



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104059143 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201410103093. 0

(22) 申请日 2008. 11. 12

(30) 优先权数据

60/987, 353 2007. 11. 12 US

60/987, 355 2007. 11. 12 US

61/053, 840 2008. 05. 16 US

61/095, 208 2008. 09. 08 US

(62) 分案原申请数据

200880123932. 8 2008. 11. 12

(71) 申请人 特罗克隆科学有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 A·G·格兰德 G·金 T·考克斯

O·奥尔森 J·米特查姆 M·默勒

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书86页 附图15页

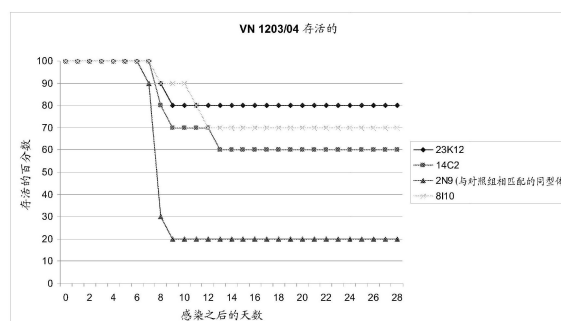
(54) 发明名称

用于对流行性感冒进行治疗以及诊断的组合物以及方法

(57) 摘要

本发明提供了新的人类抗流行性感冒抗体以及相关的组合物和方法,其中所述的抗体与一种基质2蛋白(M2)同型四聚体的构象抗原决定簇发生了结合。这些抗体被用在流行性感冒感染的诊断以及治疗当中。

高通量的预防性的体内研究



1. 一种重组抗-基质2蛋白细胞外结构域(M2e)抗体,所述的抗体包括:由包括序列识别号:43所示核酸序列的核酸序列进行编码的重链可变区域,以及由包括序列识别号:45所示核酸序列的核酸序列进行编码的轻链可变区域。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述包括序列识别号:43所示核酸序列的核酸序列是一种cDNA,以及所述包括序列识别号:45所示核酸序列的核酸序列是一种cDNA。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述序列识别号:43所示的核酸序列是一种cDNA,以及所述序列识别号:45所示的核酸序列是一种cDNA。

4. 一种载体,所述载体具有包括序列识别号:43所示核酸序列的核酸序列,以及包括序列识别号:45所示核酸序列的核酸序列。

5. 根据权利要求4所述的载体,其中所述包括序列识别号:43所示核酸序列的核酸序列是一种cDNA,或者所述包括序列识别号:45所示核酸序列的核酸序列是一种cDNA。

6. 根据权利要求4所述的载体,其中所述的载体是适合进行核酸繁殖或者复制的载体。

7. 根据权利要求4所述的载体,其中所述的载体是适合表达所述核酸的载体。

8. 根据权利要求6或者7所述的载体,其中所述的载体包括病毒、质粒、或者柯斯载体。

9. 根据权利要求8所述的载体,其中所述的载体是重组病毒。

10. 根据权利要求9所述的载体,其中所述的病毒包括来自于哺乳动物基因中的启动子。

11. 根据权利要求10所述的载体,其中所述的哺乳动物基因是人类基因。

12. 根据权利要求9所述的载体,其中所述的病毒包括来自于病毒或者逆转录病毒基因组中的启动子。

13. 根据权利要求12所述的载体,其中所述的病毒或者逆转录病毒是多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒,牛乳突淋瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,细胞巨化病毒(CMV),B型肝炎病毒或者猿猴病毒40(SV40)。

14. 一种重组抗-基质2蛋白细胞外结构域(M2e)抗体,所述的抗体包括编码具有序列识别号:44所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列,以及编码具有序列识别号:46所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列。

15. 根据权利要求15所述的抗体,其中所述编码具有序列识别号:44所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列是一种cDNA,以及所述编码具有序列识别号:46所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列是一种cDNA。

16. 一种载体,所述载体包括编码具有序列识别号:44所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列,以及编码具有序列识别号:46所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列。

17. 根据权利要求16所述的载体,其中所述编码具有序列识别号:44所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列是一种cDNA,以及所述编码具有序列识别号:46所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列是一种cDNA。

18. 根据权利要求16所述的载体,其中所述的载体是适合进行核酸繁殖或者复制的载体。

19. 根据权利要求16所述的载体,其中所述的载体是适合表达所述核酸的载体。

20. 根据权利要求 18 或者 19 所述的载体,其中所述的载体包括病毒、质粒、或者柯斯载体。

21. 根据权利要求 20 所述的载体,其中所述的载体是重组病毒。

22. 根据权利要求 21 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于哺乳动物基因中的启动子。

23. 根据权利要求 22 所述的载体,其中所述的哺乳动物基因是人类基因。

24. 根据权利要求 21 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于病毒或者逆转录病毒基因组中的启动子。

25. 根据权利要求 24 所述的载体,其中所述的病毒或者逆转录病毒是多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒,牛乳突淋瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,细胞巨化病毒 (CMV), B 型肝炎病毒或者猿猴病毒 40 (SV40)。

26. 一种重组抗 - 基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 抗体,所述的抗体包括:由包括序列识别号:49 所示核酸序列的核酸序列进行编码的重链可变区域,以及由包括序列识别号:51 所示核酸序列的核酸序列进行编码的轻链可变区域。

27. 根据权利要求 26 所述的抗体,其中所述包括序列识别号:49 所示核酸序列的核酸序列是一种 cDNA,以及所述包括序列识别号:51 所示核酸序列的核酸序列是一种 cDNA。

28. 根据权利要求 26 所述的抗体,其中所述序列识别号:49 所示的核酸序列是一种 cDNA,以及所述序列识别号:51 所示核酸序列是一种 cDNA。

29. 一种载体,所述载体具有包括序列识别号:49 所示的核酸序列的核酸序列,以及包括序列识别号:51 所示的核酸序列的核酸序列。

30. 根据权利要求 29 所述的载体,其中所述包括序列识别号:49 所示核酸序列的核酸序列是一种 cDNA,以及所述包括序列识别号:51 所示核酸序列的核酸序列是一种 cDNA。

31. 根据权利要求 29 所述的载体,其中所述的载体是适合进行核酸繁殖或者复制的载体。

32. 根据权利要求 29 所述的载体,其中所述的载体是适合表达所述核酸的载体。

33. 根据权利要求 31 或者 32 所述的载体,其中所述的载体包括病毒、质粒、或者柯斯载体。

34. 根据权利要求 33 所述的载体,其中所述的载体是重组病毒。

35. 根据权利要求 34 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于哺乳动物基因中的启动子。

36. 根据权利要求 35 所述的载体,其中所述的哺乳动物基因是人类基因。

37. 根据权利要求 34 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于病毒或者逆转录病毒基因组中的启动子。

38. 根据权利要求 37 所述的载体,其中所述的病毒或者逆转录病毒是多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒,牛乳突淋瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,细胞巨化病毒 (CMV), B 型肝炎病毒或者猿猴病毒 40 (SV40)。

39. 一种重组抗 - 基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 抗体,所述的抗体包括编码具有序列识别号:50 所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列,以及编码具有序列识别号:52 所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列。

40. 根据权利要求 39 所述的抗体,其中所述编码具有序列识别号 :50 所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列是一种 cDNA,以及所述编码具有序列识别号 :52 所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列是一种 cDNA。

41. 一种载体,所述载体包括编码具有序列识别号 :50 所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列,以及编码具有序列识别号 :52 所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列。

42. 根据权利要求 41 所述的载体,其中所述编码具有序列识别号 :50 所示氨基酸序列的重链可变区域的核酸序列是一种 cDNA,以及所述编码具有序列识别号 :52 所示氨基酸序列的轻链可变区域的核酸序列是一种 cDNA。

43. 根据权利要求 41 所述的载体,其中所述的载体是适合进行核酸繁殖或者复制的载体。

44. 根据权利要求 41 所述的载体,其中所述的载体是适合表达所述核酸的载体。

45. 根据权利要求 43 或者 44 所述的载体,其中所述的载体包括病毒、质粒、或者柯斯载体。

46. 根据权利要求 45 所述的载体,其中所述的载体是重组病毒。

47. 根据权利要求 46 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于哺乳动物基因中的启动子。

48. 根据权利要求 47 所述的载体,其中所述的哺乳动物基因是人类基因。

49. 根据权利要求 46 所述的载体,其中所述的病毒包括来自于病毒或者逆转录病毒基因组中的启动子。

50. 根据权利要求 49 所述的载体,其中所述的病毒或者逆转录病毒是多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒,牛乳突淋巴瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,细胞巨化病毒 (CMV), B 型肝炎病毒或者猿猴病毒 40 (SV40)。

用于对流行性感冒进行治疗以及诊断的组合物以及方法

[0001] 本申请是 2008 年 11 月 12 日递交的申请号为 200880123932.8, 发明名称为“用于对流行性感冒进行治疗以及诊断的组合物以及方法”的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求享有申请日为 2007 年 11 月 12 日的临时申请 USSN60/987353、申请日为 2007 年 11 月 12 日的临时申请 USSN60/987355、申请日为 2008 年 5 月 16 日的临时申请 USSN61/053840、以及申请日为 2008 年 9 月 8 日的临时申请 USSN61/095208 中的权益, 上述文献中的全部内容均作为一个整体在本发明中被引入作为参考。

发明领域

[0004] 本发明大体上涉及对流行性感冒感染的治疗、诊断以及监控。本发明更加具体的涉及到识别流行性感冒基质 2 蛋白 - 特异性抗体的方法以及它们的制造和使用。这样的抗体可以被有效的用在药物组合物中, 用于对流行性感冒进行预防以及治疗, 并且用于对流行性感冒的感染进行诊断以及监控。

背景技术

[0005] 在美国, 流行性感冒病毒每年感染了 5-20% 的人群并且导致 30000-50000 例的死亡。尽管流行性感冒疫苗是预防感染的首要方法, 在美国同样可以利用四种抗病毒药物: 金刚烷胺 (amantadine), 金刚乙胺 (rimantadine), 奥司他韦 (oseltamivir) 以及扎那米韦 (zanamivir)。到 2005 年 12 月为止, 仅仅奥司他韦 (TAMIFLU™) 被推荐用来进行 A 型流行性感冒的治疗, 这是因为所述病毒对金刚烷胺以及金刚乙胺的抗性增强, 这种抗性的增强是由于存在于所述病毒的 M2 蛋白中的氨基酸取代而产生的。

[0006] 由 A 型流行性感冒的病毒感染而引发的疾病以其周期性的性质为代表。抗原的漂变以及漂移使得每年有不同的 A 型菌株出现。不仅如此, 所述的高度致病性的菌株侵入普遍人群中的威胁加强了对于流行性感冒感染的新的治疗方法的需求。所述的中和抗体的主要片段指向所述的红血球凝集素以及神经氨酸苷酶蛋白的多态性区域。因此, 这样的一种中和性的单克隆抗体大概应当仅仅能够命中一个或者几个菌株。近来的焦点专注于相对而言不变的基质 2 (M2) 蛋白。一种作用于基质 2 蛋白 (M2) 的中和性单克隆抗体可能应当适合于对所有的 A 型流行性感冒菌株进行治疗。

[0007] 在一种形成离子通道的同型四聚体中发现了所述的基质 2 蛋白 (M2), 并且其被认为能够帮助所述的病毒在进入所述细胞中时脱除外壳。在发生感染之后, 可以在所述的细胞表面上找到丰富的基质 2 蛋白。随后其被导入到所述的病毒粒子外壳中, 在所述的病毒粒子外壳中仅仅包括全部外壳蛋白的大约 2%。所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 很短, 所述的氨基末端上的 2-24 个氨基酸陈列在所述的细胞之外。抗基质 2 蛋白单克隆抗体 (Anti-M2MAb) 迄今为止已经作用于这种线性序列。因此, 它们对于细胞表达的基质 2 蛋白不会表现出期望的结合性质, 包括在天然的基质 2 蛋白的构象抗原决定簇上的结合。

[0008] 因此, 在本领域存在一种对于新的抗体的长期需求, 其中所述的抗体能够与上述

的细胞表达的基质 2 蛋白以及所述的天然基质 2 蛋白的构象抗原决定簇进行结合。

发明内容

[0009] 本发明提供了完全人类单克隆抗体,其中所述的单克隆抗体能够特异性的作用于基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e)。任选的,所述的抗体是从人类供体的 B 细胞中分离得到的。范例性的单克隆抗体包括本发明中所描述的 8i10,21B15 以及 23K12。可以选择的,所述的单克隆抗体是一种这样的抗体,其与 8i10,21B15 以及 23K12 在同样的表位上进行结合。所述的抗体在本发明中分别被称为人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体。所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体具有下述性质中的一种或者多种:a) 在一种流行性感病毒的基质 2 细胞外结构域 (M2e) 多肽的细胞外结构域中的表位上进行结合;b) 与感染了 A 型流行性感冒的细胞进行结合;或者 c) 与 A 型流行性感冒病毒进行结合。

[0010] 所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体结合的表位是一种基质 2 蛋白多肽的非线性表位。优选的,所述的表位包括所述的基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 多肽的氨基末端区域。更加优选的,所述的表位完全的或者部分的包括所述的氨基酸序列 SLLTEV(序列识别号:42)。最为优选的,所述的表位包括存在于所述的基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 多肽的位置 2、5 以及 6 上的氨基酸,其中所述的编号与序列识别号 1 中的编号一致。所述的存在于位置 2 处的氨基酸是丝氨酸;存在于位置 5 处的氨基酸是苏氨酸;并且存在于位置 6 处的氨基酸是谷氨酸。

[0011] 一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体中含有重链可变区域以及轻链可变区域,其中所述的重链可变区域中含有序列识别号 44 或者 50 中所示的氨基酸序列,并且所述的轻链可变区域中含有序列识别号 46 或者 52 中所示的氨基酸序列。优选的,所述的三个重链互补决定区域 (CDR) 中包括一种氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列与下述氨基酸序列具有至少 90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性:NYYS(序列识别号:72),FIYYGGNTKYNPSLKS(序列识别号:74),ASCSGGYCILD(序列识别号:76),SNYMS(序列识别号:103),VIYSGGSTYYADSVK(序列识别号:105),CLSRMRGYGLDV(序列识别号:107)(通过 Kabat 方法进行测定)或者 ASCSGGYCILD(序列识别号:76),CLSRMRGYGLDV(序列识别号:107),GSSISN(序列识别号:109),FIYYGGNTK(序列识别号:110),GSSISN(序列识别号:111),GFTVSSN(序列识别号:112),VIYSGGSTY(序列识别号:113)(通过 Chothia 方法进行测定),并且所述的三个轻链互补决定区域 (CDR) 中包括一种氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列与下述氨基酸序列具有至少 90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性:RASQNIYKYLN(序列识别号:59),AASGLQS(序列识别号:61),QQSYSPPLT(序列识别号:63),RTSQSISSYLN(序列识别号:92),AASSLQSGVPSRF(序列识别号:94),QQSYMPA(序列识别号:96)(通过 Kabat 方法进行测定)或者 RASQNIYKYLN(序列识别号:59),AASGLQS(序列识别号:61),QQSYSPPLT(序列识别号:63),RTSQSISSYLN(序列识别号:92),AASSLQSGVPSRF(序列识别号:94),QQSYMPA(序列识别号:96)(通过 Chothia 方法进行测定)。所述的抗体与基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 进行了结合。

[0012] 所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的重链来自于一种生殖系 V(可变的)基因,例如,所述的免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4)生殖系基因或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因。

[0013] 本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体包括可变的重链 (V_H) 区域, 其中所述的重链区域是由人类免疫球蛋白重链可变区域 4 (IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列进行编码的。免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列在例如 Accession numbers (登录号) L10088、M29812、M95114、X56360 以及 M95117 中有所表示。免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列在例如 Accession numbers (登录号) X92218、X70208、Z27504、M99679 以及 AB019437 中有所表示。本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体包括一个由一种核酸序列编码的重链可变区域, 其中所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更加优选的, 与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 98%、99% 的同源性。所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的重链可变区域与所述的由免疫球蛋白重链可变区域 4 (IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 (IgHV3) 生殖系基因序列编码的重链可变区域的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的重链可变区域的氨基酸序列与所述的由免疫球蛋白重链可变区域 4 (IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 (IgHV3) 生殖系基因序列编码的氨基酸序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更加优选的, 与由所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 (IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 (IgHV3) 生殖系基因序列编码的序列具有至少 98%、99% 的同源性。

[0014] 本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体同样包括可变的轻链 (V_L) 区域, 其中所述的轻链区域是由人类免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列进行编码的。人类免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 轻链可变生殖系基因序列在例如 Accession numbers X59315、X59312、X59318、J00248 以及 Y14865 中有所表示。可以选择的, 所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体包括由一种核酸序列编码的轻链可变区域, 其中所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更加优选的, 与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 生殖系基因序列具有至少 98%、99% 的同源性。所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的轻链可变区域与所述的由免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列编码的轻链可变区域的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的轻链可变区域的氨基酸序列与所述的由免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列编码的氨基酸序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更加优选的, 与由所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 (IgKV1) 生殖系基因序列编码的序列具有至少 98%、99% 的同源性。

[0015] 在另外一个方面, 本发明提供了一种包括本发明所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体的组合物。在各种不同的方面中, 所述的组合物中进一步的包括一种抗病毒药物, 一种病毒侵入抑制剂或者一种病毒吸附抑制剂。所述的抗病毒药物是例如一种神经氨酸苷酶抑制剂, 一种透明质酸 (HA) 抑制剂, 一种唾液酸抑制剂或者一种基质 2 蛋

白离子通道抑制剂。所述的基质 2 蛋白离子通道抑制剂是例如金刚烷胺或者金刚乙胺。所述的神经氨酸苷酶抑制剂是例如扎那米韦,或者奥司他韦的磷酸盐。在一个进一步的方面,所述的组合物中进一步包括第二种抗 A 型流行性感冒的抗体。

[0016] 在一个进一步的方面,依照本发明所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体与一种治疗试剂或者一种可探测性标记进行了可操作的连接。

[0017] 除此之外,本发明提供了一种刺激免疫应答、治疗、预防或者缓解流行性感冒病毒感染所带来的症状的方法,其中所述的方法是通过向宿主施用一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体的方式来实现的。

[0018] 任选的,进一步的向所述的宿主施用另外一种试剂,所述的试剂是例如,但不局限于,一种流行性感冒病毒抗体,一种抗病毒药物例如神经氨酸苷酶抑制剂,透明质酸 (HA) 抑制剂,唾液酸抑制剂或者基质 2 蛋白 (M2) 离子通道抑制剂,一种病毒侵入抑制剂或者一种病毒吸附抑制剂。所述的基质 2 蛋白离子通道抑制剂是例如金刚烷胺或者金刚乙胺。所述的神经氨酸苷酶抑制剂是例如扎那米韦,或者奥司他韦的磷酸盐。所述的宿主患有或者具有发展成为流行性感冒病毒感染的倾向,例如,一种自身免疫性疾病或者是一种炎症障碍。

[0019] 在另外一个方面,本发明提供了一种向宿主施用本发明所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体的方法,其中所述的施用发生在所述的宿主被暴露于流行性感冒病毒中的之前和 / 或之后。例如,可以使用本发明中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体来治疗或者预防排斥性流行性感冒的感染。所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体是以足以促进病毒的清除或者消除感染了 A 型流行性感冒的细胞的剂量来进行施用的。

[0020] 同样被包括在本发明之内的是一种在患者体内测定一种流行性感冒病毒感染是否存在的方法,所述的方法通过下述方式来实现:将一种来自于所述患者的生物学样本与一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体进行接触;对与所述的生物学样本发生结合的所述抗体的剂量进行探测;并且将与所述的生物学样本发生结合的所述抗体的所述剂量与一个对照值进行比较。

[0021] 本发明进一步提供了一种包括人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体的诊断试剂盒。

[0022] 本发明的其他特征以及优点将通过下面的详细描述以及权利要求而变得显而易见并且其被涵盖在下述的详细描述以及权利要求之内。

附图说明

[0023] 附图 1 表示的是在存在有或者不存在有游离的基质 2 蛋白肽的情况下,本发明中所述的三种抗体以及对照的人类 14C2 抗体与 293- 人胚肾细胞 (HEK) 进行的结合,其中所述的 293- 人胚肾细胞使用一种基质 2 蛋白表达构建体或者对照载体进行了转染。

[0024] 附图 2A 以及 B 是曲线图,表示的是与 A 型流行性感冒 /PR/8/32 发生结合的人类单克隆抗体。

[0025] 附图 3A 是一个图表,表示的是基质 2 蛋白 (M2) 变体的细胞外结构域的氨基酸序列。

[0026] 附图 3B 以及 C 是柱状图表,表示的是人类单克隆抗流行性感胃抗体与附图 3A 中所示的基质 2 蛋白变体所进行的结合。

[0027] 附图 4A 以及 B 是柱状图表,表示的是经过丙氨酸分区突变后,人类单克隆抗流行性感胃抗体与基质 2 蛋白肽所进行的结合。

[0028] 附图 5 是一系列的柱状图表,表示的是单克隆抗体 8i10 以及 23K12 与基质 2 蛋白(M2) 之间所进行的结合,这代表着流行性感胃菌株 A/ 香港 /483/1997 序列在所述的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 DG44 中进行了稳定的表达。

[0029] 附图 6A 是一个图表,表示的是抗基质 2 蛋白抗体与变化的基质 2 蛋白肽之间进行的交叉反应性结合。

[0030] 附图 6B 是一个图表,表示的是基质 2 蛋白抗体对截短型基质 2 蛋白肽而言的结合活性。

[0031] 附图 7 是一个曲线图,表示的是利用人类抗流行性感胃单克隆抗体进行治疗的感染了流行性感胃的小鼠的存活情况。

[0032] 附图 8 是一个图解,表示的是所述的抗基质 2 蛋白抗体在基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 的 N- 末端中的一个高度保守的区域内发生的结合。

[0033] 附图 9 是一个图表,表示的是在酶联免疫吸附试验 (ELISA) 中,克隆于粗上清液中的抗基质 2 蛋白大鼠抗人类单克隆抗体 (rHMAb) 与流行性感胃的结合,而所述的对照抗基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 单克隆抗体 14C2 并不能容易的与病毒进行结合。

[0034] 附图 10 是一系列的照片,表示的是抗基质 2 蛋白大鼠抗人类单克隆抗体 (rHMAb) 与感染了流行性感胃的细胞所进行的结合。犬肾 (MDCK) 细胞经过或者没有经过 A 型流行性感胃 /PR/8/32 的感染并且在 24 小时之后对来自于粗上清液中的抗体结合进行测试。通过所述的荧光微量检测技术 (FMAT) 平板扫描仪对数据进行收集。

[0035] 附图 11 是一个图表,表示的是克隆于粗上清液中的抗基质 2 蛋白大鼠抗人类单克隆抗体 (rHMAb) 与细胞所进行的结合,其中所述的细胞利用所述的流行性感胃亚型 H3N2、HK483、以及 VN1203 基质 2 蛋白进行了转染。将编码与流行性感胃菌株 H3N2、HK483、以及 VN1203 相应的全长基质 2 蛋白 cDNA 的质粒与一种模拟的质粒对照瞬间转染到 293 细胞内。测试所述的 14C2、8i10、23K12,以及 21B15 单克隆抗体与所述转染体之间的结合,并且使用一种 AF647- 偶联型抗人类免疫球蛋白 G 次级抗体进行探测。图中表示的是荧光激活的细胞分选器 (FACS) 分析后,所述的特异性的单克隆抗体结合的平均荧光强度。

具体实施方式

[0036] 本发明提供了完全人类单克隆抗体,其中所述的单克隆抗体能够特异性的作用于所述的基质 2 蛋白 (M2) 多肽的细胞外结构域。所述的抗体在本发明中分别被称为人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体。

[0037] 基质 2 蛋白 (M2) 是一个有 96 个氨基酸的跨膜蛋白,其以一种同型四聚体的形式存在于流行性感胃病毒以及病毒感染性细胞的表面之上。基质 2 蛋白含有一个有 23 个氨基酸的细胞外结构域 (M2e),所述的细胞外结构域高度保守的穿过 (across)A 型流行性感胃菌株。自从 1918 年在全国流行的菌株之后,仅有几个氨基酸发生了改变,因此基质 2 蛋白细胞外结构域对于流行性感胃的治疗而言是一个有吸引力的目标。在先前的研究中,对

于所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 具有特异性的单克隆抗体是通过一种肽的免疫作用而得到的,其中所述的肽与所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 的线性序列相对应。与之形成对照的是,本发明提供了一种新的方法,其中在细胞系内表达完全长度的基质 2 蛋白 (M2),这样一来能够对与这种细胞表达的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 发生结合的人类抗体进行识别。已经表明,所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (huM2e) 抗体能够与存在于所述的基质 2 蛋白-转染细胞以及天然基质 2 蛋白上的构象抗原决定簇进行结合,可以与感染了流行性感冒的细胞进行结合,或者可以与所述的病毒自身进行结合。所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体不与所述的线性基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 肽进行结合,但是它们的确能够与几种天然的基质 2 蛋白变体进行结合,也能够经由 cDNA 的转染作用在细胞系内进行表达。因此,本发明能够对人类单克隆抗体进行识别以及制备,其中所述的人类单克隆抗体对于非常宽范围的 A 型流行性感冒病毒菌株表现出新的特异性。这些抗体可以进行诊断性的应用,用于对 A 型流行性感冒的感染进行识别,并且可以进行治疗性的应用,用于对 A 型流行性感冒的感染进行治疗。

[0038] 本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体具有下述性质中的一种或者多种:所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体结合于 a) 存在于一种流行性感冒病毒的基质 2 蛋白 (M2) 多肽的细胞外结构域内的一个表位;b) 结合于感染了 A 型流行性感冒的细胞;和/或 c) 结合于 A 型流行性感冒病毒(即,病毒粒子)。本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体经由免疫效应器机制对感染了流行性感冒的细胞进行消除并且通过与流行性感冒病毒粒子的结合促进了病毒的直接清除,其中所述的免疫效应器机制是例如抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC)。本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体与所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 多肽的氨基末端区域进行结合。优选的,本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体与所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 多肽的氨基末端进行结合,其中所述的 N-末端的蛋氨酸残基是空键。范例性的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 序列包括在下面的表格 I 中列出的那些序列。

[0039] 表格 I

[0040]

类型	名称	亚型	基质 2 蛋白的细胞外结构域序列	序列识别号
A	BREVIG MISSION.1.1918	H1N1	MSLLTEVETPTRNEW GCRCNDSSD	序列识别号 1
A	蒙 默 思 堡 1.1947	H1N1	MSLLTEVETPTKNEW ECRCNDSSD	序列识别号 2
A	新加坡.01.2005	H3N2	MSLLTEVETPIRNEW ECRCNDSSD	序列识别号 3
A	威 斯 康 星 州.10.98	H1N1	MSLLTEVETPIRNGW ECKCNDSSD	序列识别号 4
A	威 斯 康 星 州.301.1976	H1N1	MSLLTEVETPIRSEW GCRCNDSSD	序列识别号 5

[0041]

