:15具有70%或更多于70% (即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)同一性的核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列及恒定区中的M428L和N434S突变。

[0064] 核酸分子和/或多核苷酸的实例包括例如重组多核苷酸、载体、寡核苷酸、RNA分子如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA、或DNA分子如cDNA。核酸可编码本发明抗体的轻链和/或重链。换言之,抗体的轻链和重链可由相同的核酸分子编码(例如,以双顺反子方式)。或者,抗体的轻链和重链可由不同的核酸分子编码。

[0065] 由于遗传密码的冗余,故本发明还包括编码相同氨基酸序列的核酸序列的序列变体。编码抗体(或完整核酸分子)的多核苷酸可针对抗体的表达进行优化。例如,可使用核苷酸序列的密码子优化来提高表达系统中产生抗体的翻译效率。根据SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的示例性核酸序列是用于表达示例性抗体FluAB_MLNS的密码子优化序列。而且,核酸分子可包含异源要素(即,在自然界中不出现在与抗体(的重链或轻链)的编码序列相同的核酸分子上的要素)。例如,核酸分子可包含异源启动子、异源增强子、异源UTR(例如,以获得最佳翻译/表达)、异源Poly-A-尾等。

[0066] 核酸分子为包含核酸组分的分子。术语核酸分子通常是指DNA或RNA分子。其可与术语“多核苷酸”同义使用,即核酸分子可由编码抗体的多核苷酸组成。或者,除了编码抗体的多核苷酸外,核酸分子还可包含其他要素。通常,核酸分子为包含核苷酸单体或由核苷酸单体组成的聚合物,所述核苷酸单体通过糖/磷酸骨架的磷酸二酯键彼此共价连接。术语“核酸分子”还涵盖经修饰的核酸分子,如经碱基修饰、糖修饰或骨架修饰等的DNA或RNA分子。

[0067] 通常,可操作核酸分子以插入、删除或改变某些核酸序列。来自此类操作的变化包括但不限于引入限制位点、修改密码子使用、添加或优化转录和/或翻译调控序列等的变化。还可以改变核酸以改变所编码的氨基酸。例如,向抗体的氨基酸序列中引入一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等)氨基酸置换、缺失和/或插入可能是可用的。这样的点突变可改变效应子功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可引入氨基酸以连接共价基团(例如,标记)或可引入标签(例如,出于纯化目的)。或者,核酸序列中的突变可以是“沉默的”,即由于遗传密码的冗余而不反映在氨基酸序列中。通常,突变可在特定位点引入,也可随机引入,然后进行选择(例如,分子进化)。例如,一个或

多于一个编码本发明的(示例性)抗体的任何轻链或重链的核酸可随机或定向突变以在所编码的氨基酸中引入不同的性质。这样的变化可能是迭代过程的结果,其中保留初始变化并引入其他核苷酸位置处的新变化。此外,可组合在独立的步骤中实现的改变。

[0068] 在一些实施方案中,编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸(或(完整)核酸分子)可以是密码子优化的。技术人员清楚用于密码子优化的各种工具,如描述于以下中的那些: Ju Xin Chin, Bevan Kai-Sheng Chung, Dong-Yup Lee, Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design, *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 15, 1 August 2014, Pages 2210-2212; 或 Grote A, Hiller K, Scheer M, Munch R, Nortemann B, Hempel DC, Jahn D, JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1; 33 (Web Server issue): W526-31; 或例如 Genscript's OptimumGeneTM 算法(如US2011/0081708A1中所述)。

[0069] 本发明还提供了第一核酸分子和第二核酸分子的组合,其中第一核酸分子包含编码本发明的抗体的重链的多核苷酸;而第二核酸分子包含编码同一抗体的相应轻链的多核苷酸。上文关于本发明的核酸分子的(一般)特征的描述相应地适用于所述组合的第一核酸分子和第二核酸分子。例如,编码抗体的重链和/或轻链或其抗原结合片段的多核苷酸之一或两者可以是密码子优化的。

[0070] 在某些实施方案中,核酸分子的组合包含

[0071] (i) 包含编码抗体的重链的多核苷酸的第一核酸分子,所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:12中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:12具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同一性的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列;和

[0072] (ii) 包含编码抗体的轻链的多核苷酸的第二核酸分子,所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:13中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:13具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同一性的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列。

[0073] 在一些实施方案中,核酸分子的组合包含

[0074] (i) 包含编码抗体的重链的多核苷酸的第一核酸分子,所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:14中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:14具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同一性的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列及恒定区中的M428L和N434S突变;和

[0075] (ii) 包含编码抗体的轻链的多核苷酸的第二核酸分子,所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:15中所陈列的核苷酸序列或者与SEQ ID NO:15具有70%或更多于70%(即,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%)同

一性的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码如上所定义的CDR序列及恒定区中的M428L和N434S突变。

[0076] 载体

[0077] 本发明的范围内还包括载体,例如表达载体,其包含根据本发明的核酸分子或根据本发明的核酸分子的组合(例如,以双顺反子方式)。通常,载体包含如上所述的核酸分子或如上所述的核酸分子的组合(例如,以双顺反子方式)。

[0078] 本发明还提供了第一载体和第二载体的组合,其中第一载体包含如上所述的第一核酸分子(用于核酸分子的组合)而第二载体包含如上所述的第二核酸分子(用于核酸分子的组合)。

[0079] 载体通常是重组核酸分子,即自然界中不存在的核酸分子。因此,载体可包含异源要素(即,自然界中不同来源的序列要素)。例如,载体可包含多克隆位点、异源启动子、异源增强子、异源选择标记(以与不包含所述载体的细胞相比识别包含所述载体的细胞)等。本发明的上下文中的载体适合并入或携带所需的核酸序列。这样的载体可以是储存载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。储存载体是允许方便地储存核酸分子的载体。因此,载体可包含对应于例如根据本发明的所需抗体(的重链和/或轻链)的序列。表达载体可用于产生表达产物,如RNA,例如mRNA,或肽、多肽或蛋白质。例如,表达载体可包含载体的一段序列的转录所需的序列,如(异源)启动子序列。克隆载体通常是含克隆位点的载体,其可用于将核酸序列并入到载体中。克隆载体可以是例如质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适于将核酸分子转移到细胞或生物体中的载体,例如病毒载体。本发明的上下文中的载体可以是例如RNA载体或DNA载体。例如,本申请的意义上的载体包含克隆位点、选择标记如抗生素抗性因子、和适合载体增殖的序列,如复制起点。本申请的上下文中的载体可以是质粒载体。

[0080] 细胞

[0081] 在又一个方面,本发明还提供了表达根据本发明的抗体和/或包含根据本发明的载体的细胞。

[0082] 这样的细胞的实例包括但不限于真核细胞,例如酵母细胞、动物细胞或植物细胞,或原核细胞,包括大肠杆菌(E.coli.)。在一些实施方案中,细胞为哺乳动物细胞,如哺乳动物细胞系。实例包括人细胞、CHO细胞、HEK293T细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、人肝细胞、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0083] 可用根据本发明的载体、例如用表达载体转染细胞。术语“转染”是指将核酸分子如DNA或RNA(例如,mRNA)分子引入到细胞中,例如引入到真核细胞或原核细胞中。在本发明的上下文中,术语“转染”涵盖技术人员已知的用于将核酸分子引入到细胞中、如到哺乳动物细胞中的任何方法。这样的方法包括例如电穿孔、脂质转染(例如基于阳离子脂质和/或脂质体)、磷酸钙沉淀、基于纳米颗粒的转染、基于病毒的转染或基于阳离子聚合物如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺等的转染。在一些实施方案中,引入是非病毒的。

[0084] 而且,本发明的细胞可用根据本发明的载体稳定或瞬时转染,例如以表达根据本发明的抗体。在一些实施方案中,用编码根据本发明的抗体的根据本发明的载体稳定转染细胞。在其他实施方案中,用编码根据本发明的抗体的根据本发明的载体瞬时转染细胞。

[0085] 因此,本发明还提供了一种重组宿主细胞,其异源表达本发明的抗体或其抗原结

合片段。例如,所述细胞可以是非抗体的另一物种(例如,表达人抗体的CHO细胞)。在一些实施方案中,细胞的细胞类型本质上不表达(此类)抗体。而且,宿主细胞可对其天然状态存在的抗体赋予翻译后修饰(PTM;例如,糖基化)。这样的PTM可能导致功能差异(例如,降低的免疫原性)。因此,本发明的抗体或其抗原结合片段可具有不同于天然产生的抗体(例如,人免疫应答的抗体)的翻译后修饰。

[0086] 抗体的产生

[0087] 根据本发明的抗体可通过本领域已知的任何方法制备。例如,使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的一般方法是众所周知的(Kohler,G.and Milstein,C.,1975;Kozbar等人,1983)。在一些实施方案中,使用W02004/076677中描述的替代的EBV无限增殖化方法。

[0088] 在一些实施方案中,使用如通过引用并入本文的W0 2004/076677中所述的方法。在该方法中,用EBV和多克隆B细胞激活剂转化产生本发明的抗体的B细胞。在转化步骤期间可任选地添加额外的细胞生长和分化刺激剂以进一步提高效率。这些刺激剂可为细胞因子如IL-2和IL-15。在一个方面,在无限增殖化步骤期间添加IL-2以进一步提高无限增殖化的效率,但其使用不是必需的。然后可使用本领域已知的方法培养使用这些方法产生的无限增殖化B细胞并自其分离抗体。

[0089] W02010/046775中描述了另一种示例性方法。在此方法中,培养有限数量的浆细胞,或作为单个浆细胞在微孔培养板中培养。可从浆细胞培养物分离抗体。此外,可从浆细胞培养物提取RNA并可使用本领域已知的方法进行PCR。抗体的VH和VL区可通过RT-PCR(逆转录酶PCR)扩增,测序并克隆到表达载体中,然后将表达载体转染到HEK293T细胞或其他宿主细胞中。核酸在表达载体中的克隆、宿主细胞的转染、被转染的宿主细胞的培养和产生的抗体的分离可使用本领域技术人员已知的任何方法进行。

[0090] 如果需要,可使用过滤、离心和各种色谱方法如HPLC或亲和色谱法进一步纯化抗体。用于纯化抗体例如单克隆抗体的技术,包括用于产生药物级抗体的技术,是本领域众所周知的。

[0091] 可使用分子生物学的标准技术来制备编码本发明的抗体的DNA序列。可使用寡核苷酸合成技术来完全或部分地合成所需的DNA序列。可酌情使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0092] 可使用任何合适的宿主细胞/载体系统来表达编码本发明的抗体分子的DNA序列。可使用真核(例如,哺乳动物)宿主细胞表达系统来产生抗体分子,如完整的抗体分子。合适的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。在其他实施方案中,编码待使用的本发明的抗体分子的DNA序列的表达可在原核细胞中表达,包括但不限于大肠杆菌。

[0093] 本发明还提供了生产根据本发明的抗体分子的方法,其包括在适合于从编码本发明的抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养包含编码本发明的核酸的载体的(异源)宿主细胞,和分离抗体分子。

[0094] 为了产生包含重链和轻链两者的抗体,可用两种载体转染细胞系,第一载体编码轻链多肽而第二载体编码重链多肽。或者,可使用单一载体,该载体包括编码轻链多肽和重链多肽的序列。

[0095] 根据本发明的抗体可通过(i)在宿主细胞中例如通过使用根据本发明的载体表达

根据本发明的核酸序列、和(ii)分离所表达的抗体产物来产生。另外,方法可包括(iii)纯化所分离的抗体。可筛选转化的B细胞和培养的浆细胞以寻找产生具有所需特异性或功能的抗体的细胞。

[0096] 筛选步骤可通过任何免疫测定法(例如,ELISA)、通过组织或细胞(包括被转染细胞)的染色、通过中和测定法或通过本领域已知的用于鉴定所需特异性或功能的许多其他方法中之一进行。测定法可基于对一种或多于一种抗原的简单识别来选择,或可另外基于所需的功能来选择,例如选择中和抗体而不仅仅是抗原结合抗体,选择可改变靶向细胞的特性的抗体,所述特性有如其信号级联、其形状、其生长速率、其影响其他细胞的能力、其对其他细胞或其他试剂或条件的改变造成的影响的反应、其分化状态等。

[0097] 然后可从阳性转化的B细胞培养物产生各个转化的B细胞克隆。从阳性细胞的混合物分离各个克隆的克隆步骤可使用有限稀释、显微操作、通过细胞分选的单细胞沉积或本领域已知的其他方法进行。

[0098] 可使用本领域已知的方法在HEK293T细胞或其他已知的宿主细胞中分离、克隆和表达来自培养的浆细胞的核酸。

[0099] 本发明的无限增殖化B细胞克隆或转染的宿主细胞可以多种方式使用,例如,作为单克隆抗体的来源、作为编码目的单克隆抗体的核酸(DNA或mRNA)的来源、用于研究等。

[0100] 本发明还提供了包含产生根据本发明的抗体的无限增殖化B记忆细胞或转染宿主细胞的组合物。

[0101] 本发明的无限增殖化B细胞克隆或培养的浆细胞也可用于克隆抗体基因以便于随后的重组表达的核酸的来源。出于药学目的,从重组来源的表达可能比从B细胞或杂交瘤的表达更常见,例如出于稳定性、可重复性、培养容易性等原因。

[0102] 因此,本发明还提供了一种制备重组细胞的方法,其包括步骤:(i)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得一种或多于一种编码目的抗体的核酸(例如,重链和/或轻链mRNA);(ii)将核酸插入到表达载体中和(iii)将载体转染到(异源)宿主细胞中以允许目的抗体在该宿主细胞中表达。

[0103] 类似地,本发明还提供了一种制备重组细胞的方法,其包括步骤:(i)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码目的抗体的核酸测序;和(ii)使用来自步骤(i)的测序信息制备核酸来插入到宿主细胞中以允许目的抗体在该宿主细胞中表达。可以但不需要在步骤(i)和(ii)之间操作核酸以引入限制位点、改变密码子使用和/或优化转录和/或翻译调控序列。

[0104] 此外,本发明还提供了一种制备被转染宿主细胞的方法,其包括用一种或多种编码目的抗体的核酸转染宿主细胞的步骤,其中所述核酸为源自本发明的无限增殖化B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸。因此,首先制备核酸并然后使用其转染宿主细胞的程序可由在不同地方(例如,在不同国家)的不同的人于不同的时间进行。

[0105] 然后可将本发明的这些重组细胞用于表达和培养目的。它们特别适用于大规模药物生产的抗体表达。它们也可用作药物组合物的活性成分。可使用任何合适的培养技术,包括但不限于静态培养、滚瓶培养、腹水培养、中空纤维型生物反应盒、模块化微型发酵罐、搅拌罐、微载体培养、陶瓷芯灌注等。

[0106] 从B细胞或浆细胞获得和测序免疫球蛋白基因的方法是本领域众所周知的(例如

参见Kuby Immunology第4章,第4版,2000)。

[0107] 转染的宿主细胞可以是真核细胞,包括酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(例如,CHO细胞、NS0细胞、人细胞如PER.C6或HKB-11细胞、骨髓瘤细胞或人肝细胞),以及植物细胞。在一些实施方案中,转染的宿主细胞可以是原核细胞,包括大肠杆菌。在一些实施方案中,转染的宿主细胞是哺乳动物细胞,如人细胞。在一些实施方案中,表达宿主可糖基化本发明的抗体,特别是用本身在人类中不具有免疫原性的碳水化合物结构。在一些实施方案中,转染的宿主细胞可能能够在无血清培养基中生长。在其他实施方案中,转染的宿主细胞可能能够在不存在动物来源产物的培养物中生长。也可培养转染的宿主细胞以产生细胞系。

[0108] 本发明还提供了一种制备一种或多种编码目标抗体的核酸分子(例如,重链基因和轻链基因)的方法,其包括步骤:(i)根据本发明制备无限增殖化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得编码目的抗体的核酸。此外,本发明提供了一种获得编码目的抗体的核酸序列的方法,其包括步骤:(i)根据本发明制备无限增殖化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码目的抗体的核酸测序。

[0109] 本发明还提供了一种制备编码目的抗体的核酸分子的方法,其包括获得从本发明的转化的B细胞克隆或培养的浆细胞获得的核酸的步骤。因此,首先获得B细胞克隆或培养的浆细胞、然后从B细胞克隆或培养的浆细胞获得核酸的程序可由在不同地方(例如,在不同国家)的不同的人于不同的时间进行。

[0110] 本发明还包括一种制备根据本发明的抗体(例如,用于药物用途)的方法,其包括步骤:(i)获得一种或多种来自选定的B细胞克隆或培养的浆细胞的表达目的抗体的核酸(例如,重链和轻链基因)和/或对一种或多种来自选定的B细胞克隆或培养的浆细胞的表达目的抗体的核酸(例如,重链和轻链基因)测序;(ii)将核酸插入到表达载体中或使用核酸序列制备表达载体;(iii)转染可表达目的抗体的宿主细胞;(iv)在表达目的抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞;和任选地(v)纯化目的抗体。

[0111] 本发明还提供了一种制备目的抗体的方法,其包括步骤:在表达目的抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞群,例如,稳定转染的宿主细胞群,并任选地纯化目的抗体,其中所述转染的宿主细胞群已通过以下步骤制备:(i)提供由如上所述制备的B细胞克隆或培养的浆细胞产生的编码选定目的抗体的核酸,(ii)将核酸插入到表达载体中,(iii)在可表达目的抗体的宿主细胞中转染载体,和(iv)培养或传代培养包含插入的核酸的被转染宿主细胞以产生目的抗体。因此,首先制备重组宿主细胞并然后培养以表达抗体的程序可由在不同地方(例如,在不同国家)的不同的人于不同的时间进行。

[0112] 本发明还提供了一种降低抗体的免疫原性的方法,所述抗体包含分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所陈列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所陈列的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;所述方法包括在所述抗体的重链恒定区中引入突变M428L和N434S的步骤。所述突变可如上所述实现。如本说明书的实施例中所示,本发明的抗体出人意料地仅表现出非常低的免疫原性,特别是与无M428L/N434S突变的抗体相比具有更低的免疫原性。因此,向抗体中引入这些突变会降低抗体的免疫原性。

[0113] 药物组合物

[0114] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含以下中的一种或多种:

[0115] (i) 根据本发明的抗体;

[0116] (ii) 编码根据本发明的抗体的核酸;

[0117] (iii) 包含根据本发明的核酸的载体;和/或

[0118] (iv) 表达根据本发明的抗体或包含根据本发明的载体的细胞,

[0119] 和任选地,药学上可接受的稀释剂或载剂。

[0120] 换言之,本发明还提供了一种药物组合物,其包含根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体和/或根据本发明的细胞。

[0121] 药物组合物还可任选地包含药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂。尽管载剂或赋形剂会促进施用,但其本身不应诱导对接受组合物的个体产生有害的抗体。其也不应有毒。合适的载剂可以是大的、缓慢代谢的大分子如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性病毒颗粒。在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂在甲型流感病毒感染方面不是活性组分。

[0122] 可使用药学上可接受的盐,例如矿物酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0123] 药物组合物中的药学上可接受的载剂可另外含有液体如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这样的组合物中可存在辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质。这样的载剂使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、浆液剂和混悬剂,供对象摄入。

[0124] 本发明的药物组合物可以各种形式制备。例如,组合物可制备为注射剂,或呈液体溶液或呈悬浮液。也可制备适合在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式(例如,类似于Synagis™和Herceptin®的冻干组合物,以用含有防腐剂的无菌水重构)。所述组合物可制备用于局部施用,例如呈软膏、乳膏或粉末。所述组合物可制备用于经口施用,例如呈片剂或胶囊剂、呈喷雾剂或呈糖浆剂(任选地经调味)。所述组合物可制备用于肺部施用,例如呈吸入器(使用细粉)或喷雾剂。所述组合物可制备为栓剂或子宫帽。所述组合物可制备用于鼻、耳或眼施用,例如呈滴剂。所述组合物可呈试剂盒形式,设计为使得在临施用于对象之前重构合并的组合物。例如,冻干抗体可与无菌水或无菌缓冲液一起以试剂盒形式提供。

[0125] 在一些实施方案中,组合物中的(唯一)活性成分为根据本发明的抗体。因此,它可能容易在胃肠道中降解。因此,如果组合物将通过使用胃肠道的途径施用,则组合物可含有将保护抗体免于降解但一旦其已从胃肠道吸收就释放抗体的药剂。

[0126] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472中对药学上可接受的载剂作了详尽的讨论。

[0127] 本发明的药物组合物通常具有5.5至8.5的pH,在一些实施方案中,pH可以为6至8,例如约7。可通过使用缓冲液来维持pH。所述组合物可以是无菌的和/或无热原的。所述组合物对于人类可以是等渗的。在一些实施方案中,本发明的药物组合物在气密容器中供给。

[0128] 本发明的范围内有以若干施用形式存在的组合物;这些形式包括但不限于适于肠胃外施用的那些形式,例如通过注射或输注,例如通过推注或连续输注。当产品用于注射或

输注时,其可呈在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式并且其可含有配制剂如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可呈干燥形式,以在使用前用合适的无菌液体重构。

[0129] 媒介物通常理解为适于储存、运输和/或施用化合物如药学活性化合物、特别是根据本发明的抗体的材料。例如,媒介物可以是生理学上可接受的液体,其适于储存、运输和/或施用药学活性化合物、特别是根据本发明的抗体。一旦配制,本发明的组合物可直接施用于对象。在一些实施方案中,组合物适合于施用于哺乳动物,例如人类对象。

[0130] 本发明的药物组合物可通过任何数量的途径施用,包括但不限于经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、经表皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。也可使用无针注射器来施用本发明的药物组合物。任选地,药物组合物可制备用于经口施用,例如呈片剂、胶囊剂等,用于局部施用,或制备为注射剂,例如呈液体溶液或悬浮液。在一些实施方案中,药物组合物为注射剂。还涵盖适合在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式,例如药物组合物可呈冻干形式。

[0131] 对于注射,例如静脉内、皮肤或皮下注射,或在患病部位的注射,活性成分可呈无热原并具有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水溶液的形式。本领域相关技术人员能够很好地使用例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。根据需要,可包括防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂。无论是要给予个体的抗体、肽、核酸分子还是根据本发明的另一药学上有用的化合物,通常以足以显示对个体的益处的“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定)施用。实际施用的量、施用的速率和时间过程将取决于所治疗的疾病的性质和严重程度。对于注射,根据本发明的药物组合物可例如在预灌封注射器中提供。

[0132] 如上所定义的本发明药物组合物也可以任何口腔可接受的剂型经口施用,包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液剂。在口服片剂的情况下,常用的载剂包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂,如硬脂酸镁。对于以胶囊形式的经口施用,可用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当需要用于口服的水性混悬剂时,将活性成分即如上所定义的本发明的转运体货物缀合分子与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要,还可添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0133] 本发明的药物组合物也可局部施用,尤其是当治疗的目标包括易于通过局部应用及于的区域或器官时,例如,包括可及于的上皮组织。易于针对这些区域或器官中的每一个制备合适的局部制剂。对于局部应用,本发明的药物组合物可配制成合适的软膏剂,该软膏剂含有悬浮或溶解在一种或多于一种载剂中的本发明药物组合物,特别是如上所定义的其组分。用于局部施用的载剂包括但不限于矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者,本发明的药物组合物可配制成合适的洗剂或乳膏。在本发明的上下文中,合适的载剂包括但不限于矿物油、失水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨酯60、鲸蜡酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[0134] 剂量治疗可为单剂量方案或多剂量方案。特别地,药物组合物可以单剂量产品提供。在一些实施方案中,药物组合物中抗体的量-特别是如果以单剂量产品提供的话-不超过200mg,例如不超过100mg或50mg。

[0135] 例如,根据本发明的药物组合物可每天施用,例如每天一次或数次,例如每天一

次、两次、三次或四次,持续1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天或多于21天,例如,每天施用持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月。在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物可每周施用,例如每周一次或两次,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或21周或多于21周,例如每周施用持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月或者每周施用持续2年、3年、4年或5年。而且,根据本发明的药物组合物可每月施用,例如每月或每两月一次,持续1年、2年、3年、4年或5年或多于5年。施用也可持续终生。在一些实施方案中,还设想了仅单次施用,特别是对于某些适应症,例如,对于甲型流感病毒感染的预防。例如,当抗体的滴度不足以提供保护或被认为不足以提供保护时,可给予单次施用(单剂量)并可在一个或多于一个后来的时间点施用更多的剂量。

[0136] 对于单剂量,例如每日、每周或每月剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量可不超过1g或500mg。在一些实施方案中,对于单剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量可不超过200mg或100mg。例如,对于单剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量可不超过50mg。

[0137] 药物组合物通常包含“有效”量的一种或多于一种本发明的抗体,即足以治疗、改善、减弱、减轻或防止期望被治疗、改善、减弱、减轻或防止的疾病或病况或表现出可检测的治疗效果的量。治疗效果还包括致病效力或身体症状的降低或减弱。任何特定对象的精确有效量将取决于他们的体格大小、体重和健康状况、病况的性质和程度以及选择用于施用的治疗剂或治疗剂组合。给定情况的有效量由常规实验确定并在临床医师的判断范围内。出于本发明的目的,有效剂量通常可为约0.005mg/kg至约100mg/kg,例如约0.0075mg/kg至约50mg/kg或约0.01mg/kg至约10mg/kg。在一些实施方案中,有效剂量将为相对于其所施用于的个体的体重(例如,以kg计)而言约0.02mg/kg至约5mg/kg的本发明抗体(例如,药物组合物中抗体的量)。