A	巴拿马 1.66	H2N2	MSFLPEVETPIRNEW GCRCNDSSD	序列识 别号 6
A	纽约.321.1999	H3N2	MSLLTEVETPIRNEW GCRCNDSSN	序列识 别号 7
A	加拉加斯.1.71	H3N2	MSLLTEVETPIRKEW GCRCNDSSD	序列识 别号 8
A	台湾 3.71	H3N2	MSFLTEVETPIRNEW GCRCNDSSD	序列识 别号 9
A	武汉 359.95	H3N2	MSLPTEVETPIRSEW GCRCNDSSD	序列识 别号 10
A	香港 1144.99	H3N2	MSLLPEVETPIRNEW GCRCNDSSD	序列识 别号 11
A	香港 1180.99	H3N2	MSLLPEVETPIRNGW GCRCNDSSD	序列识 别号 12
A	香港 1774.99	H3N2	MSLLTEVETPTRNGW ECRCSGSSD	序列识 别号 13
A	纽约 217.02	H1N2	MSLLTEVETPIRNEW EYRCNDSSD	序列识 别号 14
A	纽约 300.2003	H1N2	MSLLTEVETPTRNEW EYRCSDSSD	序列识 别号 15
A	西班牙猪流 感.54008.2004	H3N2	MSLLTEVETPTRNGE WCRYSDSSD	序列识 别号 16
A	广州 333.99	H9N2	MSFLTEVETLTRNGW ECRCSDSSD	序列识 别号 17
A	香港 1073.99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGW ECKCRDSSD	序列识 别号 18
A	香港 1.68	H3N2	MSLLTEVETPIRNEW GCRCNDSSD	序列识 别号 19
A	香港猪流 感.126.1982	H3N2	MSLLTEVETPIRSEW GCRCNDSGD	序列识 别号 20
A	纽约 703.1995	H3N2	MSLLTEVETPIRNEW	序列识

[0042]

			ECRCNGSSD	别号 21
A	魁北克猪流感 192.81	H1N1	MSLPTEVETPIRNEW GCRCNDSSD	序列识 别号 22
A	PR8.34	H1N1	MSLLTEVETPIRNEW GCRCNGSSD	序列识 别号 23
A	香港 485.97	H5N1	MSLLTEVDTLTRNGW GCRCSDSSD	序列识 别号 24
A	香港 542.97	H5N1	MSLLTEVETLTKNGW GCRCSDSSD	序列识 别号 25
A	汕头丝羽鸡流 感 1826.2004	H9N2	MSLLTEVETPTRNGW ECKCSDSSD	序列识 别号 26
A	台湾鸡流感 0305.04	H6N1	MSLLTEVETHTRNG WECKCSDSSD	序列识 别号 27
A	阿肯色州鹤鹑 流 感 16309-7.94	H7N3 NSA	MSLLTEVKTPTRNGW ECKCSDSSD	序列识 别号 28
A	香港 486.97	H5N1	MSLLTEVETLTRNGW GCRCSDSSD	序列识 别号 29
A	宾夕法尼亚州 鸡 流 感 13552-1.98	H7N2 NSB	MSLLTEVETPTRDGW ECKCSDSSD	序列识 别号 30
A	黑龙江鸡流感 48.01	H9N2	MSLLTEVETPTRNGW GCRCSDSSD	序列识 别号 31
A	韩 国 猪 流 感.S5.2005	H1N2	MSLLTEVETPTRNGW ECKCNDSSD	序列识 别号 32
A	香港 1073.99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGW ECKCSDSSD	序列识 别号 33
A	威斯康星州 3523.88	H1N1	MSLLTEVETPIRNEW GCKCNDSSD	序列识 别号 34
A	X-31 疫苗菌株	H3N2	MSFLTEVETPIRNEW GCRCNGSSD	序列识 别号 35
A	罗斯托克鸡流	H7N1	MSLLTEVETPTRNGW	序列识

[0043]

	感 8.1934		ECRCNDSSD	别号 36
A	纽约, 环境流感 16326-1.2005	H7N2	MSLLTEVETPIRKGW ECNCSDSSD	序列识 别号 37
A	印尼 560H.2006	H5N1	MSLLTEVETPTRNEW ECRCSDSSD	序列识 别号 38
A	香港 鸡 流 感.SF1.03	H9N2	MSLLTGVETHTRNG WGCKCSDSSD	序列识 别号 39
A	香港 鸡 流 感 YU427.03	H9N2	MSLLPEVETHTRNG WGCRCSDSSD	序列识 别号 40

[0044] 在一种实施方式中,本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体与一种基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 进行了结合,其中所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 完全的或者部分的包括基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 的位置 2 至位置 7 处的氨基酸残基,其中所述的编号与序列识别号 1 中的编号相一致。例如,本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体完全的或者部分的结合于所述的氨基酸序列 SLLTEVET(序列识别号:41)。最为优选的,本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体完全的或者部分的结合于所述的氨基酸序列 SLLTEV(序列识别号:42)。优选的,本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体与所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 蛋白的非线性表位进行结合。例如,所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 抗体与一个表位进行结合,其中所述的表位包括所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 多肽的位置 2、5 以及 6,其中所述的编号与序列识别号 1 中的编号相一致,其中所述的 a) 存在于位置 2 处的氨基酸是丝氨酸;b) 存在于位置 5 处的氨基酸是苏氨酸;以及 c) 存在于位置 6 处的氨基酸是谷氨酸。在这个表位上进行结合的范例性的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域 (huM2e) 单克隆抗体是本发明中所描述的 8i10,21B15 或者 23K12 抗体。

[0045] 所述的 8i10 抗体包括重链可变区域(序列识别号:44)以及轻链可变区域(序列识别号:46),其中所述的重链可变区域是由下文中的序列识别号:43 所示的核酸序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由序列识别号:45 所示的核酸序列进行编码的。

[0046] 在下面的序列中,按照 Chothia,C 等人(于 1989 年在 Nautre《自然》342:877-883 中发表的文章)的定义,包含了所述的互补决定区域(CDR)的氨基酸用下划线表示,并且按照 Kabat E. A. 等人(于 1991 年,发表的 Sequences of Proteins of Immunological Interest 《具有免疫学兴趣的蛋白序列》,第 5 版,美国国立卫生研究院出版物(NIH Publication)编号.91-3242, U. S. Department of Health and Human Services 美国卫生与人类服务部)定义的氨基酸用粗体进行了高亮显示。

[0047] 在 Kabat 的定义中,所述的 8i10 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列: NYYWS(序列识别号:72),FIYYGGNTKYNPS LKS(序列识别号:74)以及 ASCSGGYCILD(序列识别号:76)。在 Kabat 的定义中,所述的 8i10 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列: RASQNIYKYLN(序列识别号:59),AA SGLQS(序列识别号:61)以及 QQSYSPPLT(序列识别号:

63)。

[0048] 在 Chothia 的定义中,所述的 8i10 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列: GSSISN(序列识别号:109), FIYYGGNTK(序列识别号:110) 以及 ASCSGGYCILD(序列识别号:76)。在 Chothia 的定义中,所述的 8i10 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列: RASQNIYKYLN(序列识别号:59), AASGLQS(序列识别号:61) 以及 QQSYPPLT(序列识别号:63)。

[0049] > 8I10 重链可变的核苷酸序列:(序列识别号:43)

[0050] CAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGTTTATCTATTACGGTGGAACACCAAGTACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

[0051] > 8I10 重链可变的氨基酸序列:(序列识别号:44)

[0052] Kabat 用粗体表示, Chothia 用下划线表示

[0053]

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>G</u>
K	G	L	E	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	F	I	Y	Y	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	Q	D	T	S	K	S	Q	V	S	L	T	M	S	S
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S							

[0054] > 8I10 轻链可变的核苷酸序列:(序列识别号:45)

[0055] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTCCGGCGAGGGACAGGGTGGAGATCAAAC

[0056] > 8I10 轻链可变的氨基酸序列:(序列识别号:46)

[0057] Kabat 用粗体表示, Chothia 用下划线表示

[0058]

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	W	Y	Q	Q	R	P	G	K
A	P	K	G	L	I	S	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	R	V	E
I	K																			

[0059] 所述的 21B15 抗体包括这样的抗体,其中所述的抗体中包括一个重链可变区域(序列识别号:44) 以及一个轻链可变区域(序列识别号:46),其中所述的重链可变区域是由下文中的序列识别号:47 所示的核酸序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由序列识别号:48 所示的核酸序列进行编码的。

[0060] 在下面的序列中,按照 Chothia, C 等人于 1989 年的定义,包含了所述的互补决定区域(CDR) 的氨基酸用下划线表示,并且按照 Kabat E. A. 等人于 1991 年定义的氨基酸用粗

体进行了高亮显示。

[0061] 在 Kabat 的定义中,所述的 21B15 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列: NYYWS(序列识别号:72),FIYYGGNTKYNPS LKS(序列识别号:74)以及 ASCSGGYCILD(序列识别号:76)。在 Kabat 的定义中,所述的 21B15 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列: RASQNIYKYLN(序列识别号:59),AA SGLQS(序列识别号:61)以及 QQSYPPLT(序列识别号:63)。

[0062] 在 Chothia 的定义中,所述的 21B15 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列: GSSISN(序列识别号:111),FIYYGGNTK(序列识别号:110)以及 ASCSGGYCILD(序列识别号:76)。在 Chothia 的定义中,所述的 21B15 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列: RASQNIYKYLN(序列识别号:59),AASGLQS(序列识别号:61)以及 QQSYPPLT(序列识别号:63)。

[0063] > 21B15 重链可变的核苷酸序列:(序列识别号:47)

[0064] CAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGTTTATCTATTACGGTGAAACACCAAGTACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

[0065] > 21B15 重链可变的氨基酸序列:(序列识别号:44)

[0066] Kabat 用粗体表示,Chothia 用下划线表示

[0067]

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	N	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	S	P	G
K	G	L	E	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	F	I	Y	Y	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	Q	D	T	S	K	S	Q	V	S	L	T	M	S	S
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	A	S	C	S	G	G	Y	C
I	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S							

[0068] > 21B15 轻链可变的核苷酸序列:(序列识别号:48)

[0069] GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CGCGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAGCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAAC

[0070] > 21B15 轻链可变的氨基酸序列:(序列识别号:46)

[0071] Kabat 用粗体表示,Chothia 用下划线表示

[0072]

D I Q V T Q S P S S L S A S V G D R V T I
T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K
A P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S
G S G S G T D F T L T I T S L Q P E D F A
T Y Y C Q Q S Y S P P L T F G G G T R V D
I K

[0073] 所述的 23K12 抗体包括这样的抗体,其中所述的抗体中包括一个重链可变区域(序列识别号:50)以及一个轻链可变区域(序列识别号:52),其中所述的重链可变区域是由下文中的序列识别号:49 所示的核酸序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由序列识别号:51 所示的核酸序列进行编码的。

[0074] 在下面的序列中,按照 Chothia, C 等人于 1989 年的定义,包含了所述的互补决定区域(CDR)的氨基酸用下划线表示,并且按照 Kabat E. A. 等人于 1991 年定义的氨基酸用粗体进行了高亮显示。

[0075] 在 Kabat 的定义中,所述的 23K12 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列:SNYMS(序列识别号:103),VIYSGGSTYYADSVK(序列识别号:105)以及 CLSRMRGYGLDV(序列识别号:107)。在 Kabat 的定义中,所述的 23K12 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列:RTSQSISSYLN(序列识别号:92),AASSLQSGVPSRF(序列识别号:94)以及 QQSYSPMA(序列识别号:96)。

[0076] 在 Chothia 的定义中,所述的 23K12 抗体的重链互补决定区域中具有下述序列:GFTVSSN(序列识别号:112),VIYSGGSTY(序列识别号:113)以及 CLSRMRGYGLDV(序列识别号:107)。在 Chothia 的定义中,所述的 23K12 抗体的轻链互补决定区域中具有下述序列:RTSQSISSYLN(序列识别号:92),AASSLQSGVPSRF(序列识别号:94)以及 QQSYSPMA(序列识别号:96)。

[0077] > 23K12 重链可变的核苷酸序列:(序列识别号:49)

[0078] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCA
AGAACACAGTGTCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGC
AGGATGCGGGGTTACGGTTTAGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCG

[0079] > 23K12 重链可变的氨基酸序列:(序列识别号:50)

[0080] Kabat 用粗体表示,Chothia 用下划线表示

[0081]

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S
C A A S G F T V S S N Y M S W V R Q A P G
11
K G L E W V S V I Y S G G S T Y Y A D S V
K G R F S F S R D N S K N T V F L Q M N S
L R A E D T A V Y Y C A R C L S R M R G Y
G L D V W G Q G T T V T V S

[0082] > 23K12 轻链可变的核苷酸序列:(序列识别号:51)

[0083] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATC
TATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGC
CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

[0084] > 23K12 轻链可变的氨基酸序列:(序列识别号:52)

[0085] Kabat 用粗体表示, Chothia 用下划线表示

[0086]

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	R	T	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	M	P	A	F	G	Q	G	T	K	L	E	I
K																				

[0087] 本发明所述的人类基质 2 蛋白的细胞外结构域(huM2e) 抗体同样包括这样的抗体,所述的抗体包括一种重链可变的氨基酸序列和 / 或一种轻链可变的氨基酸序列,其中所述的重链可变的氨基酸序列与序列识别号 44 或者 49 所示的氨基酸序列具有至少 90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性,所述的轻链可变的氨基酸序列与序列识别号 46 或者 52 所示的氨基酸序列具有至少 90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性。

[0088] 可以选择的,所述的单克隆抗体是一种这样的抗体,其与 8i10,21B15 以及 23K12 在同样的表位上进行结合。

[0089] 所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e) 抗体的重链来自于一种生殖系 V(可变的) 基因,例如,所述的免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 生殖系基因或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因。

[0090] 本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e) 抗体包括一个可变的重链(V_H) 区域,其中所述的重链区域是由一个人类免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列进行编码的。免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列在例如 Accession numbers L10088、M29812、M95114、X56360 以及 M95117 中有所表示。免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列在例如 Accession numbers X92218、X70208、Z27504、M99679 以及 AB019437 中有所表示。本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e) 抗体包括一个由一种核酸序列编码的重链可变区域,其中所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 80%的同源性。优选的,所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 90%、95%、96%、97%的同源性,并且更加优选的,与所述的免疫球蛋白重链可变区域 4 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3 生殖系基因序列具有至少 98%、99%的同源性。所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e) 抗体的重链可变区域与所述的由免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3(IgHV3) 生殖系基因序列编码的重链可变区域的氨基酸序列具有至少 80%的同源性。优选的,所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e) 抗体的重链可变区域的氨基酸序列与所述的由免疫球蛋白重

链可变区域 4(IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3(IgHV3) 生殖系基因序列编码的氨基酸序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性,并且更加优选的,与由所述的免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 生殖系基因序列或者免疫球蛋白重链可变区域 3(IgHV3) 生殖系基因序列编码的序列具有至少 98%、99% 的同源性。

[0091] 本发明所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体同样包括一个可变的轻链 (V_L) 区域,其中所述的轻链区域是由一个人类免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列进行编码的。人类免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 轻链可变生殖系基因序列在例如 Accession numbers X59315、X59312、X59318、J00248 以及 Y14865 中有所表示。可以选择的,所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体包括一个由一种核酸序列编码的轻链可变区域,其中所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列具有至少 80% 的同源性。优选的,所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性,并且更加优选的,与所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1 生殖系基因序列具有至少 98%、99% 的同源性。所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的轻链可变区域与所述的由免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列编码的轻链可变区域的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性。优选的,所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 抗体的轻链可变区域的氨基酸序列与所述的由免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列编码的氨基酸序列具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性,并且更加优选的,与由所述的免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1) 生殖系基因序列编码的序列具有至少 98%、99% 的同源性。

[0092] 除非另外定义,在本发明中有关内容中使用到的科学术语以及技术术语应当具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。进一步的,除非上下文另有需求,单数的术语应当包括复数形式并且复数的术语应当包括单数形式。一般而言,在本发明中所描述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白和寡核苷酸或者多核苷酸化学以及杂交的有关内容中使用到的术语以及技术在所述领域中是熟知的并且是被普遍使用的。在重组 DNA、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化中使用到的是标准的技术(例如,电穿孔,脂质体转染)。酶反应以及纯化技术是依照制造商的说明书或者所属领域通常完成的方式或者本发明中所描述的方式来进行的。除非特别给出相反的指示,本发明的实践将使用存在于所属领域的技术范围之内的滤过性微生物学、免疫学、微生物学、分子生物学以及重组 DNA 技术中的常规方法,出于描述的目的,在下面将对它们中的许多方法进行描述。这样的技术在下列文献中有完整的解释。参见,例如 Sambrook 等人所著的 Molecular Cloning :A Laboratory Manual 《分子克隆实验室手册》(第 2 版,1989 年);Maniatis 等人所著的 Molecular Cloning :A Laboratory Manual 《分子克隆实验室手册》(1982 年);DNA Cloning :A Practical Approach 《DNA 克隆:一种实用的方式》第 I&II 卷(D. Glover 编辑);Oligonucleotide Synthesis 《寡核苷酸的合成》(N. Gait 编辑,1984 年);Nucleic Acid Hybridization 《核酸的杂交》(B. Hames&S. Higgins 编辑,1985 年);Transcription and Translation 《转录与翻译》(B. Hames&S. Higgins 编辑,1984 年);Animal Cell Culture 《动物细胞培养》(R. Freshney 编辑,1986 年);Perbal 所著的 A Practical Guide to Molecular Cloning 《分子克隆的实践指南》(1984 年)。

[0093] 在本发明中所描述的涉及分析化学、合成有机化学、以及医学化学和药学化学的

有关内容中利用到的所述术语以及实验室操作和技术,是所属领域中熟知的并且是被普遍使用的。使用标准技术来进行化学合成,化学分析,药物制备,配制,以及递送,以及对患者进行的治疗。

[0094] 下述的定义可以用来对本发明进行理解:

[0095] 在本发明中所使用到的所述术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双重特异性抗体),以及抗体片段,只要它们能够表现出期望的生物学活性即可。在本发明中,所述的术语“免疫球蛋白”(Ig)可以与“抗体”进行互换使用。

[0096] “分离的抗体”指的是一种从其天然环境的组分中被分离出来和/或被再生出来的抗体。其天然环境中存在的污染组分是那些能够对所述抗体的诊断性应用或者治疗性应用产生干扰的物质,并且可以包括酶,激素,以及其他的蛋白质类溶解物或者非蛋白质类溶解物。在优选的实施方式中,所述的抗体被纯化至:(1)超过95%的重量是抗体,这是通过所述的Lowry方法来测定的,并且最为优选的超过99%的重量;(2)达到一定程度,使得通过使用转杯式序列分析仪(spinning cup sequenator)足以获得N-末端氨基酸序列或者内部氨基酸序列中的至少15个残基;或者(3)通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测具有均一性,其中所述的检测是在减压或者未减压条件下进行的,其中使用的是考马斯亮蓝染色或者优选的,使用银染色。分离的抗体包括本身存在于重组细胞内的所述抗体,因为所述抗体的天然环境中的至少一种组分将不复存在。然而,普遍而言,分离的抗体将通过至少一个纯化的步骤来进行制备。

[0097] 所述的基础的四链抗体单元是一种异型四聚型糖蛋白,所述的糖蛋白是由两条相同的轻(L)链以及两条相同的重(H)链组成的。一个免疫球蛋白M(IgM)抗体由5个所述的基础的异型四聚体单元以及一个被称为J链的额外的多肽构成,并且因此含有10个抗原结合位点,而分泌的免疫球蛋白A(IgA)抗体能够发生聚合从而形成多价的集合体,其中所述的集合体包括2-5个所述的基础的四链单元以及一个J链。在免疫球蛋白G(IgG)的情况下,所述的四链单元一般而言为大约150000道尔顿。每一条轻链通过一个共价的二硫键与一条重链进行连接,而所述的两条重链通过一个或者多个二硫键彼此进行连接,所述的二硫键的个数取决于所述的重链的亚型。每一条重链以及轻链同样有规律的将链内的二硫桥接键隔开。每一条重链在其所述的N-末端上具有一个可变的结构域(V_H),在此之后对于所述的 α 链以及 γ 链而言具有三个恒定结构域(C_H)并且对于 μ 亚型以及 ϵ 亚型而言具有四个恒定结构域。每一条轻链在其所述的N-末端上具有一个可变的结构域(V_L),在此之后有一个存在于另外一端的恒定结构域(C_L)。所述的轻链可变结构域(V_L)与所述的重链可变结构域(V_H)相对应并且所述的轻链恒定结构域(C_L)与所述的重链的第一个恒定结构域(C_{H1})相对应。可以确信,特定的氨基酸残基可以在所述的轻链可变结构域与重链可变结构域之间形成一种分界面。所述的重链可变结构域与轻链可变结构域的配对共同形成了一个抗原结合位点。需要知晓不同类别的抗体所具有的结构以及性质,可以参见,例如, Basic and Clinical Immunology 《基础免疫学与临床免疫学》,第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 以及 Tristram G Parslow(编辑), Appleton&Lange, Norwalk, Conn., 1994年, 第71页, 以及第6章。

[0098] 来自于任何脊椎动物种类的所述轻链可以被指定为两种明显不同的类型中的一种, 被称为 kappa(κ) 以及 lambda(λ), 这种指定是以它们的恒定结构域(C_L)中的氨基酸

序列为基础的。依据它们的重链恒定结构域 (C_H) 中的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被指定为不同的类型或者亚型。存在五种类型的免疫球蛋白:免疫球蛋白 A,免疫球蛋白 D,免疫球蛋白 E,免疫球蛋白 G,以及免疫球蛋白 M,它们分别具有被指定为 α (α)、 δ (δ)、 ϵ (ϵ)、 γ (γ) 以及 μ (μ) 的重链。所述的 γ 类型以及 α 类型进一步的被划分为亚类型,这种划分是以存在于重链恒定结构域序列以及功能上的相对较小的差异为基础的,例如,人类表达下述的亚类型:免疫球蛋白 G1,免疫球蛋白 G2,免疫球蛋白 G3,免疫球蛋白 G4,免疫球蛋白 A1,以及免疫球蛋白 A2。

[0099] 所述的术语“可变的”指的是这样的事实:在抗体之间,所述的可变结构域中的某些片段在序列上具有广泛的差异。所述的可变结构域介导了抗原的结合并且对于一种特定的抗体针对其特定抗原所具有的特异性进行了定义。然而,所述的可变性并不是均匀的分布在所述的可变结构域所具有的 110 个氨基酸的范围之内。取而代之的是,所述的可变区域是由被称为骨架区域 (FR) 的相对无变化的几段以及被称为“高变区域”的具有极度可变性的较为短小的区域构成的,所述的“高变区域”将所述的骨架区域 (FR) 分离开来,其中所述的骨架区域具有 15-30 个氨基酸,所述的“高变区域”中的每一个具有 9-12 个氨基酸的长度。天然的重链可变结构域以及轻链可变结构域均包括四个骨架区域,其很大程度上采取 β -板式 (β -sheet) 构象,通过三个高变区域进行连接,形成了环状的连接,并且在一些情形下形成了所述的 β -板式构象的一部分。每一条链上的所述高变区域通过所述的骨架区域与另外一条链上的所述高变区域非常紧密的结合在一起,促进了所述抗体的抗原结合位点的形成(参见 Kabat 等人发表的 Sequences of Proteins of Immunological Interest《具有免疫学兴趣的蛋白序列》,第 5 版,Public Health Service 公共卫生服务部,National Institutes of Health 美国国立卫生研究院, Bethesda, Md. (1991 年))。所述的恒定结构域并不直接参与到抗体与抗原的结合,但是表现出各种不同的效应器功能,例如所述的抗体在抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 中的参与作用。

[0100] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“高变区域”指的是负责进行抗原的识别的所述抗体的氨基酸残基。所述的高变区域一般而言包括来自于一个“互补决定区域”或者“CDR”中的氨基酸残基(例如,当依照所述的 Kabat 编号体系进行编号时,存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 的残基 24-34 (L1) 周围的氨基酸残基,残基 50-56 (L2) 周围的氨基酸残基以及残基 89-97 (L3) 周围的氨基酸残基;参见 Kabat 等人发表的 Sequences of Proteins of Immunological Interest《具有免疫学兴趣的蛋白序列》,第 5 版,Public Health Service 公共卫生服务部,National Institutes of Health 美国国立卫生研究院, Bethesda, Md. (1991 年));和/或那些来自于一个“高变环 (loop)”中的残基(例如,当依照所述的 Chothia 编号体系进行编号时,存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 的残基 24-34 (L1) 周围的氨基酸残基,残基 50-56 (L2) 周围的氨基酸残基以及残基 89-97 (L3) 周围的氨基酸残基,以及存在于所述的重链可变区域 (V_H) 的残基 26-32 (H1) 周围的氨基酸残基,残基 52-56 (H2) 周围的氨基酸残基以及残基 95-101 (H3) 周围的氨基酸残基;参见 Chot iha 以及 Lesk (于 1987 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》196:901-917 中发表的文章);和/或那些来自于一个“高变环 (loop)”/ 互补决定区域 (CDR) 中的残基(例如,当依照所述的国际免疫遗传学数据库 IMGT 编号体系进行编号时,存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 的残基 27-38 (L1) 周围的氨基酸残基,残基 56-65 (L2) 周围的氨基酸残基以及残基 105-120 (L3) 周围的氨基酸残基,以及

存在于所述的重链可变区域 (V_H) 的残基 27-38(H1) 周围的氨基酸残基, 残基 56-65(H2) 周围的氨基酸残基以及残基 105-120(H3) 周围的氨基酸残基; 参见 Lefranc, M. P. 等人 (于 1999 年) 在 Nucl. Acids Res. 《核酸研究》27:209-212 中发表的文章, Ruiz, M. 等人 (于 2000 年) 在 Nucl. Acids Res. 《核酸研究》28:219-221 中发表的文章)。任选的, 所述的抗体在下述位点处的一个或者多个上具有对称性的插入, 其中所述的位点是: 当依照 AHo 的编号体系进行编号时, 存在于所述的轻链可变区域内的 28, 36(L1), 63, 74-75(L2) 以及 123(L3), 以及存在于所述的重链可变区域内的 28, 36(H1), 63, 74-75(H2) 以及 123(H3); 参见 Honneger, A. 以及 Plunkthun, A. (于 2001 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》309: 657-670 中发表的文章)。

[0101] “生殖系核酸残基”指的是天然的存在于一种生殖系基因内的所述的核酸残基, 其中所述的生殖系基因编码一个恒定区域或者可变区域。“生殖系基因”指的是在一种生殖系细胞中发现的 DNA (即, 一种注定要变成卵细胞或者存在于所述的精液之中的细胞)。“生殖系突变”指的是发生在一种特定的 DNA 中的可遗传性的变化, 这种变化发生在处于所述的单细胞阶段的生殖细胞或者受精卵之中, 并且当其被遗传至后代时, 这样的一种突变被导入到所述机体的每一个细胞中去。生殖系突变与体细胞突变是相互形成对照的, 所述的体细胞突变是在单个的机体细胞中获得的。在一些情形下, 存在于编码一种可变区域的生殖系 DNA 序列中的核苷酸是突变的 (即, 一种体细胞突变) 并且被一种不同的核苷酸进行了取代。

[0102] 在本发明中所使用到的所述术语“单克隆抗体”指的是来自于本质上相同的抗体群体中的抗体, 即, 所述的个体抗体, 其中所述的群体是相同的, 除了可能以很小的量存在天然发生的突变之外。单克隆抗体是高度特异的, 其直接作用于单一的抗原位点。此外, 与多克隆抗体制剂形成对照的是, 每一个单克隆抗体直接作用于存在于所述抗原之上的单一的抗原决定簇上, 而所述的多克隆抗体制剂中包括不同的抗体, 这些抗体直接作用于不同的抗原决定簇 (表位)。除了它们的特异性之外, 所述的单克隆抗体的优点在于它们可以在不受到污染的情况下通过其他的抗体来进行合成。所述的修饰语“单克隆”并不能够被解释为需要通过任何特定的方法进行所述抗体的制备。例如, 可以有效的用在本发明中的所述单克隆抗体可以通过 Kohler 等人 (于 1975 年) 在 Nature 《自然》256:495 中发表的文章中第一次描述的杂交细胞方法学来进行制备, 或者可以使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或者植物细胞中对其进行制备 (参见, 例如, 美国专利 No. 4816567)。同样可以从噬菌体抗体文库中分离所述的“单克隆抗体”, 其中所述的分离可以使用例如在 Clackson 等人 (于 1991 年) 在 Nature 《自然》352:624-628 中发表的文章中描述的技术, 以及 Marks 等人 (于 1991 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》222:581-597 中发表的文章中描述的技术。

[0103] 本发明中所述的单克隆抗体包括“嵌合”抗体, 在所述的嵌合抗体中, 所述重链和/或轻链上的一部分与来自于一种特定物种的抗体或者属于一种特定的抗体类型或者亚类型的抗体中的相应序列是相同的或者是同源的, 而所述链上的其余部分与来自于另外一种特定物种的抗体或者属于另外一种抗体类型或者亚类型的抗体中的相应序列是相同的或者是同源的, 也包括这样的抗体的片段, 只要它们表现出所期望的生物学活性即可 (参见美国专利 No. 4816567; 以及 Morrison 等人 (于 1984 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美

国科学院院刊》81:6851-6855 中发表的文章)。本发明提供了来自于人类抗体的可变结构域抗原结合序列。因此,本发明中主要感兴趣的嵌合抗体包括这样的抗体:其含有一个或者多个人类抗原结合序列(例如,互补决定区域)并且含有一个或者多个来自于一种非人类抗体的序列,例如,一种骨架区域(FR)序列或者恒定(C)区域序列。除此之外,本发明中主要感兴趣的嵌合抗体包括这样的抗体:其包括一种抗体类型或者亚类型中的人类可变结构域抗原结合序列以及另外一种序列,例如,骨架区域(FR)序列或者恒定(C)区域序列,其中所述的另外一种序列来自于另外一种抗体类型或者亚类型。本发明中感兴趣的嵌合抗体同样包括这样的抗体:其含有与本发明中所描述的那些物种相关的可变结构域抗原结合序列或者来自于一个不同物种的可变结构域抗原结合序列,其中所述的不同物种是例如一种非人类的灵长类(例如,旧大陆猴(Old World Monkey),猿,等等)。嵌合抗体同样包括灵长类源化的抗体以及人源化的抗体。

[0104] 此外,嵌合抗体中可以包括那些没有在所述的受体抗体或者所述的供体抗体中发现的残基。进行这样的修饰来进一步的提高抗体的性能。更多的细节可以参见 Jones 等人(于 1986 年)在 Nature《自然》321:522-525 中发表的文章;Riechmann 等人(于 1988 年)在 Nature《自然》332:323-329 中发表的文章;以及 Presta(于 1992 年)在 Curr. Op. Struct. Biol.《结构生物学的现代观点》2:593-596 中发表的文章。

[0105] “人源化的抗体”一般而言被认为是一种人类抗体,所述的抗体中含有一个或者多个被导入其中的氨基酸残基,这些氨基酸残基来自于一种非人类的来源。这些非人类的氨基酸残基通常被称为“输入性”残基,它们通常是从一个“输入性”可变结构域中获取的。传统意义上,人源化过程是按照 Winter 及其共同合作者提供的方法来完成的(参见 Jones 等人(于 1986 年)在 Nature《自然》321:522-525 中发表的文章;Reichmann 等人(于 1988 年)在 Nature《自然》332:323-327 中发表的文章;Verhoeyen 等人(于 1988 年)在 Science《科学》239:1534-1536 中发表的文章),通过使用输入性高变区域序列对一种人类抗体中的所述相应序列进行替代。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 No. 4816567),其中,本质上不足一个完整的人类可变结构域已经被来自于一个非人类物种的相应序列进行了替代。

[0106] “人类抗体”是这样的一种抗体:在所述的抗体中仅含有由人类天然产生的序列。然而,在本发明中所使用到的人类抗体中可以包括没有在天然存在的人类抗体中发现的残基或者修饰,包括本发明中所描述的那些修饰以及变体序列。它们通常是为了进一步的提高或者增强抗体的性能而进行的。

[0107] “完整的”抗体指的是一种包括一个抗原结合位点以及一个轻链恒定结构域(C_L)以及具有至少重链恒定结构域 1、重链恒定结构域 2 和重链恒定结构域 3 的重链恒定结构域(C_H)。所述的恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人类天然序列恒定结构域)或者是上述结构域的氨基酸序列变体。优选的,所述的完整的抗体具有一种或者多种效应器功能。

[0108] “抗体片段”包括完整抗体中的一部分,优选的包括所述完整抗体中的抗原结合区域或者可变区域。抗体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 以及 Fv 片段;双功能抗体;线性抗体(参见美国专利 No. 5641870;Zapata 等人[于 1995 年]在 Protein Eng.《蛋白质工程》8(10):1057-1062 中发表的文章);单链抗体分子;以及从抗体片段中形成的多重特

异性抗体。

[0109] 所述的术语抗体的“功能性片段或者类似物”指的是一种化合物,所述的化合物具有与一种完整长度的抗体相同的定性的生物学活性。例如,一种抗免疫球蛋白 E 抗体的功能性片段或者类似物指的是这样的一种物质:其能够以一种方式与一种 IgE 免疫球蛋白进行结合,从而阻止或者本质上减小这样的分子所具有的能力,使其不具有与所述的高亲和性受体 $Fc_\epsilon RI$ 进行结合的能力。

[0110] 抗体的木瓜蛋白酶消化反应生成了两个相同的抗原结合片段,被称为“Fab”片段,以及一个残留的“Fc”片段,其名称能够容易的反映出其具有的结晶能力。所述的 Fab 片段由一条完整的轻链与所述的重链的可变区域结构域 (V_H),以及一条重链的第一个恒定结构域 (C_{H1}) 构成。每一个 Fab 片段就抗原的结合而言是单价的,即,所述的片段具有单一的抗原结合位点。对抗体进行的胃蛋白酶处理能够生成一个单一的大的 $F(ab')_2$ 片段,所述的片段与两个通过二硫键连接的 Fab 片段大致相符,并且仍然能够对抗原进行交叉结合,其中所述的 Fab 片段具有二价的抗原结合活性。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于在其第一个重链恒定结构域的所述羧基末端上具有额外的几个残基,其中包括来自于所述的抗体铰链区域的一个或者多个半胱氨酸。在本发明中, Fab' -SH 是对一种 Fab' 的命名,在所述的 Fab' 中,存在于所述的恒定结构域中的半胱氨酸残基上承担了一个游离的硫醇基团。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为 Fab' 片段对儿来制备的,在所述的 Fab' 片段对儿之间存在铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联同样是已知的。

[0111] 所述的“Fc”片段包括所述的两个重链的羧基末端部分,这两个羧基末端部分通过二硫键被连接在一起。所述抗体的效应器功能是由存在于所述的 Fc 区域内的序列来决定的,在某些类型的细胞中,发现所述的区域还是所述的 Fc 受体 (FcR) 识别的部分。

[0112] “Fv”是含有一个完整的抗原识别以及抗原结合位点的最小的抗体片段。这一片段是由一个重链可变区域结构域与一个轻链可变区域结构域的二聚物构成的,其中所述的重链可变区域结构域与所述的轻链可变区域结构域之间存在着一种紧密的、非共价的结合。通过这样两个结构域的折叠能够形成六个高变环(分别有三个环来自于所述的重链以及所述的轻链),所述的高变环构成了用于进行抗原结合的所述的氨基酸残基并且将抗原结合特异性传递给所述的抗体。然而,即使单个的可变结构域(或者是一个 Fv 的一半,仅仅包括三个对抗原具有特异性的互补决定区域)也具有识别以及结合抗原的能力,尽管其所具有的亲和性比所述的完整的结合位点低。

[0113] “单链 Fv”同样被缩略表示为“sFv”或者“scFv”,指的是一种抗体片段,其中包括连接成为单个的多肽链的重链可变抗体结构域以及轻链可变抗体结构域。优选的,所述的单链 Fv 多肽进一步的包括一个多肽连接物,存在于所述的重链可变结构域与所述的轻链可变结构域之间,其能够使所述的单链 Fv 形成为进行抗原的结合所期望的结构。对于单链 Fv 进行的回顾,可参见 Pluckthun(于 1994 年)在 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 《单克隆抗体的药理学》第 113 卷第 269-315 页中发表的文章,Rosenburg 以及 Moore 编辑, Springer-Verlag, 纽约;Borrebaeck 于 1995 年发表的文章,具体见下。

[0114] 所述的术语“双功能抗体”指的是小的抗体片段,所述的抗体片段是通过这样的方法来制备的:构建一种单链 Fv 片段(参见前述的段落),在所述的片段中在所述的重链可变结构域与所述的轻链可变结构域之间使用短小的连接物(大约 5-10 个残基),这样一来,

可以完成所述可变结构域的链间配对而不是链内配对,从而得到一个二价的片段,即,含有两个抗原结合位点的片段。具有双重特异性的双功能抗体是两个“交叉的”单链 Fv 片段的异型二聚体,其中所述的两个抗体中的重链可变结构域以及轻链可变结构域存在于不同的多肽链上。双功能抗体在例如下述的文献中有更加完整的描述:EP404097;W093/11161;以及 Hollinger 等人(于 1993 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci.《美国科学院院刊》90:6444-6448 中发表的文章。

[0115] 在本发明中所使用到的一种“被内在化的”抗体指的是当与存在于一种哺乳动物细胞之上的抗原(例如,一种细胞表面多肽或者受体)进行结合时,所述的抗体被所述的细胞所接纳(taken up)(即,侵入)。所述的被内在化的抗体将理所应当的包括抗体片段,人类抗体或者嵌合抗体,以及抗体偶联物。对于某些治疗用途而言,体内的内在化是可以预期的。所述的被内在化的所述抗体的数量应当足以或者足够杀灭细胞或者抑制其生长,所述的细胞特别是一种被感染的细胞。在一些情形下,根据所述的抗体或者抗体偶联物所具有的效能,一种单个的抗体分子在所述的细胞之内的吸收(uptake)足以杀灭所述的抗体结合的目标细胞。例如,某些毒素在杀伤方面具有很高的效能,这样一来,与所述的抗体发生偶联的所述毒素的一个分子的内在化作用足以杀灭所述的被感染细胞。

[0116] 当在本发明中进行使用时,如果一个抗体能够以一种可探测性的水平与一种抗原进行反应,那么我们说这个抗体对于所述的抗原而言是具有“免疫特异性的”,“具有特异性的”或者“发生了特异性的结合”,优选的,具有大于或者等于大约 10^4M^{-1} 的亲合性常数 K_a ,或者具有大于或者等于大约 10^5M^{-1} 的亲合性常数 K_a ,具有大于或者等于大约 10^6M^{-1} 的亲合性常数 K_a ,具有大于或者等于大约 10^7M^{-1} 的亲合性常数 K_a ,或者具有大于或者等于大约 10^8M^{-1} 的亲合性常数 K_a 。一种抗体对于与其相应的抗原所具有的亲合性通常也使用解离常数 K_d 来表示,并且在某些实施方式中,如果人类基质 2 蛋白细胞外结构域(HuM2e)抗体以小于或者等于 10^{-4}M 的解离常数 K_d 进行结合,以小于或者等于 10^{-5}M 的解离常数 K_d 进行结合,以小于或者等于 10^{-6}M 的解离常数 K_d 进行结合,以小于或者等于 10^{-7}M 的解离常数 K_d 进行结合,或者以小于或者等于 10^{-8}M 的解离常数 K_d 进行结合,则所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体能够特异性的结合基质 2 蛋白细胞外结构域(M2e)。使用常规的技术可以容易的测定抗体的亲合性,其中所述的技术是,例如,那些在 Scatchard 等人((于 1949 年)在 Ann. N. Y. Acad. Sci. USA《美国纽约科学院年报》51:660 中)发表的文章中所描述的技术。

[0117] 一般而言,可以使用免疫探测方法对一种抗体针对抗原、细胞或其组织所具有的结合性质进行测定以及评价,其中所述的免疫探测方法包括,例如,基于免疫荧光检验法的检测,例如免疫-组织化学法(IHC)和/或荧光激活的细胞分拣器(FACS)。

[0118] 具有一种指定抗体的“生物学特性”的抗体指的是这样的抗体:其拥有所述的指定抗体所具有的一种或者多种生物学特性,这使得所述的抗体区别于其他的抗体。例如,在某些实施方式中,一个带有一种指定抗体的生物学特性的抗体将在与所述的指定抗体所结合的表位相同的表位上进行结合和/或与所述的指定抗体具有共同的效应器功能。

[0119] 所述的术语“拮抗”抗体以其最宽泛的意义来进行使用,并且包括这样的抗体,所述的抗体能够对与其进行特异性的结合的表位、多肽、或者细胞所具有的生物学活性进行部分的或者完全的阻滞、抑制、或者中和。用于对拮抗抗体进行识别的方法可以包括:使能够与一种待测的拮抗抗体进行特异性结合的多肽或者细胞与所述的待测拮抗抗体进行接

触,并且对正常情况下与所述的多肽或者细胞相关的一种或者多种生物学活性发生的可探测性的变化进行测量。

[0120] 一种“能够对所述被感染的细胞的生长进行抑制的抗体”或者一种“生长抑制性”抗体指的是这样的抗体:所述的抗体与被感染的细胞进行结合并且对所述的被感染细胞产生了可测量的生长抑制,其中所述的被感染细胞表达了或者能够表达一种基质 2 蛋白细胞外结构域表位,所述的基质 2 蛋白细胞外结构域表位与所述的抗体进行结合。与所述的适宜的对照相比,优选的生长抑制性抗体能够以高于 20% 的程度对被感染细胞的生长进行抑制,优选的以大约 20% 至大约 50% 的程度,并且甚至更加优选的,以高于 50% 的程度(例如,从大约 50% 至大约 100%),其中所述的对照通常是指没有经过所述的受试抗体的处理的被感染细胞。可以在大约 0.1 至 30 微克/毫升或者大约 0.5 纳摩至 200 纳摩的抗体浓度条件下对生长抑制进行测量,其中所述的抗体是存在于细胞培养液中的,其中,在将所述的被感染细胞暴露于所述的抗体之下的 1-10 天之后,对所述的生长抑制进行测定。可以使用本领域已知的各种不同的方式对被感染细胞的生长抑制进行体内测定。如果以大约 1 微克/千克至大约 100 毫克/千克体重的水平施用所述的抗体能够导致所述被感染细胞的百分含量或者被感染细胞的全部数量的减少,其中所述的减少发生在从第一次施用所述抗体开始的大约 5 天至三个月内,优选的为大约 5 天至 30 天,则所述的抗体具有体内的生长抑制性。

[0121] 一种能够“诱导细胞凋亡”的抗体指的是这样的抗体:所述的抗体能够诱导程序性细胞死亡,这种程序性细胞死亡是通过磷脂结合蛋白 annexin V 的结合、DNA 的断裂、细胞的收缩、内质网的膨胀、细胞的断裂、和/或膜囊(被称为细胞凋亡机体)的形成来确定的。优选的所述的细胞是一种被感染的细胞。可以利用各种不同的方法对所述的与细胞凋亡有关的细胞事件进行评价。例如,可以通过磷脂结合蛋白 annexin 的结合来测量磷脂酰丝氨酸(PS)的迁移;可以通过 DNA 梯状条带对 DNA 的断裂进行评价;并且可以通过亚二倍细胞的任何增加对连同 DNA 的断裂一起的核/染色质的浓缩进行评价。优选的,所述的能够诱导细胞凋亡的抗体是这样的抗体:在一项磷脂结合蛋白 annexin 结合检测中,相对于未经处理的细胞而言,能够以大约 2 至 50 倍的水平进行磷脂结合蛋白 annexin 结合的诱导的抗体,优选的为大约 5 至 50 倍,并且最为优选的为大约 10 至 50 倍。

[0122] 抗体的“效应器功能”指的是那些归因于一种抗体的 Fc 区域(一个天然序列的 Fc 区域或者氨基酸序列变化的 Fc 区域)的生物学活性并且随着所述的抗体同型体而发生变化。抗体的效应器功能的例子包括:血清补体 C1q 的结合以及补体依赖性细胞毒性作用;Fc 受体的结合;抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC);噬菌作用;细胞表面受体(例如,B 细胞受体)的去调节;以及 B 细胞的活化作用。

[0123] “抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用”或者“ADCC”指的是细胞毒性作用的一种形式,在所述的细胞毒性作用中,与存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞,嗜中性粒细胞,以及巨噬细胞)之上的 Fc 受体(FcR)进行结合的分泌的免疫球蛋白(Ig)能够使这些细胞毒性效应器细胞与一种承载抗原的目标细胞发生特异性的结合并且随后利用细胞毒素杀灭所述的目标细胞。所述的抗体“环抱”所述的细胞毒性细胞并且这种环抱对于这样的杀灭而言是必需的。用于介导抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)的首要细胞——自然杀伤细胞,仅仅表达 Fc γ 受体 III(Fc γ RIII),而单核细胞表达 Fc γ 受体

I, Fc γ 受体 II 以及 Fc γ 受体 III。在 Ravetch 以及 Kinet (于 1991 年) 在 Annu. Rev. Immunol 《免疫学年度回顾》9 :457-92 中发表的文章中第 464 页的表格 3 中概括了发生在造血细胞上的 Fc 受体的表达。为了对一个感兴趣的分子的抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 活性进行评价, 可以进行一项体外抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 检测, 例如在美国专利 No. 5500362 或者美国专利 No. 5821337 中所描述的检测。可以有效的用于这样的检测中的效应器细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 以及自然杀伤 (NK) 细胞。可以选择的, 或者除此之外的, 可以在例如一种动物模型中对所述的感兴趣的分子所具有的抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 活性进行体内评价, 例如在 Clynes 等人 (于 1998 年) 在 PNAS (USA) 《美国科学院院刊》95 :652-656 中发表的文章中所描述的。

[0124] “Fc 受体”或者“FcR”描述的是一种与一个抗体的 Fc 区域进行结合的受体。在某些实施方式中, 所述的 Fc 受体是一种天然序列的人类 Fc 受体。而且, 一种优选的 Fc 受体指的是这样的受体: 所述的受体与一种免疫球蛋白 G 抗体 (一种 γ 受体) 进行结合并且包括所述的 Fc γ 受体 I、Fc γ 受体 II、以及 Fc γ 受体 III 亚类型的受体, 包括这些受体的等位基因变体并且可以选择的包括这些受体的剪接形式。Fc γ 受体 II 受体包括 Fc γ 受体 IIA (一种“活化受体”) 以及 Fc γ 受体 IIB (一种“抑制受体”), 两者具有类似的氨基酸序列, 所述的氨基酸序列的主要区别之处在于它们的细胞质结构域。活化受体 Fc γ 受体 IIA 在其细胞质结构域中含有一个基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体在其细胞质结构域中含有一个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(参见 Daeron (于 1997 年) 在 Annu. Rev. Immunol 《免疫学年度回顾》15 :203-234 中发表的文章中的回顾 M.)。在下述文章中对 Fc 受体进行了回顾: Ravetch 以及 Kinet (于 1991 年) 在 Annu. Rev. Immunol 《免疫学年度回顾》9 :457-92 中发表的文章; Capel 等人 (于 1994 年) 在 Immunomethods 《免疫学方法》4 :25-34 中发表的文章; 以及 de Haas 等人 (于 1995 年) 在 J. Lab. Clin. Med. 《试验室药理学与临床药理学杂志》126 :330-41 中发表的文章。其他的 Fc 受体, 包括那些将在未来被识别的 Fc 受体, 被涵盖在本发明所述的术语“Fc 受体”的范围之内。所述的术语同样包括所述的新生儿受体 FcRn, 其中所述的新生儿受体负责将所述的母体免疫球蛋白 G 递送到所述的胎儿中 (参见 Guyer 等人 (于 1976 年) 在 J. Immunol. 《免疫学杂志》117 :587 中发表的文章以及 Kim 等人 (于 1994 年) 在 J. Immunol. 《免疫学杂志》24 :249 中发表的文章)。

[0125] “人类效应器细胞”是一种白细胞, 所述的白细胞能够表达一种或者多种 Fc 受体并且执行效应器功能。优选的, 所述的细胞至少表达 Fc γ 受体 III 并且执行抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 的效应器功能。能够介导抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 的人类白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC), 自然杀伤 (NK) 细胞, 单核细胞, 细胞毒性 T 细胞以及嗜中性粒细胞; 外周血单核细胞以及自然杀伤细胞是优选的。所述的效应器细胞可以从一种天然的来源中被分离得到, 例如从血液中被分离得到。

[0126] “补体依赖性细胞毒性作用”或者“CDC”指的是在有所述的补体存在的情况下一种目标细胞的溶解。经典的补体途径的活化作用是通过所述的补体系统的第一种组分 (C1q) 与 (具有适宜亚类型的) 抗体之间进行的结合来触发的, 其中所述的抗体同与其相应的抗原发生了结合。为了对补体的活化作用进行评价, 可以进行一种补体依赖性细胞毒性作用 (CDC) 检测, 例如, 在 Gazzano-Santoro 等人 (于 1996 年) 在 J. Immunol. Methods 《免疫学

方法杂志》202 :163 中发表的文章中所描述的检测。

[0127] 所述的术语“流行性感冒 A”以及“流行性感冒病毒 A”指的是所述的正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 家族病毒的一个种。流行性感冒病毒 A 仅仅包括一个种类 : 流行性感冒 A 病毒, 所述的病毒在鸟类、人类、猪、以及马中引发流行性感冒。已经从野生鸟类中分离得到流行性感冒 A 病毒的所有亚类型菌株, 尽管这一疾病是罕见的。流行性感冒 A 病毒的一些分离株能够在家养家禽以及人类中引发严重的疾病, 尽管在人类中引发疾病是罕见的。

[0128] 以治疗一种感染为目的所使用到的“哺乳动物”指的是任何的哺乳动物, 包括人类, 家养动物以及农场动物, 以及动物园动物, 竞技动物, 或者宠物动物, 例如狗, 猫, 牛, 马, 绵羊, 猪, 山羊, 兔, 等等。优选的, 所述的哺乳动物是人类。

[0129] “治疗”或者“处理”或者“缓解”指的是治疗性的处理以及预防性的或者防治性的措施 ; 其中所述的目标是对所针对的病理学病症或者障碍进行预防或者减缓 (减轻) 。那些需要接受治疗的对象包括那些已经患有所述障碍的对象以及那些倾向于患有所述障碍的对象或者那些在其身上防治了所述障碍的发生的对象。在依照本发明中所述的方法接受了一种治疗剂量的抗体之后, 如果所述的患者在一个或者多个下述的方面中表现出了可以观察到的和 / 或可以测量到的减少或者消失, 则表明所述的宿主或者哺乳动物的感染被成功的“治疗”了, 其中所述的一个或者多个方面是 : 所述的被感染细胞的数量减少或者所述的被感染细胞的消失 ; 所述的被感染的细胞总数的百分含量的减少 ; 和 / 或在一定程度上对一种或者多种与所述的具体感染相关的症状的缓解 ; 发病率以及死亡率的降低, 以及生活质量的提高。可以通过内科医师熟知的常规步骤, 容易的对上述的参数进行测量, 用以对所述疾病的成功治疗以及疾病的改善进行评价。

[0130] 所述的术语“治疗有效剂量”指的是一种抗体或者一种药物的剂量, 所述的剂量能够有效的“治疗”宿主或者哺乳动物体内的疾病或者障碍。参见前述对于“治疗”的定义。

[0131] “慢性”施用指的是以一种连续的方式进行所述试剂的施用, 是与急性的方式相对的, 这样一来能够在一段长期的时间段内维持最初的治疗效应 (活性) 。“间歇性”施用指的是不是以不经中断的连续方式完成的治疗, 而实质上是周期性的。

[0132] 与一种或者多种其他的治疗试剂“一同”施用包括同时 (并发) 施用以及以任意的顺序依次施用。

[0133] 在本发明中所使用到的“载体”包括药物可接受性载体, 赋形剂, 或者稳定剂, 其中所述的药物可接受性载体、赋形剂或者稳定剂在以其所使用的所述剂量以及浓度的水平下, 对于暴露在其中的所述细胞或者哺乳动物而言是无毒的。通常所述的生理学可接受性载体是一种水性的 pH 缓冲溶液。生理学可接受性载体的例子包括缓冲剂例如磷酸盐, 柠檬酸盐, 以及其他的有机酸 ; 抗氧化剂包括抗坏血酸 ; 低分子量 (小于大约 10 个残基) 多肽 ; 蛋白质, 例如血清白蛋白, 凝胶, 或者免疫球蛋白 ; 亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮 ; 氨基酸例如甘氨酸, 谷氨酸盐, 天冬酰胺, 精氨酸或者赖氨酸 ; 单糖, 二糖, 以及其他的碳水化合物包括葡萄糖, 甘露糖, 或者糊精 ; 螯合试剂例如乙二胺四乙酸 (EDTA) ; 糖醇例如甘露醇或者山梨醇 ; 形成盐的反义离子例如钠 ; 和 / 或非离子表面活性剂例如 TWEEN™ 聚乙二醇 (PEG), 以及 PLURONICS™。

[0134] 在本发明中所使用到的所述术语“细胞毒性试剂”指的是一种能够对所述细胞的

功能进行抑制或者预防的物质和 / 或能够引发细胞的破坏的物质。所述的术语意在包括放射性同位素 (例如, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 以及 Lu 的放射性同位素), 化学治疗剂, 例如, 甲氨蝶呤 (methotrexate), 亚德里亚霉素 (adriamycin), 长春花碱 (vinca alkaloid) (长春新碱, 长春碱, 依托泊甙), 多柔比星 (doxorubicin), 美法仑 (melphalan), 丝裂霉素 C, 苯丁酸氮芥 (chlorambucil), 道诺霉素 (daunorubicin) 或者其他的插入剂, 酶及其片段例如核水解酶, 抗生素, 以及毒素例如小分子毒素或者来源于细菌、真菌、植物或者动物的具有酶学活性的毒素, 包括它们的片段和 / 或变体, 以及将在下面被公开的所述的各种不同的抗肿瘤试剂或者抗癌剂试剂。其他的细胞毒性试剂将在下面进行描述。

[0135] 当在本发明中进行使用时, 一种“生长抑制性试剂”指的是一种能够在体外或者体内抑制细胞生长的化合物或者组合物。生长抑制性试剂的例子包括那些能够阻止细胞周期的进行的试剂, 例如能够诱导 G1 阻滞以及 M 期阻滞的试剂。经典的 M 期阻滞剂包括所述的长春花碱 (长春新碱, 长春瑞滨以及长春碱), 紫杉烷类 (taxanes), 以及拓扑异构酶 II 抑制剂例如多柔比星, 表柔比星 (epirubicin), 道诺霉素, 依托泊甙 (etoposide), 以及博来霉素 (bleomycin)。那些阻滞 G1 的试剂同样溢出参与到 S 期阻滞, 例如, DNA 烷基化试剂例如它莫西芬 (tamoxifen), 强的松 (prednisone), 氮烯咪胺 (dacarbazine), 二氯甲基二乙胺, 顺铂 (cisplatin), 甲氨蝶呤, 5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil), 以及胞嘧啶阿拉伯糖苷 (ara-C)。进一步的信息可以在 Mendelsohn 以及 Israel 编辑的 The Molecular Basis of Cancer 《癌症的分子原理》第 1 章中找到, 第 1 章中由 Murakami 等人发表的名称为 “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs 《细胞周期调节、致癌基因、以及抗肿瘤药物》” 的文章 (W B Saunders : 费城, 1995 年), 特别是第 13 页。所述的紫杉烷类 (紫杉醇以及多烯紫杉醇) 均是来自于所述的紫杉树的抗癌剂药物。来自于所述的欧洲紫杉的多烯紫杉醇 (Docetaxel) (TAXOTERETM, Rhone-Poulenc Rorer) 是紫杉醇 (paclitaxel) (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb) 的一种半合成类似物。紫杉醇以及多烯紫杉醇促进了来自于所述的微管蛋白二聚物的微管的组配并且通过防止解聚作用对微管进行稳定化, 这导致了对所述细胞的有丝分裂产生的抑制作用。