[0138] 此外,根据本发明的药物组合物还可包含另外的活性组分,其可以是进一步的抗体或不是抗体的组分。例如,药物组合物可包含一种或多于一种(不是抗体的)抗病毒剂。而且,药物组合物还可包含一种或多于一种(不是根据本发明的)抗体,例如针对其他流感病毒抗原(非血凝素)的抗体或针对另一种流感病毒(例如,针对乙型流感病毒或针对丙型流感病毒)的抗体。相应地,根据本发明的药物组合物可包含一种或多于一种另外的活性组分。

[0139] 根据本发明的抗体可存在于与另外的活性组分相同的药物组合物中,或者,根据本发明的抗体包含在第一药物组合物中而另外的活性组分包含在与第一药物组合物不同的第二药物组合物中。因此,如果设想了不止一种另外的活性组分,则每种另外的活性组分和根据本发明的抗体可包含在不同的药物组合物中。这样的不同的药物组合物可组合地/同时地或在分开的时间或在分开的位置(例如,身体的不同部分)施用。

[0140] 根据本发明的抗体和另外的活性组分可提供增加的治疗效果,例如协同治疗效果。术语“协同”用于描述两种或多于两种活性剂的联用效果,其大于每种相应的活性剂的单独效果的总和。因此,在两种或多于两种药剂的联用效果导致活性或过程的“协同抑制”的情况下,意图是活性或过程的抑制大于每种相应的活性剂的抑制效果的总和。术语“协同

治疗效果”是指用两种或多于两种治疗剂的组合所观察到的治疗效果,其中所述治疗效果(如通过多个参数中的任何一个来量度)大于用相应的单独的治疗剂所观察到的单独的治疗效果的总和。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的组合物可包含本发明的抗体,其中所述抗体可占组合物中总蛋白质的至少50重量%(例如,60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或多于99%)。在本发明的组合物中,抗体可呈纯化形式。

[0142] 本发明还提供了一种制备药物组合物的方法,其包括步骤:(i)制备本发明的抗体;和(ii)将经纯化的抗体与一种或多于一种药学上可接受的载剂混合。

[0143] 在其他实施方案中,制备药物组合物的方法包括步骤:将抗体与一种或多于一种药学上可接受的载剂混合,其中所述抗体为从本发明的经转化的B细胞或培养的浆细胞获得的单克隆抗体。

[0144] 作为出于治疗目的递送抗体或B细胞的替代方案,可以将源自B细胞或培养的浆细胞的编码目的单克隆抗体的核酸(通常为DNA)递送给对象,使得核酸可在对象中原位表达以提供期望的治疗效果。合适的基因疗法和核酸递送载体是本领域已知的。

[0145] 药物组合物可包含抗微生物剂,特别是如果以多剂量形式包装的话。它们可包含表面活性剂,例如吐温(聚山梨酯),如吐温80。表面活性剂通常以低水平存在,例如小于0.01%。组合物还可包含钠盐(例如,氯化钠)以赋予张力(tonicity)。例如,10±2mg/ml NaCl的浓度是典型的。

[0146] 此外,药物组合物可包含糖醇(例如,甘露糖醇)或二糖(例如,蔗糖或海藻糖),例如约15mg/ml至30mg/ml(例如,25mg/ml),特别是如果它们将被冻干或者如果它们包含已从冻干材料重构的材料的话。在冻干之前,可将用于冻干的组合物的pH调节到5至8,或5.5至7,或6.1左右。

[0147] 本发明的组合物还可包含一种或多于一种免疫调节剂。在一些实施方案中,一种或多于一种免疫调节剂包括佐剂。

[0148] 医学治疗和用途

[0149] 在又一个方面,本发明提供了根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在预防和/或治疗甲型流感病毒感染中、或在(ii)甲型流感病毒感染的诊断中的用途。相应地,本发明还提供了一种减少甲型流感病毒感染或降低甲型流感病毒感染风险的方法,其包括:向有此需要的对象施用治疗上有效量的根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物。而且,本发明还提供了根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在制造用于预防、治疗或减弱甲型流感病毒感染的药物中的用途。

[0150] 诊断方法可包括使抗体与样本接触。这样的样本可自对象分离,例如取自例如鼻道、窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液如血浆或血清的分离的组织样本。诊断方法还可包括检测抗原/抗体复合物,特别是在抗体与样本接触之后。这样的检测步骤通常在工作台上进行,即不与人体或动物体有任何接触。检测方法的实例是本领域技术人员众所周知的并包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定法)。

[0151] 甲型流感病毒感染的预防特别是指预防性环境,其中对象未被诊断为甲型流感病毒感染(未进行诊断或诊断结果为阴性)和/或对象未表现出甲型流感病毒感染的症状。甲型流感病毒感染的预防对于感染时出现严重疾病或并发症的风险较高的对象特别有用,如孕妇、儿童(如59个月以下的儿童)、老年人、患有慢性疾病(如慢性心脏疾病、肺病、肾病、代谢疾病、神经发育疾病、肝病或血液疾病)的个体和患有免疫抑制病(如HIV/AIDS、接受化疗或类固醇、或恶性肿瘤)的个体。而且,甲型流感病毒感染的预防对于例如因增加的暴露而有较高的甲型流感病毒感染风险的对象也特别有用,例如在公共场所工作或逗留的对象,尤其是卫生保健工作者。

[0152] 相反,在治疗性环境中,对象通常感染了甲型流感病毒、诊断为甲型流感病毒感染和/或显示出甲型流感病毒感染的症状。值得注意的是,甲型流感病毒感染的术语“治疗”和“疗法”/“医治”包括(完全)治愈以及减弱/减轻甲型流感病毒感染和/或相关症状。

[0153] 相应地,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可用于在诊断为甲型流感病毒感染的对象中或在显示出甲型流感病毒感染的症状的对象中治疗甲型流感病毒感染。

[0154] 根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物还可用于在无症状对象中预防和/或治疗甲型流感病毒感染。这些对象可能被诊断为或未被诊断为甲型流感病毒感染。

[0155] 在一些实施方案中,待治疗的对象(例如,在如上所述的预防性环境或治疗性环境中)患有自身免疫疾病或过敏症;或有患上自身免疫疾病或过敏症的风险。有患上自身免疫疾病或过敏症的风险的对象包括家庭成员患有自身免疫疾病和/或过敏症的对象,以及(定期)暴露于过敏原的对象。如本说明书的实施例所示,本发明的抗体出人意料地仅表现出非常低的免疫原性,特别是与无M428L/N434S突变的抗体相比具有更低的免疫原性。相应地,本发明的抗体在具有广泛免疫反应风险的对象中可能特别有用。

[0156] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于甲型流感病毒感染的预防和/或治疗,其中所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物在(可能的)甲型流感病毒感染之前至多三个月、或在(可能的)甲型流感病毒感染之前至多一个月,例如在(可能的)甲型流感病毒感染之前至多两周、或在(可能的)甲型流感病毒感染之前至多一周施用。例如,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于甲型流感病毒感染的预防和/或治疗,其中所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物在(可能的)甲型流感病毒感染之前至多一天施用。这样的治疗方案特别是指预防性环境。

[0157] 而且,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可用于甲型流感病毒感染的预防和/或治疗,其中所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物在出现甲型流感感染的第一症状之前至多三个月、或在出现甲型流感感染的第一症状之前至多一个月,例如在出现甲型流感感染的第一症状之前至多两周、或在出现甲型流感感染的第一症状之前至多一周施用。例如,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于甲型流感病毒感染的预防和/或治疗,其中所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物

在出现甲型流感感染的第一症状之前至多三天或两天施用。

[0158] 一般而言,在第一次施用根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可跟着一次或多于一次后续施用,例如每天或每两天一次单剂量,持续1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天。在第一次施用根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可跟着一次或多于一次后续施用,例如每周一次或两次单剂量,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或21周。在第一次施用根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可跟着一次或多于一次后续施用,例如每2周或4周一次单剂量,持续1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或21周。在第一次施用根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可跟着一次或多于一次后续施用,例如每两个月或四个月一次单剂量,持续1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或21个月。在第一次施用根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可跟着一次或多于一次后续施用,例如每年一次或两次单剂量,持续1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或10年。

[0159] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物以0.005mg/kg至100mg/kg体重或0.0075mg/kg至50mg/kg体重的(单)剂量施用,如以0.01mg/kg至10mg/kg体重的(单)剂量或以0.05mg/kg至5mg/kg体重的(单)剂量施用。例如,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物以0.1mg/kg至1mg/kg体重的(单)剂量施用。

[0160] 根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可通过任何数量的途径施用,如经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、经表皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。

[0161] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物预防性地施用,即在诊断出甲型流感感染之前施用。

[0162] 在一些实施方案中,本发明的抗体以不超过用比较抗体预防或治疗甲型流感感染所需剂量的一半的剂量施用,比较抗体与所述抗体的不同仅在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。例如,本发明的抗体的剂量不超过用所述比较抗体预防或治疗甲型流感感染所需剂量的三分之一、四分之一、五分之一、六分之一、七分之一、八分之一或九分之一。在一些实施方案中,本发明的抗体以不超过用比较抗体预防或治疗甲型流感感染所需剂量的十分之一的剂量施用,比较抗体与所述抗体的不同仅在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。本说明书的实施例5显示,在重链恒定区中包含突变M428L和N434S的本发明抗体在比比较抗体低得多的剂量下有效,比较抗体与本发明抗体的不同仅

在于比较抗体在重链恒定区中不含突变M428L和N434S。实施例5还显示,本发明的抗体增加的功效与循环抗体水平无关。

[0163] 相应地,本发明的抗体可施用于在甲型流感感染的直接风险下的对象。甲型流感感染的直接风险通常发生在甲型流感流行期间。甲型流感病毒已知会传播并引起疾病的季节性流行(WHO, Influenza (Seasonal) Fact sheet, 2018年11月6日)。在温带气候下,季节性流行主要发生在冬季,而在热带地区,流感全年都可能发生,导致暴发更不规律。例如,北半球在11月、12月、1月、2月和3月甲型流感流行风险高,而南半球在5月、6月、7月、8月和9月甲型流感流行风险高。

[0164] 联合治疗

[0165] 根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在根据本发明的方法和用途中的施用可单独地或与可用于防止和/或治疗流感感染的活性助剂(本文也称为“另外的活性组分”)联合地进行。

[0166] 本发明涵盖根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的施用,其中其在可用于治疗和/或预防流感的活性助剂或另一治疗方案之前、与可用于治疗和/或预防流感的活性助剂或另一治疗方案同时或者在可用于治疗和/或防止流感的活性助剂或另一治疗方案之后施用于对象。与所述活性助剂联合施用的所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物可在相同或不同的组合物中并通过相同或不同的施用途径施用。如本文所用,表达如“联合治疗”、“联合施用”、“组合施用”等意在指(将“联合”施用的)药物的联合作用。为此,联用药物通常同时和/或在重叠的时间窗口出现在作用部位。也可能在施用另一药物时由药物中之一触发的效果仍在持续中(即使药物本身可能不再存在),使得两种药物的效果可相互影响。然而,在另一药物之前很久施用(例如,超过一个月、两个月、三个月或更长时间或一年)使得在施用该另一药物时其不再存在(或其作用不再持续)的药物通常不被认为是“联合”施用的。例如,在不同流感季节施用的流感药物通常不是“联合”施用的。

[0167] 所述其他治疗方案或活性助剂可以是例如抗病毒剂。抗病毒剂(或“抗病毒药剂”或“抗病毒药”)是指一类专门用于治疗病毒感染的药物。像针对细菌的抗生素一样,抗病毒剂可以是对各种病毒有用的广谱抗病毒剂或用于特定病毒的特定抗病毒剂。与大多数抗生素不同,抗病毒药物通常不会破坏其目标病原体,而是通常抑制目标病原体的发育。

[0168] 因此,在本发明的另一个方面,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物与用于如本文所述的(医学)用途的抗病毒剂(在抗病毒剂之前、与抗病毒剂同时或在抗病毒剂之后)联合施用。

[0169] 一般而言,抗病毒剂可以是广谱抗病毒剂(可用于对抗流感病毒和其他病毒)或流感病毒特异性抗病毒剂。在一些实施方案中,抗病毒剂不是抗体。例如,抗病毒剂可以是小分子药物。可用于预防和/或治疗流感的小分子抗病毒剂的实例描述于Wu X, Wu X, Sun Q, et al. Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7(4): 826-845中。如Wu等人, 2017中所述,技术人员熟悉可用于预防和/或治疗流感的各种抗病毒剂。可用于流感中的更多抗病毒剂描述于Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the

Future.Front Immunol.2018;9:1946和Koszalka P,Tilmanis D,Hurt AC.Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial.Influenza Other Respir Viruses.2017;11(3):240-246中。

[0170] 可用于预防和/或治疗流感的抗病毒剂包括(i)靶向流感病毒本身的功能蛋白的药剂和(ii)靶向宿主细胞例如上皮细胞的药剂。

[0171] 宿主细胞靶向剂包括噻唑烷(thiazolide)类广谱抗病毒剂、唾液酸酶融合蛋白、III型干扰素、Bcl-2(B细胞淋巴瘤2)抑制剂、蛋白酶抑制剂、V-ATP酶抑制剂和抗氧化剂。噻唑烷类广谱抗病毒剂的实例包括硝唑尼特(NTZ),其在血液中迅速脱乙酰化为活性代谢形式替唑尼特(TIZ),和第二代噻唑烷化合物,其在结构上与NTZ相关,如RM5061。Fludase(DAS181)是唾液酸酶融合蛋白的一个实例。III型IFN包括例如IFN λ 。Bcl-2抑制剂的非限制性实例包括ABT-737、ABT-263、ABT-199、WEHI-539和A-1331852(Davidson S.Treating Influenza Infection,From Now and Into the Future.Front Immunol.2018;9:1946)。蛋白酶抑制剂的实例包括蔡莫司他、亮抑酶肽、 ϵ -氨基己酸、卡莫司他和抑肽酶。V-ATPase抑制剂包括NorakinR、ParkopanR、AntiparkinR和AkinetonR。抗氧化剂的一个实例为 α -生育酚。

[0172] 在一些实施方案中,抗病毒剂为靶向流感病毒本身的功能蛋白的药剂。例如,抗病毒剂可靶向流感病毒的功能蛋白,而不是血凝素。一般来说,靶向流感病毒的功能蛋白的抗病毒剂包括进入抑制剂、血凝素抑制剂、神经氨酸酶抑制剂、流感聚合酶抑制剂(RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)抑制剂)、核衣壳蛋白抑制剂、M2离子通道抑制剂和盐酸阿比朵尔。进入抑制剂的非限制性实例包括三萜类衍生物,如甘草酸(甘草酸苷)和甘草次酸;皂苷;乌拉尔甘草皂苷M-Y(如乌拉尔甘草皂苷M);硫酸葡聚糖(DS);水飞蓟素;姜黄素;和趋溶酶体药,如刀豆素A、巴弗洛霉素A1和氯喹。血凝素抑制剂的非限制性实例包括BMV-27709;司他弗林;天然产物,如棉子酚、芦丁、槲皮素、木番荔枝碱和茶黄素;三价糖肽模拟物,如Wu X,Wu X,Sun Q等人Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents.Theranostics.2017;7(4):826-845中描述的化合物1;罗汉松酸衍生物,如Wu X,Wu X,Sun Q等人Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents.Theranostics.2017;7(4):826-845中描述的化合物2;天然产物五环三萜,如Wu X,Wu X,Sun Q等人Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents.Theranostics.2017;7(4):826-845中描述的化合物3;和异戊二烯化吲哚二酮哌嗪生物碱,如新海胆灵B。核衣壳蛋白抑制剂的非限制性实例包括nucleozin、放线菌酮、蔡普生和英加韦林。M2离子通道抑制剂的非限制性实例包括批准的M2抑制剂金刚烷胺和金刚乙胺及其衍生物;以及非金刚烷衍生物,如精胺、亚精胺、螺哌啶和蕈烷胺衍生物。

[0173] 在一些实施方案中,抗病毒剂选自神经氨酸酶(NA)抑制剂和流感聚合酶抑制剂(RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)抑制剂)。神经氨酸酶(NA)抑制剂的非限制性实例包括扎那米韦;奥司他韦;帕拉米韦;拉尼那米韦;其衍生物,如在Wu X,Wu X,Sun Q等人Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents.Theranostics.2017;7(4):826-845中所描述的化合物4-10,和二聚扎那米韦缀合物(例如,如Wu X,Wu X,Sun Q等人Progress of small molecular inhibitors in the

development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中所述); 苯甲酸衍生物 (例如, 如 Wu X, Wu X, Sun Q 等人 Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中所述; 例如化合物 11-14); 吡咯烷衍生物 (例如, 如 Wu X, Wu X, Sun Q 等人 Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中所述; 例如化合物 15-18); 银杏双黄酮-唾液酸缀合物; 黄烷酮类和黄酮类异黄芩素及其衍生物 (例如, 如 Wu X, Wu X, Sun Q 等人 Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中所描述); AV5080; 和 N-取代的奥司他韦类似物 (例如, 如 Wu X, Wu X, Sun Q 等人 Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中所描述)。流感聚合酶抑制剂 (RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp)) 抑制剂的非限制性实例包括 RdRp 破坏化合物, 如 Wu X, Wu X, Sun Q 等人 Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. Theranostics. 2017; 7 (4) : 826-845 中描述的那些; PB2 帽结合抑制剂, 如 JNJ63623872 (VX-787); 帽依赖性核酸内切酶抑制剂, 如巴洛沙韦玛波西酯 (S-033188); PA 核酸内切酶抑制剂, 如 AL-794、EGCG 和其脂族类似物、N-羟肟酸和 N-羟基酰亚胺、flutimide 及其芳族类似物、特特拉姆酸衍生物、L-742, 001、ANA-0、多酚儿茶素、苯乙基-苯基邻苯二甲酰亚胺类似物、大环双联苺、pyrimidinol、富勒烯、羟基喹啉酮、羟基吡啶酮、羟基哒嗪酮、含三羟基-苯基-的化合物、2-羟基-苯甲酰胺、羟基-嘧啶酮、 β -二酮酸及其生物电子等排化合物、缩氨基硫脲、双羟基吡啶-氮甲酰和吡啶并-哌嗪二酮 (Endo-1); 及核苷和核碱基类似物抑制剂, 如利巴韦林、法匹拉韦 (T-705)、2'-脱氧-2'-氟鸟苷 (2'-FdG)、2'-取代的 carba-核苷类似物、6-甲基-7-取代-7-脱氮嘌呤核苷类似物和 2'-脱氧-2'-氟胞苷 (2'-FdC)。例如, 抗病毒剂可以是扎那米韦、奥司他韦或巴洛沙韦。

[0174] 因此, 根据本发明的药物组合物可包含一种或多种另外的活性组分。根据本发明的抗体可与另外的活性组分 (活性助剂) 存在于相同的药物组合物中。或者, 根据本发明的抗体与另外的活性组分 (活性助剂) 包含在不同的药物组合物中 (例如, 不在同一组合物中)。因此, 如果设想了不止一种另外的活性组分 (活性助剂), 则每种另外的活性组分 (活性助剂) 和根据本发明的抗体或其抗原结合片段可由不同的药物组合物所包含。这样的不同的药物组合物可组合地/同时地或在分开的时间和/或由分开的施用途施用。

[0175] 根据本发明的抗体和另外的活性组分 (活性助剂) 可提供加性或协同治疗效果。术语“协同”用于描述两种或多种活性剂的联用效果, 其大于每种相应的活性剂的单独效果的总和。因此, 在两种或多种药剂的联用效果导致活性或过程的“协同抑制”的情况下, 意图是活性或过程的抑制大于每种相应的活性剂的抑制效果的总和。术语“协同治疗效果”是指用两种或多种治疗剂的组合所观察到的治疗效果, 其中所述治疗效果 (如通过多个参数中的任何一个所量度) 大于用相应的单独的治疗剂所观察到的单独的治疗效果的总和。

[0176] 因此, 本发明还提供了 (i) 如本文所述的本发明的抗体和 (ii) 如上文所述的抗病毒剂的组合。

附图说明

[0177] 下面将给出附图的简要说明。附图旨在更详细地示意本发明。然而，它们无意于以任何方式限制本发明的主题。

[0178] 图1针对实施例2示出了人抗体FluAB_MLNS(空心正方形)和FluAB_wt(比较抗体；实心圆圈)在经由ELISA评估直至第56天的猕猴血浆样本中的血浆浓度。

[0179] 图2针对实施例3示出了FluAB_MLNS(动物C90142、C90190)的血浆浓度，使用抗-CH2抗体ELISA测量来量化总人mAb或使用HA抗原结合ELISA来确定mAb的功能性。曲线图示出了在选定的时间点(第1天、第21天、第56天、第86天和第113天)下个体动物的总人mAb定量与HA结合之间的线性回归。

[0180] 图3针对实施例4示出了(A)使用ELISA测得并按尿素含量标准化的鼻拭子中人抗体FluAB_MLNS和FluAB_wt的浓度，如；(B)人抗体FluAB_MLNS和FluAB_wt的生物分布，以鼻拭子中尿素标准化浓度对血浆浓度的%表示。个体动物ID和接种的人抗体变体(FluAB_MLNS或FluAB_wt)在下面指示。

[0181] 图4针对实施例5示出了用FluAB_wt(小图B、小图D，圆圈)、FluAB_MLNS(小图C、小图E，正方形)以1mg/kg(小图B、小图C，灰色符号)和0.3mg/kg(小图D、小图E，浅灰色符号)治疗或未经治疗(小图A，三角形)的Tg32小鼠随时间的累积体重变化；所有小鼠鼻内感染PR8病毒。示出了个体动物；粗黑线代表BW±SD的平均趋势。指示了每组的个体数。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ (仅相对于对照(A))， $^{\circ}p<0.05$ 、 $^{\circ\circ}p<0.01$ (均相对于MEDI8852的相对时间点)，双向ANOVA与Bonferroni多重检验校正。

[0182] 图5针对实施例5示出了在未经任何治疗(虚线)、经FluAB_wt治疗、或经FluAB_MLNS治疗的受感染Tg32雄性小鼠中1mg/kg剂量(左小图)与0.3mg/kg剂量(右小图)之间的存活百分数比较。 $**p<0.01$ (相对于未经治疗的小鼠(CTR))和FluAB_MLNS 0.3mg/kg； $^{\circ\circ\circ}p<0.001$ (相对于FluAB_wt)，log-rank分析，Mantel-Cox方法。

[0183] 图6针对实施例5示出了注射抗体的循环水平。示出了临感染前(第0天)和感染后6天在小鼠血清中测得的循环的FluAB_wt(圆圈)和FluAB_MLNS(正方形)的个体水平($\mu\text{g}/\text{ml}$)。条代表平均值±SD。

[0184] 图7针对实施例6示出了在体外中和测试法中使用的板方案。

[0185] 图8针对实施例6示出了单独的FluAB_MLNS和奥司他韦对H1N1(A、C)和H3N2(B、D)病毒感染的中和活性。

[0186] 图9针对实施例6示出了FluAB_MLNS和奥司他韦对H1(A)和H3(B)病毒感染的联用中和活性。数据示出了单独的FluAB_MLNS和与异摩尔浓度的奥司他韦联用在MDCK细胞的H1N1(A)和H3N2(B)病毒感染中的抑制分数。数据表示为三个平行测定的值的平均值±SD，每个平行测定在三个独立的培养板中获得。

[0187] 图10针对实施例6示出了联用的FluAB_MLNS与奥司他韦的半数效应图。将两种化合物以指定的恒定比率连续稀释并加到感染了H1(A)和H3(B)病毒毒株的MDCK细胞中。还示出了从非恒定比率(NCR)下的选定组合获得的值。

[0188] 图11针对实施例6示出了FluAB_MLNS和奥司他韦对H1N1病毒感染的联用指数。斑点代表在指示的恒定比率下的实际实验点，累积药物-药物浓度在旁边表示。虚曲线示出了在整个效应范围内预测的联用指数。

[0189] 图12针对实施例6示出了FluAB_MLNS和奥司他韦对H3N2病毒感染的联用指数。斑点代表在指示的恒定比率下的实际实验点,累积药物-药物浓度在旁边表示。虚曲线示出了在整个效应范围内预测的联用指数。

[0190] 图13针对实施例6示出了FluAB_MLNS-奥司他韦组合对H1N1病毒感染的等效线图。斑点示出了不同恒定比率FluAB_MLNS-奥司他韦组合的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值。对于每个实验点,示出了累积浓度。

[0191] 图14针对实施例6示出了FluAB_MLNS-奥司他韦组合对H3N2病毒感染的等效线图。斑点示出了不同恒定比率FluAB_MLNS-奥司他韦组合的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值。对于每个实验点,示出了累积浓度。

[0192] 图15针对实施例6示出了单独的FluAB_MLNS和扎那米韦对H1N1 (A、C) 和H3N2 (B、D) 病毒感染的中和活性。

[0193] 图16针对实施例6示出了FluAB_MLNS和扎那米韦对H1 (A) 和H3 (B) 病毒感染的联用中和活性。数据示出了单独的FluAB_MLNS和与异摩尔浓度的扎那米韦联用在MDCK细胞的H1N1 (A) 和H3N2 (B) 病毒感染中的抑制分数。数据表示为三个平行测定的值的平均值 $\pm$ SD,每个平行测定在三个独立的培养板中获得。