[0136] 在本发明中所使用到的“标记物”指的是一种可探测性的化合物或者组合物, 其中所述的化合物或者组合物直接或者间接的与所述的抗体发生偶联, 从而生成一种“被标记的”抗体。所述的标记物本身可以是具有可探测性的 (例如, 放射性同位素标记物或者荧光素标记物), 或者, 在一种酶标记物的情况下, 所述的标记物可以催化一种底物化合物或者组合物的化学变化, 这种化学变化是具有可探测性的。

[0137] 在本发明中所使用到的所述术语“附加表位”指的是一种嵌合型的多肽, 其中所述的多肽包括一个与一种“标签多肽”进行融合的多肽。所述的标签多肽 (tag polypeptide) 含有足够的残基来提供一种表位, 针对所述的表位可以进行一种抗体的制备, 但其又足够短小, 这样一来, 它不会对与其进行融合的所述多肽所具有的活性产生干扰。所述的标签多肽同样优选的是相当独特的, 这样一来, 所述的抗体在本质上不会与其他的表位发生交叉反应。适宜的标签多肽一般而言具有至少六个氨基酸残基并且通常具有大约 8 至 50 个氨基酸残基 (优选的, 具有大约 10 至 20 个氨基酸残基)。

[0138] “小分子”在本发明中被定义为具有低于大约 500 道尔顿 (Dalton) 的分子量。

[0139] 所述的术语“核酸”以及“多核苷酸”在本发明中是交替使用的,指的是单链的或者双链的 RNA、DNA、或者混合的聚合物。多核苷酸可以包括基因组序列,另外的基因组以及质粒序列,以及较小的工程化基因片段,其中所述的工程化基因片段能够表达多肽,或者适合进行多肽的表达。

[0140] 一种“分离的核酸”指的是这样的核酸:所述的核酸本质上是与其他的基因组 DNA 序列以及蛋白或者复合体分离开来的,并且天然的伴随着一种天然序列,其中所述的复合体是例如核糖体以及聚合酶。所述的术语包含了一种被从其天然存在的环境中分离出来的核酸序列,并且包括重组的 DNA 分离物或者克隆的 DNA 分离物以及化学合成的类似物或者通过异源体系生物合成的类似物。一种本质上纯的核酸包括所述核酸的分离物形式。当然,这指的是最初被分离出的所述核酸并且不排除通过人为的操作在所述的分离的核酸中后期添加的基因或者序列。

[0141] 所述的术语“多肽”是以其常规的含义来进行使用的,即,是一种氨基酸序列。所述的多肽并不局限于一种具有特定长度的产物。肽、寡肽、以及蛋白被包含在所述多肽的定义的范围之内,并且除非另外特别指明,这些术语在本发明中是可以交替使用的。这一术语同样指的并不是所述多肽经过表达之后的修饰形式,或者并不排除所述多肽经过表达之后的修饰形式,其中所述的修饰是例如,糖基化,乙酰基化,磷酸化以及类似的修饰,以及本领域已知的天然发生的以及非天然发生的其他修饰。一种多肽可以是一个完整的蛋白质,或者是其中的一个序列。在本发明的上下文中感兴趣的特定多肽是包括互补决定区域(CDR)并且能够结合一种抗原或者感染有 A 型流行性感冒的细胞的氨基酸序列。

[0142] 一种“分离的多核苷酸”指的是这样的多核苷酸:所述的多核苷酸是从其天然环境的组分中被识别并且分离和/或回收得到的。在优选的实施方式中,所述的分离的多核苷酸被纯化至:(1) 超过 95% 的重量是多肽,这是通过所述的 Lowry 方法来测定的,并且最为优选的超过 99% 的重量;(2) 达到一定程度,使得通过使用转杯式序列分析仪(spinning cup sequenator)足以获得 N-末端氨基酸序列或者内部氨基酸序列中的至少 15 个残基;或者(3) 通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测具有均一性,其中所述的检测是在减压或者未减压条件下进行的,其中使用的是考马斯亮蓝染色或者优选的,使用银染色。分离的多肽包括本身存在于重组细胞内的所述多肽,因为所述多肽的天然环境中的至少一种组分将不复存在。然而,普遍而言,分离的多肽将通过至少一个纯化的步骤来进行制备。

[0143] 一种“天然序列”的多核苷酸指的是这样的多核苷酸:所述的多核苷酸与一种来自于天然的多核苷酸具有相同的核苷酸序列。一种“天然序列”的多肽指的是这样的多肽:所述的多肽与一种来自于天然(例如,来自于任何物种)的多肽(例如,抗体)具有相同的氨基酸序列。这样的天然序列的多核苷酸以及天然序列的多肽可以从天然中分离得到,或者可以通过重组方式或者合成方式制备得到。

[0144] 在本发明中所使用到的所述术语一种多核苷酸“变体”指的是这样的多核苷酸:所述的多核苷酸与本发明中具体公开的多核苷酸的典型不同之处在于其具有一个或者多个取代、缺失、添加和/或插入。这样的变体可以是天然发生的或者可以通过合成产生的,例如,通过下述方式:对本发明中所述的一种或者多种多核苷酸序列进行修饰并且对本发明中所描述的所述编码的多肽所具有的一种或者多种生物学活性进行评价和/或使用本

领域熟知的各种技术中的任意一种。

[0145] 在本发明中所使用到的所述术语一种多肽“变体”指的是这样的多肽：所述的多肽与本发明中具体公开的肽的典型不同之处在于其具有一个或者多个取代、缺失、添加和/或插入。这样的变体可以是天然发生的或者可以通过合成产生的，例如，通过下述方式：对本发明中所述的上述多肽序列进行修饰并且对本发明中所描述的所述多肽所具有的一种或者多种生物学活性进行评价和/或使用本领域熟知的各种技术中的任意一种。

[0146] 可以对本发明中所述的多核苷酸以及多肽所具有的结构进行修饰并且仍然能够获得一种功能性分子，所述的功能性分子编码一种具有期望的特征的变体多肽或者衍生多肽。当期望对一种多肽的氨基酸序列进行改变从而生成一种等价体，或者甚至生成一种本发明所述多肽的变体或者一部分时，本领域技术人员通常将对所述的编码 DNA 序列的一个或者多个密码子进行改变。

[0147] 例如，在一种蛋白质结构中，某些氨基酸可以被另外的氨基酸进行取代，而不会使其与其他多肽（例如，抗原）或者细胞进行结合的能力发生可估量的损失。由于一种蛋白所具有的结合能力以及性质定义了这种蛋白的生物学功能性活性，可以在一种蛋白序列中进行某些氨基酸序列的取代，并且，理所当然的，可以在基本的 DNA 编码序列中进行某些氨基酸序列的取代，并且仍然能够获得一种具有类似性质的蛋白质。因此可以预期到的是，可以在本发明公开的组合物的所述的肽序列中进行各种不同的改变，或者在编码所述肽的相应 DNA 序列中进行各种不同的改变，而不会使它们的生物学可利用性或者活性产生可估量的损失。

[0148] 在许多情形中，一种多肽变体将含有一个或者多个保守性的取代。一种“保守性的取代”指的是这样的取代：在所述的取代中，一个氨基酸被另外一个具有类似性质的氨基酸进行了取代，这样一来肽化学领域的技术人员将能够预料到所述的多肽所具有的二级结构以及亲水性质在本质上没有发生改变。

[0149] 在进行这样的改变时，所述的氨基酸所具有的亲水指数应当被考虑在内。所述的亲水性氨基酸指数在赋予蛋白质以相互反应的生物学功能方面所具有的重要性一般而言是本领域中能够理解的（参见 Kyte 以及 Doolittle 于 1982 年发表的文章）。已经公认的是，所述的氨基酸所具有的相对而言的亲水性质造就了由其所构成的蛋白的二级结构，所述的蛋白的二级结构继而定义了所述蛋白与其他分子之间的相互作用，其中所述的其他分子是例如，酶，底物，受体，DNA，抗体，抗原，以及类似的分子。根据其所具有的疏水性以及电荷特征为每一种氨基酸指定了一个亲水指数（参见 Kyte 以及 Doolittle 于 1982 年发表的文章）。这些数值为：异亮氨酸 (+4.5)；缬氨酸 (+4.2)；亮氨酸 (+3.8)；苯丙氨酸 (+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸 (+2.5)；蛋氨酸 (+1.9)；丙氨酸 (+1.8)；甘氨酸 (-0.4)；苏氨酸 (-0.7)；丝氨酸 (-0.8)；色氨酸 (-0.9)；酪氨酸 (-1.3)；脯氨酸 (-1.6)；组氨酸 (-3.2)；谷氨酸盐 (-3.5)；谷氨酰胺 (-3.5)；天冬氨酸盐 (-3.5)；天冬酰胺 (-3.5)；赖氨酸 (-3.9)；以及精氨酸 (-4.5)。

[0150] 本领域已知，某些氨基酸可以被具有类似的亲水指数或者亲水得分的其他氨基酸进行取代并且仍然能够产生一种具有类似的生物学活性的蛋白质，即，仍然能够获得一种生物学功能等价的蛋白质。在进行这样的改变时，发生在亲水指数在 ± 2 的范围之内的氨基酸之间的取代是优选的，那些发生在亲水指数在 ± 1 的范围之内的氨基酸之间的取代

是格外优选的,并且那些发生在亲水指数在 ± 0.5 的范围之内的氨基酸之间的取代甚至是更加格外优选的。本领域同样能够理解的是,可以根据亲水性质有效的进行所述的相似氨基酸之间的取代。美国专利 4554101 中陈述到:一种蛋白质所具有的最大的局部平均亲水性与所述蛋白质所具有的生物学性质有关联,其中所述的最大的局部平均亲水性是由其邻近的氨基酸所具有的亲水性来掌控的。

[0151] 正如在美国专利 4554101 中详细描述,给氨基酸残基指定了下述的亲水性数值:精氨酸 (+3.0);赖氨酸 (+3.0);天冬氨酸盐 (+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸盐 (+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸 (+0.3);天冬酰胺 (+0.2);谷氨酰胺 (+0.2);甘氨酸 (0);苏氨酸 (-0.4);脯氨酸 (-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸 (-0.5);组氨酸 (-0.5);半胱氨酸 (-1.0);蛋氨酸 (-1.3);缬氨酸 (-1.5);亮氨酸 (-1.8);异亮氨酸 (-1.8);酪氨酸 (-2.3);苯丙氨酸 (-2.5);色氨酸 (-3.4)。应当被理解的是,一种氨基酸可以被另外一种具有类似的亲水性数值的氨基酸进行取代并且仍然能够获得一种生物学等价的蛋白质,并且特别的,获得一种免疫学等价的蛋白质。在这样的改变中,发生在亲水指数在 ± 2 的范围之内的氨基酸之间的取代是优选的,那些发生在亲水指数在 ± 1 的范围之内的氨基酸之间的取代是格外优选的,并且那些发生在亲水指数在 ± 0.5 的范围之内的氨基酸之间的取代甚至是更加格外优选的。

[0152] 正如上文中所概括的,因此,氨基酸的取代一般而言是依据所述的氨基酸测量取代基所具有的相对而言的相似性来进行的,例如,它们所具有的疏水性、亲水性、电荷、大小、以及类似的性质。将上述各种不同的特征考虑在内的范例性的取代是本领域技术人员熟知的并且包括:精氨酸与赖氨酸;谷氨酸盐与天冬氨酸盐;丝氨酸与苏氨酸;谷氨酰胺与天冬酰胺;以及缬氨酸,亮氨酸与异亮氨酸。

[0153] 可以进一步的依据下述情况进行氨基酸的取代,所述的情况是:极性的相似度,电荷的相似度,溶解性的相似度,疏水性的相似度,亲水性的相似度和/或所述残基所具有的两性性质。例如,负性带电的氨基酸包括天冬氨酸以及谷氨酸;正性带电的氨基酸包括赖氨酸以及精氨酸;并且,具有类似的亲水性数值的、带有不带电荷的极性顶端基团的氨基酸包括亮氨酸,异亮氨酸与缬氨酸;甘氨酸与丙氨酸;天冬酰胺与谷氨酰胺;以及丝氨酸,苏氨酸,苯丙氨酸与酪氨酸。可以代表保守性的改变的其他氨基酸组包括:(1) 丙氨酸,脯氨酸,甘氨酸,谷氨酸,天冬氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,丝氨酸,苏氨酸;(2) 半胱氨酸,丝氨酸,酪氨酸,苏氨酸;(3) 缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,蛋氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸;(4) 赖氨酸,精氨酸,组氨酸;以及(5) 苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸,组氨酸。一种变体同样可以包括,或者可以选择性的,含有非保守性的改变。在一种优选的实施方式中,变体多肽与一种天然序列之间的不同之处在于五种氨基酸或者更少的氨基酸发生的取代、缺失或者添加。同样可以(或者可以选择性的)利用下述方式对变体进行修饰,例如,进行氨基酸的缺失或者添加,其中所述的氨基酸对于所述多肽所具有的免疫原性、二级结构以及亲水性质能够产生最小程度的影响。

[0154] 多肽可能在所述的蛋白质的 N-末端端点上包括一个信号(或者前导)序列,其中所述的信号(或者前导)序列在翻译时或者在经过翻译之后导致了所述蛋白质的转移。为了便于进行所述多肽(例如,聚组氨酸)的合成、纯化或者识别,或者为了增强所述多肽与一种固体支持物之间的结合,所述的多肽同样可以与一种连接物或者其他序列进行偶联。例如,一种多肽可以与一种免疫球蛋白 Fc 区域进行偶联。

[0155] 在对多核苷酸序列以及多肽序列进行比较时,按照下文中的描述,当以最大的一致程度进行比对 (align) 时,如果存在于所述的两个序列中的核苷酸序列或者氨基酸序列是相同的,则我们说所述的两个序列是“具有同一性的”。在两个序列之间进行的比较通常是通过下述方式来进行的:在一段比较视窗内 (comparison window) 对所述的序列进行比较,从而识别并且比较序列的局部区域的相似度。在本发明中所使用到的“比较视窗”指的是一个具有至少大约 20 个连续位置的片段,通常为 30 至大约 75 个,40 至大约 50 个,其中可以将一个序列与一个具有相同数量的连续位置的参考序列进行比较,所述的比较发生在将所述的两个序列进行最佳比对之后。

[0156] 为了进行比较,可以使用下述方式实现序列的最佳比对:使用所述的 Lasergene suite 生物信息学软件 (DNASTAR, Inc., 麦迪逊, 威斯康星州) 中的 Megalign 程序,其中使用默认的参数。这种程序中包含了几种比对方案,所述的比对方案在下述参考文献中进行了描述:Dayhoff, M. O. (于 1978 年) 发表的文章 A Model of evolutionary change in proteins——Matrices for detecting distant relationships 《一种蛋白质的进化变化的模型——用以探测远距离关系的基础》,发表于 Dayhoff, M. O. (编辑的) Atlas of Protein Sequence and Structure 《蛋白质序列以及结构地图》, National Biomedical Research Foundation 国家生物医学研究基金会, Washington DC 华盛顿, 第 5 卷, 第 3 增刊, 第 345-358 页;Hein J. (于 1990 年) 发表的文章 Unified Approach to Alignment and Phylogenesis 《比对与种系基因的统一方法》第 626-645 页, Methods in Enzymology 《酶学方法》第 183 卷, Academic Press, Inc., 学术出版社有限公司, San Diego 圣地亚哥, CA 加利福尼亚;Higgins, D. G 以及 Sharp, P. M. (于 1989 年) 在 CABIOS 《生物科学中的计算机应用》5:151-153 中发表的文章;Myers, E. W. 以及 Muller W. (于 1988 年) 在 CABIOS 《生物科学中的计算机应用》4:11-17 中发表的文章;Robinson, E. D. (于 1971 年) 在 Comb. Theor 《组合理论杂志》11:105 中发表的文章;Santou, N. Nes, M. (于 1987 年) 在 Mol. Biol. Evol. 《分子生物学与进化论》4:406-425 中发表的文章;Sneath, P. H. A. 以及 Sokal, R. R. (于 1973 年) 发表的文章 Numerical Taxonomy——the Principles and Practice of Numerical Taxonomy 《数字分类法——数字分类法的原则与实践》, Freeman Press, Freeman 出版社, San Francisco 旧金山, CA 加利福尼亚;Wilbur, W. J. 以及 Lipman, D. J. (于 1983 年) 在 Proc. Natl. Acad., USA 《美国科学院院刊》80:726-730 中发表的文章。

[0157] 可以选择的,为了进行比较,可以通过下述的方式实现序列的最佳比对:通过 Smith 以及 Waterman (于 1981 年) 在 Adv. APPL. Math 《应用数学的研究进展》2:482 中发表的文章中记载的局部同一性运算法则的方式,通过 Needleman 以及 Wunsch (于 1970 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》48:443 中发表的文章中记载的同一性比对运算法则的方式,通过 Pearson 以及 Lipman (于 1988 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》85:2444 中发表的文章中记载的对于相似度方法的检索的方式,通过这些运算法则 (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 以及 TFASTA, 存在于所述的 Wisconsin Genetics Software Package 威斯康星州遗传学软件包中, Genetics Computer Group 遗传学计算机小组 (GCG), 575 Science Dr., 麦迪逊, 威斯康星州) 的计算机执行的方式,或者通过检查的方式。

[0158] 适合用来确定序列的同一性百分数以及序列的相似度的运算法则中的一个优选的例子是所述的 BLAST (基础局部比对检查工具) 运算法则以及 BLAST2.0 运算法则,上

述的运算法则分别在 Altschul 等人（于 1977 年）在 Nucl. Acids Res. 《核酸研究》25 : 3389-3402 中发表的文章中有所描述, 以及在 Altschul 等人（于 1990 年）在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》215 : 403-410 中发表的文章中有所描述。BLAST(基础局部比对检查工具) 以及 BLAST2.0 可以与例如本发明中描述的所述参数一同进行使用, 从而为本发明中所述的多核苷酸以及多肽确定序列同一性百分数。执行 BLAST(基础局部比对检查工具) 分析的软件是公众可以经由 National Center for Biotechnology Information 国家生物技术信息中心处获得的。

[0159] 在一种描述性的实施例中, 对于核苷酸序列而言, 可以使用所述的参数 M(一对匹配的残基所带来的得分 ; 总是 > 0) 以及 N(由于错配的残基所带来的罚分 ; 总是 < 0) 对累计的得分进行计算。当出现下列情况时, 所述的词语在每一个方面中所涉及的范围被终止 : 由于所述的 X 的数量, 使得所述的累计的比对得分从其最高达到的数值处滑落 ; 由于所述的一个或者多个负性得分的残基比对的累积, 使得所述的累计的得分达到零或者零以下 ; 或者是任何一个序列到达其末端。所述的 BLAST(基础局部比对检查工具) 运算法则的参数 W, T 以及 X 确定了所述比对的敏感性以及速度。所述的 BLASTN 程序 (用于核苷酸序列) 使用下列默认参数 : 字符串长度 (wordlength) (W) 为 11, 并且期望值 (expectation) (E) 为 10, 并且所述的 BLOSUM62 计分矩阵 (scoring matrix) (参见 Henikoff 以及 Henikoff (于 1989 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》89 : 10915 中发表的文章) 比对中, (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M = 5$, $N = -4$ 并且对两条链进行比较。

[0160] 对于氨基酸序列而言, 计分矩阵可以被用来计算所述的累计得分。当出现下列情况时, 所述的词语在每一个方面中所涉及的范围被终止 : 由于所述的 X 的数量, 使得所述的累计的比对得分从其最高达到的数值处滑落 ; 由于所述的一个或者多个负性得分的残基比对的累积, 使得所述的累计的得分达到零或者零以下 ; 或者是任何一个序列到达其末端。所述的 BLAST(基础局部比对检查工具) 运算法则的参数 W, T 以及 X 确定了所述比对的敏感性以及速度。

[0161] 在一种方式中, 所述的“序列的同一性百分数”是通过下述方式确定的 : 在一个具有至少 20 个位置的比较视窗内对两个经过最佳比对的序列进行比较, 其中为了对所述的两个序列进行最佳比对, 与所述的参考序列 (其中不包括添加或者缺失) 相比, 所述的多核苷酸序列或者多肽序列中存在于所述的比较视窗内的部分中可以包括 20% 或者更少的添加或者缺失 (即, 缺口), 通常为 5 至 15%, 或者 10 至 12%。所述的百分数是通过下述方式计算得到的 : 确定所述的位置的数量, 其中在所述的位置上, 两条序列具有相同的核酸碱基或者氨基酸残基, 从而得到了所述的匹配位置的数量, 将所述的匹配位置的数量除以存在于所述的参考序列中的所述位置的全部数量 (即, 视窗的大小) 并且将上述得到的结果乘以 100, 从而得到了所述的序列同一性百分数。

[0162] “同源性”指的是在经过序列的比对之后存在于所述的多核苷酸序列变体或者多肽序列变体中的与所述的非变体序列相同的残基的百分含量, 并且, 如果需要的话, 可以导入缺口从而得到最大程度的同源性百分数。在特定的实施方式中, 多核苷酸变体以及多肽变体与本发明中描述的一种多核苷酸或者多肽相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、或者至少 99% 的多核苷酸同源性或者多肽同源性。

[0163] “载体”包括穿梭载体以及表达载体。通常情况下, 所述的质粒构建体将同样包括

一种复制起点（例如，所述的 ColE1 复制起点）以及一种选择性的标记物（例如，氨苄西林或者四环素抗性），分别用于所述的质粒在细菌中的复制以及选择。一种“表达载体”指的是这样的载体：所述的载体中含有为使所述抗体在细菌细胞或者真核细胞中进行表达而必需的调控序列或者调节元件，其中所述的抗体包括本发明中所述的抗体片段。适合的载体将在下文中被公开。

[0164] 除非在上下文中明确的另外表明，在本说明书以及后附的权利要求中所使用到的所述的单数形式“一个”、“一个”以及“所述的”，包括复数的情况。

[0165] 本发明包括包含了本发明所述多肽的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (HuM2e) 抗体，包括那些由实施例 1 中列出的多核苷酸序列编码的多肽，以及由实施例 1 以及 2 中列出的氨基酸序列编码的多肽，及其片段以及变体。在一种实施方式中，所述的抗体是一种在本发明中被命名为 8i10、21B15、或者 23K12 的抗体。与具有同样的细胞类型的未经感染的对照细胞相比，这些抗体优先的与感染有 A 型流行性感冒的细胞进行结合，或者特异性的与感染有 A 型流行性感冒的细胞进行结合。

[0166] 在特定的实施方式中，本发明中所述的抗体与所述的基质 2 蛋白 (M2) 进行结合。在某些实施方式中，本发明提供的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体与存在于基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 内的表位进行结合，其中所述的表位仅仅存在于所述的天然构象之中，即，被看作是在细胞中进行表达的。在特定的实施方式中，这些抗体不能够与一种分离的基质 2 蛋白细胞外结构域多肽进行特异性的结合，其中所述的分离的基质 2 蛋白细胞外结构域多肽是例如所述的具有 23 个氨基酸残基的基质 2 蛋白细胞外结构域片段。应当被理解的是，这些抗体能够对所述的基质 2 蛋白多肽的非线性（即，构象性的）表位进行识别。

[0167] 这些存在于所述的基质 2 蛋白中的特异性的构象表位，并且特别是存在于基质 2 蛋白的细胞外结构域中的特异性的构象表位，可以被用来作为疫苗，用以在宿主体内预防所述的流行性感冒感染的发生。

[0168] 本领域的熟练技师应当能够理解，在本发明中对于抗体的一般性的描述及其制备方法以及使用方法同样可以应用于个体的抗体多肽组成成分以及抗体片段。

[0169] 本发明中所述的抗体可以是多克隆抗体或者单克隆抗体。然而，在优选的实施方式中，它们是单克隆的。在特定的实施方式中，本发明中所述的抗体是完全人类抗体。制备多克隆抗体以及单克隆抗体的方法是本领域已知的并且在例如美国专利 No. 6824780 中进行了大体上的描述。通常情况下，本发明中所述的抗体是通过重组的方法制备得到的，其中使用了本领域中可以利用的载体以及方法，这将在下文中进行进一步的描述。同样可以通过体外活化的 B 细胞来生成人类抗体（参见美国专利 No. 5567610 以及 5229275）。

[0170] 同样可以在转基因动物（例如，小鼠）中进行人类抗体的制备，其中所述的转基因动物能够生成完整系统的人类抗体，而不会出现内生性免疫球蛋白产物的产生。例如，已经描述了对嵌合型以及生殖系突变小鼠的抗体重链连接区域 (J_H) 基因进行的纯合性缺失能够导致对内生性抗体产物的完全抑制。所述的人类生殖系免疫球蛋白基因阵列向这种生殖系突变小鼠中的转移能够经由抗原的挑战导致所述的人类抗体的生成。参见，例如，Jakobovits 等人（于 1993 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》90:2551 中发表的文章；Jakobovits 等人（于 1993 年）在 Nature 《自然》362:255-258 中发表的文章；Bruggemann 等人（于 1993 年）在 Year in Immuno. 《免疫学年刊》7:33 中发表的文章；

美国专利 No. 5445806, 5569825, 5591669 (全部来自于 GenPharm); 美国专利 No. 5545807; 以及 W097/17852。可以对这样的动物进行遗传学的工程化处理, 从而制备包括本发明所述的多肽的人类抗体。

[0171] 在某些实施方式中, 本发明中所述的抗体是嵌合抗体, 其中所述的嵌合抗体同时包括来自于人类来源以及非人类来源的序列。在特定的实施方式中, 这些嵌合抗体是人源化的或者是灵长类动物源化TM的。在实践中, 人源化的抗体通常是人类抗体, 在所述的人类抗体中, 某些高变区域残基以及可能的某些骨架区域 (FR) 残基被来自于啮齿动物抗体的类似位点上的残基进行了取代。

[0172] 在本发明的上下文中, 嵌合抗体同样包括完全人类抗体, 其中所述的人类高变区域或者一个或多个互补决定区域 (CDR) 被得以保留, 但是序列中的一个或者多个其他区域已经被来自于一种非人类动物的相应的序列进行了取代。

[0173] 当所述的抗原意在被用来作为人类的治疗剂进行使用时, 对于被用来制备所述的嵌合抗体而对包括轻链以及重链的非人类序列进行的选择在降低抗原性以及人类抗非人类抗体应答方面是重要的。更为重要的是嵌合抗体应当保留对于所述抗原而言的高度的结合亲和性以及令人满意的生物学性质。为了实现这一目标, 根据一种优选的方法, 通过一种对所述的母本序列以及各种不同的概念性的嵌合产物的分析方法来制备嵌合抗体, 其中在所述的分析方法中使用所述的母本人类序列以及非人类序列的三维模型。三维的免疫球蛋白模型是可以普遍获得的并且对于本领域技术人员而言是熟知的。可以利用计算机程序, 所述的计算机程序能够对所选择的待测免疫球蛋白序列的可能性的三维构象结构进行描述以及显示。对于这些显示所进行的检查允许对所述的残基在所述的待测免疫球蛋白序列具有的机能中所起到的可能的作用进行分析, 即, 对所述的残基影响所述的待测免疫球蛋白与其抗原进行结合的能力所进行的分析。通过这种方式, 可以对骨架区域 (FR) 的残基进行筛选并且与所述的受体进行组合并导入序列中, 这样一来, 可以实现所期望的抗体特征, 例如对所述的目标抗原所具有的增加的亲和性。一般而言, 所述的高变区域的残基直接影响了抗原的结合并且在最为本质的关系上影响了抗原的结合。

[0174] 正如上文中所注释到的, 抗体 (或者免疫球蛋白) 可以被划分为五种不同的类型, 这种划分是以存在于所述重链的恒定区域内的氨基酸序列中的差异为依据的。在一种给定的类型范围内的所有免疫球蛋白都具有非常相似的重链恒定区域。可以通过序列研究或者更为普遍的通过血清学的方式 (即, 通过使用直接作用于这些差异之处的抗体) 对这些差异进行探测。本发明中所述的一种抗体、或者是上述抗体的片段可以是任意类型的, 并且因此, 可以具有 γ 重链, μ 重链, α 重链, σ 重链, 或者 ϵ 重链。 γ 链可以是 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, 或者 $\gamma 4$; 并且 α 链可以是 $\alpha 1$ 或者 $\alpha 2$ 。

[0175] 在一种优选的实施方式中, 本发明中的一种抗体, 或者是上述抗体的片段, 是一种免疫球蛋白 G (IgG)。免疫球蛋白 G 被认为是最为多功能的免疫球蛋白, 因为它能够实现免疫球蛋白分子的全部功能。免疫球蛋白 G 是血清中的主要的免疫球蛋白, 并且是唯一一种能够穿过胎盘的免疫球蛋白类型。免疫球蛋白 G 同样能够对补体进行锚定, 尽管所述的免疫球蛋白 G4 亚类型不能够。巨噬细胞、单核细胞、外周血嗜中性粒细胞 (PMN) 以及一些淋巴细胞中含有与所述的免疫球蛋白 G 的 Fc 区域进行反应的受体。并不是所有的亚类型都能够平等的进行良好的结合: 免疫球蛋白 G2 以及免疫球蛋白 G4 不能够与 Fc 受体进行结合。

与存在于外周血嗜中性粒细胞 (PMN)、单核细胞以及巨噬细胞上的所述的 Fc 受体进行结合的结果是：所述的细胞现在能够使所述的抗原更好的内在化 (internalize)。免疫球蛋白 G 是一种调理素，其能够增强噬菌作用。免疫球蛋白 G 与存在于其他类型的细胞之上的 Fc 受体之间的结合能够导致其他功能的活化。本发明中所述的抗体可以是任意的免疫球蛋白 G 亚类型。

[0176] 在另外一种优选的实施方式中，本发明中的一种抗体，或者是上述抗体的片段，是一种免疫球蛋白 E (IgE)。免疫球蛋白 E 是最为不常见的血清免疫球蛋白，这是因为即便在与抗原发生相互作用之前，所述的免疫球蛋白 E 与存在于嗜碱细胞以及肥大细胞之上的 Fc 受体进行了紧密的结合。作为其与嗜碱细胞以及肥大细胞进行结合的结果，免疫球蛋白 E 参与了过敏反应。所述的过敏原与存在于所述细胞之上的免疫球蛋白 E 之间的结合导致了各种不同的药理学介导物的释放，所述的释放导致了过敏的症状。免疫球蛋白 E 同样在寄生虫蠕虫疾病中发挥了作用。嗜嗜红细胞具有与免疫球蛋白 E 发生反应的 Fc 受体并且嗜嗜红细胞与覆盖有免疫球蛋白 E 的蠕虫之间的结合将导致对所述寄生虫的杀灭。免疫球蛋白 E 不能够对补体进行锚定。

[0177] 在各种不同的实施方式中，本发明中所述的抗体，以及上述抗体的片段，包括一个可变的轻链，所述的轻链可以是 κ 链或者是 λ 链。所述的 λ 链可以是任意亚类型的，包括，例如， $\lambda 1$ ， $\lambda 2$ ， $\lambda 3$ ，以及 $\lambda 4$ 。

[0178] 正如上文中所注释的，本发明进一步提供了抗体片段，其中所述的抗体片段中包括了一种本发明中所述的多肽。在某些情形下，使用抗体片段比使用完整的抗体具有优势。例如，所述片段所具有的较小的尺寸允许进行快速的清除，并且可以导致更好的进入到某些组织中去，其中所述的组织是例如固体肿瘤。抗体片段的例子包括：Fab，Fab'，F(ab')₂，以及 Fv 片段；双功能抗体；线性抗体；单链抗体；以及从抗体片段中形成的多重特异性抗体。

[0179] 已经发展出了各种不同的技术，用来进行抗体片段的制备。传统方法上，这些片段是经由完整抗体的蛋白水解消化作用而得到的（参见，例如，Morimoto 等人（于 1985 年）在 Science 《科学》229:81 中发表的文章）。然而，现在这些片段可以通过重组的宿主细胞而被直接制备而成。Fab、Fv 以及单链 Fv 抗体片段都可以在大肠杆菌 (E. coli) 中进行表达并且从大肠杆菌中被得以分泌，因此允许容易的制备出大量的这样的片段。Fab'-SH 片段可以直接从大肠杆菌中进行回收并且通过化学偶联从而形成 F(ab')₂ 片段（参见 Carter 等人（于 1992 年）在 Bio/Technology 《生物学与技术》10:163-167 中发表的文章）。根据另外一种方式，可以从重组的宿主细胞培养物中直接分离得到 F(ab')₂ 片段。在美国专利 No. 5869046 中描述了具有增强的体内半衰期的 Fab 片段以及 F(ab')₂ 片段，其中所述的片段中包括了一种补救受体结合表位残基 (salvage receptor binding epitope residues)。用于制备所述的抗体片段的其他技术对于熟练的从业者而言将是显而易见的。

[0180] 在其他的实施方式中，对于所述抗体的选择是一种单链的 Fv 片段 (scFv)。参见 W093/16185；美国专利 No. 5571894；以及 5587458。Fv 以及单链 Fv (sFv) 是仅有的带有完整的结合位点而全无恒定区域种类。因此，在体内的使用过程中，它们适宜进行减少的非特异性的结合。可以对单链 Fv 融合蛋白进行构建，从而在一种单链 Fv 的氨基末端或者羧基末端上实现一种效应器蛋白质的融合。参见 Antibody Engineering 《抗体的工程化》，

由 Borrebaeck 编辑, 见上。所述的抗体片段同样可以是一种“线性抗体”, 例如, 在美国专利 No. 5641870 中所描述的。这样的线性抗体片段可以是具有单一特异性的或者是双重特异性的。

[0181] 在某些实施方式中, 本发明中所述的抗体是双重特异性的或者是多重特异性的。双重特异性抗体指的是这样的抗体, 其对至少两个不同的表位具有结合特异性。范例性的双重特异性抗体能够与一个抗原上的两个不同的表位进行结合。其他这样的抗体可以将第一个抗原结合位点与第二个抗原的结合位点进行组合。可以选择的, 一种抗基质 2 蛋白细胞外结构域抗原臂 (arm) 可以与一个抗原臂 (arm) 进行组合, 其中所述的抗原臂 (arm) 与存在于一种白细胞之上的激发分子进行结合, 例如是一种 T 细胞受体分子 (例如, CD3), 或者是与免疫球蛋白 G 发生反应的 Fc 受体 (Fc γ 受体), 例如 Fc γ 受体 I (CD64), Fc γ 受体 II (CD32) 以及 Fc γ 受体 III (CD16), 这样一来, 能够将细胞的防御机制聚焦并且集中在所述的被感染细胞上。双重特异性抗体同样可以被用来将细胞毒性试剂集中到所述的被感染细胞上。这样的抗体拥有一种基质 2 蛋白细胞外结构域结合抗原臂 (arm) 以及一种能够与所述的细胞毒性试剂 (例如, 肥皂草素, 抗干扰素 - α , 长春花碱, 蓖麻毒素 A 链, 甲氨蝶呤或者放射性同位素半抗原) 进行结合的抗原臂 (arm)。双重特异性的抗体可以作为完整长度的抗体或者抗体片段 (例如, F(ab')₂ 双重特异性抗体) 来进行制备。W096/16673 中公开了一种具有双重特异性的抗表皮生长因子受体 2 (ErbB2)/抗 Fc γ 受体 I 抗体。在 W098/02463 中描述了一种具有双重特异性的抗表皮生长因子受体 2 (ErbB2)/Fc α 抗体。美国专利 No. 5821337 中教导了一种具有双重特异性的抗表皮生长因子受体 2 (ErbB2)/抗 CD3 抗体。

[0182] 用于制备双重特异性抗体的方法是本领域已知的。具有完整长度的双重特异性抗体的传统制备方法是以所述的两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达为基础的, 其中所述的两条链具有不同的特异性 (参见 Millstein 等人 (于 1983 年) 在 Nature 《自然》305 : 537-539 中发表的文章)。由于所述的免疫球蛋白重链以及轻链的随机分配, 这些杂种细胞 (quadromas) 生成了一种具有十种不同的抗体分子的可能的混合物, 其中仅有一种具有所述正确的双重特异性结构。对于所述正确的分子的纯化步骤, 是相当麻烦的, 所述的纯化步骤通常是通过亲和色谱步骤来完成的, 并且所述的产物产量是很低的。类似的操作步骤在 W093/08829 以及在 Traunecker 等人 (于 1991 年) 在 EMBO J. 《欧洲分子生物学学会杂志》10 : 3655-3659 中有所公开。

[0183] 根据一种不同的方式, 将抗体可变结构域融合到免疫球蛋白恒定结构域序列中, 其中所述的抗体可变结构域具有所期望的结合特异性 (抗体 - 抗原结合位点)。优选的, 所述的融合优选发生在免疫球蛋白的重链恒定区域中, 包括所述的铰链区域, 重链恒定 2 (CH2) 区域, 以及重链恒定 3 (CH3) 区域中的至少一部分。优选具有所述的重链恒定区域 1 (CH1), 其中所述的重链恒定区域 1 中含有与轻链结合所必需的位点, 所述的位点存在于至少一种融合区域中。DNA 编码所述的免疫球蛋白重链融合区域并且, 如果需要的话, 将所述的免疫球蛋白轻链插入到单独的表达载体中, 并且共转染至一个适当的宿主细胞中。这在某些实施方式中为进行所述的三个多肽片段之间的共有比例的调整提供了更大的适应性, 其中在所述的实施方式中, 在所述的构建体中所使用到的所述三条多肽链之间的不相等的比例提供了所期望的双重特异性抗体的最佳产量。然而, 当所述的至少两条多肽链以相等

的比例进行表达能够导致高的产量时,或者当所述的比例对所期望的链的组合的产量不会产生显著的影响时,将用于两条或者全部三条多肽链的编码序列插入到一个表达载体中是可能的。

[0184] 在这种方法的一种优选的实施方式中,所述的具有双重特异性的抗体是由一种存在于一条抗原臂 (arm) 上的杂交的免疫球蛋白重链以及一种存在于另外一条抗原臂 (arm) 上的杂交的免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二种结合特异性) 组成的,其中所述的杂交的免疫球蛋白重链具有第一种结合特异性。已经发现,这种不对称的结构促进了所期望的双重特异性化合物从不期望的免疫球蛋白链的组合中的分离,因为所述的免疫球蛋白链以仅占所述的双重特异性分子的一半的量存在,从而提供了一种容易的分离方式。这种方法在 W094/04690 中被公开。为了获得制备双重特异性抗体的进一步的详细内容,可以参见,例如,Suresh 等人 (于 1986 年) 在 *Methods in Enzymology* 《酶学方法》121:210 中发表的文章。

[0185] 根据在美国专利 No. 5731168 中描述的另外一种方法,可以对存在于一对抗体分子之间的分界面进行工程化处理,从而使得从重组的细胞培养物中回收得到的所述的异型二聚物的百分含量最大化。所述的优选的分界面包括所述的重链恒定区域 3 结构域中的至少一部分。在这一方法中,来自于所述的第一个抗体分子的分界面上的一个或者多个小的氨基酸侧链被较大的侧链 (例如,酪氨酸或者色氨酸) 进行了取代。通过使用较小的氨基酸侧链 (例如,丙氨酸或者苏氨酸) 对大的氨基酸侧链进行的取代,在所述的第二个抗体分子的分界面上生成与所述的大的侧链具有相同尺寸或者相似尺寸的补偿“腔”。这样提供了一种机制,用以增加所述的异型二聚物的产量,使所述的产量超过其他不期望的终产物例如同型二聚物。

[0186] 双重特异性抗体包括交联的抗体或者“异源偶联的”抗体。例如,在所述的异源偶联物中的所述抗体中的一种可以与抗生物素蛋白进行偶联,另外一种抗体与生物素进行偶联。这样的抗体例如已经被提议用来使免疫系统细胞作用于不期望的细胞 (参见美国专利 No. 4676980), 并且可以被用来进行人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的治疗 (参见 W091/00360, W092/200373, 以及 EP03089)。可以使用任何常规的交联方法制备异源偶联型抗体。适宜的交联试剂以及各种不同的交联技术是本领域熟知的,并且在美国专利 No. 4676980 中有所公开。

[0187] 用于通过抗体片段生成双重特异性抗体的技术同样在下述文献中进行了描述。例如,可以使用化学连接的方法制备双重特异性的抗体。Brennan 等人 (于 1985 年) 在 *Science* 《科学》229:81 中发表的文章中描述了一种操作方法,其中完整的抗体被进行蛋白水解性的裂开,从而生成 $F(ab')_2$ 片段。在有所述的二硫醇配位试剂、亚砷酸钠存在的条件下使这些片段进行还原,从而对邻近的二硫醇进行稳定并且防止分子内二硫键的形成。之后将上述生成的所述 Fab' 片段转化成硫代硝基苯甲酸 (TNB) 衍生物。之后将所述的 Fab' -硫代硝基苯甲酸衍生物之一重新转化为所述的 Fab' -硫醇,其中所述的转化是通过使用巯基乙胺进行还原而得到的,并且将所述的 Fab' -硫醇与等摩尔剂量的另外的 Fab' -硫代硝基苯甲酸衍生物混合从而形成所述的双重特异性抗体。上述制备得到的双重特异性抗体可以作为试剂用于所述酶的选择固定化反应中。

[0188] 近来的研究进展促进了从大肠杆菌 (*E. coli*) 中直接进行 Fab' -SH 片段的回收,其

中所述的 Fab'-SH 片段可以进行化学偶联从而形成双重特异性的抗体。Shalaby 等人（于 1992 年）在 J. Exp. Med. 《实验医学杂志》175 :217-225 中发表的文章中描述了一种完全人源化的双重特异性抗体 F(ab')₂ 分子的制备。每一个 Fab' 片段在大肠杆菌中进行单独的分泌并且使其在体外进行直接的化学偶联从而形成所述的双重特异性的抗体。所述的由此形成的双重特异性的抗体能够与过表达所述的表皮生长因子受体 2 (ErbB2) 受体的细胞以及正常的人类 T 细胞进行结合, 并且能够激发所述的人类细胞毒性淋巴细胞针对人类乳腺癌肿瘤目标的细胞溶解酶活性。

[0189] 用于直接通过重组的细胞培养物进行双重特异性抗体的制备以及分离的各种不同的技术也同样已经被进行了描述。例如, 可以使用亮氨酸拉链对双重特异性的抗体进行制备。参见 Kostelny 等人（于 1992 年）在 J. Immunol. 《免疫学杂志》148(5) :1547-1553 中发表的文章。所述的亮氨酸拉链肽是通过基因融合的方式与所述的两种不同抗体中的 Fab' 部分进行连接的, 其中所述的亮氨酸拉链肽来自于所述的 Fos 蛋白质以及 Jun 蛋白质。所述的抗体同型二聚物在所述的铰链区域内发生还原从而形成单体并且之后发生再次氧化从而形成了所述的抗体异型二聚物。这种方法同样可以被用来进行所述的抗体同型二聚物的制备。由 Hollinger 等人（于 1993 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》90 :6444-6448 中发表的文章中所描述的“双功能抗体”技术已经为双重特异性抗体片段的制备提供了一种可供选择的机制。所述的片段中包括一个重链可变结构域 (V_H), 所述的重链可变结构域通过一个连接物与一个轻链可变结构域 (V_L) 进行了连接, 其中所述的连接物过于短小以至于不能够允许在同一条链上的两个结构域之间进行配对。因此, 存在于一个片段之上的所述的重链可变结构域以及轻链可变结构域被迫与另外一个片段之上的互补的轻链可变结构域以及重链可变结构域进行配对, 从而形成了两个抗原结合位点。通过使用所述的单链 Fv (sFv) 二聚物制备双重特异性抗体片段的另外一种策略也已经被进行了报道。参见 Gruber 等人（于 1994 年）在 J. Immunol. 《免疫学杂志》152 :5368 中发表的。

[0190] 具有多于两种化合价的抗体是可以预期的。例如, 可以制备具有三重特异性的抗体。参见 Tutt 等人（于 1991 年）在 J. Immunol. 《免疫学杂志》147 :60 中发表的文章。一种多价的抗体可能比一种二价的抗体更加快速的进行内在化反应（和 / 或代谢分解化反应）, 其中所述的反应是通过一个表达一种抗原的细胞来进行的, 其中所述的抗体与所述被表达的抗原进行结合。本发明中所述的抗体可以是多价抗体, 所述的多价抗体带有三个或者更多个抗原结合位点（例如, 四价抗体）, 所述的多价抗体可以很容易的通过核酸的重组表达来进行制备, 其中所述的核酸编码所述抗体的多肽链。所述的多价抗体中可以包括一个二聚化作用结构域以及三个或者更多个抗原结合位点。所述的优选的二聚化作用结构域包括一个 Fc 区域或者一个铰链区域（或者由一个 Fc 区域或者一个铰链区域构成）。在这样的情景下, 所述的抗体将包括一个 Fc 区域以及三个或者更多个抗原结合位点氨基末端, 其中所述的抗原结合位点氨基末端与所述的 Fc 区域发生反应。在本发明中所述的优选的多价抗体包括三个至大约八个抗原结合位点（或者由三个至大约八个抗原结合位点构成）, 但是优选包括四个抗原结合位点。所述的多价抗体中包括至少一条多肽链（并且优选的为两条多肽链）, 其中所述的多肽链中包括两个或者多个可变结构域。例如, 所述的多肽链可以包括 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, 其中 VD1 指的是第一个可变结构域, VD2 指的是第二个

可变结构域, Fc 指的是一个 Fc 区域中的一条多肽链, X1 以及 X2 代表的是一个氨基酸或者多肽, 并且 n 是 0 或者是 1。例如, 所述的多肽链可以包括: 重链可变结构域 - 重链恒定结构域 1- 弹性连接物 - 重链可变结构域 - 重链恒定结构域 1-Fc 区域链 (VH-CH1-flexible linker-VH-CH1-Fc region chain); 或者重链可变结构域 - 重链恒定结构域 1- 重链可变结构域 - 重链恒定结构域 1-Fc 区域链。在本发明中所述的多价抗体中优选的进一步包括至少两个 (并且优选为四个) 轻链可变结构域多肽。在本发明中所述的多价抗体中可以, 例如, 包括大约两个至大约八个轻链可变结构域多肽。在本发明中被预期的所述的轻链可变结构域多肽包括一个轻链可变结构域以及, 任选的, 进一步的包括一个轻链恒定结构域。

[0191] 本发明中所述的抗体进一步的包括单链抗体。

[0192] 在特定的实施方式中, 本发明中所述的抗体是经过内在化 (internalizing) 的抗体。

[0193] 在本发明中所描述的所述抗体中的氨基酸序列的修饰作用是可以预期的。例如, 可能期望对所述抗体所具有的结合亲和性和 / 或其他的生物性质进行改善。可以通过向一种多核苷酸中导入适宜的核苷酸变化来制备所述抗体的氨基酸序列变体, 其中所述的多核苷酸对所述的抗体进行编码, 或者对所述抗体中的链进行编码, 或者通过肽的合成方法。这样的修饰作用包括, 例如, 对存在于所述抗体所具有的氨基酸序列中的残基进行缺失, 和 / 或插入和 / 或取代。可以进行缺失、插入、以及取代的任意组合, 从而得到所述的最终抗体, 只要所述的最终构建体具有所期望的特征即可。所述的氨基酸的变化同样能够对所述抗体经过翻译之后的过程进行改变, 例如对所述的糖基化位点的数量或者位置进行改变。对本发明中所述的多肽进行的上述描述的任意变化或者修饰, 均被包含在本发明中所述的抗体的范围之内。

[0194] 用于识别一个抗体中发生突变的优选位置上的某些残基或者区域的有效的方法被称之为“丙氨酸扫描突变”, 这是在 Cunningham 以及 Wells (于 1989 年) 在 Science 《科学》244:1081-1085 中发表的文章中所描述的。在这里, 一个残基或者一组目标残基被识别出来 (例如, 带有电荷的残基例如精氨酸, 天冬氨酸, 组氨酸, 赖氨酸, 以及谷氨酸) 并且被一种中性的或者负性带电的氨基酸 (最为优选的是丙氨酸或者聚丙氨酸) 进行取代, 从而对所述氨基酸与前列腺干细胞 (PSCA) 抗原之间的相互作用产生影响。之后, 对那些已经证明对所述的取代具有功能敏感性的氨基酸位置进行精制, 其中所述的精制是通过向所述的取代位点上导入进一步的变体或者其他变体的方式来实现的, 或者是通过针对所述的取代位点而导入进一步的变体或者其他变体的方式来实现的。因此, 尽管用来导入一种氨基酸序列变化的所述位点是预先确定的, 而所述的突变本身所具有的性质不需要进行预先的确定。例如, 为了分析在一个给定的位点上发生的一种突变的性能, 可以在所述的目标密码子或者区域上进行丙氨酸扫描或者随机突变并且对上述表达的抗 - 抗体变体进行筛选, 筛选出所期望的活性。

[0195] 氨基酸序列的插入包括与多肽发生的氨基末端和 / 或羧基末端的融合, 其中所述的融合的长度范围从一个残基开始, 并且其中所述的多肽中含有一百个或者更多个残基, 也可以进行单个或者多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括一种带有一个 N- 末端甲二磺酰基残基的抗体或者所述的与一种细胞毒性多肽发生融合的抗体。一种抗体所具有的其他的插入性的变体包括所述抗体的所述 N- 末端或者 C- 末端与一种酶 (例如,

用于一种抗体导向酶-前体药物疗法(ADEPT)中)进行的融合或者与一种多肽进行的融合,其中与所述的多肽进行的融合能够增加所述抗体所具有的血清半衰期。

[0196] 另外一种类型的变体是一种氨基酸取代变体。这些变体指的是在所述的抗体分子中至少有一个氨基酸残基被一种不同的残基进行了取代。为进行取代性的突变而最为感兴趣的所述位点包括所述的高变区域,但是骨架区域(FR)的改变同样是可以预期的。保守性取代以及非保守性取代是可以预期的。

[0197] 对所述抗体所具有的生物学性质所进行的本质上的修饰是通过下述方式来进行的:对取代作用进行筛选,选择那些在功能上具有显著差异的取代作用,其中所述的功能指的是下述方面的功能:维持(a)存在于所述的取代区域内的所述多肽骨架的结构,例如,作为一种板式构象或者螺旋构象,(b)存在于所述的目标位点之上的所述分子的电荷或者疏水性,或者(c)大多数的所述侧链。

[0198] 在对所述抗体所具有的适宜构象进行维持的过程中不涉及到的任何的半胱氨酸残基是同样可以被进行取代的,一般而言使用丝氨酸对其进行取代,从而提高所述分子所具有的氧化稳定性并且防止异常的交联发生。相反的,可以将半胱氨酸键添加到所述的抗体中,从而提高所述抗体的稳定性(特别是在当所述的抗体是一种抗体片段时,所述的抗体片段是例如一种Fv片段)。

[0199] 一种类型的取代变体包括对一种母本抗体中的一个或者多个高变区域残基进行取代。一般而言,相对于所述的母本抗体而言,筛选出的用于进行进一步的研发的上述得到的变体将具有提高的生物学性质,其中所述的变体是通过所述的母本抗体而生成的。用于生成这样的取代变体的一种方便的方式包括使用噬菌体展示(phage display)的亲和力成熟方法。简要的说,对几个高变区域的位点(例如,6-7个位点)进行突变,从而在每个位点上生成全部可能的氨基酸取代。所述的由此生成的抗体变体以一种单价的形式从丝状噬菌体粒子中被展示出来,其中所述的抗体与所述的M13的基因III产物进行了融合,其中所述的M13被每一种粒子进行了包裹。之后按照本发明中公开的方法,对所述的经过噬菌体展示的变体进行生物学活性(例如,结合亲和性)的筛选。为了识别出用于修饰作用的候选的高变区域位点,可以进行丙氨酸扫描突变,用以识别出那些对抗原的结合有显著贡献的高变区域残基。可以选择的,或者除此之外的,对所述的抗原-抗体复合体的晶体结构进行分析是有益的,从而识别出存在于所述抗体与一种抗原或者被感染细胞之间的接触点。根据本发明中详细描述的技术,这样的接触残基以及邻近的残基属于取代作用的候选残基。一旦生成了这样的变体,按照本发明中所描述的方法对所述的变体组进行筛选,并且可以筛选出在一项或者多项相关性的检测中表现出较为优越性质的抗体,用于进行进一步的研究发展。

[0200] 所述抗体的另外一种类型的氨基酸变体改变了所述抗体的初始糖基化类型。改变指的是使在所述的抗体中发现的一个或者多个碳水化合物半族缺失,和/或添加一个或者多个原本不存在于所述的抗体之中的糖基化位点。

[0201] 抗体的糖基化作用通常是N-连接的或者是O-连接的。N-连接的指的是所述的碳水化合物半族与所述天冬酰胺残基的侧链之间进行的连接。所述的三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸以及天冬酰胺-X-苏氨酸是用于进行酶法连接的识别序列,其中所述的X是除脯氨酸之外的任意氨基酸,所述的酶法连接是发生在所述的碳水化合物半族与所述的天

冬酰胺侧链之间的。因此,在一个多肽中,存在这些三肽序列中的任意一个,就可以生成一个可能的糖基化位点。O-连接的糖基化作用指的是所述的糖类 N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖、或者木糖中的一种与一种羟基氨基酸之间进行的连接,其中所述的最为普遍的羟基氨基酸是丝氨酸或者苏氨酸,尽管 5-羟基脯氨酸或者 5-羟基赖氨酸同样是可以被使用的。

[0202] 向所述的抗体中进行糖基化位点的添加是通过下述方式来便利的完成的:对所述的氨基酸序列进行改变,这样一来,其含有一个或者多个上述描述的三肽序列(用于进行 N-连接的糖基化位点)。所述的改变同样可以通过下述方式来进行:向所述的原始抗体的序列中添加一个或者多个丝氨酸残基或者苏氨酸残基,或者使用一个或者多个丝氨酸残基或者苏氨酸残基对所述的原始抗体的序列进行取代(用于进行 O-连接的糖基化位点)。

[0203] 本发明中所述的抗体在有关效应器功能的方面被进行了修饰,例如,使得增强了所述抗体具有的抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性作用(CDC)。这可以通过在所述抗体的一个Fc区域内导入一个或者多个氨基酸的取代的方式来实现。可以选择的或者除此之外的,可以在所述的Fc区域内导入半胱氨酸残基,从而允许在这个区域内产生链间二硫键的形成。所述的由此生成的同型二聚型抗体应当具有提高的内在化(internalization)能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤作用以及抗体依赖性的细胞毒性作用(ADCC)。参见 Caron 等人(于 1992 年)在 J. Exp. Med.《实验医学杂志》176:1191-1195 中发表的文章以及 Shopes, B.(于 1992 年)在 J. Immunol.《免疫学杂志》148:2918-2922 中发表的文章。同样可以使用异源双重功能的交联物对具有增强的抗感染活性的同型二聚型抗体进行制备,其中所述的异源双重功能的交联物是在 Wolff 等人(于 1993 年)在 Cancer Research《癌症研究》53:2560-2565 中发表的文章中所描述到的。可以选择的,可以对一种抗体进行工程化处理,使其具有双重的Fc区域并且从而能够具有增强的补体溶解能力以及抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)能力。参见 Stevenson 等人(于 1989 年)在 Anti-Cancer Drug Design《抗癌症药物的设计》3:219-230 中发表的文章。