[0194] 图17针对实施例6示出了联用的FluAB_MLNS与扎那米韦的半数效应图。将两种化合物以指定的恒定比率连续稀释并加到感染了H1 (A) 和H3 (B) 病毒毒株的MDCK细胞中。还示出了从非恒定比率 (NCR) 下的选定组合获得的值。

[0195] 图18针对实施例6示出了FluAB_MLNS和扎那米韦对H1N1病毒感染的联用指数。斑点代表在指示的恒定比率下的实际实验点,累积药物-药物浓度在旁边表示。虚曲线示出了在整个效应范围内预测的联用指数。

[0196] 图19针对实施例6示出了FluAB_MLNS和扎那米韦对H3N2病毒感染的联用指数。斑点代表在指示的恒定比率下的实际实验点,累积药物-药物浓度在旁边表示。虚曲线示出了在整个效应范围内预测的联用指数。

[0197] 图20针对实施例6示出了FluAB_MLNS-扎那米韦组合对H1N1病毒感染的等效线图。斑点示出了不同恒定比率FluAB_MLNS-扎那米韦组合的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值。对于每个实验点,示出了累积浓度。

[0198] 图21针对实施例6示出了FluAB_MLNS-扎那米韦组合对H3N2病毒感染的等效线图。斑点示出了不同恒定比率FluAB_MLNS-扎那米韦组合的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值。对于每个实验点,示出了累积浓度。

[0199] 图22针对实施例6示出了单独的FluAB_MLNS和巴洛沙韦对H1N1 (A、C) 和H3N2 (B、D) 病毒感染的中和活性。

[0200] 图23针对实施例6示出了FluAB_MLNS和巴洛沙韦对H1 (A) 和H3 (B) 病毒感染的联用中和活性。数据示出了单独的FluAB_MLNS和与异摩尔浓度的巴洛沙韦联用在MDCK细胞的H1N1 (A) 和H3N2 (B) 病毒感染中的抑制分数。数据表示为三个平行测定的值的平均值 $\pm$ SD,每个平行测定在三个独立的培养板中获得。

[0201] 图24针对实施例6示出了联用的FluAB_MLNS与巴洛沙韦的半数效应图。将两种化合物以指定的恒定比率连续稀释并加到感染了H1 (A) 和H3 (B) 病毒毒株的MDCK细胞中。还绘制了从非恒定比率 (NCR) 下的选定组合获得的值。

[0202] 图25针对实施例6示出了FluAB_MLNS与巴洛沙韦的联用指数。斑点代表在指示的恒定比率下的实际实验点,累积药物-药物浓度在旁边表示。虚曲线示出了在整个效应范围内预测的联用指数。

[0203] 图26针对实施例6示出了FluAB_MLNS-巴洛沙韦组合的等效线图。斑点示出了不同恒定比率FluAB_MLNS-巴洛沙韦组合的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值。对于每个实验点,示出了累积浓度。

[0204] 图27针对实施例7示出了溶液中的人FcRn与固定化的FluAB_MLNS的结合(灰线)或与固定化的FluAB_wt的结合(黑线),如在pH=6.0 (A) 或pH=7.4 (B) 下通过Octet所测得。时间点0秒代表从基线缓冲液向含有人FcRn的缓冲液的切换。时间点420秒(灰色垂直虚线)代表在相应的pH下切换到空白缓冲液。使用Octet RED96 (FortéBio) 实时测量缔合和离解曲线。

[0205] 图28针对实施例9示出了通过ELISA测得的ADA反应水平以检测小鼠抗药物IgG (A; 条代表治疗组的平均值 $\pm$ SD); 和静脉内注射后14天测得的循环的人IgG水平(X轴) 与同一时间点下存在的ADA信号(Y轴) 之间的相关性分析(B)。示出了显著值的非参数Spearman相关系数。

[0206] 图29针对实施例10示出了在皮下(s.c.) 注射FluAB_MLNS或FluAB_wt后的ADA反应水平。数据表示为在皮下注射后三周获得的个体血清中检测到的ADA信号(OD 450nm) 的值($n=5$ /组), 在PBS中以1:25预稀释, 然后进一步连续稀释5倍。

实施例

[0207] 在下文中,呈现了示意本发明的各种实施方案和方面的特定实施例。然而,本发明的范围不应受本文描述的具体实施方案的限制。以下制备和实施例为使本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本发明而给出。然而,本发明的范围不受所例示的实施方案的限制,这些例示的实施方案仅旨在作为本发明的单个方面的示意,功能上等效的方法也在本发明的范围内。实际上,根据前面的描述、附图和下面的实施例,除了本文描述的那些外对本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。所有这样的修改落在附随的权利要求书的范围内。

[0208] 实施例1:根据本发明的抗体在食蟹猴中的安全性和耐受性

[0209] 设计并产生根据本发明的抗体,其包含(i) 如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中所陈列的CDR序列和(ii) 重链恒定区中的两个突变M428L和N434S。更具体地,该抗体包含(i) 如SEQ ID NO:7中所陈列的重链可变区(VH) 序列和如SEQ ID NO:8中所陈列的轻链可变区(VL) 序列;和(ii) 重链恒定区中的两个突变M428L和N434S。甚至更具体地,该抗体包含的重链具有如SEQ ID NO:9中所陈列的氨基酸序列并且包含的轻链具有如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列。该抗体在本文中称为“FluAB_MLNS”。

[0210] 为了比较,使用了抗体“FluAB_wt”,其与抗体“FluAB_MLNS”的不同仅在于其在重链恒定区中不含两个突变M428L和N434S。相应地,比较抗体“FluAB_wt”包含的重链具有如SEQ ID NO:11中所陈列的氨基酸序列并且包含的轻链具有如SEQ ID NO:10中所陈列的氨基酸序列。

[0211] 在60分钟的静脉内输注中向每个测试组的三只雌性食蟹猴(Macaca

fascicularis) 给予5mg/kg FluAB_MLNS或FluAB_wt (体积为2.5ml/kg) 的单次静脉内输注。在给药前及给药后第7天和第21天采集血液或尿液用于临床化学和血液学分析。

[0212] 在60分钟的静脉内输注中以5mg/kg给予FluAB_MLNS或FluAB_wt后,密切监测雌性食蟹猴的健康和体重并定期采集血液和尿液样本。在静脉内接种抗体后,除了在一些动物中在接种部位处于给药后24小时观察到瘀伤和给药后3天时观察到红皮病外,没有观察到不良事件。所有动物总体上都健康,食物消耗正常,并且在整个研究过程中体重总体增加。与给药前样本相比,给药后7天或21天时的临床化学、血液学和尿液分析参数正常。

[0213] 概括起来,向食蟹猴中单次静脉内输注FluAB_MLNS或FluAB_wt没有引起不良事件并且通常耐受性良好。

[0214] 实施例2:血浆浓度和药代动力学的测定

[0215] 这些实验目的在于确定浓度、建立半衰期并比较根据本发明的抗体FluAB_MLNS与比较抗体FluAB_wt相比在单次静脉内注射后在血浆中的药代动力学。

[0216] 在给药前,使用斑点免疫结合测定法测试动物的流感特异性抗体呈阴性。血清反应阳性的动物被排除在研究之外,因为预先存在的免疫力可能会干扰该测试。另外,排除了出现抗药物抗体(ADA)反应的动物。

[0217] 在60分钟的静脉内输注中向每个测试组的三只雌性猕猴给予5mg/kg FluAB_MLNS或FluAB_wt (体积为2.5ml/kg) 的单次静脉内输注。给药前将血液采集在含有K₂EDTA的试管中并处理得到血浆用于在给药后大约1小时、6小时、24小时、96小时、168小时、504小时、840小时和1344小时(h) 后的药代动力学测试。

[0218] 使用ELISA测定法体外测定抗体的血浆浓度。简言之,将IAV-HA抗原(甲型流感病毒H1N1 A/California/07/2009血凝素蛋白抗原(具有His标签);Sino Biologicals)在PBS中稀释至2μg/ml并将25μl添加到96-孔平底1/2-面积ELISA板的孔中,于4℃下包被过夜。包被后,使用自动ELISA洗涤器用补充有0.05%吐温20(洗涤溶液)的0.5×PBS洗涤板两次。然后,在室温(RT)下用100μl/孔的补充有1%BSA的PBS(封闭溶液)封闭板1小时并然后洗涤两次。血浆样本在4℃下于10000g下离心10分钟并然后在96孔细胞培养板中在封闭溶液中稀释(1:10,然后1:30),最终1:300稀释。对用于定量的猕猴血浆的最小稀释度(1:300)进行了测试和设置以确保基质效应可忽略不计。然后三份平行地以1:2逐步稀释样本,总共稀释12次。经由在来自所有测试动物的接种前血浆的合并物中以1:300稀释抗体至1μg/ml来类似地制备每种待试抗体的标准品,从而模拟测试样本的基质。然后三份平行地在封闭溶液中以1:3逐步稀释标准品,总共稀释12次。将25μl制得的样本或标准品加入到血凝素(HA)包被的孔中并于室温下孵育1小时。四次洗涤后,向每孔中加入25μl以1:5000在封闭溶液中稀释(最终浓度0.16μg/ml)的山羊抗人IgG HRP缀合物(AffiniPure F(ab')₂片段,Fcγ片段-特异性;Jackson ImmunoResearch)用于检测并于室温下孵育1小时。四次洗涤后,通过添加每孔40μl的SureBlue TMB底物(Bioconcept)来使板显色。在室温下孵育约7-20分钟后,当显色反应达到平台期(最大OD约3.8)时,向每孔中加入40μl 1%的HCl以使反应停止并使用分光光度计于450nm下测量吸光度。

[0219] 为了确定食蟹猴血浆中抗体的浓度,在Gen5软件(BioTek)中将来自ELISA数据的OD值对浓度作图。使用可变斜率模型、四个参数和下式应用非线性曲线拟合: $Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$ 。将落在标准曲线的可预测测定范围内的样本稀释液OD值内插以对样本定量,

标准曲线为如通过在曲线的上部、中间或下部范围中的质量控制样本在设置实验中测得。然后考虑样本的最终稀释度来确定抗体的血浆浓度。如果不止一个样本稀释度的值落在标准曲线的线性范围内,则使用这些值的平均值。通过使用WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (8.1.0.3530 Core版本,Phoenix软件,Certara) 和以下设置来分析药代动力学(PK)数据:模型:血浆数据,恒定输注施用;非缺失观测数:8;稳态间隔Tau:1.00;给药时间:0.00;给药量:5.00mg/kg;输注时长:0.04天;计算方法:线性梯形法加线性插值法; λ_z 计算的加权:统一加权; λ_z 方法:找到对 λ_z 的最佳拟合,Log回归。使用Prism 7.0软件(GraphPad,La Jolla,CA,USA)进行绘图和统计分析(线性回归或异常值分析)。使用ROUT方法(Q=1%)进行异常值分析,有可能在任一方向上找到任何数量的异常值。

[0220] 结果示于图1中。对接种后一直到56天抽取的食蟹猴血浆样本的分析表明,与比较抗体FluAB_wt相比,根据本发明的抗体FluAB_MLNS具有延长的体内半衰期(图1)。用WinNonLin使用非房室分析,对于根据本发明的抗体FluAB_MLNS, $T_{1/2}$ 估计为19.5天,而对于比较抗体FluAB_wt, $T_{1/2}$ 估计为11.6天。定量的下限为300ng/ml。

[0221] 概括起来,与比较抗体FluAB_wt相比,根据本发明的抗体FluAB_MLNS在接种后至少一直到第56天都具有延长的体内半衰期。

[0222] 实施例3:体内长期稳定性

[0223] 为了测试根据本发明的抗体FluAB_MLNS的抗原结合随时间的体内稳定性和功能性,将接受根据本发明的抗体FluAB_MLNS的组的药代动力学测量(如实施例2中所述)延长至接种后第86天和第113天。在接种后第1天、第21天、第56天、第86天、第113天使用如实施例2中所述的血凝素(HA)结合ELISA对功能性FluAB_MLNS进行定量。

[0224] 此外,使用特异性结合人但不结合猴Ab的CH2区域的捕获mAb,使用特异性抗-CH2 ELISA对猕猴血浆中的总人抗体进行定量。为了测量总人IgG并因此定量食蟹猴血浆中总的接种人抗体,使用用对人IgG具有特异性的小鼠抗-CH2结构域(克隆R10Z8E9;Thermo Scientific)的ELISA捕获。经证实,该mAb不与猴IgG发生交叉反应。对于96孔平底1/2-面积ELISA板的包被,以0.5 μ g/ml向PBS中加入小鼠抗人IgG CH2并于4℃下孵育过夜。然后,洗涤板并于室温下加入100 μ l/孔的含有5%BSA的封闭溶液,保持1小时。根据本发明的抗体FluAB_MLNS的标准品经由在封闭溶液中将FluAB_MLNS稀释至1ng/ml来制备。然后两份平行地在封闭溶液中以1:1.5逐步稀释标准品,总共稀释12次。食蟹猴血浆样本在4℃下以10000g离心10分钟并在封闭溶液中逐步稀释至最终的1:1000、1:5000或1:15000。在洗涤板后,向ELISA板中加入25 μ l样本或标准品并于室温下孵育1小时。三次洗涤后,将25 μ l 0.04 μ g/ml的山羊抗人IgG HRP(AffiniPure F(ab')₂片段,Fc γ 片段-特异性;Jackson ImmunoResearch)加到含有1%BSA的封闭溶液中进行检测并于室温下孵育45分钟。三次洗涤后,通过添加每孔40 μ l的SureBlue TMB底物(Bioconcept)来使板显色。于室温下孵育20分钟后,加入40 μ l 1%的HCl以使反应停止,并于450nm下测量吸光度。

[0225] 结果示于图2中。两种定量得到食蟹猴血浆中相似的人抗体浓度(图2)。经由线性回归进行的额外分析表明,经由HA结合的定量与总抗-CH2定量之间的关系在所有选择的时间点都遵循线性模式。因此,血浆中存在的FluAB_MLNS的总量在与甲型流感病毒(IAV)的血凝素(HA)茎区域的结合中发挥作用,在体内86天和113天后也是如此。

[0226] 概括起来,根据本发明的抗体FluAB_MLNS证实了功能性抗原结合并因此在研究扩

展期间一直到接种后第113天都具有良好的体内长期稳定性。

[0227] 实施例4:鼻拭子中的抗体浓度和生物分布

[0228] 为了确定根据本发明的抗体FluAB_MLNS和比较抗体FluAB_wt在鼻粘液与血浆之间的生物分布,测定了鼻拭子中的抗体浓度。为此,在施用根据本发明的抗体FluAB_MLNS或比较抗体FluAB_wt后24小时、504小时和1344小时采集实施例2中描述的猕猴的鼻拭子。鼻拭子中抗体FluAB_MLNS和FluAB_wt的浓度基本上如实施例2中针对血浆中的测定所描述那样测定,但有以下细微调整:(a) ELISA板在室温下封闭2小时;(b) 鼻拭子样本用1%的BSA/PBS以1:2开始稀释,然后按1:2逐步连续稀释,共8个稀释点;(c) 使用鼻拭子培养基(RT MINI病毒转运培养基;Copan)作为测定基质对照。

[0229] 为了消除取拭子过程中的差异或每只动物在不同时间点(第1天、第21天和第56天)存在的鼻腔分泌物量的差异,将来自鼻拭子的结果按尿素含量标准化。尿素在血液间自由扩散,在这些血浆或拭子样本中以相似的量存在(Lim等人,2017, Antimicrob Agents Chemother 61(8):e00279-17)。为此,按照制造商的程序使用“尿素氮(BUN)比色检测试剂盒”(Invitrogen)来定量地测量尿素氮(BUN)。简言之,将样本在PBS中以1:3稀释,与试剂盒试剂A和B混合,并于室温下孵育30分钟。使用96孔酶标仪在450nm下读取氧化还原反应的有色产物。经由比较样本与BUN标准品来进行定量,BUN标准品随试剂盒一起提供并同等处理。

[0230] 结果示于图3中。鼻拭子中标准化抗体的量随时间减少(图3A)。经由比较鼻浓度与血浆浓度来确定生物分布揭示在根据本发明的抗体FluAB_MLNS与比较抗体FluAB_wt之间没有差异(图3B),表明MLNS-Fc突变虽然延长了FluAB_MLNS在血浆中的半衰期但没有增强抗体向鼻粘液中的生物分布。

[0231] 概括起来,鼻拭子样本未揭示三种mAb变体之间在鼻粘液与血浆之间的生物分布存在任何显著差异。

[0232] 实施例5:抗体FluAB_MLNS在PR8感染Tg32小鼠中的预防活性

[0233] 接下来,在致死性甲型流感感染的H1N1鼠模型中测定了根据本发明的抗体FluAB_MLNS与抗体FluAB_wt相比的预防活性。

[0234] 为了评价预防功效,以0.3至1mg/kg的范围内的剂量向9至14周龄的FcRn-/-hFcRn系32Tg小鼠(C57B6背景)静脉内(i.v.)注射(经由尾静脉)5ml/kg含有根据本发明的抗体FluAB_MLNS或比较抗体FluAB_wt的溶液。i.v.注射后二十四小时,从尾静脉对小鼠取血以测定感染前的血清抗体水平。在感染后(p.i.)第6天和第13天也重复取血。注射了抗体和未经治疗的小鼠都被麻醉(异氟醚,4%,在O₂中,0.3L/min)并通过在两个鼻孔中缓慢滴注50μl (25μl/每个)含有5倍于小鼠半数致死剂量(5 MLD₅₀,相对于1200 TCID₅₀/小鼠)的甲型流感病毒(H1N1,A/Puerto Rico/8/34,如Cottey,R.,Rowe,C.A.,and Bender,B.S.(2001).Influenza virus.Curr Protoc Immunol Chapter 19,Unit19.11-19.11.32中所述)的PBS来进行鼻内攻击。将每只小鼠保持直立,头部略微向后倾斜约1分钟,以减少接种物从鼻孔滴落的可能性。手术后并在出现翻正反射后,将动物放回笼中。每天监测小鼠的体重减轻和疾病症状,直到感染后第14天,如果它们的体重减轻超过其初始体重的20%(其中在感染当天设定为0%)或达到4的发病率评分,则实施安乐死。表1详细说明了所应用的发病率评分:

[0235] 表1-PR8-感染小鼠的发病率评分

[0236]	发病率评分	临床指征
	1	健康
	2	颈上毛皮一直褶皱
	3	竖毛、可能需要深呼吸、警觉性降低
	4	呼吸困难、颤抖和萎靡不振
	5	步态异常、活动力下降、消瘦、尾耳发绀
	6	死亡

[0237] 最终处死所有动物以采集血清和肺。

[0238] 血清制备：

[0239] 向含有凝胶的管中采集大约0.05ml血液并让在室温下停留30分钟。将管以5500rpm (3200×g) 旋转5分钟，将血清转移到新管中并储存于-20℃下直至使用。

[0240] 根据以下设计进行两个独立的实验：

[0241] 表2-研究设计实验1：

[0242]	组	动物数量	IV治疗	mAb剂量
	1	4	-	-
	2	8	FluAB_wt	1mg/kg
	3	4	FluAB_wt	0.3mg/kg
	4	8	FluAB_MLNS	1mg/kg
	5	4	FluAB_MLNS	0.3mg/kg

[0243] 表3-研究设计实验2：

[0244]	组	动物数量	IV治疗	mAb剂量
	1	9	-	-
	2	10	FluAB_wt	0.3mg/kg
	3	6	FluAB_MLNS	0.3mg/kg

[0245] 循环mAb的ELISA定量：

[0246] 在第0天和第6天评估血清的循环抗体水平。简言之，将ELISA板的一半面积在4℃下用来自H1N1毒株A/California/07/09的重组血凝素 (HA) 包被过夜 (2μg/ml, 在PBS中, 25μl/孔)。在封闭 (PBS/1%BSA, 100μl/孔, 室温1小时) 和用ELISA洗涤液 (PBST) 洗涤 (220μl/孔) 2次后，两份平行地加入两种稀释度的血清 (对于1mg/kg, 初始稀释度为1:150; 对于0.3mg/kg, 初始稀释度为1:50) 和抗体标准品 (FluAB_MLNS和FluAB_wt, 0.1μg/ml) (25μl/孔)，并连续稀释 (1:2乘10个血清稀释点, 1:3乘8个抗体标准品点)。在室温孵育1.5小时后，将板用PBST洗涤4次并在室温下与HRP标记的抗人二抗 (0.16μg/ml, 25μl/孔) 一起进一步孵育1.5小时。用PBST洗涤4次后，给板分配以底物溶液 (25μl/孔)，显色14分钟并用1%HC1 (体积/体积, 25μl/孔) 封闭。最后用分光光度计于450nm下读板以进行信号量化。通过使用log (激动剂) 对反应的非线性回归模型 (可变斜率模型, 四个参数, GraphPad Prism) 计算浓度值。

[0247] 数据分析：

[0248] 使用适用于Macintosh的GraphPad Prism软件8.0版 (GraphPad Software, La

Jolla California USA, www.graphpad.com) 对数据绘图和分析。通过使用经Bonferroni多重比较检验校正的普通2-向ANOVA来评估连续变量的统计学显著差异 ($p < 0.05$, 95%置信区间)。通过使用log-rank分析和Mantel-Cox方法来比较生存数据 ($p < 0.05$ 被认为统计上显著)。合并来自上述两个独立实验的数据。

[0249] 结果:

[0250] 在经由鼻内感染进行H1N1 PR8病毒攻击之前一天向Tg32小鼠静脉内施用FluAB_MLNS和FluAB_MLNS (1mg/kg和0.3mg/kg) 后测试了预防活性。结果示于图4至图6中。

[0251] 如图4中所描绘,与未经治疗(小图A)和注射FluAB_wt(小图B和小图C)的小鼠相比,经用1mg/kg(小图D)或0.3mg/kg(小图E)的FluAB_MLNS治疗的小鼠显示出较低的体重减轻。

[0252] 在图5中示出的生存分析中确认了FluAB_MLNS比FluAB_wt更好的保护活性。

[0253] FluAB_MLNS与FluAB_wt之间的功效差异与血清中不同的循环抗体水平不相关,如静脉内施用抗体后第1天和第7天所测得(图6)。值得指出的是,注射后14天没有测得可检测的循环抗体水平(未示出)。

[0254] 概括起来,FluAB_MLNS比比较抗体FluAB_wt在Tg32小鼠中对H1N1 PR8鼻内病毒攻击表现出更好的保护能力。功效与循环抗体水平无关。这些数据表明,FluAB_MLNS与Tg32小鼠表达的hFcRn增强的相互作用也介导了与延长的抗体半衰期无关的体内效应,如在保护活性方面提高的功效。

[0255] 实施例6:抗体FluAB_MLNS与各种抗病毒剂的联用

[0256] 药物联用为增强效力同时降低选择抗性的可能性提供了明确的机会。而且,推定的加性或协同效应可能最终造就剂量节省方法。FDA目前批准的流感药物包括神经氨酸酶抑制剂奥司他韦和扎那米韦以及最近批准的属于核酸内切酶抑制剂类的巴洛沙韦玛波西酯。

[0257] 为了评价本发明的抗体FluAB_MLNS与抗病毒剂奥司他韦、扎那米韦或巴洛沙韦玛波西酯对H1N1和H3N2代表性病毒毒株的联用活性,进行体外中和以评价所得抑制效应。通过使用半数效应图和联用指数(CI)的计算来进行联用效应的分析。

[0258] 简言之,将MDCK (Madin-Darby犬肾) 细胞以30000个细胞/孔接种到96孔板(平底,黑色)中。细胞在37℃、5%CO₂下培养过夜。二十四小时后,通过根据图7中所示的板方案使用FluAB_MLNS(从166.7nM开始,最终9个水平点)和不同抗病毒剂(奥司他韦、扎那米韦或巴洛沙韦玛波西酯,从125nM(对于扎那米韦,250nM)开始,7个垂直点)的交叉1:2连续稀释来制备4×抗体和抗病毒剂(奥司他韦、扎那米韦或巴洛沙韦玛波西酯)在60μl感染培养基(MEM(Sigma Aldrich,目录号M0644)+Glutamax(Invitrogen,41090-028)+1g/ml经TPCK处理的胰蛋白酶(Worthington Biochemical#LS003750)+10g/ml卡那霉素)中的稀释液。

[0259] 对于每种组合,制备三个独立的板,以便具有三份平行的每种药物-药物组合比率。每个板中包含单一化合物滴定(即,FluAB_MLNS,9个点,和每种抗病毒剂,8个点)。以120×TCID₅₀在60μl中的浓度制备病毒溶液,在MEM中以1:1进一步稀释或与FluAB_MLNS稀释液以1:1混合,并在33℃下孵育1小时。使用200μl/孔不含补充剂的MEM洗涤细胞2次,然后加入100μl单独的病毒或100μl FluAB_MLNS/病毒混合物(100×TCID₅₀/孔)并在33℃、5%CO₂下孵育4小时。在添加100μl/孔的感染培养基后,将细胞于33℃、5%CO₂下进一步培养72小时。