[0204] 为了增加所述抗体所具有的血清半衰期,可以向所述的抗体(特别是一个抗体片段)中导入一个补救受体结合表位,例如按照美国专利 No. 5739277 中所描述的那样。在本发明中所使用到的所述术语“补救受体结合表位(salvage receptor binding epitope)”指的是一个存在于免疫球蛋白 G 分子(例如,免疫球蛋白 G1,免疫球蛋白 G2,免疫球蛋白 G3,或者免疫球蛋白 G4)的所述的Fc区域中的表位,其中所述的表位负责增加所述的免疫球蛋白 G 分子所具有的体内血清半衰期。

[0205] 同样可以对本发明中所述的抗体进行修饰,使其包括一个表位标签或者表位标记物,例如,可以用于进行纯化或者诊断方面的应用。本发明同样涉及到使用免疫偶联物进行治疗,其中所述的免疫偶联物中包括一个与一种抗癌症试剂或者一种生长抑制性试剂进行偶联的抗体,其中所述的抗癌症试剂是例如一种细胞毒性试剂。能够有效的用于这样的免疫偶联物的生成过程中的化学治疗试剂已经在上文中进行了描述。

[0206] 抗体与一种或者多种小分子毒素以及这些毒素的衍生物之间形成的偶联物同样是本发明中可以预期到的,其中所述的小分子毒素是例如卡奇霉素(calicheamicin),美登素类(maytansinoids),单端孢霉烯(trichothecene),以及 CC1065,并且所述的毒素衍生物具有毒素的活性。

[0207] 在一种优选的实施方式中,本发明中所述的一个抗体(完整长度的或者是片段)与一种或者多种美登素类的分子进行了偶联。美登素类是有丝分裂抑制剂,它们通过抑制微管蛋白的聚合而发挥作用。美登素 I(maytansine) 是首先从所述的东非灌木丛齿叶美登木(Maytenus serrata) 中分离得到的(参见美国专利 No. 3896111)。在此之后,发现某些微生物同样能够制备美登素类,例如美登醇(maytansinol) 以及 C-3 美登醇酯(参见美国专利 No. 4151042)。合成性的美登醇及其衍生物以及类似物在例如下述文献中被公开:美国专利 No. 4137230 ;4248870 ;4256746 ;4260608 ;4265814 ;4294757 ;4307016 ;4308268 ;4308269 ;4309428 ;4313946 ;4315929 ;4317821 ;4322348 ;4331598 ;4361650 ;4364866 ;4424219 ;4450254 ;4362663 ;以及 4371533。

[0208] 为了尝试提高它们的治疗指数,将美登素 I 以及美登素类与抗体进行了偶联,其中所述的抗体能够与肿瘤细胞抗原进行特异性的结合。含有美登素类的免疫偶联物以及它们的治疗用途在例如下述文献中进行了公开:美国专利 No. 5208020,5416064 以及欧洲专利 EP0425235B1。Liu 等人(于 1996 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》93 :8618-8623 中发表的文章中描述了一种免疫偶联物,所述的免疫偶联物中包括一种被命名为 DM1 的美登素类,所述的美登素类与所述的单克隆抗体 C242 进行了偶联,所述的单克隆抗体 C242 能够直接作用于人类的结肠直肠癌。已经发现所述的偶联物对于经过培养的结肠癌细胞而言具有高度的细胞毒性,并且在体内肿瘤生长检测中表现出了抗肿瘤的活性。

[0209] 抗体-美登素类的偶联物是通过下述方式制备得到的:将一种抗体与一个美登素类的分子进行化学连接,其中所述的化学连接是在不显著的消除所述的抗体或者所述的美登素类分子所具有的生物学活性的前提下进行的。在每个抗体分子上进行平均 3-4 个美登素类分子的偶联已经表现出增强了针对目标细胞的细胞毒性的功效,同时不会对所述抗体所具有的功能或者溶解性能产生负面的影响,尽管可以预料到,即使使用一个分子的毒素/抗体也能够产生超越所述的抗体的单独使用效果的增强的细胞毒性。美登素类是本领域中熟知的并且可以通过已知的技术进行合成或者从天然的来源中进行分离。适合的美登素类在例如美国专利 No. 5208020 以及在上文中所提及的其他专利文献以及非专利出版物中有所公开。优选的美登素类是美登醇以及美登醇的类似物,其中所述的类似物是在所述的美登醇分子的芳香环上或者在其他的位置上被进行了修饰,例如各种美登醇酯类。

[0210] 用于制备抗体偶联物的许多连接基团是本领域中已知的,包括,例如,那些在美国专利 No. 5208020 或者欧洲专利 0425236B1 以及 Chari 等人(于 1992 年)在 Cancer Research 《癌症研究》52 :127-131 中发表的文章中所公开的。所述的连接基团包括二硫键基团,硫醚基团,酸敏感性基团,光敏感性基团,肽酶敏感性基团,或者酯酶敏感性基团,正如在上述指定的专利中所公开的,二硫键基团以及硫醚基团是优选的。

[0211] 可以使用各种不同的双重功能性蛋白质偶联试剂进行免疫偶联物的制备,其中所述的双重功能性蛋白质偶联试剂是例如 N-琥珀酰基-3-(2-二硫基吡啶)丙酸酯(SPDP),4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯,亚氨基硫烷(IT),双重功能的亚胺酯衍生物(例如己二胺盐酸二甲酯),活性酯(例如辛酸二琥珀酰亚胺酯),醛类(例如戊二醛),双-叠氮类化合物(例如双-(对-叠氮苯甲酰基)己二胺),双-重氮衍生物(例如双-(对-二重氮苯甲酰基)乙二胺),二异氰酸酯(例如甲苯 2,6-二异氰酸酯),

以及双重活性的含氟化合物（例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。特别优选的偶联试剂包括 N-琥珀酰基-3-(2-二硫基吡啶)丙酸酯 (SPDP)（参见 Carlsson 等人 [于 1978 年] 在 Biochem. J. 《生物化学杂志》173:723-737 中发表的文章）以及 N-琥珀酰基-4-(2-硫基吡啶)戊酸酯 (SPP)，从而提供一种二硫键的连接。例如，可以按照 Vitetta 等人（于 1987 年）在 Science 《科学》238:1098 中发表的文章中所描述的方法制备一种蓖麻毒素免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二乙撑三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是一种范例性的螯合试剂，用于进行放射性核素与所述抗体的偶联。参见 W094/11026。所述的连接物可以是一种“可断开的连接物”，方便了所述的细胞毒性药物在所述细胞中的释放。例如，可以使用一种酸敏感性的连接物（参见（于 1992 年）在 Cancer Research 《癌症研究》52:127-131 中发表的文章；美国专利 No. 5208020）。

[0212] 另外一种感兴趣的免疫偶联物中包括一种与一个或者多个卡奇霉素 (calicheamicin) 分子进行偶联的抗体。所述的卡奇霉素抗生素家族能够以亚皮摩尔 (sub-picomolar) 的浓度水平制备双链 DNA 的断裂。关于所述的卡奇霉素家族偶联物的制备，可以参见美国专利 No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296（全部属于 American Cyanamid Company 美国氨基氰公司）。可以与所述的抗体进行偶联的另外一种药物是 QFA，它是一种抗叶酸制剂。卡奇霉素以及 QFA 均具有细胞内的作用位点并且不会轻易的穿透所述的质膜。因此，这些试剂的细胞内吸收作用极大的增强了它们的细胞毒性作用，其中所述的细胞内吸收作用是经由抗体介导的内在化作用来实现的。

[0213] 可以与本发明中所述的抗体进行偶联的其他试剂的例子包括卡氮芥 (BCNU)，链佐星 (streptozocin)，长春新碱以及 5-氟尿嘧啶，已知共同被称为 LL-E33288 复合物的试剂家族，以及埃斯佩拉霉素 (esperamicin)（参见美国专利 No. 5877296），其中所述的 LL-E33288 复合物是在美国专利 No. 5053394, 5770710 中描述的。

[0214] 可以使用的酶活毒素及其片段包括，例如，白喉毒素 A 链，白喉毒素的非结合活性片段，外毒素 A 链（来自于绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)），蓖麻毒素 A 链，相思豆毒素 A 链，莫迪素 A 链， α -辛纳毒素，油桐蛋白，康乃馨蛋白，美洲商陆蛋白（美洲商陆蛋白 I (PAPI)，美洲商陆蛋白 II (PAPII)，以及美洲商陆蛋白-S (PAP-S)），苦瓜抑制剂，麻疯树毒素，巴豆毒素，肥皂草抑制剂，白树毒素，米托洁林 (mitogillin)，局限曲菌素 (restriocin)，酚霉素，依诺霉素，以及单端孢霉烯。参见，例如，W093/21232。

[0215] 本发明中进一步的包括一种免疫偶联物，所述的免疫偶联物是在一种抗体与一种具有核溶解活性的化合物（例如，一种核糖核酸酶或者一种 DNA 核酸内切酶例如一种脱氧核糖核酸酶；脱氧核糖核酸酶）之间形成的。

[0216] 为了对被感染细胞进行选择性的破坏，所述的抗体包括一个具有高度的放射性活性的原子。可以利用各种不同的放射性同位素来制备所述的放射性偶联的抗-前列腺干细胞抗原 (PSCA) 抗体。例子包括 At^{211} ， I^{131} ， I^{125} ， Y^{90} ， Re^{186} ， Re^{188} ， Sm^{153} ， Bi^{212} ， P^{32} 以及 Lu 的放射性同位素。当所述的偶联物被用来进行诊断时，其可以包括一种用于进行闪烁照相 (scintigraphic) 研究的放射性原子，或者包括一种用于进行核磁共振 (NMR) 成像（也被称之为磁共振成像，mri）的自旋标记物，其中所述的放射性原子是例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或者 I^{123} ，所述的自旋标记物是例如碘-123，碘-131，铟-111，氟-19，碳-13，氮-15，氧-17，钆，锰或者

铁。

[0217] 使用已知的方式向所述的偶联物中导入所述的放射性标记物或者其他的标记物。例如,所述的肽可以通过生物合成得到的或者是通过化学的氨基酸合成法合成得到的,其中在所述的化学氨基酸合成法中使用适合的氨基酸前体对氢进行取代,其中所述的氨基酸前体是例如氟-19。标记物可以经由一个存在于所述的肽中的半胱氨酸残基来进行连接,其中所述的标记物是例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或者 I^{123} , Re^{186} 以及 In^{111} 。钇-90 可以经由一个赖氨酸残基来进行连接。可以使用所述的 IODOGEN(碘化法)方法(参见 Fraker 等人(于 1978 年)在 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 《生物化学与生物物理学研究通讯》80:49-57 中发表的文章)来进行碘-123 的导入。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy 《免疫闪烁照相法中的单克隆抗体》”(Chatal, 于 1989 年, CRC 出版社)中详细的描述了其他的方法。

[0218] 可以选择的,例如,通过重组技术或者肽的合成法制备一种融合蛋白,其中所述的融合蛋白中包括所述的抗体以及细胞毒性试剂。所述的 DNA 的长度应当包括编码所述的偶联物中的两个部分的各自区域,其中所述的区域可以是彼此相邻的或者被一个区域分割开来的,其中所述的分割区域编码一种连接物肽,并且不会对所述的偶联物所具有的期望的性质进行破坏。

[0219] 同样可以通过将所述的抗体与一种前体药物-活化酶进行偶联的方式,将本发明中所述的抗体用在抗体依赖性的酶介导的前体药物的治疗(ADET)当中,其中所述的前体药物-活化酶能够将一种前体药物(例如,一种肽酰基化学治疗试剂,参见 W081/01145)转化成为一种活性的抗癌症药物(参见,例如, W088/07378 以及美国专利 No. 4975278)。

[0220] 能够有效的用在抗体依赖性的酶介导的前体药物的治疗(ADET)当中的所述的免疫偶联物中的酶组分包括能够以那样的一种方式对前体药物产生作用的任意的酶,从而将所述的前体药物转化成为更加具有活性的、细胞毒性的形式。能够有效的用在本发明中所述的方法之中的酶包括,但不局限于,碱性磷酸酶,所述的酶能够有效的将含有磷酸盐的前体药物转化成为游离的药物;芳基硫酸酯酶,所述的酶能够有效的将含有硫酸酯的前体药物转化成为游离的药物;胞核嘧啶脱氨酶,所述的酶能够有效的将非毒性的 5-氟胞核嘧啶转化成所述的抗癌症药物,5-氟尿嘧啶;蛋白酶,例如沙雷氏菌属的蛋白酶,嗜热菌蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶,羧肽酶以及组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B 以及组织蛋白酶 L),所述的酶能够有效的将含有肽的前体药物转化成为游离的药物;D-丙氨酰基羧肽酶,所述的酶能够有效的对含有 D-氨基酸取代基的前体药物进行转化;碳水化合物-裂解酶,例如 β -半乳糖苷酶以及神经氨酸苷酶,所述的酶能够有效的将发生糖基化的前体药物转化成为游离的药物; β -内酰胺酶,所述的酶能够有效的将衍生自 β -内酰胺的药物转化成为游离的药物;以及盘尼西林酰胺酶,例如盘尼西林 V 酰胺酶或者盘尼西林 G 酰胺酶,所述的酶能够有效的将通过它们的胺态氮原子衍生得到的药物转化成为游离的药物,其中所述的衍生药物是分别与苯氧基乙酰基以及苯基乙酰基进行反应而得到的。可以选择的,可以使用具有酶活性的抗体来将本发明中所述的前体药物转化成为游离的活性药物,其中所述的具有酶活性的抗体在本领域中同样被称之为“抗体酶”(参见,例如, Massey(于 1987 年)在 *Nature* 《自然》328:457-458 中发表的文章)。可以按照本发明中所描述的方法,制备抗体-抗体酶的偶联物,用以将所述的抗体酶递送到一种被感染的细胞种群中。

[0221] 本发明中所述的酶可以通过本领域中熟知的技术与所述的抗体进行共价结合,其

中所述的熟知的技术是例如使用上文中所讨论的具有异源双重功能的交联试剂。可以选择的,可以使用本领域中熟知的重组 DNA 技术来构建一种融合蛋白,其中在所述的融合蛋白中包括至少一个本发明中所述抗体的抗原结合区域,所述的抗原结合区域与至少一个本发明中所述的酶的功能活性部分进行了连接。(参见,例如,Neuberger 等人(于 1984 年)在 Nature《自然》312:604-608 中发表的文章)。

[0222] 对于所述抗体所进行的其他的修饰是本发明中可以预期的。例如,所述的抗体可以与各种不同的非蛋白质源的聚合物中的一种进行连接,其中所述的非蛋白质源的聚合物是,例如,聚乙二醇,聚丙二醇,聚氧化烯,或者聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物。所述的抗体同样可以被包埋在微胶囊中、胶状药物递送系统中(例如,脂质体,白蛋白微球体,微乳液,纳米粒子以及纳米胶囊)、或者大分子乳液中,其中所述的微胶囊是通过例如凝聚技术或者通过分界面聚合作用(例如,分别制成羟甲基纤维素微胶囊或者凝胶-微胶囊以及聚(甲基丙烯酸)微胶囊)来进行制备的。在 Oslo, A.(于 1980 年)编著的 Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿氏药物科学》第 16 版本中对这样的技术进行了公开。

[0223] 在本发明中所公开的所述抗体同样可以被配制成免疫脂质体。“脂质体”是一种小的囊泡结构,是由各种不同类型的油脂、磷脂和/或表面活性剂组成的,其中所述的油脂、磷脂和/或表面活性剂能够有效的将一种药物递送给一种哺乳动物。所述的脂质体中所含有的组分通常是以一种双层的形式来排列的,这与所述的生物膜中所具有的油脂排列相类似。可以通过本领域已知的方法对含有所述抗体的脂质体进行制备,其中所述的方法是例如 Epstein 等人(于 1985 年)在 Proc Natl Acad Sci USA《美国科学院院刊》82:3688 中发表的文章中所描述的方法;Hwang 等人(于 1980 年)在 Proc Natl Acad Sci USA《美国科学院院刊》77:4030 中发表的文章中所描述的方法;美国专利 No. 4485045 以及 4544545 中所描述的方法;以及公开于 1997 年 10 月 23 日的 W097/38731 中所描述的方法。在美国专利 No. 5013556 中公开了具有增加的循环时间的脂质体。

[0224] 可以通过逆相蒸发法利用一种脂质组合物制成特别有效的脂质体,其中所述的脂质组合物包括卵磷脂,胆固醇,以及聚乙二醇(PEG)衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。脂质体经由具有规定的孔径尺寸的过滤器被挤出,从而生成了具有所期望的直径的脂质体。按照 Martin 等人(于 1982 年)在 J. Biol. Chem.《生物化学杂志》257:286-288 中发表的文章中的描述,经由一种二硫键交换反应,可以将本发明所述的抗体的 Fab' 片段与所述的脂质体进行偶联。在所述的脂质体中,任选的含有一种化学治疗试剂。参见 Gabizon 等人(于 1989 年)在 J. National Cancer Inst.《国家癌症学会杂志》81(19)1484 中发表的文章。

[0225] 本发明中所述的抗体,或者是所述抗体的片段,可以具有各种不同的生物学特征或者功能性特征中的任何一种。在某些实施方式中,这些抗体是对 A 型流行性感具有特异性的抗体或者对基质 2 蛋白具有特异性的抗体,这表明,与一种普通的对照细胞相比,它们能够分别与 A 型流行性感进行特异性的结合,或者优先的与 A 型流行性感进行结合,或者与其中的基质 2 蛋白进行特异性的结合,或者优先的与其中的基质 2 蛋白进行结合。在特定的实施方式中,所述的抗体是人类基质 2 蛋白细胞外结构域(HuM2e)抗体,这表明,它们能够特异性的与基质 2 蛋白的细胞外结构域蛋白进行结合,与一种普通的对照细胞相比,仅仅当所述的基质 2 蛋白在细胞中进行表达时或者存在于一种病毒之上时,所述的抗体优选的与存在于所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域上的一个表位进行结合。

[0226] 在特定的实施方式中,本发明中所述的抗体是一种拮抗抗体,所述的抗体能够对与其进行特异性的结合或者优先的结合的多肽或者细胞所具有的生物学活性进行部分的或者完全的阻滞或者抑制。在其他的实施方式中,本发明中所述的抗体是一种生长抑制性抗体,所述的抗体能够对与其进行结合的一个被感染的细胞的生长进行部分的或者完全的阻滞或者抑制。在另外一种实施方式中,本发明中所述的抗体对细胞凋亡进行诱导。在另外一种实施方式中,本发明中所述的抗体诱导了或者促进了抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用或者补体依赖性的细胞毒性作用。

[0227] 识别以及制备对流行性感冒病毒具有特异性的抗体的方法

[0228] 本发明提供了用于对所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (HuM2e) 抗体进行识别的新的方法,正如在实施例 4 中所列举到的。这些方法可以被容易的适用于识别对其他多肽具有特异性的抗体,其中所述的多肽是由一种感染性试剂在所述的细胞表面上进行表达的,或者所述的多肽甚至是由一种感染性试剂本身在其表面上进行表达的。

[0229] 一般而言,所述的方法中包括:从患者中获得血清样本,其中所述的患者被一种感染性试剂进行了感染,或者已经接种了针对一种感染性试剂的疫苗。之后对这些血清样本进行筛选,从而识别出那些含有抗体的样本,其中所述的抗体对一种与所述的感染性试剂有关的特定多肽具有特异性,其中所述的多肽是例如,一种在所述的细胞表面上进行特异性的表达的多肽,所述的细胞被所述的感染性试剂进行了感染,而不是未被感染的细胞。在特定的实施方式中,通过下述方式对所述的血清样本进行筛选:将所述的样本与一种细胞进行接触,其中已经使用一种表达载体对所述的细胞进行了转染,使其能够在所述的被感染细胞的表面上进行所述多肽的表达。

[0230] 一旦对患者进行了识别,发现所述的患者带有含有一种抗体的血清,其中所述的抗体对所述的感兴趣的感染性试剂多肽具有特异性,则使用从所述的相同患者处获得的单核细胞和/或 B 细胞对一种能够制备所述抗体的细胞或者是所述细胞的克隆进行识别,其中所述的识别使用到的是在本发明中所描述的方法或者本领域中可以利用的方法中的任意一种。一旦能够制备所述抗体的 B 细胞被识别出来,可以使用标准的逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 载体以及对保守的抗体序列具有特异性的引物对 cDNA 进行克隆,其中所述的 cDNA 能够编码所述抗体的可变区域或者所述可变区域中的片段,并且使其在表达载体中进行亚克隆,其中所述的表达载体是用来进行所述的单克隆抗体的重组制备的,所述的单克隆抗体对所述的感兴趣的感染性试剂多肽具有特异性。

[0231] 在一种实施方式中,本发明提供了一种对抗体进行识别的方法,其中所述的抗体能够与感染有 A 型流行性感冒的细胞进行特异性的结合,所述的方法包括:将一个 A 型流行性感冒病毒或者一种能够表达所述的基质 2 蛋白的细胞与一种生物学样本进行接触,其中所述的生物学样本来自于一名患者,所述的患者已经感染有 A 型流行性感冒;确定存在于所述的生物学样本之中的与所述的细胞发生结合的抗体的量;并且将上述确定的量与一个对照数值进行比较,其中,如果上述确定的数值比所述的对照数值高至少两倍,则表明所述的抗体能够与感染有 A 型流行性感冒的细胞进行特异性的结合。在各种不同的实施方式中,所述的表达一种基质 2 蛋白的细胞是这样的细胞:所述的细胞被一种 A 型流行性感冒病毒进行了感染或者已经利用一种多核苷酸对所述的细胞进行了转染,其中所述的多核苷酸能够表达所述的基质 2 蛋白。可以选择的,所述的细胞可以表达所述的基质 2 蛋白中的一

部分,这一部分中包括所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域以及足够的其他基质 2 蛋白序列,使得所述的蛋白仍然保持了与所述细胞的相关性并且所述的基质 2 蛋白的细胞外结构域仍然存在于所述的细胞表面之上,其中所述的存在是以与存在于完整长度的基质 2 蛋白中的方式相同的方式而存在的。考虑到所述的基质 2 蛋白序列是公众可以获得的,制备一种基质 2 蛋白的表达载体并且对一种适合的细胞进行转染的方法,包括本发明中所描述的那些方法,是可以被容易的实现的。参见,例如,流行性感病毒序列数据库 (ISD) (www.flu.lanl.gov),在 Macken 等人于 2001 年在 Options for the Control of Influenza IV. 中发表的文章“The value of a database in surveillance and vaccine selection《数据库在监督管理以及疫苗的选择上的价值》”,A. D. M. E., Osterhaus&Hampson(编辑),Elsevier Science,阿姆斯特丹,第 103-106 页)以及在 The Institute for Genomic Research(TIGR)(美国基因组研究所)中的 the Microbial Sequencing Center(MSC)(微生物序列中心)(www.tigr.org/msc/infl_a_virus.shtml)。

[0232] 在上文中所描述的所述表达基质 2 蛋白细胞外结构域的细胞或者病毒被用来对从一名患者处获得的所述的生物学样本进行筛选,其中所述的患者感染有 A 型流行性感病毒,筛选是否存在有所述的抗体,其能够优先的与表达所述的基质 2 蛋白多肽的所述细胞进行结合,其中所述的筛选是使用标准的生物学技术来完成的。例如,在某些实施方式中,所述的抗体可以是经过标记的,并且例如使用荧光微量检测技术 (FMAT) 或者荧光激活的细胞分选器 (FACS) 分析,对所述的与细胞相关的标记物的存在进行探测。在特定的实施方式中,所述的生物学样本是血液,血清,血浆,支气管冲洗液,或者唾液。可以使用高通量的技术对本发明中所述的方法进行实践。

[0233] 之后,可以对识别出的人类抗体进行进一步的特征鉴定。例如,可以对所述的存在于所述的基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 蛋白中的特定的构象表位进行确定,其中所述的构象表位对于所述抗体的结合而言是必需的或者是足以的,其中所述的确定可以利用例如被表达的基质 2 蛋白细胞外结构域多肽的定点突变来实现。这些方法可以容易的适用于对人类抗体进行的识别,其中所述的人类抗体与在一种细胞表面上进行表达的任意蛋白质进行了结合。此外,这些方法可以适用于对所述的抗体与所述的病毒本身之间所进行的结合进行确定,而不是与一种表达重组的基质 2 蛋白细胞外结构域的细胞或者被所述的病毒所感染了的细胞之间所进行的结合。

[0234] 为了对所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (HuM2e) 抗体进行重组制备,可以将一种多核苷酸序列亚克隆至表达载体之中,其中所述的多核苷酸序列编码所述的抗体、所述抗体的可变区域、或者所述抗体的抗原结合片段。在一种实施方式中,这是通过下述方式来完成:从一名患者处获得单核细胞,其中所述的患者是:从其血清中获得了含有上述被识别出的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体;通过所述的单核细胞制备 B 细胞克隆;对所述的 B 细胞进行诱导从而生成制备抗体的浆细胞;并且对由所述的浆细胞制备得到的所述的上清液进行筛选,从而确定其中是否含有所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体。一旦一种能够制备人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体的 B 细胞克隆被识别出来,实施逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR),从而对所述的 DNA 进行克隆,其中所述的 DNA 编码所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体中的可变区域或者是可变区域中的一部分。之后,将这些序列亚克隆至表达载体之中,其中所述的表达载体是适合于进行所述的人类基质 2 蛋白

细胞外结构域抗体的重组制备的表达载体。通过对所述的重组抗体与细胞进行结合的能力进行测定,可以确定所述的结合特异性,其中所述的细胞能够表达基质 2 蛋白细胞外结构域多肽。

[0235] 在本发明中所述方法的一种特定的实施方式中,对从外周血或者淋巴结中分离得到的 B 细胞进行分拣,并且将其放置于例如 96 孔、384 孔、或者 1536 孔结构中,其中所述的分拣是例如以所述 B 细胞所具有的 CD19 阳性为基础的,所述的放置例如少到每个孔中只有专有的一种细胞。对所述的细胞进行诱导,使其分化成为制备抗体的细胞,例如,浆细胞,并且收集所述的培养物上清液并测试它们与细胞之间进行的结合,其中所述的细胞在它们的表面上表达所述的感染性试剂多肽,所述的测试使用的是例如荧光微量检测技术 (FMAT) 或者荧光激活的细胞分拣器 (FACS) 分析。之后使阳性细胞进行全孔 (whole well) 逆转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR),从而对所述的免疫球蛋白 G 分子所具有的重链可变区域以及轻链可变区域进行扩增,其中所述的免疫球蛋白 G 分子是由所述的克隆性的子代浆细胞进行表达的。将上述得到的聚合酶链式反应 (PCR) 产物亚克隆至人类抗体表达载体之中,用于进行重组表达,其中所述的聚合酶链式反应 (PCR) 产物编码所述的重链可变区域以及轻链可变区域,或者是上述可变区域的一部分。之后,对上述得到的重组抗体进行测试,从而确定它们所具有的初始结合特异性并且可以对它们进行进一步的测试,测试它们在所述的各种不同的感染性试剂的分离物菌株之中所具有的泛特异性。

[0236] 因此,在一种实施方式中,按照下述的方式对一种用于识别人类基质 2 蛋白细胞外结构域 (HuM2e) 抗体的方法进行实践。首先,将具有完整长度的或者大致完整长度的基质 2 蛋白 (M2) 的 cDNA 转染至一种细胞系之中,用于进行基质 2 蛋白的表达。其次,对各自的人类血浆样本或者血清样本进行测试,测试能够与由所述的细胞所表达的基质 2 蛋白进行结合的抗体。并且最后,依据与所述的由相同的细胞所表达的基质 2 蛋白之间进行的结合,对来自于血浆 - 阳性个体或者血清 - 阳性个体中的单克隆抗体进行特征鉴定。在此时,可以对所述的单克隆抗体所具有的精确的特异性进行进一步的定义。