感染后第3天,在MuNANA缓冲液(MES 32.5mM/CaCl₂4mM,pH 6.5)中制备20μM的MuNANA(4-MUNANA(2-(4-甲基伞形酮基)-α-D-N-乙酰神经氨酸钠盐合物(Sigma-Aldrich) #69587)溶液并以50μl/孔分配到黑色96孔板中。将50μl中和滴定或单独的病毒滴定上清液转移到板并于37℃下孵育60分钟。然后用100μl/孔0.2M的甘氨酸/50%EtOH(pH 10.7)使反应停止。使用荧光计(Bio-Tek)在460nm下定量荧光。

[0260] 病毒中和分数按下式计算:

$$[0261] \quad 1 - \left(\frac{f_x - f_{\min}}{f_{\max}} \right),$$

[0262] 其中, f_x =样本荧光信号(细胞+病毒+FluAB_MLNS+抗病毒剂); $f_{\min}$ =最小荧光信号(仅细胞,无病毒); $f_{\max}$ =最大荧光信号(仅细胞+病毒)。

[0263] 根据Chou和Talalay的方法(Chou TC,Talalay P:Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.Adv.Enzyme Regul.1984,22:27-55)使用中和分数数据来计算药物-药物联用的剂量-效应关系的定量分析。通过使用CompuSyn软件(ComboSyn Inc.,Paramus,NJ,USA)(Chou T-C:Theoretical basis,experimental design,and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.Pharmacological Reviews 2006,58:621-681)获得联用指数、受累分数(Fa)和等效线图。

[0264] 结果在图8至图26中示出并在下面描述。

[0265] FluAB_MLNS与奥司他韦的组合

[0266] 对两种病毒血清型代表H3N2和H1N1毒株,体外比较FluAB_MLNS和奥司他韦中和甲型流感病毒的相对功效。如图8中所示,当独立地与H3N3和H1N1病毒一起暴露时,分开测试的两种化合物都能够剂量依赖性地完全抑制细胞感染(图8A、图8B)。IC₅₀值,如根据半数效应图(图8C、图8D)在数据对数线性化后所计算(如(Chou TC,Talalay P:Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.Adv.Enzyme Regul.1984,22:27-55)中所描述),对于FluAB_MLNS(对于H3和H1毒株,分别为17.9nM和15.6nM)和奥司他韦(对于H3和H1毒株,分别为7nM和9.1nM)两者确实都在纳摩尔范围内。总体而言,在H3与H1病毒感染之间在FluAB_MLNS的抑制反应方面没有测得实质性的差异,虽然H1N1病毒对奥司他韦的抑制作用要稍敏感一些。

[0267] 为了测试FluAB_MLNS和奥司他韦的组合在中和H3和H1病毒对MDCK细胞的感染中的作用,如上所述以不同的比率连续稀释两种化合物,并评估在不同药物浓度的存在下神经氨酸酶的酶活性(NA;作为培养物中病毒含量的读数)并与单一药物作用进行比较。用FluAB_MLNS测得的中和效果因异摩尔浓度的第二化合物的相伴存在而大大增强,因此表明对H3和H1病毒感染具有协同效应而非加性效应(图9)。检测到H1和H3病毒对奥司他韦的抑制作用的敏感性略有不同。

[0268] 为了精确地定量各种药物组合比率的推定协同效应,根据半数效应原理进一步变换中和数据并用如上所述的CompuSyn软件进行分析。几种不同的FluAB_MLNS-奥司他韦组合定比的效应绘制在半数效应图中,如图10中所示。

[0269] CompuSyn软件将半数效应方程的对数变换应用于实验数据并计算各种药物组合的效力(IC₅₀)和所谓的联用指数(CI)。CI是Chou-Talalay(半数效应)方程派生的参数,其考

考虑了质量作用定律的物理化学性质并由要达到一定的效果与药物2联用的药物1的剂量部分除以要获得相同的效果单一药物1和2的剂量之间的两个比率之和得到。根据该数学算法, $CI=1$ 指示加性作用, $CI<1$ 指示协同作用, $CI>1$ 指示拮抗作用。

[0270] 如图11和12中所示, 对于所有受试的组合比率及H1 (图11) 和H3病毒 (图12), 抑制分数范围上的预测CI值描述了所有药物组合比率远低于1的曲线并且几乎所有组合的不同组合浓度的实际实验点也在1以下。总而言之, 数据表明FluAB_MLNS和奥司他韦在联用时具有直接的协同作用。

[0271] 或者, 同样的数据可用等效线图来描述, 等效线图比较了单一药物和联用药物的等效浓度。如图13和14中所示, 三种不同的组合比率针对H1 (图13) 和H3 (图14) 的 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值的分布远低于连接受试的单一药物针对H1 (图13) 和H3 (图14) 的相应 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 的等效线, 这表明了一致的协同作用 (而加性和拮抗作用将分别产生位于单一药物等效图之上或上方的等效点)。

[0272] FluAB_MLNS与扎那米韦的组合

[0273] 对两种病毒血清型代表H3N2和H1N1毒株, 也体外比较FluAB_MLNS和扎那米韦中和甲型流感病毒的相对功效。如图15中所示, 当独立地与H3N3和H1N1病毒一起暴露时, 分开测试的两种化合物都能够剂量依赖性地完全抑制细胞感染。FluAB_MLNS的相对计算 IC_{50} 值为23.1nM至24.4nM, 扎那米韦的为10.7nM至13.7nM。

[0274] 对于FluAB_MLNS与扎那米韦的联用效应, 图16显示, 与奥司他韦类似, 扎那米韦大大增强FluAB_MLNS对H1病毒和H3病毒两者的抑制能力。

[0275] 使用CompuSyn和如上所述半数效应原理类似地计算协同效应的定量。图17中示出了FluAB_MLNS与扎那米韦的联用效应的半数效应图。图18和图19中示出了FluAB_MLNS和扎那米韦对H1 (图18) 和H3 (图19) 的计算CI并清楚地表明了两种药物之间的协同效应, 如由所有受试实验点的值均低于1所示。一致地, 对于两种病毒毒株, 等效线图表明在 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值 (图20和21中所示) 上具有强的协同效应, 均显著低于用单一药物的IC值。

[0276] FluAB_MLNS与巴洛沙韦玛波西酯的组合

[0277] 类似于如上文对奥司他韦和扎那米韦所述, 最初在H1和H3毒株上与单独的FluAB_MLNS比较了最近批准的核酸内切酶抑制剂巴洛沙韦玛波西酯。结果示于图22中。FluAB_MLNS的相对计算 IC_{50} 值为20.1nM至15.4nM, 巴洛沙韦玛波西酯的为4.9nM至2.3nM。

[0278] 尽管与NA抑制剂相比, 巴洛沙韦在抑制病毒复制方面具有不同的作用机制, 但该药物仍然能够强烈增强FluAB_MLNS的抑制能力, 清楚地表明具有协同效应 (图23)。使用不同的组合比率获得的抑制数据, 用CompuSyn软件计算半数效应和绘图, 并如上所述计算药物-药物相互作用的类型 (图24)。FluAB_MLNS和巴洛沙韦玛波西酯对H1和H3病毒的计算CI (图25) 清楚地表明了两种药物之间的协同效应, 如由大多数受试实验点的值低于1所示。等效线图表明了 IC_{50} 、 IC_{75} 和 IC_{90} 值上稳健且完全的协同效应 (图26)。

[0279] 概括起来, FluAB_MLNS对H1和H3毒株的中和能力被不同的抗病毒剂协同增强, 即NA抑制剂奥司他韦和扎那米韦以及核酸内切酶抑制剂巴洛沙韦玛波西酯。

[0280] 实施例7: 在不同pH下与人FcRn的结合

[0281] 使用生物层干涉测量法 (BLI) 并排比较FluAB_wt和FluAB_MLNS与新生儿Fc受体 (FcRn) 结合的能力。

[0282] 为此,在Octet RED96仪器(生物层干涉测量仪,BLI,ForteBio)上测量FluAB_wt和FluAB_MLNS与人FcRn的结合。将包被有抗人Fab-CH1的生物传感器在室温下于动力学缓冲液中预水合10分钟。然后,将以1 μ g/ml在pH 7.4的动力学缓冲液中的人mAb(FluAB_wt或FluAB_MLNS)负载到生物传感器上,持续30分钟。在pH=7.4或pH=6.0的动力学缓冲液(经无菌过滤的0.01%的无内毒素牛血清白蛋白、0.002%的吐温-20(聚山梨酯20)、0.005%的NaN₃在PBS中)中测量基线,持续4分钟。然后将负载有人mAb的传感器暴露于人FcRn在pH=7.4或pH=6.0的动力学缓冲液中的1 μ g/ml溶液以测量FcRn-mAb在不同环境中的缔合(缔合速率),持续7分钟。然后在相同pH的动力学缓冲液中测量离解,持续另外5分钟(离解速率)。所有步骤均在30℃下以1000rpm搅拌的同时进行。随着干涉图案的变化,实时测量结合和离解曲线。

[0283] 如图27中所示,在酸性pH(pH 6.0)下,FluAB_MLNS比FluAB_wt以更高的亲和力结合人FcRn,而FluAB_MLNS和FluAB_wt在中性pH(pH 7.4)下都不结合FcRn。

[0284] 实施例8:在抗体扩展表位中鉴定的多态性的表征

[0285] 使用通过反向遗传学在A/Puerto Rico/8/34(PR8)背景上用H1 HA或H3 HA生成的病毒评价了扩展表位中的历史多态性对FluAB_MLNS的中和活性的影响。

[0286] 使用定点诱变将单核苷酸多态性引入到PR8 H1 HA或A/Aichi/2/68(Aichi) HA pHW2000质粒中。使用标准方法在PR8骨架上与相关的H1或H3 HA一起拯救重组甲型流感病毒(例如,如Erich Hoffmann,Gabriele Neumann,Yoshihiro Kawaoka,Gerd Hobom,Robert G.Webster,2000,A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids.Proceedings of the National Academy of Sciences May 2000, 97(11):6108-6113;doi:10.1073/pnas.100133697中所述)。

[0287] 使用标准方法在MDCK细胞中评价中和活性。例如,可例如在96孔板中在MDCK细胞中评价中和活性。为此,可在感染前24小时以30000个细胞/孔接种MDCK细胞。在加入到MDCK细胞中之前,抗体FluAB_MLNS可与病毒一起于37℃下孵育1小时。为此,可在感染培养基中创建FluAB_MLNS的1:2.5 9点连续稀释液,每个稀释度可三份平行地测试(例如,50 μ g/mL-0.03 μ g/mL最终浓度),并可与120 TCID₅₀的病毒一起于37℃下孵育1小时。MDCK细胞可用PBS洗涤两次,可加入100 μ l/孔的病毒:抗体溶液,并可在37℃下孵育细胞4小时。4小时后,可向细胞加入另外100 μ l/孔的感染培养基。于37℃下孵育72小时后,可通过qRT-PCR提取和测量病毒RNA,例如使用WHO引物(世界卫生组织.CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A H1N1.2009年4月28日)。IC₅₀以减少50%的病毒复制的抗体浓度(单位 μ g/mL)表示并可使用按对照孔(无病毒和单独的病毒)标准化的数据的非线性4-参数逻辑拟合曲线计算。

[0288] FluAB_MLNS对扩展表位中的H1和H3 HA多态性的中和活性示于下表4中。

病毒	HA 中的氨基酸变化	FluAB_MLNS	
		Geomean 中和 IC ₅₀ (μg/mL)	相对于 WT 病毒的变化倍数
[0289]	PR8:Aichi HA wt	野生型	5.6
	PR8:Aichi HA P11S	P11S	9.5
	PR8:Aichi HA D46N	D46N	3.3
	PR8:Aichi HA N49T	N49T	5.0
	PR8 wt	野生型	4.7
	PR8 HA N146D	N146D	5.5
			1.2

[0290] 表4.Aichi=A/Aichi/2/68;Geomean=几何平均;HA=血凝素;NA=不适用;PR8=A/Puerto Rico/8/34 H1N1;wt=野生型

[0291] 对于编码H3 HA的病毒,FluAB_MLNS中和了具有突变HA1 P11S、HA2 D46N或HA2 N49T的病毒,IC₅₀值与野生型病毒相似(相对于野生型病毒,IC₅₀的变化<2倍)。对于编码H1 HA的病毒,FluAB_MLNS中和了编码HA2 N146D的病毒,IC₅₀值与野生型病毒相似(相对于野生型病毒,IC₅₀的变化<2倍)。另外,使用的PR8野生型毒株编码了HA2多态性L38Q和D46N并被FluAB_MLNS中和,IC₅₀值为4.7μg/mL。总体而言,对于FluAB_MLNS,评价的所有多态性产生相对于野生型病毒<2的IC₅₀倍数变化。概括起来,FluAB_MLNS有效地中和了扩展表位中的所有被评价的历史多态性(H3 HA:HA1 P11S、HA2 D46N或HA2 N49T;H1 HA:N146D)。

[0292] 实施例9:在Tg32小鼠中的抗药物抗体反应

[0293] 关于M428L/N434S突变,最近有人担心所述突变会增加包含该突变的抗体的免疫原性(Brian C.Mackness,Julie A.Jaworski,Ekaterina Boudanova,Anna Park,Delphine Valente,Christine Mauriac,Olivier Pasquier,Thorsten Schmidt,Mostafa Kabiri,Abdullah Kandira,Katarina Radošević&Huawei Qiu(2019)Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life,mAbs,11:7,1276-1288;Maeda A,Iwayanagi Y,Haraya K等人Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody.MAbs.2017;9(5):844-853)。

[0294] 为了评估抗体FluAB_MLNS与其亲本抗体FluAB_wt相比的免疫原性,特别是抗药物反应(抗药物抗体;ADA),对单独的两组(n=5)TG32小鼠(人FcRn转基因小鼠)静脉内注射5mg/kg的FluAB-MLNS或FluAB_wt单克隆抗体。为了评价注射的mAb的循环水平,然后在不同的时间点获取血液样本。使用注射后第14天和第21天采集的样本来通过特异性ELISA评价对注射的人单克隆抗体的抗药物抗体(ADA)反应。

[0295] 简言之,将经纯化的FluAB_wt和FluAB_MLNS单克隆抗体以2μg/ml包被在96孔板上。封闭后,将来自注射后14天和21天获得的经治疗动物的血清以1:180稀释并于室温(RT)下孵育1.5小时。洗涤后,向板中加入过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG F(ab')₂片段(0.16 μg/ml)并于室温下孵育1.5小时。然后用适当的底物展示ADA IgG(针对注射的抗体FluAB_wt和FluAB_MLNS的鼠抗体)并用分光光度计读取。示出的数据为在静脉内施用抗体后14天

和21天采集的每个个体血清 (n=5/组) 中获得的OD值 (450nm)。使用来自未接受过治疗的Tg32小鼠 (ctrl) 的血清作为阴性对照。

[0296] 结果示于图28中。出人意料的是,鼠血清IgG与FluAB-MLNS抗体反应的信号非常低并对应于在对照、未注射动物中检测到的信号,而相反,在注射了FluAB_wt的小鼠的血清中在静脉内注射后14天和21天测得的ADA反应都显著高(图28A)。另外,注射后第14天测得的ADA的水平与循环FluAB_wt的水平呈显著负相关(血清FluAB_wt水平由于针对FluAB_wt的鼠抗体而降低),而同时测得的循环FluAB-MLNS的水平确实远更高且更均匀(图28B)。

[0297] 概括起来,这些数据表明,出人意料地,与FluAB_wt相比,FluAB-MLNS的抗药物反应(抗药物抗体;ADA)和因此免疫原性降低。

[0298] 实施例10:皮下施用后的抗药物抗体反应和免疫原性

[0299] 为了在更高免疫原性环境中进一步证实这一出人意料的发现,对单独的Tg32小鼠组 (n=5) 皮下 (s.c.) 注射FluAB-MLNS或FluAB_wt (5mg/kg), 这通常被认为是更高免疫原性的施用途径。皮下施用三周后,通过小鼠抗药物特异性ELISA (如上文实施例9中所述) 在皮下注射了FluAB_wt或FluAB-MLNS的小鼠的血清中测量血清中的抗药物抗体水平。作为阴性对照,使用来自未接受过治疗的未经处理动物的10份血清的合并物。

[0300] 结果示于图29中。尽管是更高免疫原性的环境,但如通过抗-hIgG抗体的血清滴度与在未注射的对照动物的血清中检测到的血清滴度重叠所证实,用FluAB-MLNS皮下治疗的动物仍未增加体液免疫原性反应。相反,在用FluAB_wt治疗的动物中的ADA滴度在所有经治疗动物中明显呈阳性且可测量。在仅注射FluAB_wt的小鼠的血清中检测到注射抗体的循环水平与抗hIgG内源性反应之间的负相关(未示出)。

[0301] 这些数据出人意料地表明,与其亲本抗体FluAB_wt相比,抗体FluAB-MLNS表现出较低的免疫原性。

[0302] 序列和SEQ ID NO的表格(序列表):

[0303]

SEQ ID NO	序列	备注
FluAB_MLNS		
SEQ ID NO: 1	SYNAVWN	CDRH1
SEQ ID NO: 2	RTYYRSGWYNDYAESVKS	CDRH2
SEQ ID NO: 3	SGHITVFGVNVDADFDM	CDRH3
SEQ ID NO: 4	RTSQSLSSYTH	CDRL1
SEQ ID NO: 5	AASSRGS	CDRL2
SEQ ID NO: 6	QQSRT	CDRL3
SEQ ID NO: 7	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYN AVWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSGWYNDYA ESVKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARSGHITVFGVNVDADFDMWGQGTMTVTVSS	VH
SEQ ID NO: 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSLSYTH WYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVE IK	VL
SEQ ID NO: 9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYN AVWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSGWYNDYA ESVKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARSGHITVFGVNVDADFDMWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHSHYTKQSLSLSPGK	重链
SEQ ID NO: 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSLSYTH WYQQKPGKAPKLLIYAASSRSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	轻链
FluAB_wt		

SEQ ID NO: 11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSYN AVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYA ESVKSRLTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARSGHITVFCVNVDADFDMWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSV <u>M</u> HEALH <u>N</u> HYTQKSLSLSPGK	重链
FluAB_MLNS 核酸序列		
SEQ ID NO: 12	CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGT CTGGTGAAGCCTAGCCAGACTCTGTCTTTAAC TTGCGCCATCTCCGGCGACAGCGTGAGCAG CTACAACGCCGTCTGGAAGTGGATTCGTACG AGCCCTAGCAGAGGTTTAGAGTGGCTGGGT CGTACTTACTATCGTTCCGGCTGGTACAACGA CTACGCCGAGAGCGTGAAGTCTCGTATCACT ATCAACCCCGATACTAGCAAGAACCAGTTCTC TTACAGCTGAACAGCGTGACTCCCGAAGAC ACTGCCGTGTACTACTGCGCTCGTAGCGGCC ACATCACTGTGTTCCGGCGTGAATGTGGACGC CTTCGACATGTGGGGCCAAGGTACTATGGTC ACTGTGAGCAGC	FluAB_MLNS VH nuc
SEQ ID NO: 13	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCTTT AAGCGCTAGCGTGGGCGATAGGGTCACTAT CACTTGTCGTAAGTCCAGTCTTTAAGCTCCT ACACTCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGTAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTGCCAGC AGCAGAGGCAGCGGAGTGCCTAGCAGATTT AGCGGCAGCGGTAGCGGCACTGACTTCACT CTGACAATCAGCTCTTTACAGCCCGAAGACTT CGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTCGTACTT TCGGCCAAGGTACTAAGGTGGAGATCAAG	FluAB_MLNS VL nuc

[0304]

[0305]

SEQ ID NO: 14	CAAGTTCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGT CTGGTGAAGCCTAGCCAGACTCTGTCTTTAAC TTGCGCCATCTCCGGCGACAGCGTGAGCAG CTACAACGCCGTCTGGAAGTGGATTGTCAG AGCCCTAGCAGAGGTTTAGAGTGGCTGGGT CGTACTTACTATCGTTCGGCTGGTACAACGA CTACGCCGAGAGCGTGAAGTCTCGTATCACT ATCAACCCCGATACTAGCAAGAACCAGTTCTC TTTACAGCTGAACAGCGTGACTCCCGAAGAC ACTGCCGTGTACTACTGCGCTCGTAGCGGCC ACATCACTGTGTTCCGGCGTGAATGTGGACGC CTTCGACATGTGGGGCCAAGGTACTATGGTC ACTGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCCGTCTTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTT GAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGC GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCACTCCCCGAAGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGCTGCATGA GGCTCTGCACAGCCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	FluAB_MLNS 重链 nuc
---------------	---	----------------------

[0306]

SEQ ID NO: 15	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCTTT AAGCGCTAGCGTGGGCGATAGGGTCACTAT CACTTGTCGTACTAGCCAGTCTTTAAGCTCCT AACTCACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGTAA GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCTGCCAGC AGCAGAGGCAGCGGAGTGCCTAGCAGATTT AGCGGCAGCGGTAGCGGCACTGACTTCACT CTGACAATCAGCTCTTTACAGCCCGAAGACTT CGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTCGTACTT TCGGCCAAGGTACTAAGGTGGAGATCAAGC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGT	FluAB_MLNS 轻链 nuc
---------------	--	----------------------

序列表

<110> 胡默波斯生物医学公司
 <120> 用于治疗甲型流感感染的抗体和方法
 <130> HB01P039W01
 <150> PCT/EP2019/061134
 <151> 2019-04-30
 <160> 15
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDRH1
 <400> 1

Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn
 1 5

[0001]

<210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDRH2
 <400> 2

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val
 1 5 10 15

Lys Ser

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDRH3
 <400> 3

Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 4

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

<400> 5

[0002] Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 7
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH

<400> 7

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

1	5	10	15
Thr Leu Ser	Leu Thr Cys Ala Ile	Ser Gly Asp Ser Val	Ser Ser Tyr
20	25	30	
Asn Ala Val	Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser	Arg Gly Leu Glu	
35	40	45	
Trp Leu Gly	Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr	Asn Asp Tyr Ala	
50	55	60	
Glu Ser Val Lys	Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys	Asn	
65	70	75	80
Gln Phe Ser Leu	Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr	Ala Val	
85	90	95	
Tyr Tyr Cys	Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly	Val Asn Val	
100	105	110	
[0003] Asp Ala Phe	Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr	Val Ser Ser	
115	120	125	
<210>	8		
<211>	103		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	VL		
<400>	8		
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 Thr Ser Gln Ser Leu Ser	Ser Tyr	
20	25	30	
Thr His Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	Leu Leu Ile	
35	40	45	
Tyr Ala Ala	Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser	Gly	
50	55	60	

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 9

<211> 458

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FluAB_MLNS重链

<400> 9

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

[0004] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

[0005]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

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

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
355 360 365

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 10

<211> 210

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 轻链

<400> 10

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 Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
100 105 110

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
115 120 125

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
130 135 140

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
145 150 155 160

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
180 185 190

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
195 200 205

[0007]

Glu Cys
210

<210> 11
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FluAB_wt重链

<400> 11

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

[0008]

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

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

	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
	290						295					300					
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
	305					310					315					320	
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
					325					330					335		
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				340					345					350			
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
			355					360					365				
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
	370						375					380					
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
	385					390					395					400	
[0009]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
					405					410					415		
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
				420					425					430			
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
			435					440					445				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
	450						455										
	<210>	12															
	<211>	384															
	<212>	DNA															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	FluAB_MLNS VH nuc															
	<400>	12															
	caagttcagc	tgcagcagag	cggccccggt	ctggtgaagc	ctagccagac	tctgtcttta											60
	acttgcgcca	tctccggcga	cagcgtgagc	agctacaacg	ccgtctggaa	ctggattcgt											120

	cagagcccta gcagaggttt agagtggctg ggtcgtactt actatcgttc cggctggtac	180
	aacgactacg ccgagagcgt gaagtctcgt atcactatca accccgatac tagcaagaac	240
	cagttctctt tacagctgaa cagcgtgact cccgaagaca ctgccgtgta ctactgcgct	300
	cgtacgggcc acatcactgt gttcggcgtg aatgtggacg ccttcgacat gtggggccaa	360
	ggtactatgg tcactgtgag cagc	384
	<210> 13	
	<211> 309	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> FluAB_MLNS VL nuc	
	<400> 13	
	gacatccaga tgactcagag ccttcctctt ttaagcgtc gcgtgggcga tagggtcact	60
	atcacttgtc gtactagcca gtctttaagc tcctacactc actggtacca gcagaagccc	120
	ggtaaggccc ctaagctgct gatctacgt gccagcagca gaggcagcgg agtgcctagc	180
	agatttagcg gcagcggtag cggcactgac ttactctga caatcagctc ttacagccc	240
[0010]	gaagacttcg ccacttacta ctgccagcag tctcgtactt tcggccaagg tactaagggtg	300
	gagatcaag	309
	<210> 14	
	<211> 1374	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> FluAB_MLNS重链nuc	
	<400> 14	
	caagttcagc tgcagcagag cggccccggt ctggtgaagc ctagccagac tctgtcttta	60
	acttgcgcca tctccggcga cagcgtgagc agctacaacg ccgtctggaa ctggattcgt	120
	cagagcccta gcagaggttt agagtggctg ggtcgtactt actatcgttc cggctggtac	180
	aacgactacg ccgagagcgt gaagtctcgt atcactatca accccgatac tagcaagaac	240
	cagttctctt tacagctgaa cagcgtgact cccgaagaca ctgccgtgta ctactgcgct	300
	cgtacgggcc acatcactgt gttcggcgtg aatgtggacg ccttcgacat gtggggccaa	360
	ggtactatgg tcactgtgag cagcgtagc accaagggcc catcggctctt cccctggca	420

	ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac	480
	ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc	540
	ttcccgccg tctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc	600
	tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	660
	aaggtggaca agcgggttga gccc aaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	720
	ccagcacctg aactcctggc gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac	780
	accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	840
	gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	900
	aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	960
	caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	1020
	ctccccgaag agaaaacat ctccaaagcc aaaggcgagc cccgagaacc acaggtgtac	1080
	accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	1140
	aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	1200
	aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag	1260
[0011]	ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgctgcat	1320
	gaggctctgc acagccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa	1374
	<210> 15	
	<211> 630	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> FluAB_MLNS轻链nuc	
	<400> 15	
	gacatccaga tgactcagag cccttctct ttaagcgcta gcgtgggcga tagggtcact	60
	atcacttgtc gtactagcca gtctttaage tctacactc actggtacca gcagaagccc	120
	ggtaaggccc ctaagctgct gatctacgt gccagcagca gaggcagcgg agtgcctagc	180
	agatttagcg gcagcggtag cggcactgac ttactctga caatcagctc ttacagccc	240
	gaagacttcg ccacttacta ctgccagcag tctcgtactt tcggccaagg tactaagggtg	300
	gagatcaagc gtacggtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag	360
	ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc	420
	aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca	480

	gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca	540
[0012]	gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc	600
	gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	630