[0237] 可以对这些方法进行实践,从而对各种不同的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体进行识别,其中所述的抗体包括对下述物质具有特异性的抗体:(a) 存在于一种线性的基质 2 蛋白肽之上的表位,(b) 存在于多种基质 2 蛋白细胞外结构域变体中的共同的表位,(c) 一种基质 2 蛋白同型四聚体的构象决定簇,以及 (d) 所述的多种基质 2 蛋白同型四聚体变体之间的共同的构象决定簇。所述的最后一项类别是格外令人期望的,因为这种特异性性质也许会对所有的 A 型流行性感冒菌株产生特异性。

[0238] 根据本领域中可以利用的方法以及本发明中所描述的方法,可以从表达人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体的细胞中分离得到多核苷酸,其中所述的多核苷酸能够编码本发明中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体或者是上述抗体中的一部分,其中在所述的方法中包括:通过聚合酶链式反应进行扩增,在所述的聚合酶链式反应中使用到的引物对人类抗体多肽所具有的保守性区域具有特异性。例如,可以从所述的 B 细胞中对轻链可变区域以及重链可变区域进行克隆,其中所述的克隆依照的是在下述文献中所描述的分子生物学技术:W092/02551;美国专利 No. 5627052;或者 Babcook 等人(于 1996 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》93:7843-48 中发表的文章。在某些实施方式中,对多核苷酸进行亚克隆以及测序,其中所述的多核苷酸编码所述的免疫球蛋白 G 分子所具有

的重链可变区域以及轻链可变区域中的全部或者一个区域,所述的免疫球蛋白 G 分子是由所述的克隆性的子代血浆细胞进行表达的,其中所述的克隆性的子代血浆细胞表达所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体。可以通过所述的多核苷酸序列容易的确定出所述的被编码的多肽的序列。使用本领域中已知的操作步骤以及本发明中所描述的操作步骤,可以将分离的多核苷酸亚克隆至一种表达载体之中,从而重组性的制备本发明中所述的抗体以及多肽,其中所述的分离的多核苷酸编码本发明中所述的一种多肽。

[0239] 一般而言,可以使用免疫探测方法对一种抗体(或者是所述抗体的片段)对基质 2 蛋白的细胞外结构域(M2e)或者被感染的细胞或者组织所具有的结合性质进行确定以及评价,其中所述的免疫探测方法包括,例如,基于荧光免疫检验法的检测,例如免疫-组织化学法(IHC)和/或荧光激活的细胞分选器(FACS)。免疫检测方法中可以包括对照物以及这样的操作步骤,所述的操作步骤用以确定抗体是否与来自于一种或者多种具体的 A 型流行性感菌株中的基质 2 蛋白细胞外结构域(M2e)进行特异性的结合,并且不会识别普通的对照细胞或者与普通的对照细胞之间进行交叉反应。

[0240] 在对血清进行预先筛选从而识别出能够制备针对一种感染性试剂或其多肽的抗体的患者之后,在本发明中所述的方法中通常包括从一种生物学样本中对所述的 B 细胞进行的分离或者纯化,其中所述的感染性试剂的多肽是例如基质 2 蛋白(M2),所述的生物学样本是事先从一名患者或者宿主处获得的。所述的患者或者宿主可以是目前或者之前被诊断为患有的一种特定的疾病或者感染的患者或者宿主,或者是目前或者之前被怀疑患有的一种特定的疾病或者感染的患者或者宿主,或者所述的患者或者宿主被认为已经摆脱了一种特定的疾病或者感染。通常情况下,所述的患者或者宿主是一种哺乳动物并且,在特定的实施方式中,是人类。所述的生物学样本可以是含有 B 细胞的任何样本,包括但不限于,淋巴结或者淋巴结组织,胸腔积液,外周血,腹水,肿瘤组织,或者脑脊髓液(CSF)。在各种不同的实施方式中,B 细胞是从不同类型的生物学样本中分离得到的,其中所述的生物学样本是例如一种被特定的疾病或者感染所侵袭了的生物学样本。然而,可以理解的是,在本发明中所述的任意的实施方式中可以使用包括 B 细胞的任何的生物学样本。

[0241] 一旦被分离,所述的 B 细胞被进行诱导以制备抗体,例如,通过在一定的条件下培养所述的 B 细胞的方式,其中所述的条件是能够支持 B 细胞进行增殖或者发展成为一种浆细胞、浆母细胞、或者血浆细胞的条件。之后对所述的抗体进行筛选,通常情况下使用高通量的技术进行筛选,从而对一种能够与目标抗原进行特异性的结合的抗体进行识别,其中所述的目标抗原是例如,一种特定的组织,细胞,感染性试剂,或者多肽。在某些实施方式中,所述的与所述抗体发生结合的特异性的抗原,例如细胞表面多肽,并不是已知的,而在其他的实施方式中,所述的与所述抗体发生特异性的结合的抗原是已知的。

[0242] 根据本发明,可以通过本领域中已知的并且可以利用的任意方式,从一种生物学样本中进行 B 细胞的分离,其中所述的样本是,例如,肿瘤,组织,外周血或者淋巴结样本。B 细胞通常是通过荧光激活的细胞分选器(FACS)来进行分选的,这是依据在它们表面上存在的一种 B 细胞-特异性标记物来进行分选的,其中所述的 B 细胞-特异性标记物是例如,CD19, CD138, 和/或表面免疫球蛋白 G。然而,本领域中已知的其他方法是可以被使用的,例如,使用 CD19 磁性珠或者免疫球蛋白 G 特异性磁性珠的柱纯化,在此之后从所述的柱中进行洗脱。然而,利用任意标记物的 B 细胞的磁性分离可能导致某些 B 细胞的损失。因此,

在某些实施方式中,并不对所述的分离的细胞进行分拣,而是取而代之的,将从肿瘤中分离得到的经过 phicol 纯化的单核细胞直接放置在孔中,其中在每个孔中以适宜的水平或者以期望的专有数量水平进行放置。

[0243] 为了对能够制备出一种对感染性试剂具有特异性的抗体的 B 细胞进行识别,通常以较低的密度(例如,每孔中含有专有的单一的细胞,每孔中含有 1-10 个细胞,每孔中含有 10-100 个细胞,每孔中含有 1-100 个细胞,每孔中含有少于 10 个细胞,或者每孔中含有少于 100 个细胞)将所述的 B 细胞放置多孔培养板或者微滴定板中,其中所述的多孔培养板或者微滴定板是例如 96 孔、384 孔、或者 1536 孔结构的。当所述的 B 细胞最初是以一种高于每孔一个细胞的密度被进行放置时,则本发明所述的方法中可以包括随后的对孔中的细胞进行稀释的步骤,其中所述的细胞被识别为能够制备一种抗原特异性抗体,直至达到每个孔中专有一种细胞的水平,从而促进了对所述的 B 细胞所进行的识别,其中所述的 B 细胞能够制备所述的抗原特异性抗体。可以对细胞上清液或者其中的一部分和 / 或细胞进行冷冻以及储存,用于今后的测试以及稍后进行的抗体多核苷酸的回收。

[0244] 在某些实施方式中,在能够促成所述的 B 细胞进行所述抗体的制备的条件下对所述的 B 细胞进行培养。例如,可以在能够促成 B 细胞进行增殖或者分化从而生成一种浆母细胞、浆细胞、或者血浆细胞的条件下对所述的 B 细胞进行培养。在特定的实施方式中,所述的 B 细胞是在存在有一种 B 细胞有丝分裂原的条件下进行培养的,其中所述的有丝分裂原是例如脂多糖 (LPS) 或者 CD40 配位体。在一种具体的实施方式中,通过使用饲养细胞和 / 或其他的 B 细胞活化剂对其进行培养, B 细胞分化成为制备抗体的细胞,其中搜书的 B 细胞活化剂是例如 CD40 配位体。

[0245] 使用本领域中可以利用的常规方法,可以对细胞的培养物上清液或者从其中获得的抗体进行测试,测试它们与一种目标抗原进行结合的能力,其中所述的常规方法包括在本发明中所描述的那些。在特定的实施方式中,使用高通量的方法对培养物上清液进行测试,测试所述抗体的存在,其中所述的抗体能够与一种目标抗原进行结合。例如,可以将 B 细胞培养在多孔微滴定板中,这样一来,可以使用机器性的培养板处理器同时对多个细胞上清液进行取样并且进行测试,测试其中是否存在所述的抗体,其中所述的抗体能够与一种目标抗原进行结合。在特定的实施方式中,抗原与珠子(例如,顺磁性珠或者乳胶珠)进行了结合,从而促进了对所述的抗体 / 抗原复合体的捕获。在其他的实施方式中,抗原以及抗体是被荧光素标记的(使用不同的标记物)并且进行荧光激活的细胞分拣器 (FACS) 分析,从而识别所述抗体的存在,其中所述的抗体能够与目标抗原进行结合。在一种实施方式中,使用荧光微量检测技术 (FMAT™) 分析以及仪器 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 确定抗体的结合。荧光微量检测技术 (FMAT™) 是一种用于进行高通量筛选的荧光共聚焦式平台,是一种混合以及读取 (mix-and-read) 的非放射性检测,其中使用存活的细胞或者珠子进行检测。

[0246] 在各种不同的实施方式中,在将一种抗体与一种特定的目标抗原(例如,一种生物学样本例如感染的组织或者细胞,或者感染性试剂)之间进行的结合与一种对照样本(例如,一种生物学样本例如未被感染的细胞,或者一种不同的感染性试剂)进行比较的内容中,如果所述的抗体与所述特定的目标抗原之间所进行的结合超过其结合一种对照样本的量的至少两倍、至少三倍、至少五倍、或者至少十倍,则认为所述的抗体能够优先的与所

述的特定的目标抗原进行结合。

[0247] 可以使用本领域中能够利用的任意方式从细胞中对多核苷酸进行分离,其中所述的多核苷酸编码抗体链,抗体链的可变区域,或者是其中的片段。在一种实施方式中,使用聚合酶链式反应 (PCR) 对多核苷酸进行分离,例如,使用寡核苷酸引物的逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR),其中所述的寡核苷酸引物与编码重链或者轻链的多核苷酸序列或其补体进行了特异性的结合,所述的逆转录聚合酶链式反应是使用本领域中可以利用的常规操作步骤来进行的。在一种实施方式中,使阳性孔进行全孔 (whole well) 的逆转录聚合酶链式反应,从而对所述的免疫球蛋白 G 分子的重链可变区域以及轻链可变区域进行扩增,其中所述的免疫球蛋白 G 分子是由所述的克隆性的子代血浆细胞进行表达的。可以对这些聚合酶链式反应产物进行测序。

[0248] 之后,依照本领域中的常规操作步骤,将上述得到的聚合酶链式反应产物亚克隆至人类抗体表达载体之中并且进行重组表达,其中所述的聚合酶链式反应产物编码所述的重链可变区域以及轻链可变区域或者是上述区域中的片段(参见,例如,美国专利 No. 7112439)。可以依照各种不同的用于进行核酸的切除、绑定、转化、以及转染的熟知的操作步骤中的任意一种,对本发明中所描述的编码一种肿瘤特异性抗体或者是所述抗体的片段的核酸分子进行繁殖并且表达。因此,在某些实施方式中,一种抗体片段所进行的表达可以优选的发生在一种原核宿主细胞中,其中所述的原核宿主细胞是例如大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) (参见,例如,Pluckthun 等人(于 1989 年)在 *Methods Enzymol.* 《酶学方法》178:497-515 中发表的文章)。在某些其他的实施方式中,所述抗体或者是所述抗体的一种抗原结合片段所进行的表达可以优选的发生在一种真核宿主细胞中,其中所述的真核宿主细胞包括酵母(例如,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe*, 以及巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*); 动物细胞(包括哺乳动物细胞); 或者植物细胞。适合动物细胞的例子包括,但不限于,骨髓瘤细胞, COS(猿猴肾细胞), CHO(中国仓鼠卵巢细胞), 或者杂交瘤细胞。植物细胞的例子包括烟草细胞, 玉米细胞, 大豆细胞, 以及大米细胞。通过本领域普通技术人员已知的方法并且根据本发明中公开的内容,可以将一种核酸载体设计成为在一个特定的宿主体系内表达外源序列,并且之后可以插入编码所述的肿瘤特异性抗体(或者是所述抗体的片段)的多核苷酸序列。将依据所述的特定宿主对所述的调控元件进行改变。

[0249] 可以制备一种或者多种可复制的表达载体并且使用所述的表达载体对一个合适的细胞系进行转化,在所述的细胞系中将发生所述抗体的制备,其中所述的表达载体中含有一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码一个可变区域和 / 或恒定区域,所述的合适的细胞系是例如,一种不生成骨髓瘤的细胞系,例如是一种小鼠 NS0(骨髓瘤细胞)细胞系或者是一种细菌,例如大肠杆菌。为了能够获得有效的转录以及翻译,所述的存在于每一个载体之中的多核苷酸序列中应当包括合适的调控序列,特别是一种与所述的可变结构域序列发生可操作性的连接的启动子以及前导序列。用来通过这种方式进行抗体的制备的特定方法一般而言是本领域熟知的并且是在常规情况下被使用到的。例如,分子生物学操作步骤是在 Sambrook 等人(于 1989 年,在 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 《分子克隆实验室手册》第 2 版中, Cold Spring Harbor Laboratory 冷泉港实验室, 纽约; 同样可以参见 Sambrook 等人(于 2001 年)发表的第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory 冷泉港实验

室,纽约)中所描述的。尽管并不是必需的,在某些实施方式中,可以对编码所述的重组抗体的多核苷酸区域进行测序。可以按照 Sanger 等人((于 1977 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》74 :5463 中发表的文章)的描述以及 Amersham International plc sequencing handbook 中的描述以及包括对上述技术的改进来完成 DNA 的测序。

[0250] 在特定的实施方式中,在此之后对上述得到的重组抗体或者是所述抗体的片段进行测试,从而确定它们的初始特异性并且可以对其进行进步的测试,测试它们的泛特异性,例如,使用相关的感染性试剂来进行测试。在特定的实施方式中,对依照本发明中所述的方法被识别出的抗体或者制备得到的抗体进行测试,测试它们的细胞杀伤能力和 / 或进行内在化反应的能力,其中所述的细胞杀伤能力的测试是经由抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 来实现的。

[0251] 多核苷酸

[0252] 在其他的方面,本发明提供了一种多核苷酸组合物。在优选的实施方式中,这些多核苷酸编码了本发明中所述的一种多肽,例如,一种抗体的可变链上的一个区域,其中所述的抗体与 A 型流行性感、基质 2 蛋白 (M2)、或者基质 2 蛋白的细胞外结构域 (M2e) 进行结合。本发明中所述的多核苷酸是单链的 (编码 DNA 或者反义 DNA) 或者双链的 DNA (基因组 DNA, eDNA 或者合成性 DNA) 分子或者 RNA 分子。RNA 分子包括,但不局限于, HnRNA (不均一核 RNA) 分子以及 mRNA (信使 RNA) 分子,其中所述的 HnRNA (不均一核 RNA) 分子中含有基因内区并且以一种一对一 (one-to-one) 的方式与一种 DNA 分子相对应,所述的 mRNA (信使 RNA) 分子中不含有基因内区。可以选择的,或者除此之外的,编码序列或者非编码序列存在于本发明所述的多核苷酸之中。同样可以选择的,或者除此之外的,多核苷酸与本发明中所述的其他分子和 / 或支撑物质之间进行了连接。本发明中所述的多核苷酸被用在例如杂交检测中,从而在一种生物学样本中探测所述的 A 型流行性感抗体的存在,并且可以被用在本发明所述多肽的重组制备过程中。

[0253] 因此,根据本发明中的另外一个方面,提供了多核苷酸组合物,所述的多核苷酸组合物中包括在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列中的一部分或者全部,在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列的补体,以及在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列的退化变体。在某些优选的实施方式中,在其中所列出的所述的多核苷酸序列能够编码一种多肽,与一种普通的未经感染的对照细胞相比,所述的多肽能够优先的与一种感染有 A 型流行性感冒的细胞进行结合,其中所述的多肽包括具有在实施例 1 或者 2 中所列出的序列的多肽。此外,本发明中包括能够编码本发明所述的任意一种多肽的所有多核苷酸。

[0254] 在其他相关的实施方式中,本发明提供了多核苷酸变体,其中所述的多核苷酸变体与附图 1 中所列出的所述序列具有本质上的同一性,例如,与本发明中所描述的一种多核苷酸序列相比,它们包括至少 70% 的序列同一性,优选的为至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或者 99% 或者更高的序列同一性,其中所述的序列同一性是使用本发明中所描述的方法来进行确定的 (例如,使用标准参数的 BLAST (基础局部比对检查工具) 分析)。本领域技术人员将能够认识到,可以对这些数值进行适当的调整,用以确定由两条核苷酸序列所编码的蛋白质所具有的相应的同一性,其中将密码子的退化、氨基酸的相似性、阅读框的位置、以及类似的因素纳入考虑的范围。

[0255] 通常情况下,多核苷酸变体中含有一种或者多种取代,添加,缺失和 / 或插入,优

选的,这样一来,相对于由本发明中具体列出多核苷酸序列所编码的多肽而言,由所述的变体多核苷酸所编码的所述多肽的免疫原性结合性质没有发生实质性的削弱。在另外的实施方式中,本发明提供了多核苷酸片段,所述的片段包括一种序列的各种不同长度的连续性的延伸,其中所述的序列与本发明中公开的所述一种或者多种序列是相同的或者是互补的。例如,本发明中所提供的多核苷酸中包括本发明中所公开的所述一种或者多种序列中的至少大约 10 个、15 个、20 个、30 个、40 个、50 个、75 个、100 个、150 个、200 个、300 个、400 个、500 个或者 1000 个或者更多个连续的核苷酸,以及存在于上述数值范围之内的中间长度。在本发明中所使用到的所述术语“中间长度”指的是存在于上述引证的数值之间的任意长度,例如 16 个,17 个,18 个,19 个,等等;21 个,22 个,23 个,等等;30 个,31 个,32 个,等等;50 个,51 个,52 个,53 个,等等;100 个,101 个,102 个,103 个,等等;150 个,151 个,152 个,153 个,等等;包括在 200 至 500 之间的所有整数;在 500-1000 之间的所有整数,以及类似的情况。

[0256] 在本发明中的另外一种实施方式中,提供了一种多核苷酸组合物,其中所述的多核苷酸组合物能够在中等严格的条件下至高等严格的条件下与本发明中所提供的一种多核苷酸序列进行杂交,或者与所述的多核苷酸序列的一个片段进行杂交,或者与所述的多核苷酸序列的一个补体序列进行杂交。杂交技术是分子生物学领域中熟知的。为了进行描述,用于测试本发明中所述的多核苷酸与其他的多核苷酸进行杂交的适宜的中等严格的条件包括:在 5 倍 (5X) 的 SSC、0.5% 的十二烷基磺酸钠 (SDS)、1.0 毫摩的乙二胺四乙酸 (EDTA) (pH8.0) 溶液中进行预先洗涤;在 50℃ -60℃ 下,5 倍的 SSC 中,杂交过夜;之后在 65℃ 下进行两次 20 分钟的洗涤,每一次分别使用 2 倍的、0.5 倍的以及 0.2 倍的 SSC,其中所述的 SSC 中含有 0.1% 的十二烷基磺酸钠 (SDS)。本领域技术人员将能够理解,可以容易对所述的杂交条件的严格程度进行操纵,例如通过改变所述的杂交溶液中的盐含量和 / 或改变所述的杂交反应进行的温度的方式。例如,在另外一种实施方式中,适宜的高度严格的杂交条件包括在上文所描述的那些条件,不同之处在于所述的杂交反应的温度被升高了,例如,升高至 60-65℃ 或者 65-70℃。

[0257] 在优选的实施方式中,由所述的多核苷酸变体或者片段所编码的所述多肽与由所述的天然多核苷酸所编码的所述多肽具有相同的结合特异性 (即,能够与相同的表位或者 A 型流行性感菌株进行特异性的结合或者优先的结合)。在某些优选的实施方式中,上文中所描述的多核苷酸编码一种多肽,所述的多肽所具有的结合活性的水平为本发明中所具体列出的多肽序列的结合活性水平的至少大约 50%,优选的为至少大约 70%,并且更加优选的为至少大约 90%,其中所述的多核苷酸是例如,多核苷酸变体,片段以及杂交序列。

[0258] 本发明中所述的多核苷酸,或者是所述多核苷酸的片段,可以与其他 DNA 序列进行组合,不考虑所述的编码序列自身所具有的长度,其中所述的 DNA 序列是例如启动子,聚腺苷酸化信号,另外的限制性酶切位点,多个克隆位点,其他的编码片段,以及类似的 DNA 序列,这样一来,它们所具有的整体长度可以发生相当程度的变化。可以使用几乎具有任意长度的核酸片段,为了便于进行制备以及在预先确定的重组 DNA 方案中进行使用,优选对所述的总长度进行限制。例如,在本发明中的多种执行方案中所包括的列举性的多核苷酸片段具有大约 10000、大约 5000、大约 3000、大约 2000、大约 1000、大约 500、大约 200、大约 100、大约 50 个碱基对的长度,以及类似的长度 (包括所有的中间长度)。

[0259] 本领域普通技术人员将能够认识到,作为所述的遗传密码发生退化的结果,存在多种能够编码本发明中所描述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的某一些与任意天然基因所具有的所述核苷酸序列之间具有最小程度的同源性。虽然如此,能够编码本发明中所述的一种多肽但由于在密码子的使用上存在差异而发生变化的多核苷酸是本发明中可以特别预期到的。进一步的,包括本发明中所提供的所述多核苷酸序列在内的所述基因的等位基因是存在于本发明所述的范围内的。等位基因属于内源性基因,它是作为一种或者多种突变的结果而发生变化的,其中所述的突变是例如核苷酸的缺失、添加和 / 或取代。上述得到的 mRNA 以及蛋白可以,但不必须,具有一种改变的结构或者功能。可以使用标准的技术(例如杂交技术,扩增技术和 / 或数据库序列比对技术)对等位基因进行识别。

[0260] 在本发明中的某些实施方式中,为了对所述被编码的多肽所具有的一种或者多种性质进行改变,对上述公开的多核苷酸序列实施突变,其中所述的性质是例如它的结合特异性或者结合强度。用来进行突变的技术是本领域熟知的,并且其被广泛的用于生成多肽变体以及多核苷酸变体。在本发明中所描述的所述多肽的变体和 / 或衍生物的制备方法中,使用到一种例如定点突变的突变方式。通过这种方式,经由对一种多肽序列进行编码的基本的多核苷酸所进行的突变,在所述的多肽序列中进行了特异性的修饰。这些技术提供了一种直截了当的方式来制备并且测试序列变体,例如,考虑到前述的一种或者多种顾虑,向所述的多核苷酸中导入一种或者多种核苷酸序列上的变化。定点突变允许通过使用特异性的寡核苷酸序列来进行突变体的制备,其中所述的寡核苷酸序列包括带有所期望的突变的核苷酸序列,以及具有足够数量的相邻核苷酸,从而提供一种具有足够大小以及序列复杂性的引物序列,从而在将要被切断的缺失连接处的两侧上形成一种稳定的二倍体(duplex)。在一种选定的多核苷酸序列上进行突变,从而提高、转变、降低、修饰、或者改变所述的多核苷酸本身所具有的性质,和 / 或转变所述的被编码的多肽所具有的性质、活性、组成、稳定性、或者主要序列。

[0261] 在本发明中的其他实施方式中,将本发明中提供的所述的多核苷酸序列作为探针或者引物,用来进行核酸的杂交,例如,作为一种聚合酶链式反应引物。这样的核酸探针所具有的与一种目标序列进行特异性的杂交的能力使得它们能够在一种给定的样本中探测所述的互补序列的存在。然而,其他的用途同样是本发明可以预期的,例如作为所述的序列信息,用于进行突变种类的引物的制备,或者用来作为引物,用于制备其他的遗传构建体。这样一来,本发明中所述的包括至少大约 15 个核苷酸长度的连续序列的序列区域的核酸片段是格外有效的,其中所述的 15 个核苷酸长度的连续序列与本发明中所公开的一种具有 15 个核苷酸长度的连续序列属于相同的序列或者是互补的序列。具有更长长度的连续的同源性序列或者互补性序列,例如那些具有大约 20 个、30 个、40 个、50 个、100 个、200 个、500 个、1000 个(包括所有的中间长度)包括完整长度的序列,以及存在于上述范围之中的所有的长度,同样被用在某些实施方式中。

[0262] 特别可以预期到的是,有些多核苷酸分子能够作为杂交探针,用在例如 Southern 印迹以及 Northern 印迹中,和 / 或作为引物,用在例如聚合酶链式反应(PCR)中,其中所述的多核苷酸分子所具有的序列区域是由 10-14 个、15-20 个、30 个、50 个、或者甚至是 100-200 个核苷酸或者类似数量(也包括中间长度)的连续的核苷酸片段所构成的,所述的连续的核苷酸片段与本发明中公开的一种多核苷酸序列是相同的或者是互补的。所述片段

所具有的总长度,以及所述的互补片段所具有的长度,最终取决于所述的特定的核酸片段的预先确定的用途或者应用。一般而言,较小的片段被用在杂交反应的实施方式中,其中所述的连续的互补区域所具有的长度可以在例如大约 15 至大约 100 个核苷酸之间变化,但是更长的连续的互补片段是可以使用的,这取决于希望进行探测的所述的互补序列所具有的长度。

[0263] 使用一种具有大约 15-25 个核苷酸长度的杂交探针能够形成一种二倍体 (duplex) 分子,其中所述的二倍体分子是稳定的以及具有选择性的。一般而言,具有超过 12 个碱基长度的片段的连续的互补序列的分子是优选的,尽管,这是为了增强所述的杂交物所具有的稳定性和选择性,并且从而对获得的特异性的杂交分子所具有的质量以及程度 (degree) 进行改善。一般而言,具有 15-25 个连续的核苷酸的基因-互补片段的核酸分子是优选的,如果需要的话,甚至可以具有更长的互补片段。

[0264] 可以从本发明中公开的任何序列的任何部分中选取杂交探针。所需要的仅仅是对希望被利用来作为一种探针或者引物的本发明中所列出的序列进行审核,或者是所述序列中的任意连续的部分,从大约 15-25 个核苷酸的长度直至并且包括所述的完整长度的序列。对与所述的探针序列以及引物序列所进行的选择受到各种不同的因素的支配。例如,可能希望使用来自于邻近所述的完整序列的末端的引物。

[0265] 本发明中所述的多核苷酸、或者是所述多核苷酸的片段或者变体,可以容易的通过例如直接合成的方法来进行制备,其中所述的直接合成指的是通过化学方式对所述的片段进行直接合成,这是普遍被得以实践的,使用到的是一种自动的寡核苷酸合成器。同样的,可以通过核酸繁殖技术的应用获得片段,其中所述的核酸繁殖技术是例如在美国专利 4683202 中描述的聚合酶链式反应 (PCRTM) 技术,通过向用于进行重组制备的重组载体之中导入选定的序列的方式来实现,以及通过分子生物学领域的技术人员通常已知的其他重组 DNA 技术来实现。

[0266] 载体,宿主细胞以及重组方法

[0267] 本发明提供了包括本发明中所述的核酸的载体以及宿主细胞,以及重组技术,用于进行本发明中所述的多肽的制备。本发明中所述的载体包括那些能够在任何类型的细胞或者生物体内进行复制的载体,例如,质粒,噬菌体,柯斯载体,以及微型染色体。在各种不同的实施方式中,包括本发明中所述的多核苷酸的载体是适合进行多核苷酸的繁殖或者复制的载体,或者是适合表达本发明所述中所述的多肽的载体。这样的载体是本领域已知的并且是可以商业购买获得的。

[0268] 对本发明中所述的多核苷酸进行合成,之后将其全部或者部分进行组合,并且使用常规的分子生物学技术以及细胞生物学技术将它们插入到一个载体之中,其中所述的常规技术包括,例如,使用适宜的限制性位点以及限制性酶将所述的多核苷酸亚克隆至一种经过线性化处理的载体之中。使用寡核苷酸引物通过聚合酶链式反应对本发明中所述的多核苷酸进行扩增,其中所述的寡核苷酸引物与所述的多核苷酸的每一条链是互补的。这些引物中同样包括限制性酶切位点,用以促进在一种载体之中的亚克隆。所述的可复制的载体组分一般而言包括,但不局限于,下述中的一种或者多种:信号序列,复制起点,以及一种或者多种标记物或者选择性基因。

[0269] 为了表达本发明中所述的一种多肽,将表达所述多肽或者功能性等价物的所述的

核苷酸序列插入到一种适宜的表达载体之中,即,含有对于上述被插入的编码序列的转录以及翻译而言必不可少的元件的载体。使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体,其中所述的表达载体中含有编码一种感兴趣的多肽的序列以及适宜的转录控制元件以及翻译控制元件。这些方法包括体外重组 DNA 技术,合成技术,以及体内遗传重组技术。这样的技术在例如下述文章中被进行了描述: Sambrook 等人(于 1989 年)发表的 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 《分子克隆实验室手册》, Cold Spring Harbor Press, 冷泉港出版社, Plainview, 纽约, 以及 Ausubel, F. M. 等人(于 1989 年)发表的 *Current Protocols in Molecular Biology* 《分子生物学当代议案》, John Wiley & Sons, 纽约, N. Y.