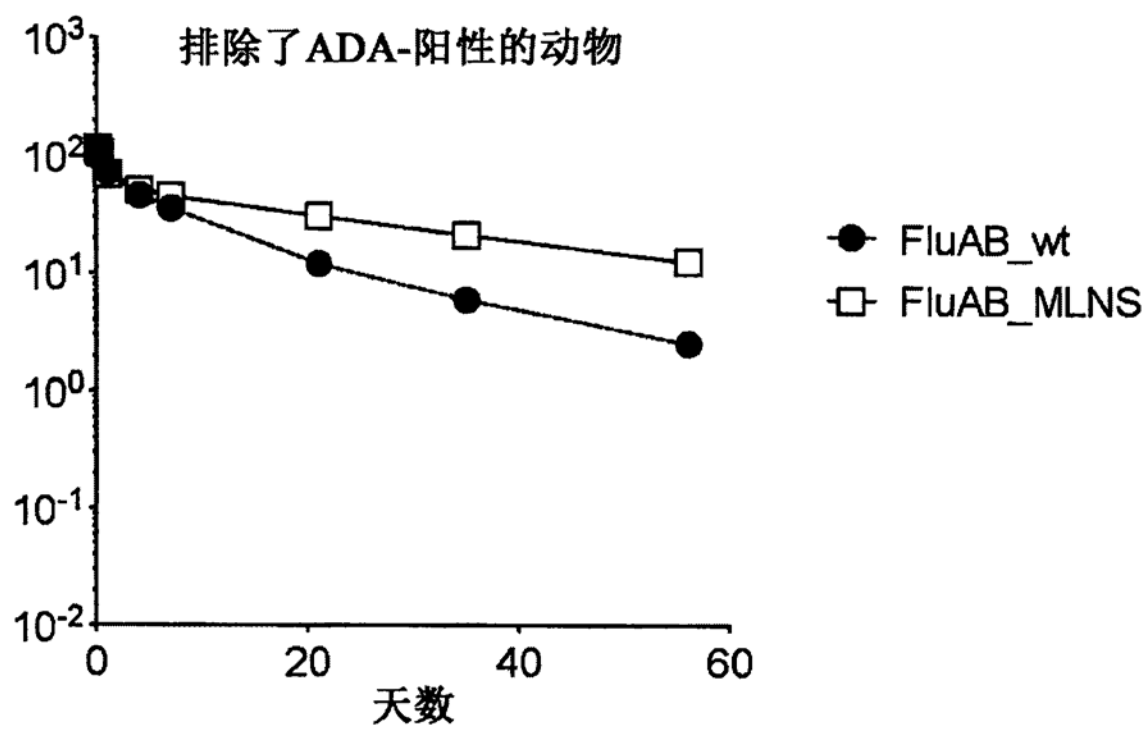


图1

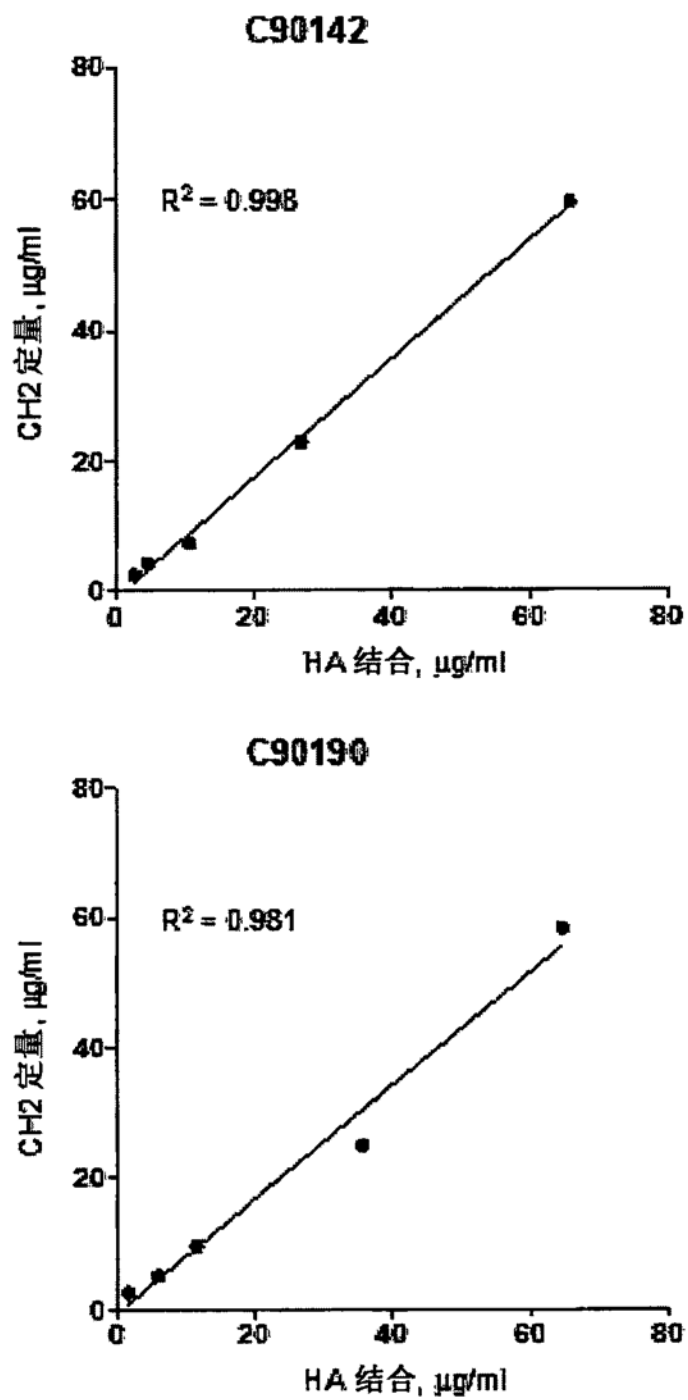


图2

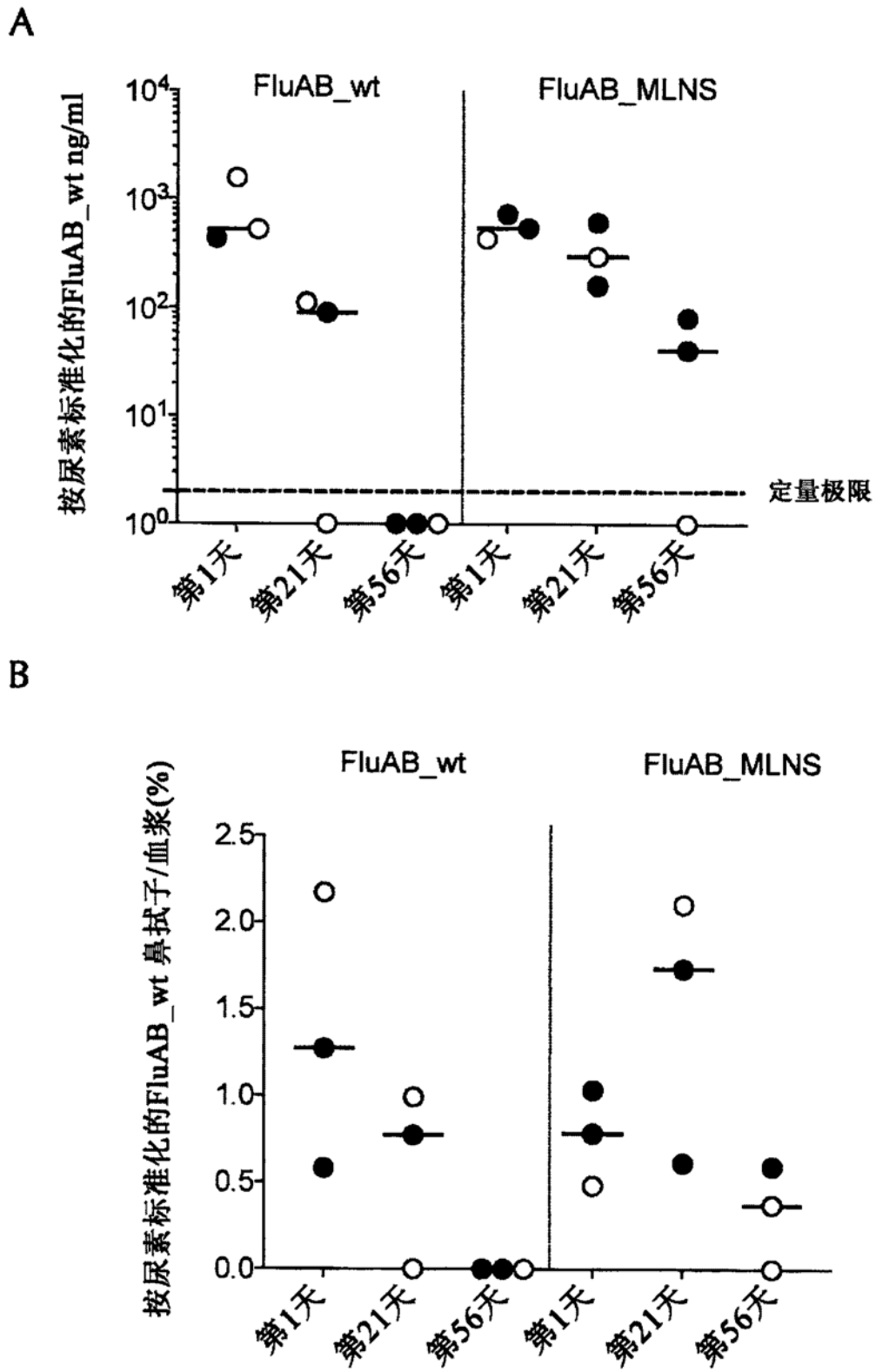


图3

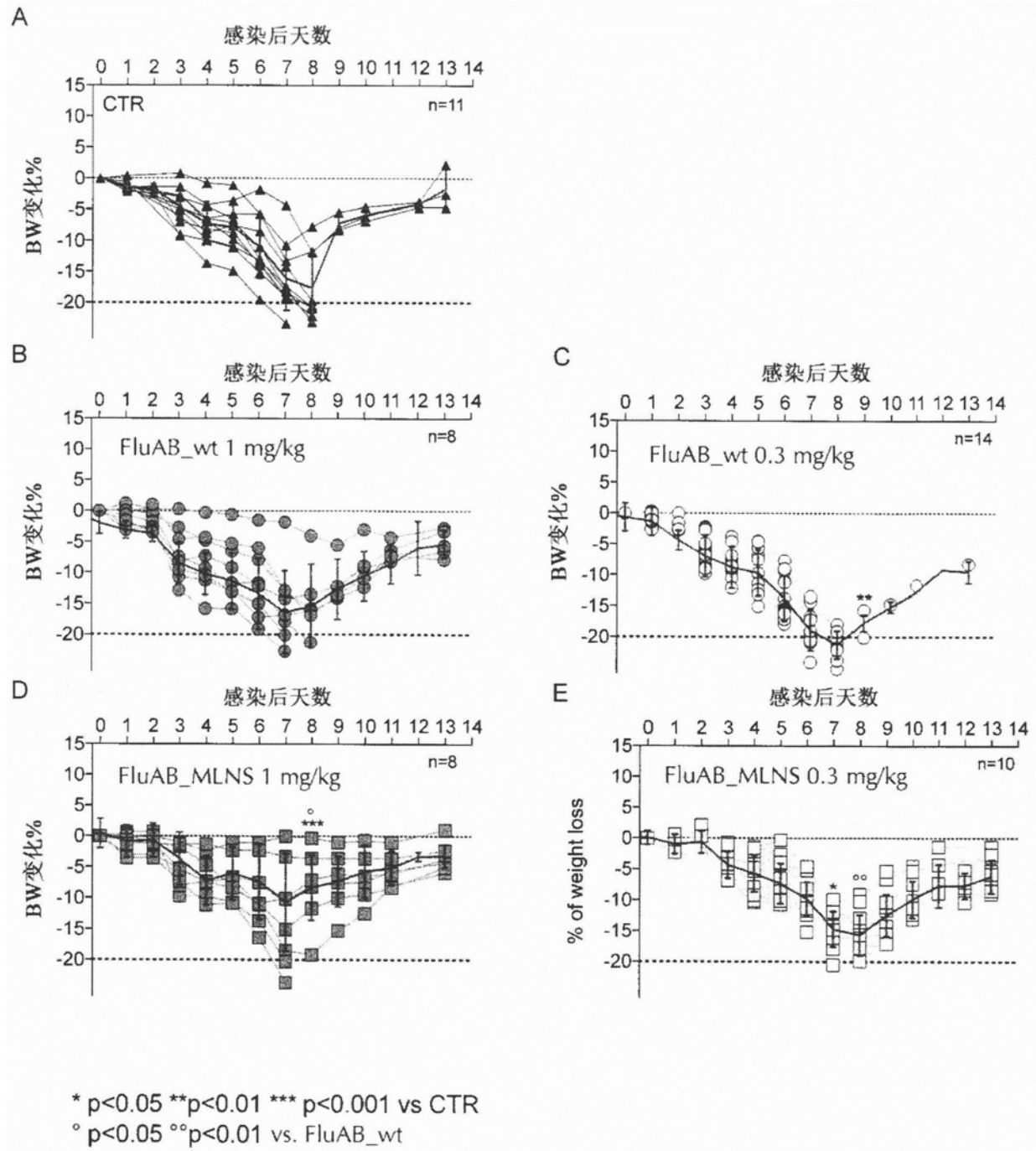


图4

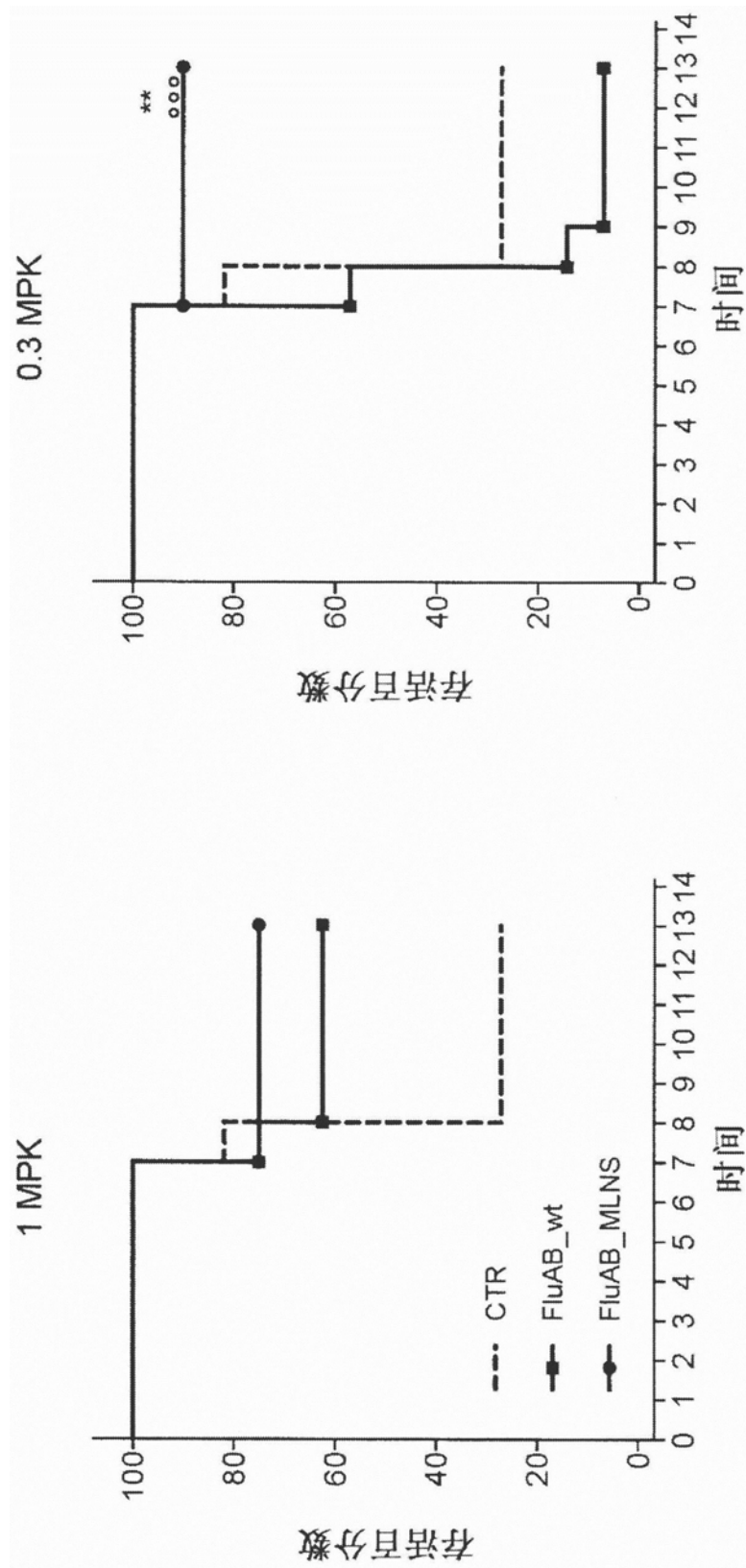


图5

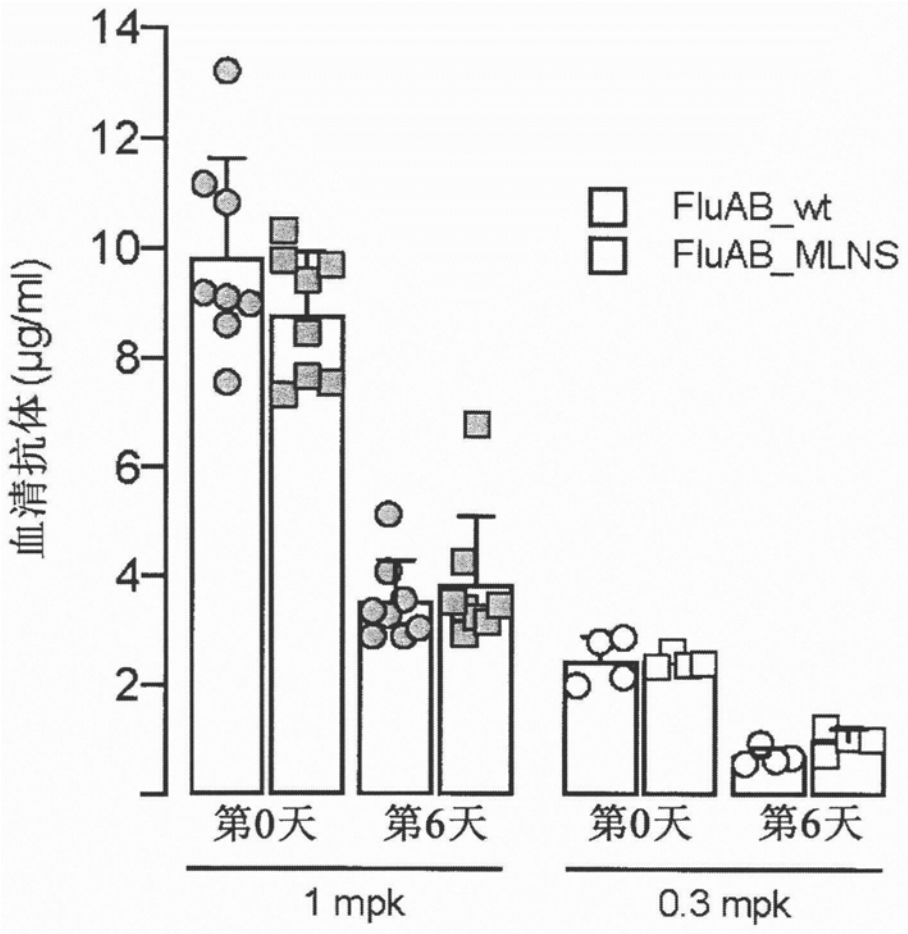


图6

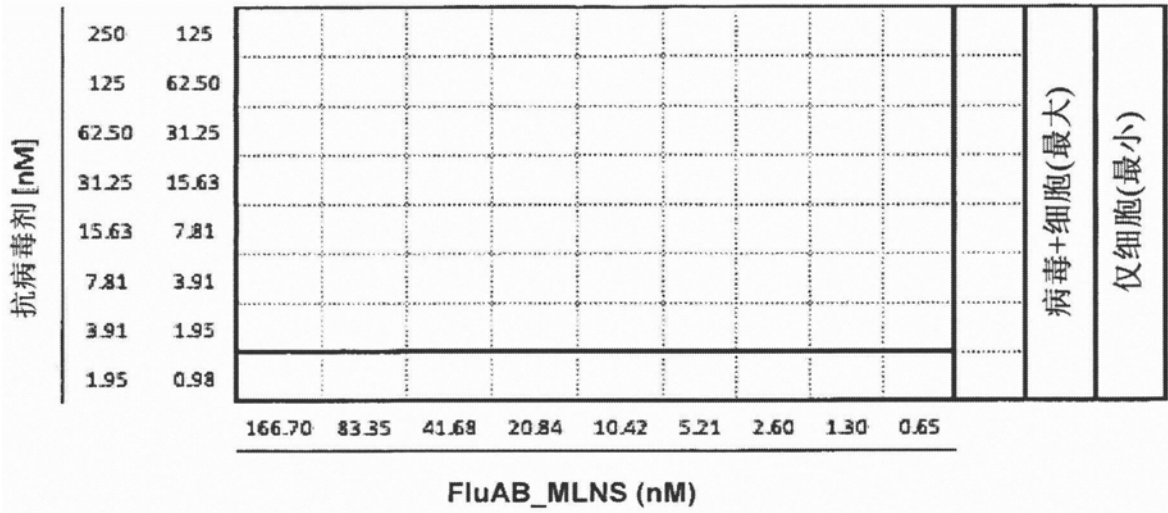


图7

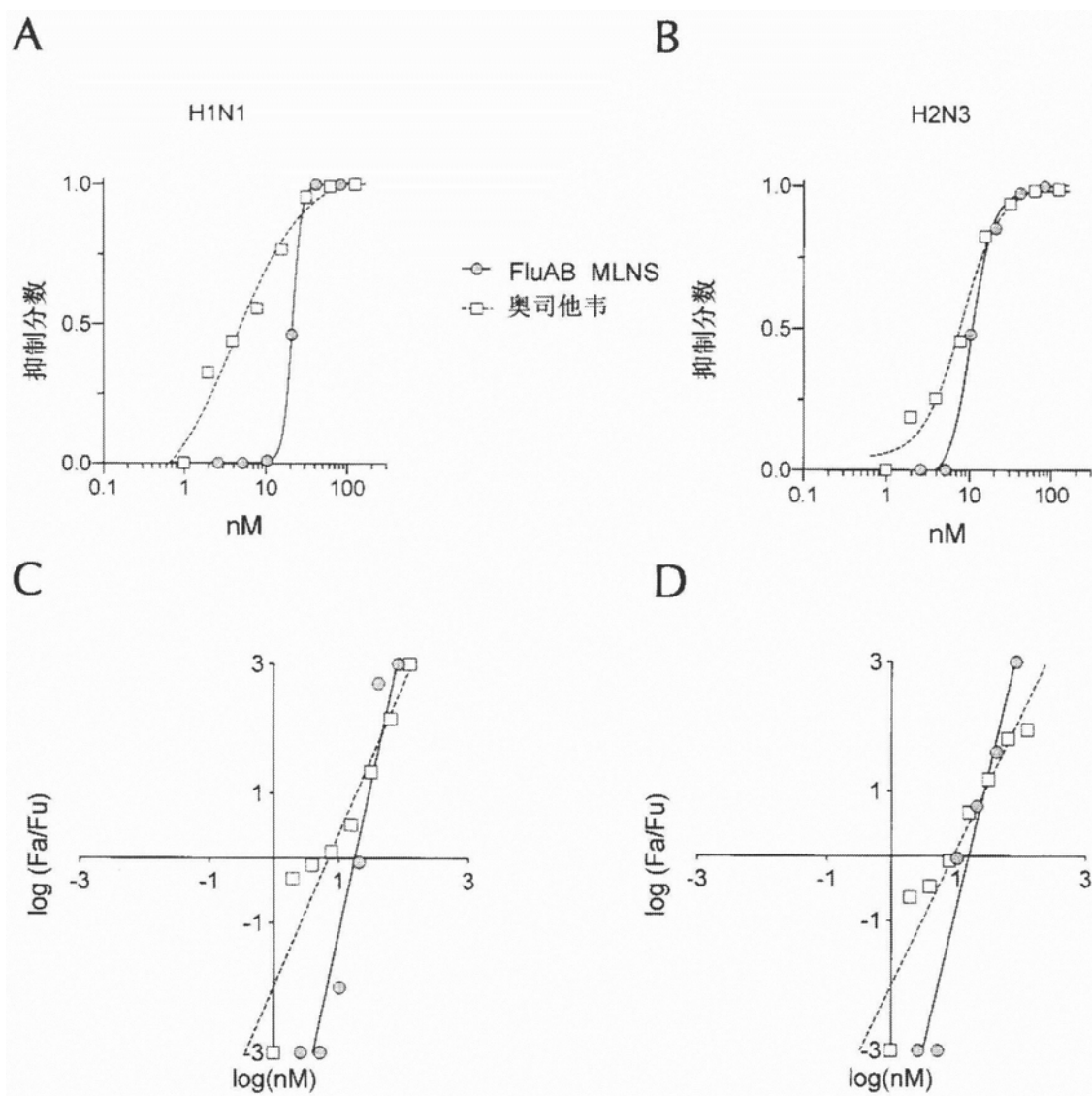


图8

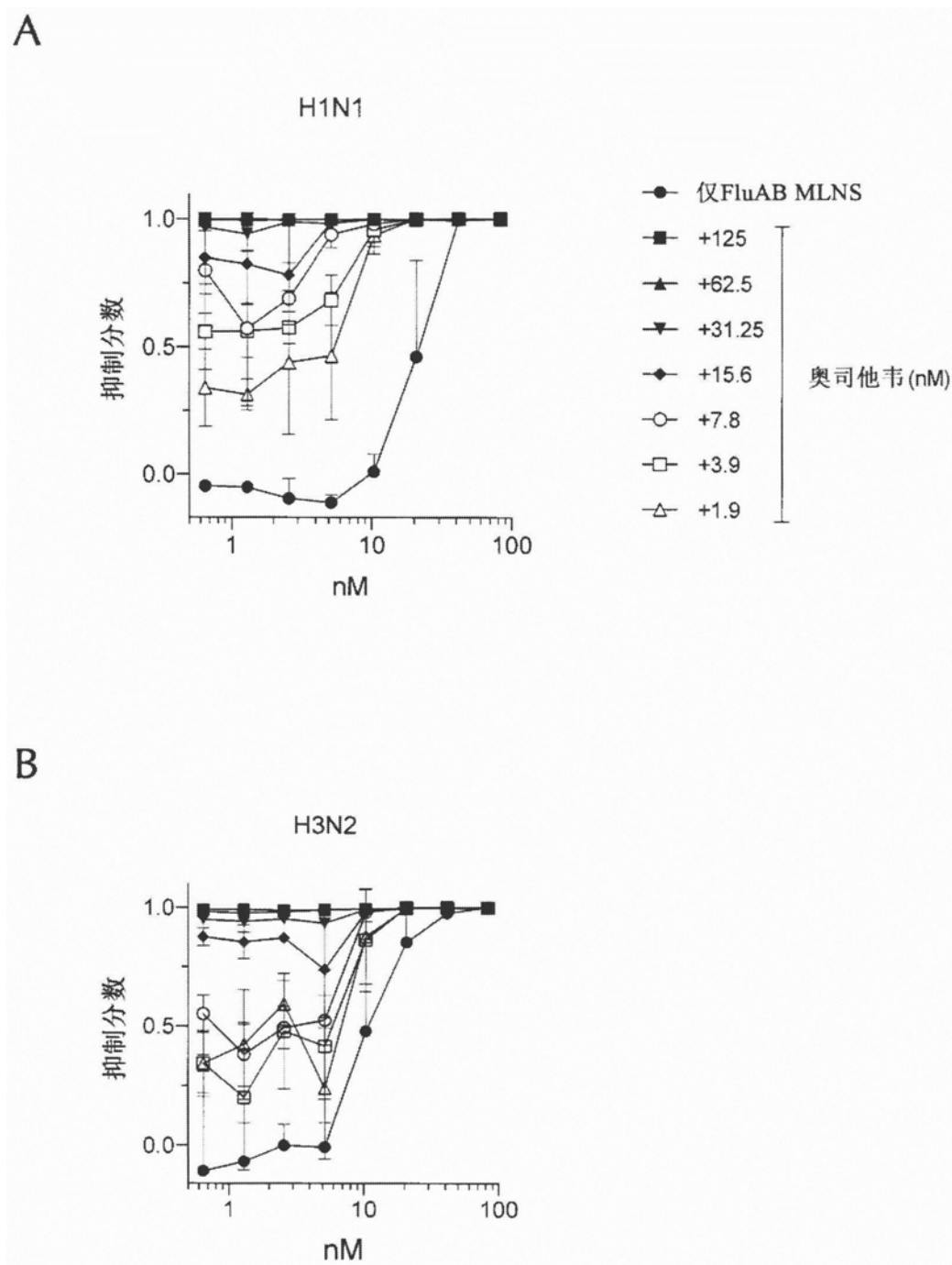


图9

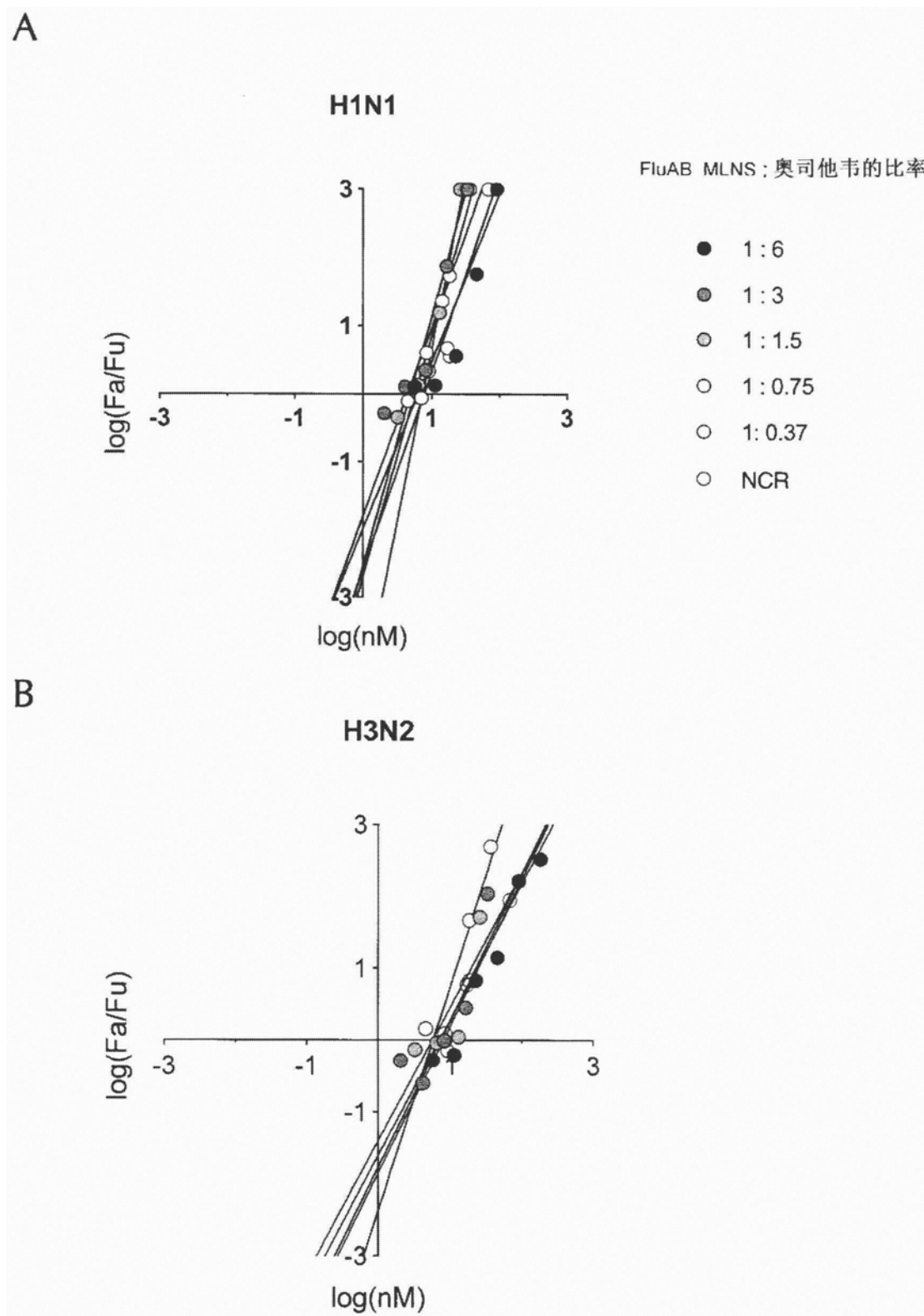


图10

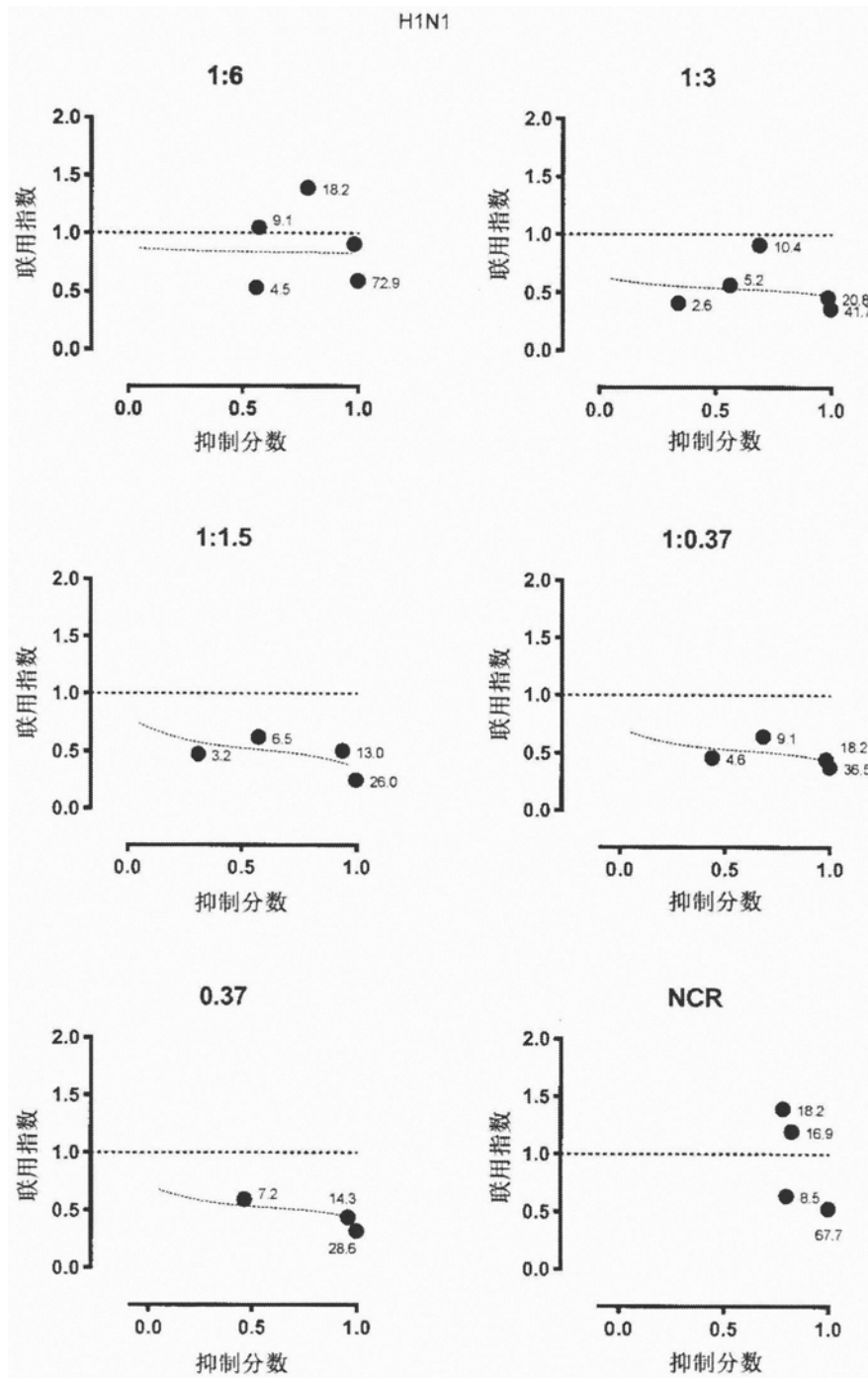


图11

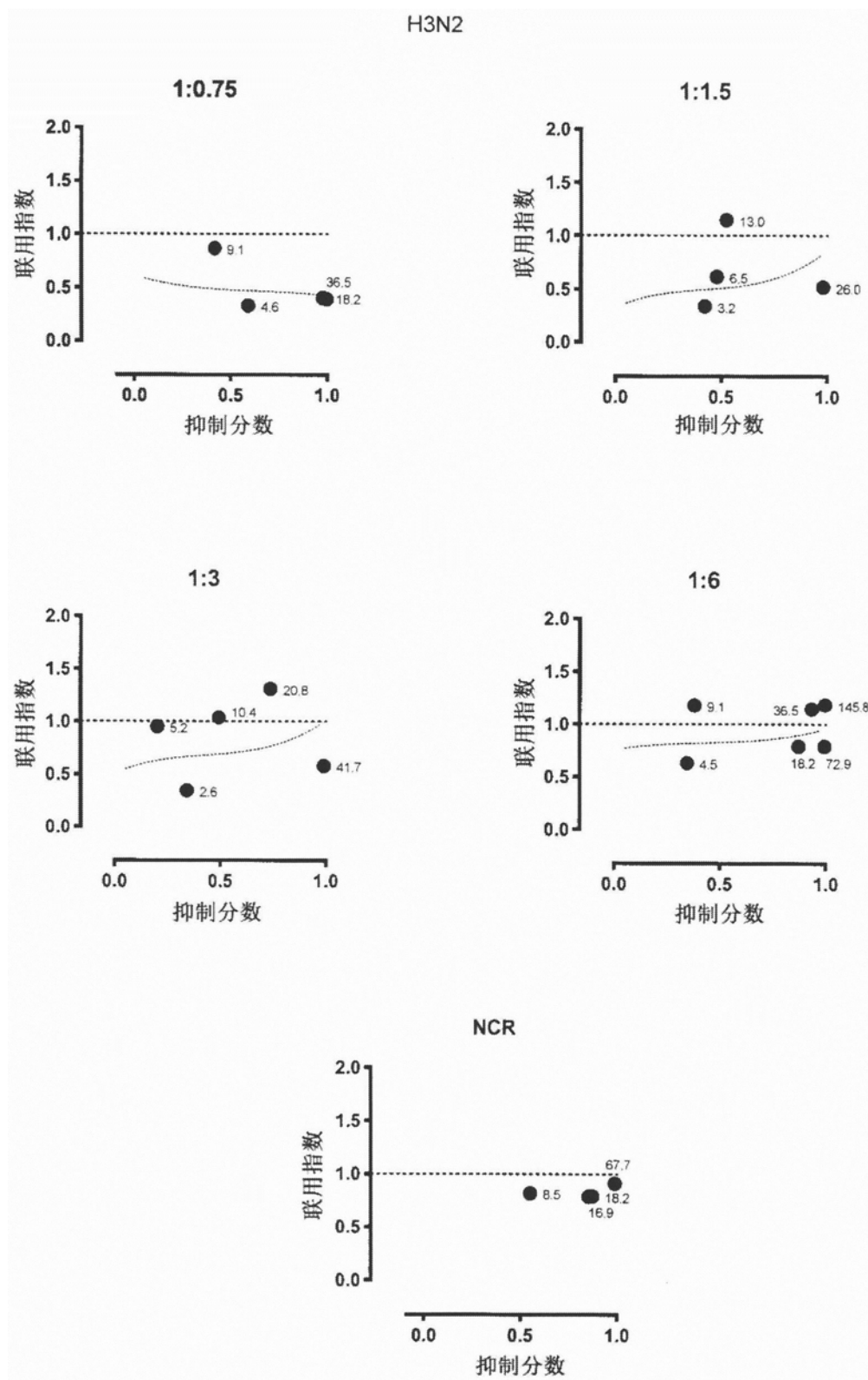


图12

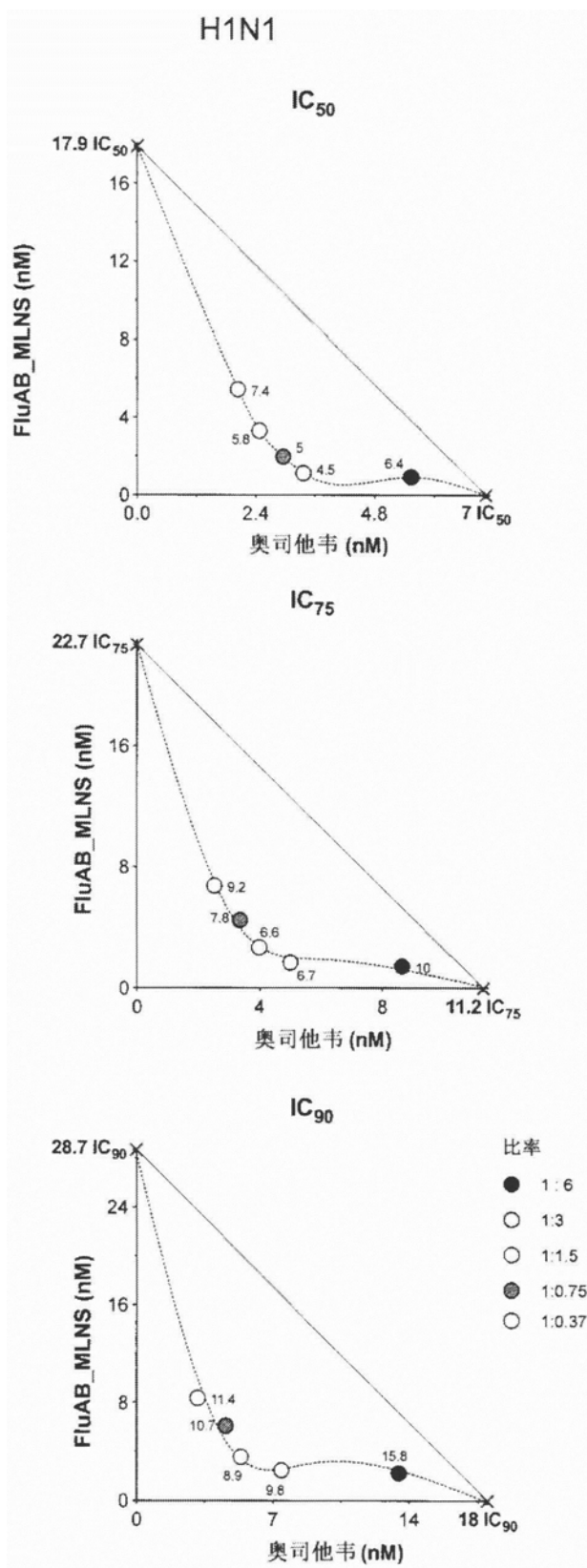


图13

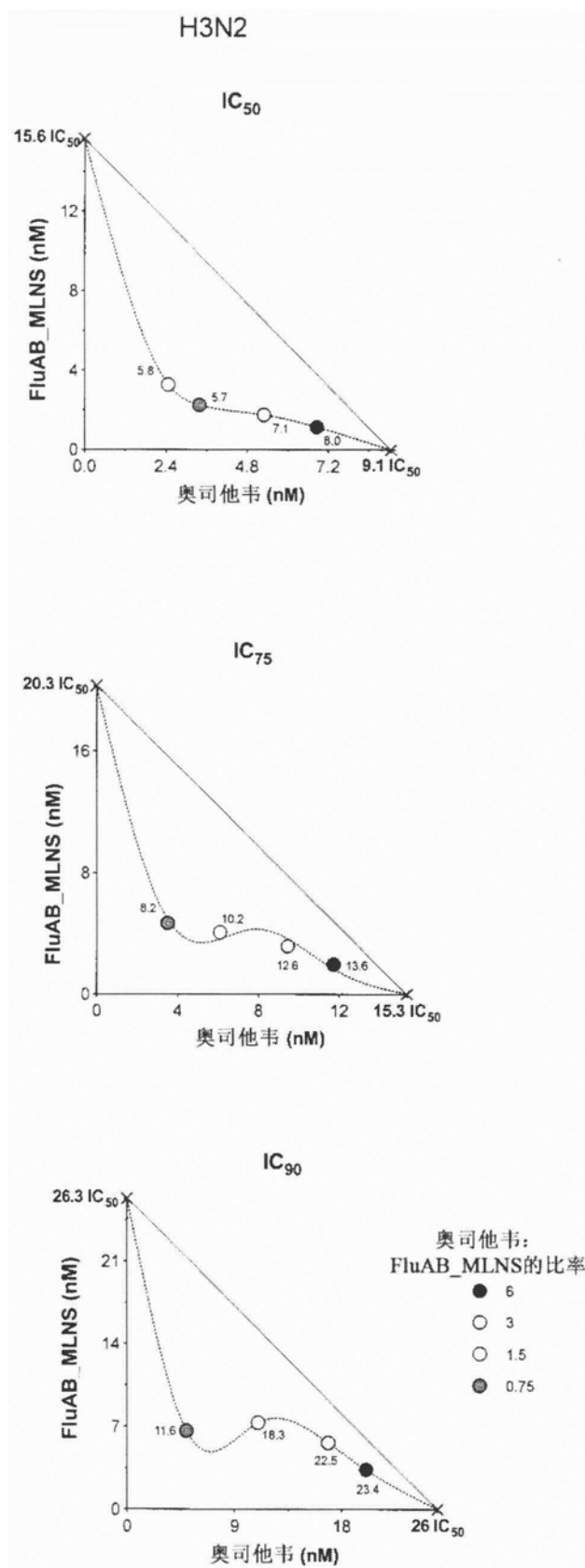


图14

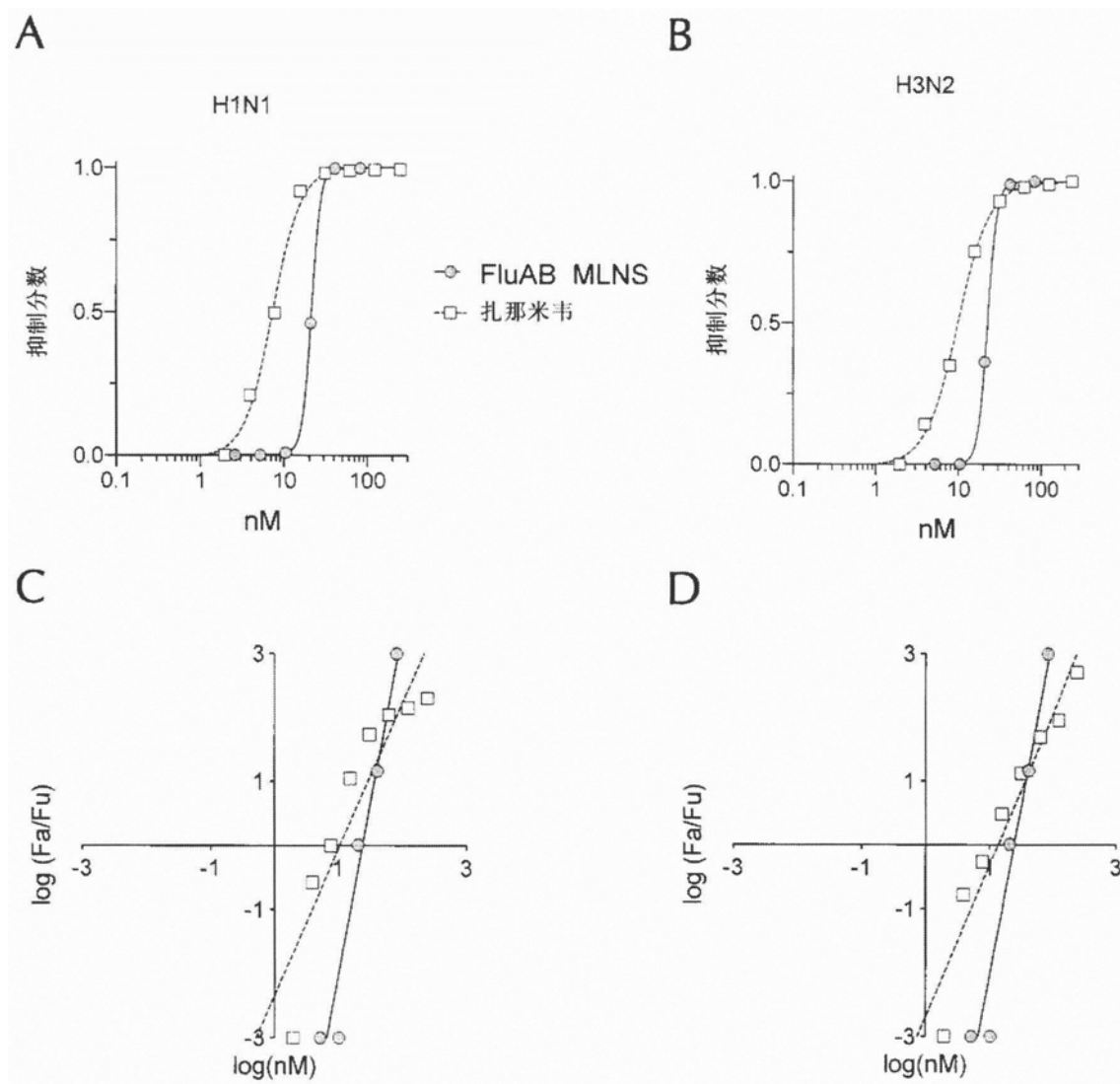


图15

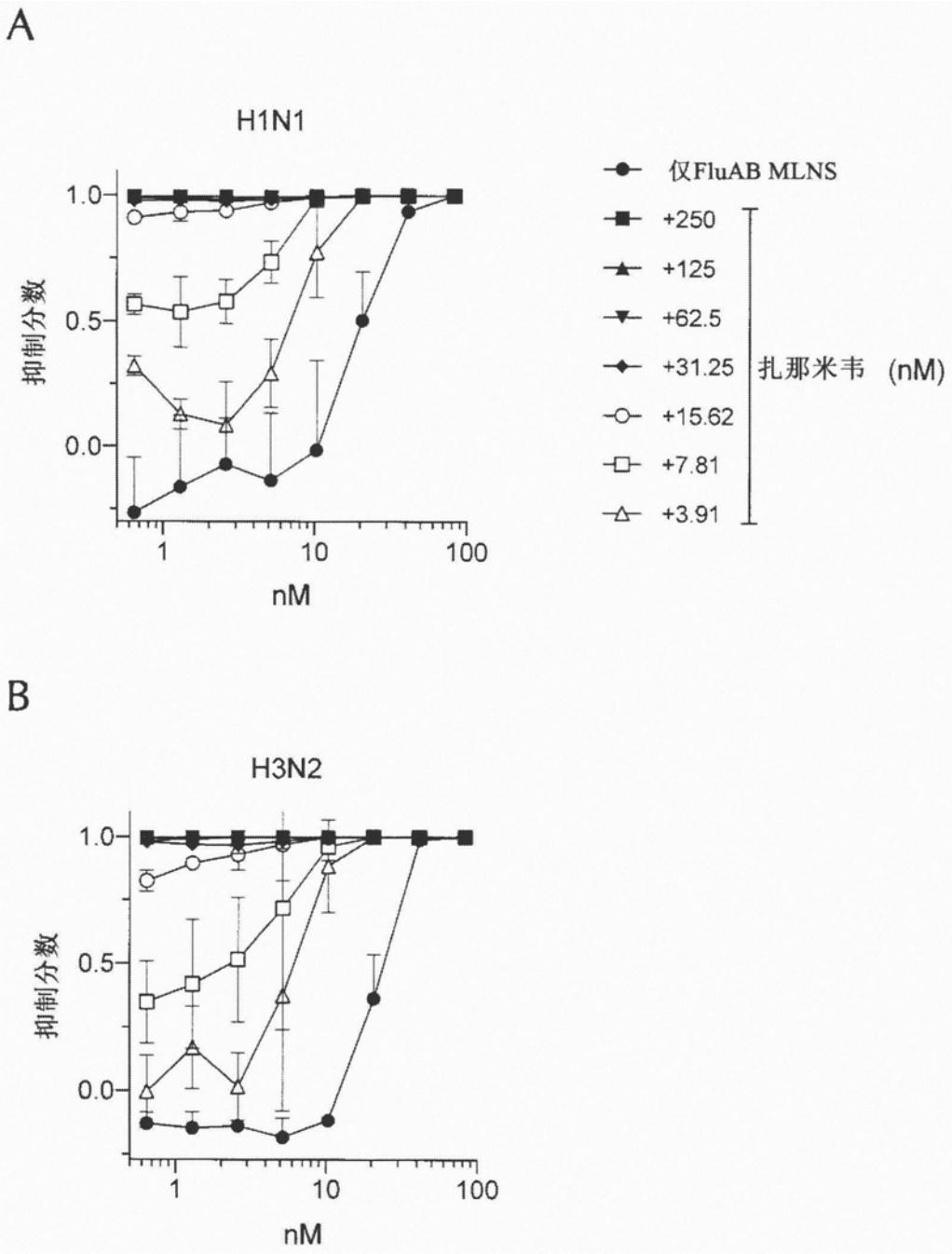


图16

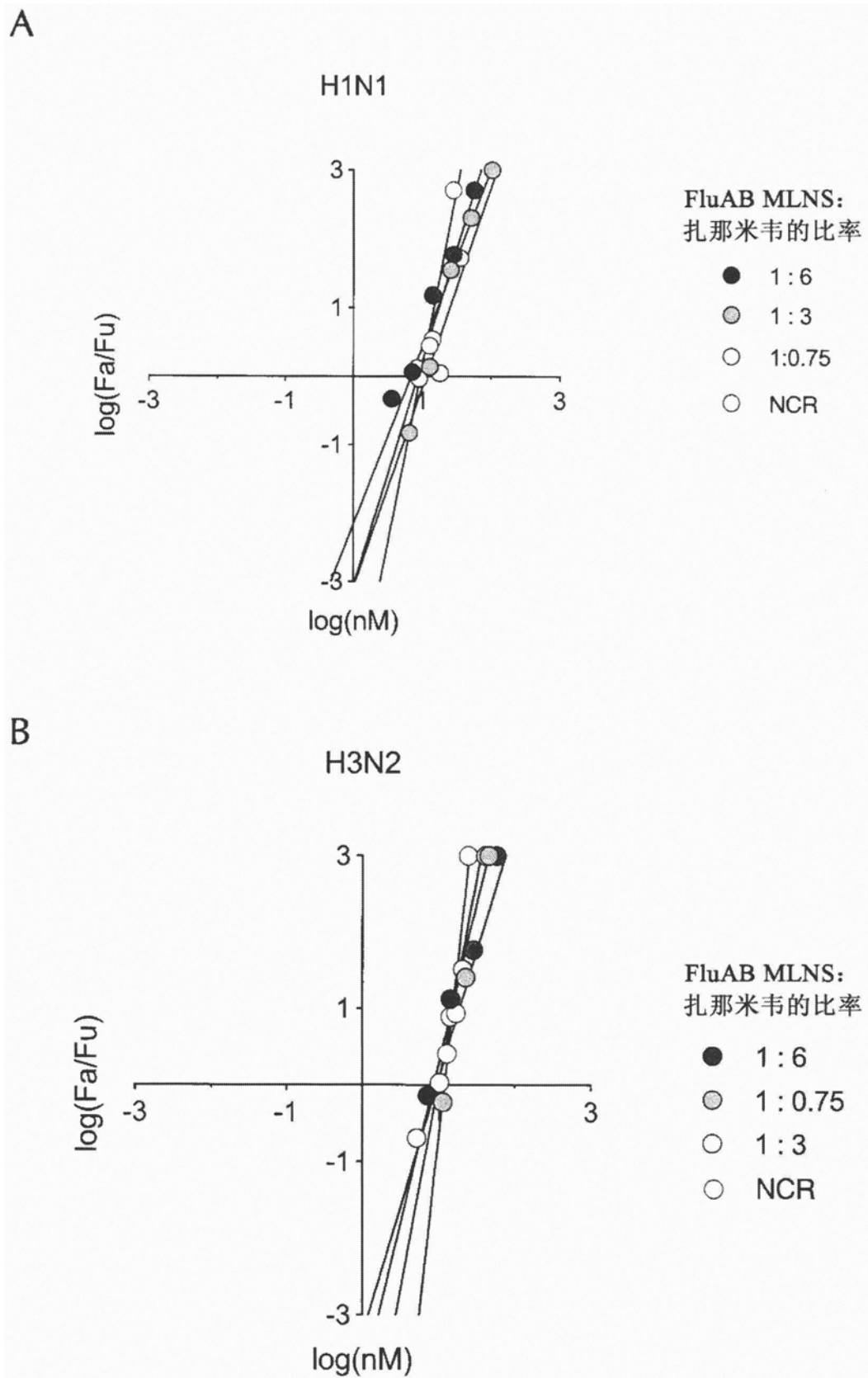


图17

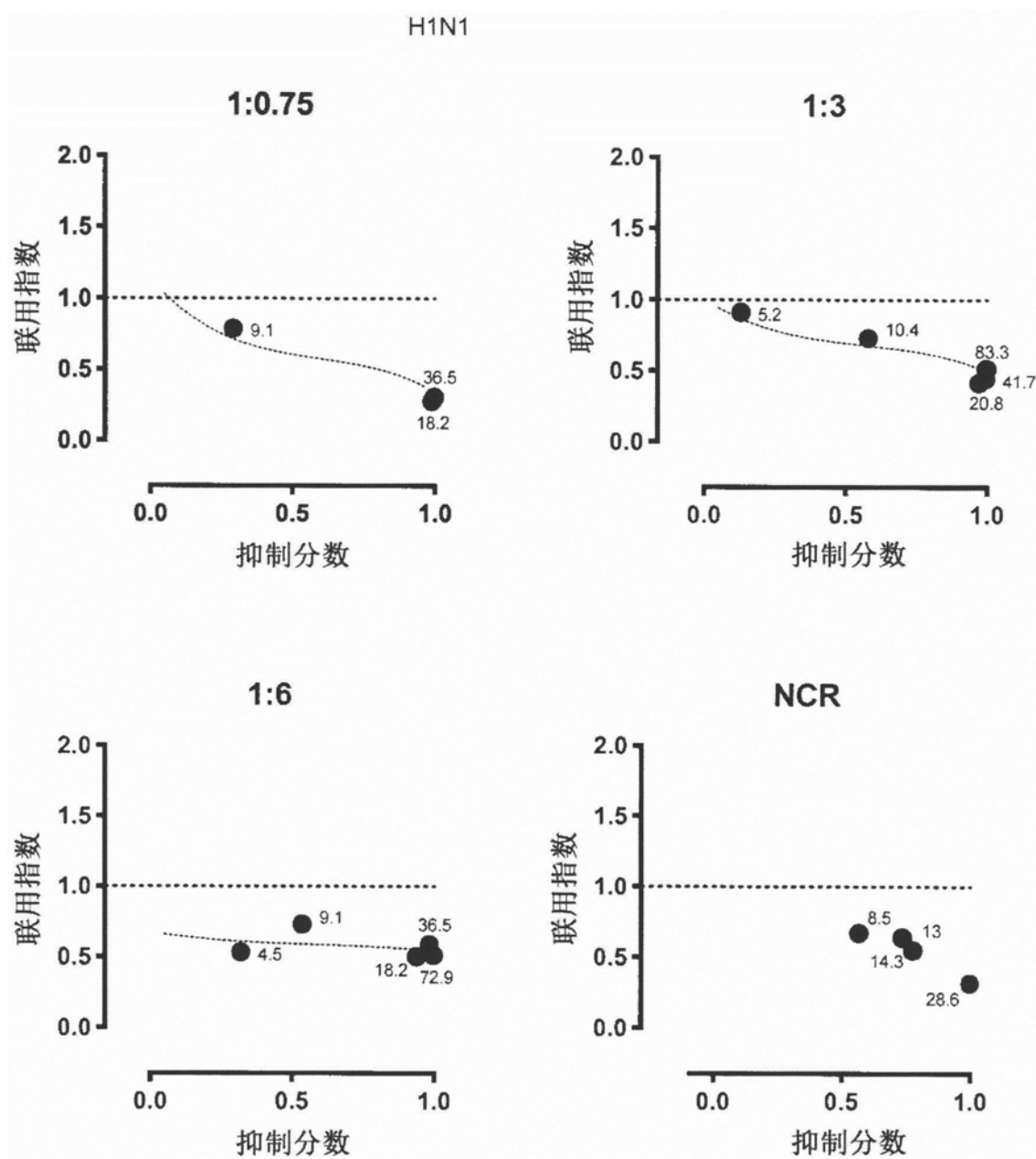


图18

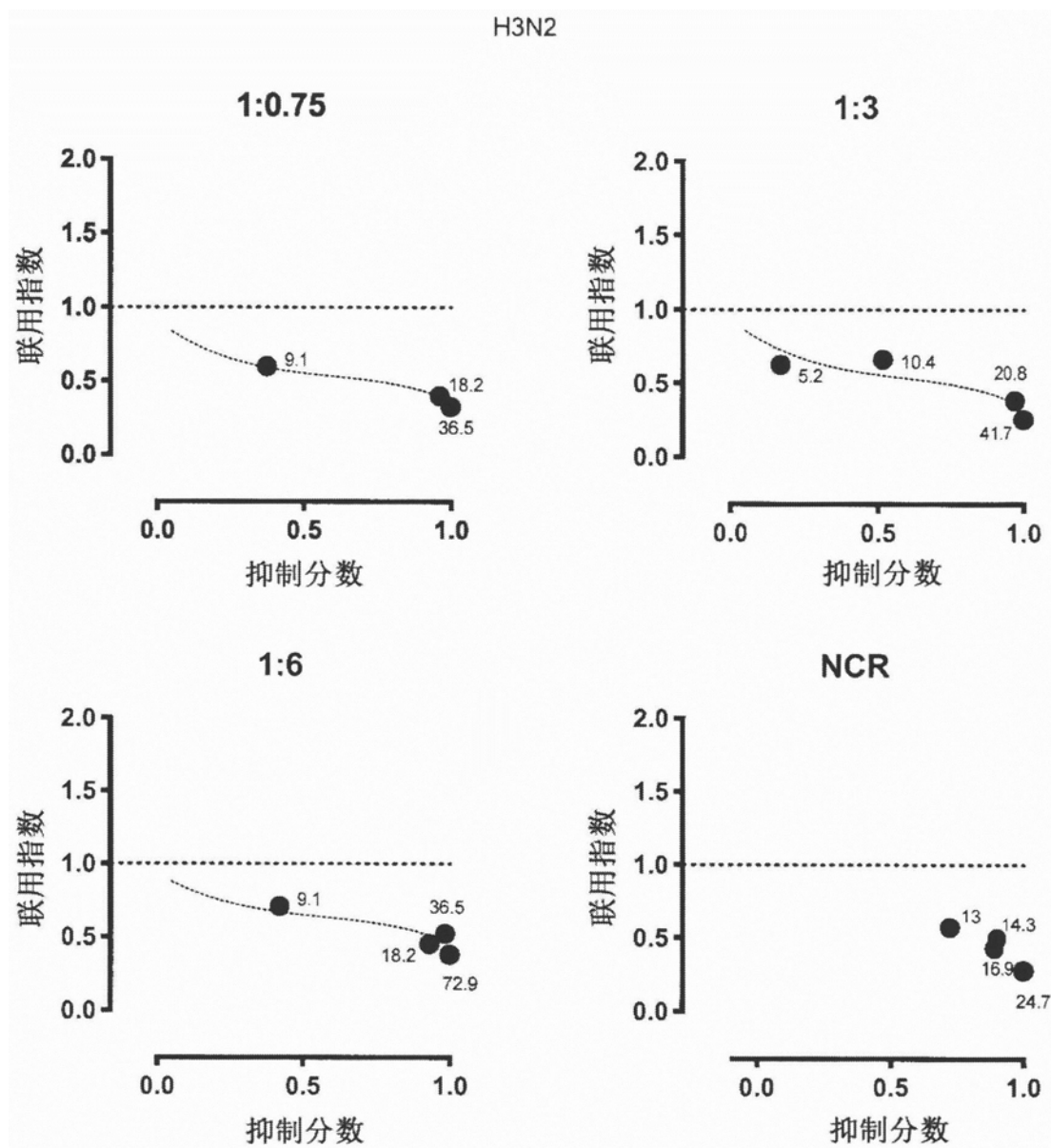


图19

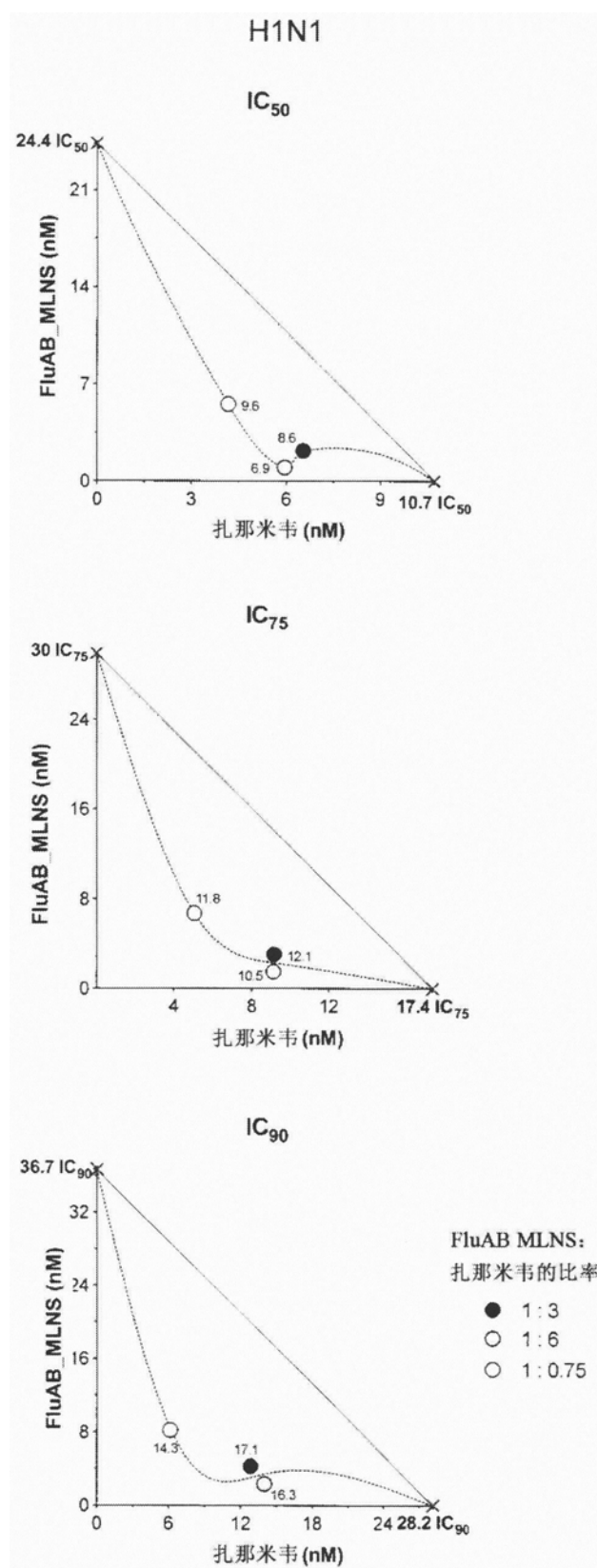


图20

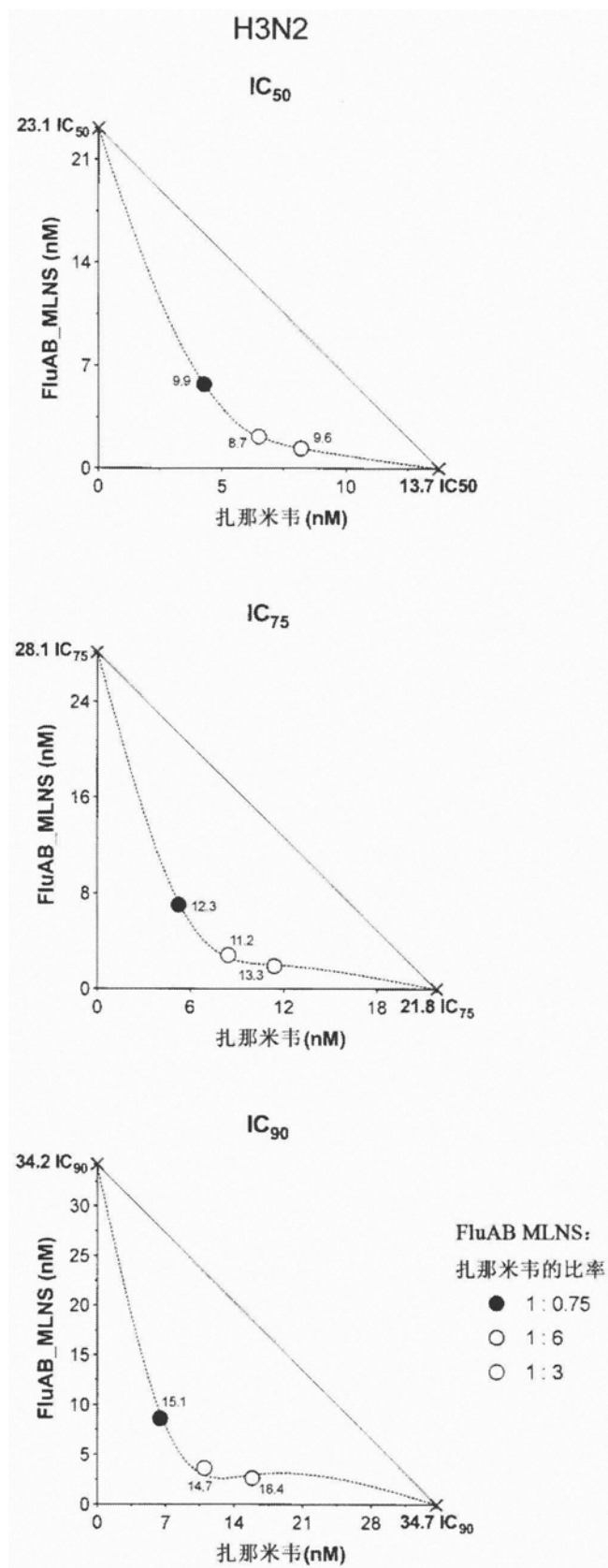


图21

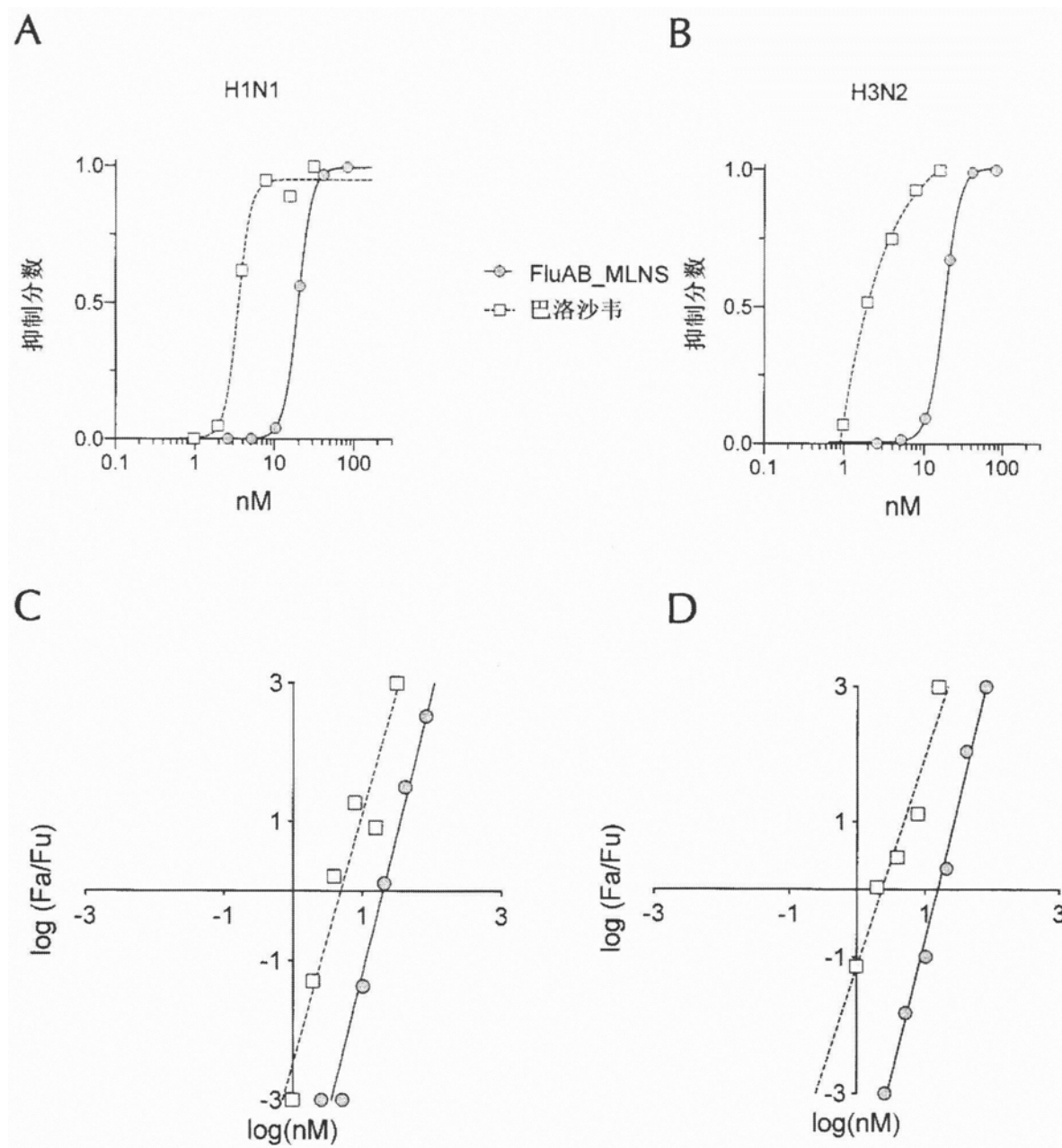


图22

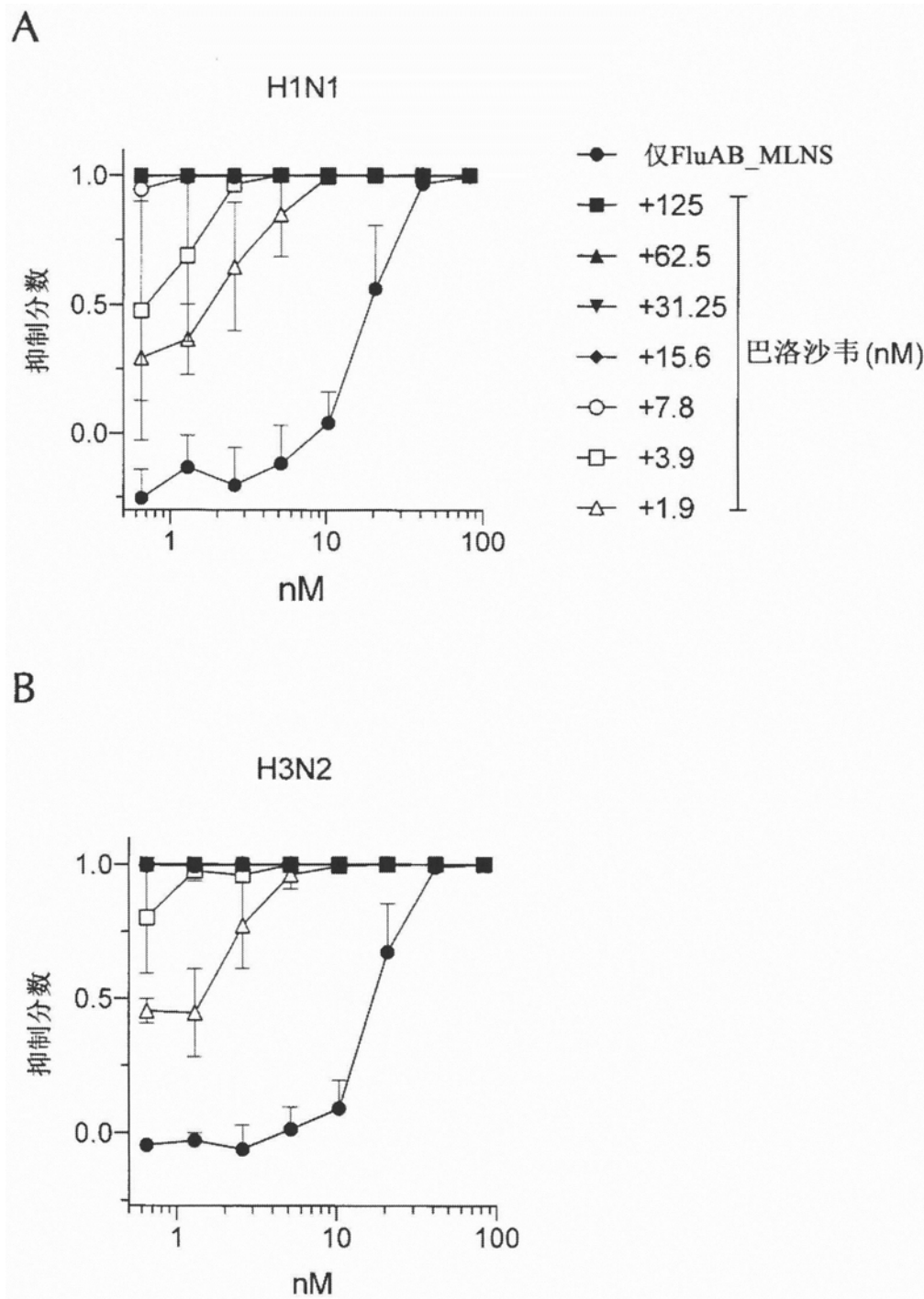


图23

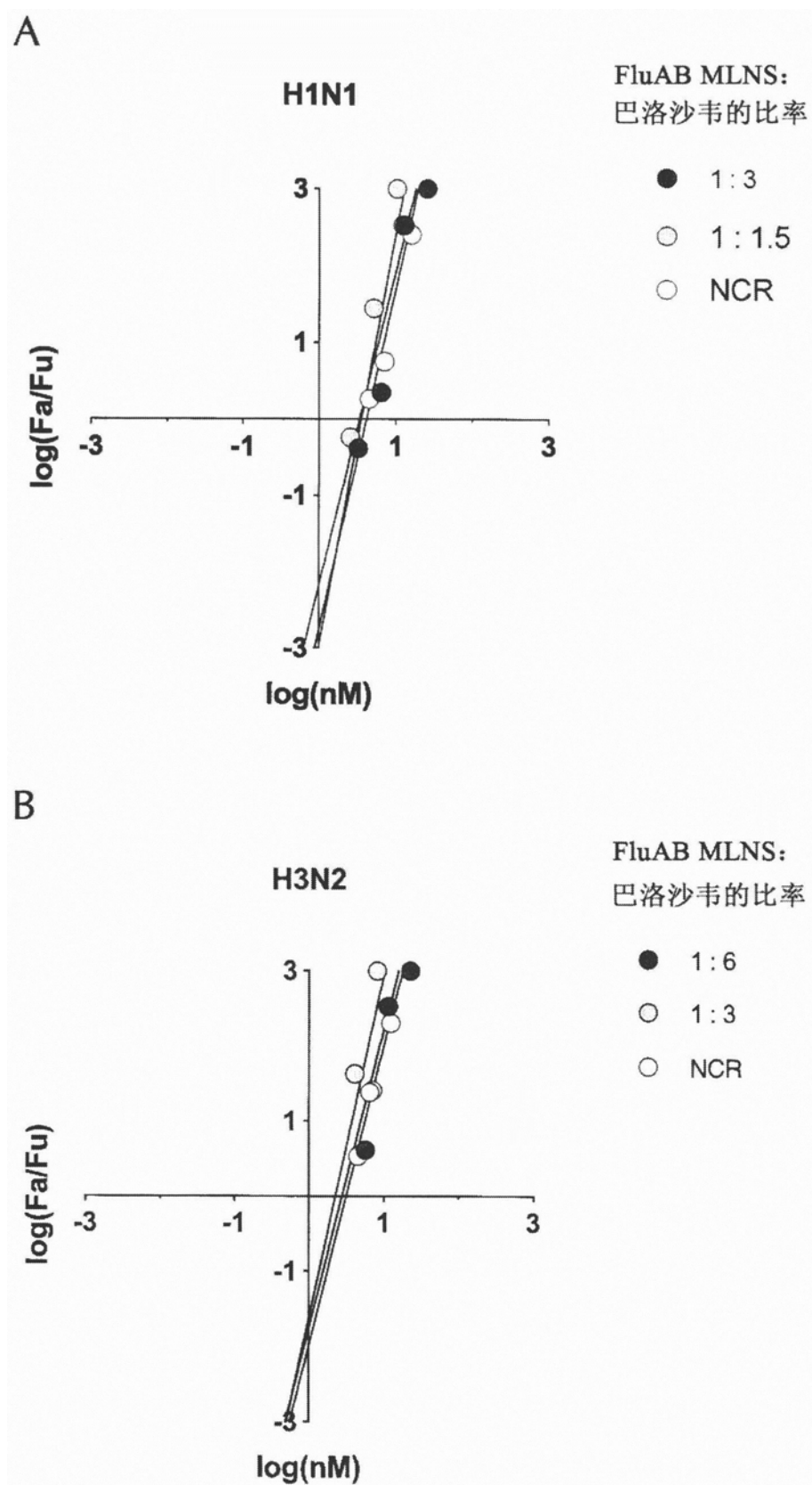


图24

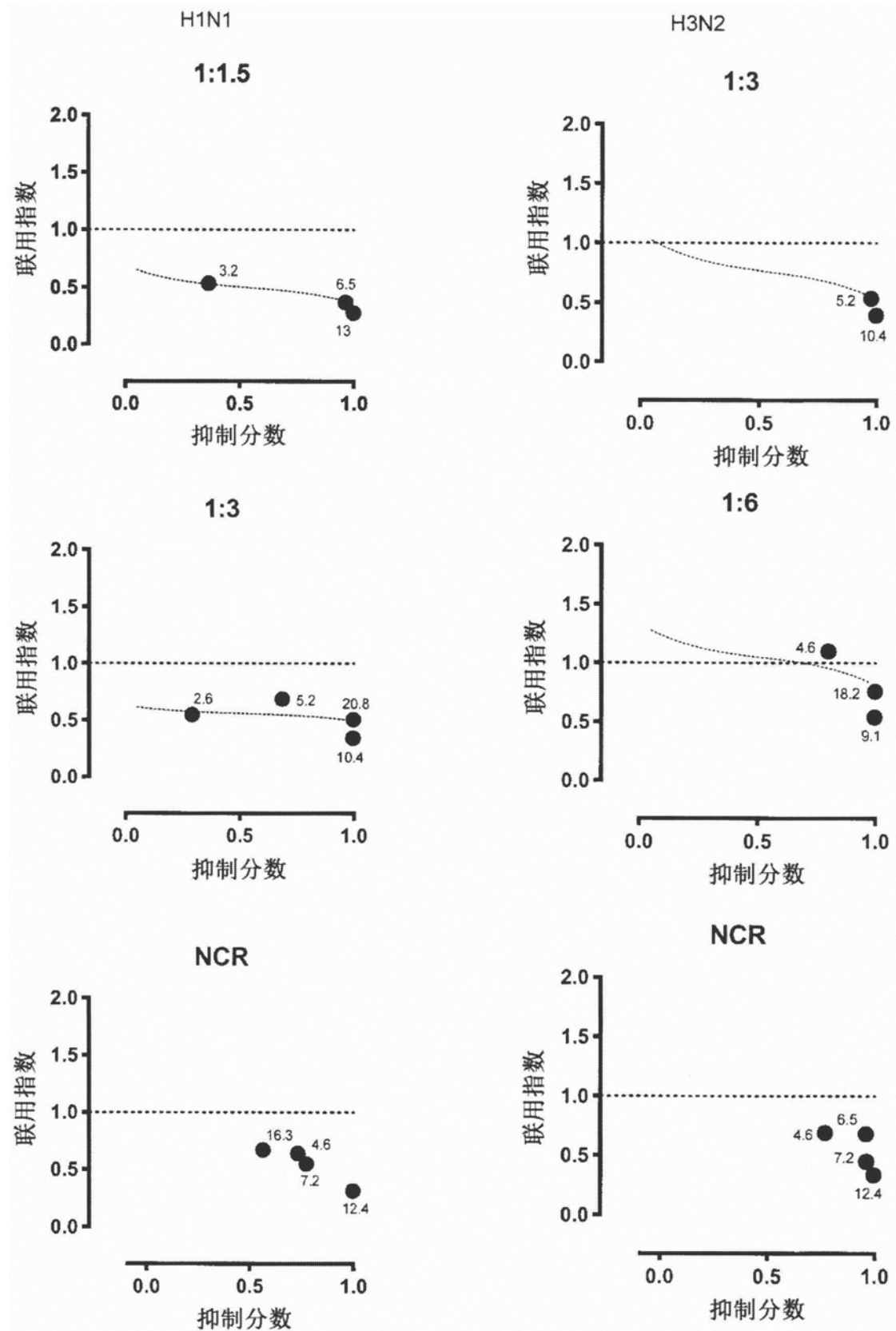


图25

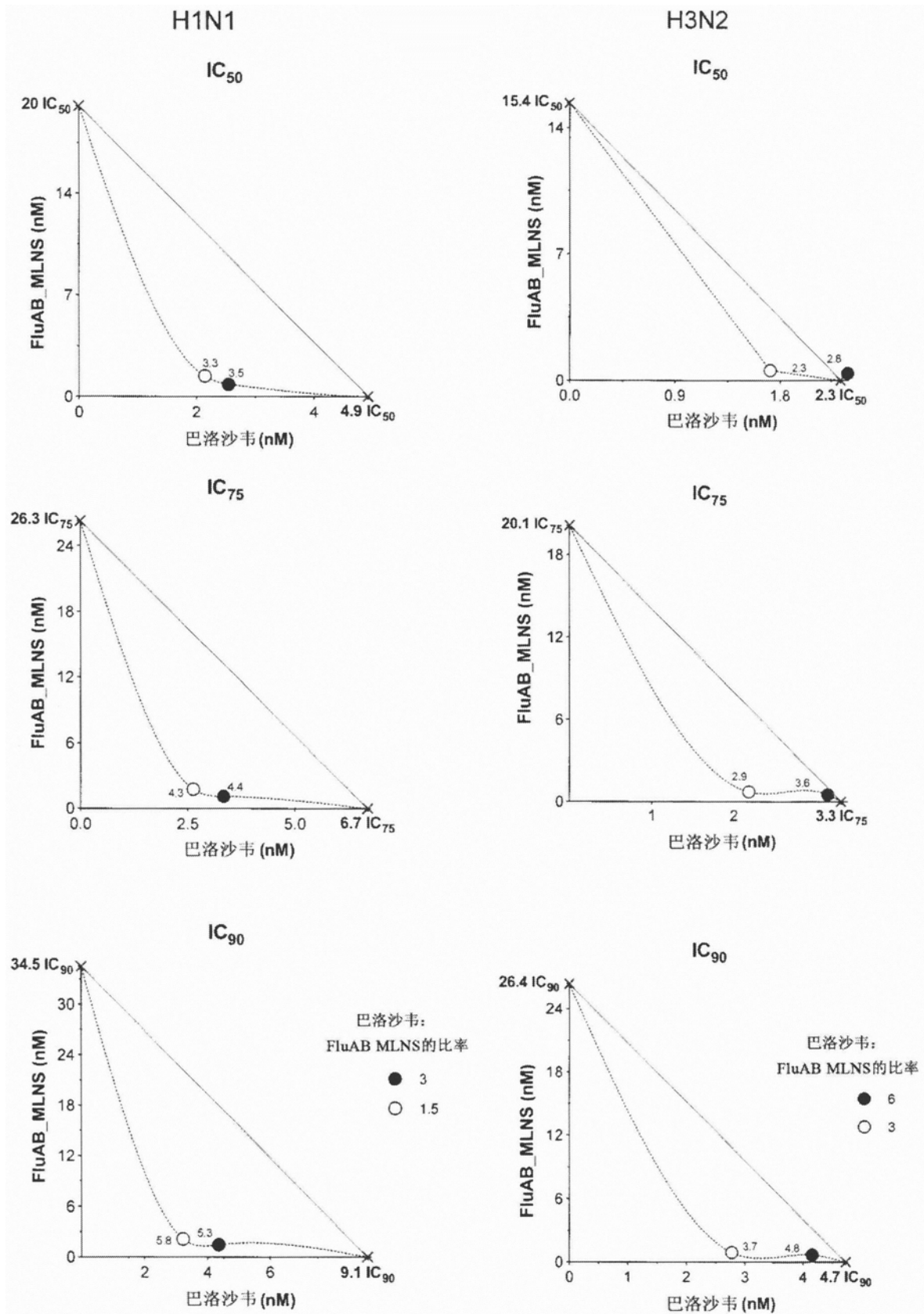


图26

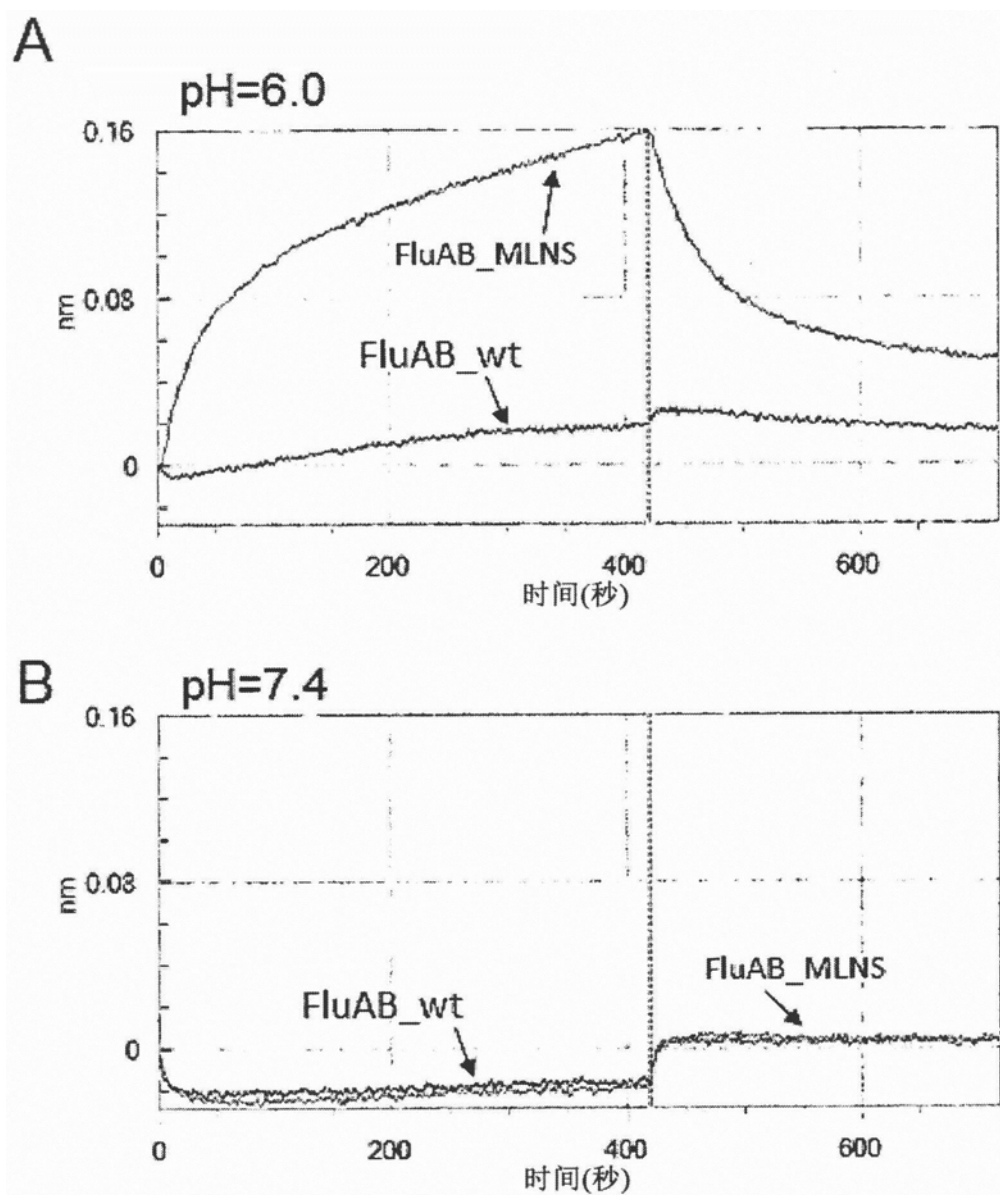


图27

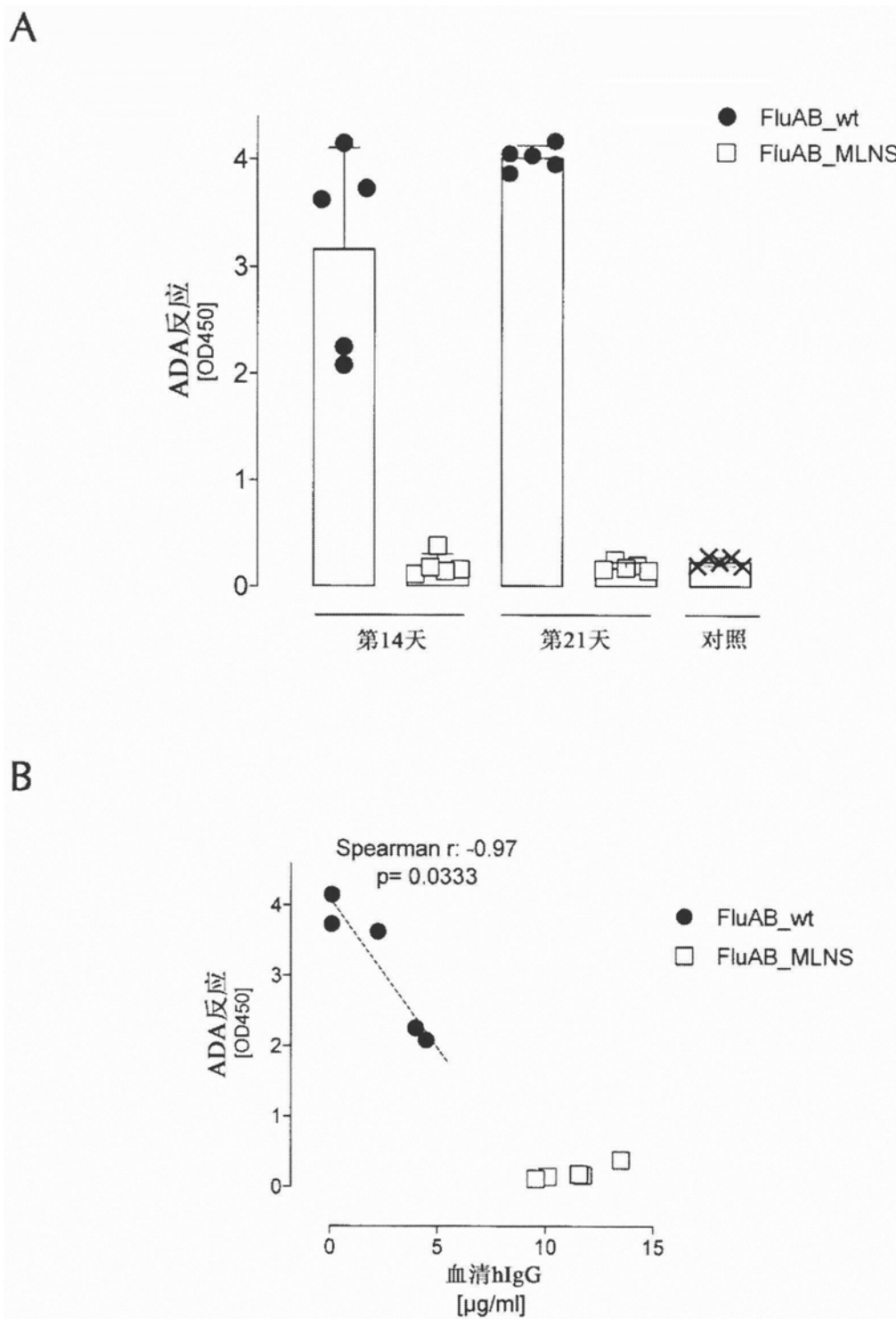


图28

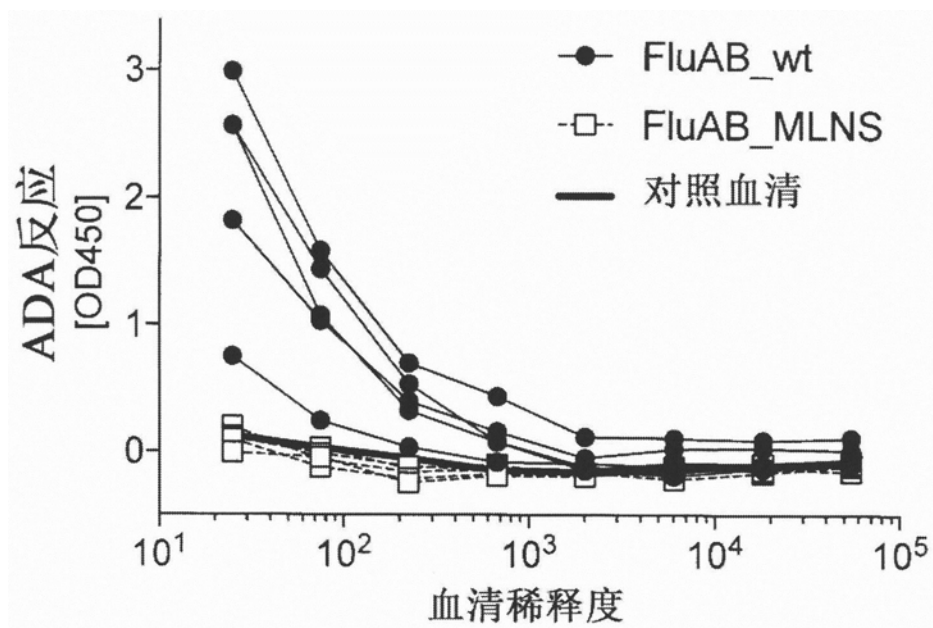


图29