[0270] 可以利用各种不同的表达载体/宿主体系来容纳并且表达多核苷酸序列。这些包括,但不局限于,微生物例如被重组的细菌噬菌体、质粒、或者柯斯载体 DNA 表达载体进行转化了的细菌;被酵母表达载体进行转化了的酵母;被病毒表达载体(例如,杆状病毒)进行感染了的昆虫细胞体系;被病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 进行转化了的植物细胞体系或者被细菌表达载体(例如, Ti 质粒或者 pBR322 质粒)进行转化了的植物细胞体系;或者动物细胞体系。在一种实施方式中,使用核苷酸引物从一个杂交瘤细胞中对一种基因的可变区域进行了扩增,其中所述的基因表达一种感兴趣的单克隆抗体。这些引物可以由本领域的普通技术人员进行合成,或者可以通过商业可以利用的途径购买获得(参见,例如, Stratagene (La Jolla, 加利福尼亚), 其出售用于对小鼠的可变区域以及人类的可变区域进行扩增的引物)。所述的引物被用来对重链可变区域或者轻链可变区域进行扩增,所述的重链可变区域或者轻链可变区域此后分别被插入到例如 ImmunoZAP™ H 或者 ImmunoZAP™ L (Stratagene) 这样的载体之中。之后将这些载体导入到大肠杆菌、酵母、或者以哺乳动物为基础的体系中,用于进行表达。使用这样的方法,可以制备出大量的单链蛋白,其中在所述的单链蛋白中含有所述的重链可变结构域与轻链可变结构域的融合(参见 Bird 等人(于 1988 年)在 *Science*《科学》242:423-426 中发表的文章)。

[0271] 存在于一种表达载体之中的所述“控制元件”或者“调控序列”指的是所述的载体之中那些未翻译的区域,所述的区域与宿主的细胞蛋白发生相互作用,从而实施了转录以及翻译,其中所述的未翻译的区域是例如,增强子,启动子,5' 以及 3' 未翻译区域。这样的元件可以在它们的强度以及特异性方面进行变化。可以使用任意数量的适宜的转录元件以及翻译元件,包括组成型启动子以及诱导型启动子,这取决于所利用的载体体系以及宿主。

[0272] 适合与原核宿主一同进行使用的启动子的例子包括所述的碱性磷酸酶启动子 (phoA promoter), β -内酰胺酶以及乳糖启动子体系,碱性磷酸酶启动子,色氨酸 (trp) 启动子体系,以及杂交启动子例如所述的 tac 启动子。然而,其他已知的细菌性启动子是适合的。通常情况下,用于细菌体系中的启动子中同样含有一个 Shine-Dalgarno 序列,所述的序列可操作性的与编码所述多肽的所述 DNA 进行了连接。诱导型启动子是可以使用的,其中所述的诱导型启动子是例如所述的 PBLUESCRIPT 噬菌粒的杂交 lacZ 启动子 (Stratagene, La Jolla, 加利福尼亚) 或者 PSPORT1 质粒的杂交 lacZ 启动子 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 以及类似的启动子。

[0273] 用于真核细胞中的各种不同的启动子序列是已知的并且依照本发明可以使用其中的任何一种。事实上所有的真核基因都具有一个富含 AT 的区域,所述的区域位于所述的转录开始的位点上游大约 25 至 30 个碱基的位置上。另外一个序列,发现位于许多基因的

转录开始处的上游的 70 至 80 个碱基的位置上是一个 CNCAAT 区域,其中 N 可以是任意的核苷酸。在大多数真核基因的 3' 末端处,存在一个 AATAAA 序列,所述的 AATAAA 序列可能是所述的 poly A 尾巴进行添加的信号,其中所述的添加发生在所述的编码序列的 3' 末端上。所有这些序列适合被插入到真核的表达载体之中。

[0274] 在哺乳动物细胞体系中,来自于哺乳动物基因中的启动子或者来自于哺乳动物病毒中的启动子一般而言是优选的。例如通过启动子对来自于载体的多肽的表达进行控制,其中所述的表达发生在哺乳动物的宿主细胞内,所述的启动子来自于所述的病毒基因组,来自于异源的哺乳动物启动子,以及来自于热休克启动子,只要这样的启动子能够与所述的宿主细胞体系相互兼容即可,其中所述的病毒是例如多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒(例如,2 型腺病毒),牛乳突淋瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,细胞巨化病毒(CMV),逆转录酶病毒,B 型肝炎病毒并且最为优选的是猿猴病毒 40(SV40),所述的来自于异源哺乳动物启动子的启动子是例如所述的肌动蛋白启动子或者免疫球蛋白启动子。如果必须生成一种细胞系,所述的细胞系中含有编码一种多肽的所述序列的多份拷贝,则基于猿猴病毒 40 或者 EB 病毒的载体能够有利的与一种适宜的选择性标记物一同进行使用。一种适合的表达载体的一个例子是 pcDNA-3.1(Invitrogen, Carlsbad, CA),所述的表达载体中包括一种细胞巨化病毒(CMV) 启动子。

[0275] 可以利用许多基于病毒的表达体系来进行多肽的哺乳动物表达。例如,在使用腺病毒作为一个表达载体情形中,可以将编码一种感兴趣的多肽的序列绑定在一种腺病毒转录/翻译复合体之内,其中所述的腺病毒转录/翻译复合体是由所述的晚期启动子以及三重前导序列所构成的。可以通过向所述的病毒基因组的非必需 E1 区域或者 E3 区域内进行的插入来获得一种存活的病毒,所述的病毒能够在被感染的宿主细胞内进行所述多肽的表达(参见 Logan, J. 以及 Shenk, T. (于 1984 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》81:3655-3659 中发表的文章)。除此之外,可以使用转录增强子来增加在哺乳动物宿主细胞中进行的表达,其中所述的转录增强子是例如所述的鲁斯氏肉瘤病毒(RSV) 增强子。

[0276] 在细菌体系中,可以选择各种表达载体中的任何一种,这取决于对所述的被表达的多肽预先确定的用途。例如,当期望得到大的数量时,可以使用能够进行高水平的融合蛋白的表达的载体,其中所述的高水平的融合蛋白是很容易被纯化的。这样的载体包括,但不局限于,所述的多功能的大肠杆菌克隆以及表达载体例如 BLUESCRIPT(Stratagene),在所述的表达载体中,编码所述的感兴趣的多肽的所述序列可以被绑定在所述的载体之中,存在于编码所述的氨基末端蛋氨酸(Met)以及随后的 β -半乳糖苷酶的 7 个残基的序列的骨架内,这样一来,生成一种杂交蛋白;pIN 载体(参见 Van Heeke, G 以及 S. M. Schuster(于 1989 年)在 J. Biol. Chem. 《生物化学杂志》264:5503-5509 中发表的文章);以及类似的载体。pGEX 载体(Promega, 麦迪逊, 威斯康星州)同样可以被用来表达外源多肽,使其作为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。一般而言,这样的融合蛋白是可溶性的并且能够容易的从溶解的细胞中被纯化出来,其中所述的纯化是通过吸附至谷胱甘肽-琼脂糖珠子上并且随后在有游离的谷胱甘肽存在的条件下进行洗脱的方式来实现的。在这样的体系中制备得到的蛋白质被设计成为包括肝磷脂、凝血酶、或者 XA 因子蛋白酶酶切位点,这样一来,所述的感兴趣的克隆多肽可以被随意的从所述的谷胱甘肽 S-转移酶(GST) 半族中释放出

来。

[0277] 在所述的酵母酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,使用各种不同的含有组成型启动子或者诱导型启动子的载体,其中所述的载体是例如 α 因子,酒精氧化酶,以及 PGH。与酵母宿主一同进行使用的其他适合的启动子序列的例子包括与 3- 磷酸甘油酯激酶或者其他的糖酵解酶一同进行使用的启动子,其中所述的其他的糖酵解酶是例如,烯醇酶,甘油醛-3- 磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6- 磷酸异构酶,3- 磷酸甘油酯变位酶,丙酮酸激酶,丙糖磷酸异构酶,磷酸葡萄糖异构酶,以及葡萄糖激酶。为了进行回顾,可以参见 Ausubel 等人发表的文章(见上)以及 Grant 等人(于 1987 年)在 *Methods Enzymol.* 《酶学方法》153:156-544 中发表的文章。属于诱导型启动子、在转录方面具有额外的优点、受到生长条件的控制的其他的酵母启动子包括与下述酶一同进行使用的所述启动子区域:2 型酒精脱氢酶, isocytochrome C, 酸性磷酸酶,与氮的代谢相关的降解酶,金属硫因,甘油醛-3- 磷酸脱氢酶,以及负责进行麦芽糖以及半乳糖的利用的酶。用于进行酵母的表达的适合的载体以及启动子在 EP73657 中有进一步的描述。酵母增强子同样可以有利的与酵母启动子一同进行使用。

[0278] 在使用植物表达载体的情形中,通过各种启动子中的任意一种对编码多肽的所述序列的表达进行驱动。例如,病毒启动子可以被单独使用或者与来自于烟草花叶病毒 (TMV) 的所述的 omega 前导序列进行组合使用(参见 Takamatsu, N. (于 1987 年)在 *EMBO J.* 《欧洲分子生物学学会杂志》6:307-311 中发表的文章),其中所述的病毒启动子是例如所述的花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 启动子以及 19S 启动子。可以选择的,植物启动子是可以使用的,其中所述的植物启动子是例如 RUBISCO 的小的亚单位或者热休克启动子(参见 Coruzzi, G 等人(于 1984 年)在 *EMBO J.* 《欧洲分子生物学学会杂志》3:1671-1680 中发表的文章; Broglie, R. 等人(于 1984 年)在 *Science* 《科学》224:838-843 中发表的文章; 以及 Winter, J. 等人(于 1991 年)在 *Results Probl. Cell Differ.* 《由细胞文化而产生的问题》17:85-105 中发表的文章)。可以通过直接的 DNA 转化作用或者病原体介导的转染作用将这些构建体导入到植物细胞之中。这样的技术在各种一般可以获得的回顾中进行了描述(参见,例如 Hobbs, S. 或者 Murry, LE. (于 1992 年)在 *McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* 《麦格劳-希尔科学与技术年鉴》中发表的文章, McGraw Hill, 纽约, N.Y. ;第 191-196 页)。

[0279] 一种昆虫体系同样被用来进行一种感兴趣的多肽的表达。例如,在一种这样的体系中,苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa Californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 被用来作为一种载体,在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞或者在粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 幼虫中进行外源基因的表达。将编码所述多肽的所述序列克隆至所述病毒的一种非必需区域之内,并且在所述的多角体启动子的控制下进行安置 (place),其中所述的病毒的非必需区域是例如所述的多角体基因。所述的编码多肽的序列的成功插入使得所述的多角体基因发生灭活并且生成了重组的病毒缺乏性的外壳蛋白。之后所述的重组病毒被用来感染例如草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 细胞或者粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 的幼虫,在所述的草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 细胞或者粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 的幼虫中,所述的感兴趣的多肽被进行了表达(参见 Engelhard, E. K. 等人(于 1994 年)在 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 《美国科学院院刊》91:3224-3227 中发表的文章)。

[0280] 特异性的起始信号同样被用来实现所述序列的更为有效的翻译,其中所述的序列编码一种感兴趣的多肽。这样的信号包括所述的 ATG 起始密码子以及邻近的序列。在编码所述多肽的序列的情形中,当其起始密码子以及上游序列被插入到所述的适宜的表达载体之中时,可以不需要额外的转录或者转录控制信号。然而,在仅仅插入编码序列、或者仅仅插入编码序列中的一部分的情形中,需要提供外源性的翻译控制信号,其中所述的翻译控制信号中包括所述的 ATG 起始密码子。此外,所述的起始密码子存在于所述的正确的阅读框内,从而确保上述被插入的多核苷酸进行正确的翻译。外源性的翻译元件以及起始密码子可以是各种不同的来源的,天然的以及合成的。

[0281] 通常通过向所述的载体中插入一种增强子序列,来增强 DNA 的转录,其中所述的 DNA 编码本发明中所述的一种多肽。许多增强子序列是已知的,包括,例如,那些在编码球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白、以及胰岛素的基因中识别出的增强子序列。然而,通常情况下,使用的是一种来自于真核细胞病毒的增强子。例子包括所述的猿猴病毒 40(SV40) 增强子,所述的细胞巨化病毒早期启动子增强子,所述的多瘤病毒增强子,以及腺病毒增强子,其中所述的猿猴病毒 40 增强子存在于所述的复制起点的后侧 (late side) (bp100-270),所述的多瘤病毒增强子存在于所述的复制起点的后侧 (late side)。同样可以参见 Yaniv(于 1982 年)在 Nature《自然》297:17-18 中发表的文章中关于增强元件的描述,其中所述的增强元件用于进行真核启动子的活化。所述的启动子被拼接进入所述的载体之中,位于 5' 或者 3' 至所述的编码多肽的序列的位置上,但是优选的存在于所述的启动子的 5' 位点上。

[0282] 在真核性的宿主细胞(酵母,真菌,昆虫,植物,动物,人类,或者来自于其他的多分子生物体的有核细胞)中使用的表达载体中通常还含有一种序列,所述的序列对于所述转录的终止以及稳定所述的 mRNA 而言是必需的。这样的序列通常可以从所述的 5' 以及偶尔为 3'、未经翻译的真核性的或者病毒性的 DNA 或者 cDNA 处获得。这些区域中含有核苷酸片段,其中所述的核苷酸片段作为经过聚腺苷酸化作用的片段在所述的 mRNA 的未经翻译的区域中进行转录,其中所述的 mRNA 对抗 - 前列腺干细胞 (PSCA) 抗体进行编码。一种有效的转录终止组分是所述的牛生长激素聚腺苷酸化作用区域。参见 W094/11026 以及在那里公开的所述表达载体。

[0283] 用于在本发明所述的载体中进行所述 DNA 的克隆或者表达的适合的宿主细胞是上文中所描述的原核细胞,酵母,植物细胞或者更高级的真核细胞。用于这一目的的适合的原核细胞的例子包括真细菌,例如革兰氏阴性生物体或者革兰氏阳性生物体,例如肠内细菌科 (Enterobacteriaceae) 例如埃希氏菌属 (Escherichia),例如大肠杆菌 (E. coli),肠产气杆菌 (Enterobacter),欧文菌属 (Erwinia),克雷伯氏菌 (Klebsiella),变形杆菌属 (Proteus),沙门氏菌 (Salmonella),例如,鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium),沙雷菌属 (Serratia),例如,黏质沙雷氏菌 (Serratia marcescans),以及志贺氏杆菌 (Shigella),以及杆菌 (Bacilli) 例如枯草芽孢杆菌 (B. subtilis) 以及地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis) (例如,在 1989 年 4 月 12 日公开的 DD266710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P),假单胞菌属 (Pseudomonas) 例如铜绿色假单胞菌 (P. aeruginosa),以及链霉菌属 (Streptomyces)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC31446),尽管其他的菌株例如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC31537),以及大肠杆菌 W3110(ATCC27325) 是适

合的。这些例子是描述性的而不是限制性的。

[0284] 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 或者常见的面包酵母, 是低级的真核宿主微生物中最为广泛使用的。然而, 许多其他的属、种、以及菌株是通常可以利用的并且是可以在本发明中进行使用的, 例如栗酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 宿主例如, 乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*), 脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC12424), 保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC16045), 魏氏克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC24178), *K. waltii* (ATCC56500), 果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC36906), 耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*), 以及马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*); 耶罗维亚酵母 (*Yarrowia*) (EP402226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183070); 假丝酵母 (*Candida*); 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) (EP244234); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*); 许旺酵母 (*Schwanniomyces*) 例如 *Schwanniomyces occidentalis*; 以及丝状真菌例如, 脉孢菌 (*Neurospora*), 青霉菌 (*Penicillium*), 环孢菌素 (*Tolypocladium*), 以及曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主例如构巢曲霉菌 (*A. nidulans*) 以及黑曲霉 (*A. niger*)。

[0285] 在某些实施方式中, 对一种宿主细胞菌株进行选择, 选择所述的菌株对所述的被插入序列的表达进行调节的能力, 或者以所期望的方式对所述表达的蛋白质进行加工的能力。对所述多肽所进行的这样的修饰方式包括, 但不局限于, 乙酰基化, 羧基化, 糖基化, 磷酸化, 脂化, 以及酰基化。同样可以使用翻译后的加工 (processing) 来促进正确的插入, 折叠和 / 或发挥功能, 其中所述的翻译后的加工将所述蛋白质的“前体原 (prepro)”形式切断。可以选择不同的宿主细胞, 从而确保对所述的外源蛋白进行正确的修饰以及加工, 其中所述的宿主细胞是例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 猿猴肾细胞 (COS), 海拉细胞 (HeLa), MDCK (犬肾细胞), 人胚肾细胞 (HEK) 293, 以及 W138 (人肺) 细胞, 这些宿主细胞具有特异性的细胞机器以及适合于这种翻译后的活性的特征机制。

[0286] 特别适合于所述抗体的表达或者所述抗体片段的表达的方法以及试剂同样是本领域已知的并且可以利用的, 包括那些在例如美国专利 No. 4816567 以及 6331415 中所描述的。在各种不同的实施方式中, 抗体的重链以及轻链, 或者是所述重链以及轻链的片段, 可以在相同的载体中进行表达或者在单独的载体中进行表达。在一种实施方式中, 两条链在相同的细胞中进行表达, 从而促进了一种功能性抗体的形成, 或者是所述的功能性抗体的片段的形成。

[0287] 完整长度的抗体、抗体片段、以及抗体融合蛋白可以在细菌中进行制备, 特别是当不需要进行糖基化以及 Fc 效应器功能时, 例如, 当所述的治疗性抗体与一种细胞毒性试剂 (例如, 一种毒素) 发生偶联并且所述的免疫偶联物本身就能够在破坏被感染细胞的方面表现出功效的时候。抗体片段以及多肽在细菌中的表达, 可以参见, 例如, 美国专利 No. 5648237, 5789199, 以及 5840523, 上述文章中描述了用于进行最优化的表达以及分泌所需要的翻译起始区域 (TIR) 以及信号序列。在进行表达之后, 将所述的抗体从所述的大肠杆菌细胞中分离出来, 其中所述的大肠杆菌细胞粘附在一种可溶性的片段之上, 并且可以由例如一种蛋白质 A 柱或者蛋白质 G 柱对其进行纯化, 柱的选择取决于所述的同型体。可以使用一种方法实施最终的纯化, 其中所述的方法与用来对在例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中进行表达的抗体的纯化的方法相类似。

[0288] 用于进行所述的糖基化的多肽以及抗体的表达的适合的宿主细胞来自于多细胞有机体。无脊椎细胞的例子包括植物细胞以及昆虫细胞。已经识别出了许多杆状病毒的菌株及其变体以及相应的被许可的昆虫宿主细胞,其中所述的昆虫宿主细胞来自于例如下述的宿主:草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫),埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子),白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子),黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (实蝇),以及桑蚕 (*Bombyx mori*)。用于进行转染的各种不同的病毒菌株是公众可以获得的,例如,所述的苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa Californica*) 核型多角体病毒 (NPV) 的 L-1 变体以及桑蚕 (*Bombyx mori*) 核型多角体病毒 (NPV) 的 Bm-5 菌株,并且依据本发明,这样的病毒可以用来作为本发明中所使用的病毒,特别是用来进行草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、爱牵牛花、西红柿、以及烟草的植物细胞培养物同样可以被利用来作为宿主。

[0289] 用于在培养物(组织培养物)中的脊椎细胞中进行抗体多肽的繁殖以及抗体多肽片段的繁殖的方法被涵盖在本发明的范围之内。用在本发明中所述的方法之中的哺乳动物宿主细胞系的例子是利用猿猴病毒 40 (SV40) 进行转化的猴肾 (CV1) 细胞系(猿猴肾细胞-7, ATCC CRL1651);人类胚肾细胞系(293 细胞或者被进行亚克隆从而在悬浮的培养物中进行生长的 293 细胞,参见 Graham 等人(于 1977 年)在 J. Gen Virol. 《遗传病毒杂志》36:59 中发表的文章);幼地鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (二氢叶酸还原酶基因) (CHO, 参见 Urlaub 等人(于 1980 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA《美国科学院院刊》77:4216 中发表的文章);小鼠赛尔托利细胞 (TM4, 参见 Mather (于 1980 年)在 Biol. Reprod. 《繁殖生物学》23:243-251 中发表的文章);猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587);人类子宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2);犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34);布法罗大鼠肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL1442);人类肺细胞 (W138, ATCC CCL75);人类肝细胞 (Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51);1 型 T 调节细胞 (TR1) (参见 Mather 等人(于 1982 年)在 Annals N. Y. Acad. Sci. 《纽约科学学会年报》383:44-68 中发表的文章);MRC5 细胞;FS4 细胞;以及人类肝细胞瘤细胞系 (Hep G2)。

[0290] 使用上文中描述的用于进行多肽的制备的表达载体或者克隆载体对宿主细胞进行转化,并且将其培养于常规的营养培养基中,用于诱导启动子,筛选转化体,或者对编码所述的期望序列的所述基因进行扩增,其中所述的营养培养基是经过适宜的修饰的。

[0291] 为了对重组蛋白质进行长期的、高产量的制备,稳定的表达一般而言是优选的。例如,使用表达载体对能够稳定的表达一种感兴趣的多核苷酸的细胞系进行转化,其中在所述的表达载体中含有复制的病毒起始物和/或内源性表达元件以及一种选择性的标记物基因,其中所述的基因存在于上述的表达载体之上或者存在于一种单独的载体之上。在完成上述载体的导入之后,允许细胞在富集的培养基中进行 1-2 天的生长,在此之后将它们转移到选择性培养基中。所述的选择性的标记物的作用在于提供对选择的抗性,并且它的存在使得所述的细胞能够进行生长以及回收,其中所述的细胞成功的对上述插入的序列进行了表达。使用与所述的细胞类型相适应组织培养技术对经过稳定转化的细胞的抗性克隆进行扩增。

[0292] 可以使用大多数的选择系统来回收经过转化的细胞系。这些系统包括,但不局限于,所述的单纯疱疹病毒胸苷激酶(参见 Wigler M. 等人(于 1977 年)在 Cell《细胞》11:

223-32 中发表的文章) 基因以及腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(参见 Lowy, I. 等人(于 1990 年)在 *Cell* 《细胞》22 :817-23 中发表的文章) 基因,上述的基因分别被用在 tk^- 细胞中或者 $aprt^-$ 细胞中。同样的,抗代谢物、抗生素或者除草剂抗性被用来作为进行所述选择的基础;例如,二氢叶酸还原酶基因($dhfr$),其提供对于甲氨蝶呤的抗性(参见 Wigler, M. 等人(于 1980 年)在 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 《美国科学院院刊》77 :3567-70 中发表的文章); npt , 其提供对于所述的氨基糖苷类、新霉素以及 G-418 的抗性(参见 Colbere-Garapin, F. 等人(于 1981 年)在 *J. Mol. Biol.* 《分子生物学杂志》150 :1-14 中发表的文章);以及 als 或者 pat , 其提供分别对于氯磺隆以及膦丝菌素乙酰基转移酶的抗性(参见 Murry 发表的文章,同上)。另外的选择性的基因也已经有过描述。例如, $trpB$ 允许细胞利用吡啶来替代色氨酸,而 $hisD$ 允许细胞利用 $histinol$ 来替代组氨酸(参见 Hartman, S. C. 以及 R. C. Mulligan(于 1988 年)在 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 《美国科学院院刊》85 :8047-51 中发表的文章)。所述的可见标记物的使用被得到了普及,这样的标记物例如花青素、 β -葡萄糖苷酸酶及其底物 GUS、以及荧光素酶及其底物虫荧光素不仅被广泛的用来识别转化体,同样也被用来对归结于一种特异性的载体系统的短暂的蛋白表达或者稳定的蛋白表达的量进行量化(参见 Rhodes, C. A. 等人(于 1995 年)在 *Methods Mol. Biol.* 《分子生物学方法》55 :121-131 中发表的文章)。

[0293] 尽管所述的标记物基因表达的存在 / 不存在表明了所述的感兴趣的基因同样是存在的,它的存在以及表达是被确定的。例如,如果将编码一种多肽的所述序列插入到一种标记物基因序列之内,可以通过所述的标记物基因在功能上的缺失来识别出含有序列的重组细胞。可以选择的,在一个单独的启动子的控制下,将一种标记物基因与一种编码多肽的序列进行串联放置。所述的标记物基因因为应答诱导或者选择而进行的表达通常也指示着所述的串联基因的表达。可以选择的,通过本领域技术人员已知的各种不同的操作步骤对含有并且表达一种期望的多核苷酸序列的宿主细胞进行识别。这些操作步骤包括,但不局限于, DNA-DNA 杂交技术或者 DNA-RNA 杂交技术以及蛋白质的生物检测技术或者蛋白质的免疫检测技术,其中所述的免疫检测技术包括,例如,基于膜、溶液、或者芯片的技术,用于对核酸或者蛋白质进行探测和 / 或量化。

[0294] 用于对所述的编码多核苷酸的产物的表达进行探测以及测量的各种不同的方案是本领域已知的,其中在所述的方案中,使用对所述的产物具有特异性的多克隆抗体或者单克隆抗体。非限制性的例子包括酶联免疫吸附检测 (ELISA),放射性免疫检测 (RIA),以及荧光激活的细胞分选器 (FACS)。对于某些应用而言,优选的是一种基于单克隆抗体的双位点的免疫检测,在所述的免疫检测中利用一种单克隆抗体,所述的单克隆抗体能够与存在于一个给定的多肽之上的两个互不干扰的表位发生反应,但是是一种竞争性的结合检测同样是可以使用的。除了其他出处之外,这些检测以及其他的检测在 Hampton, R. 等人(于 1990 年; *Serological Methods, a Laboratory Manual* 《血清学方法实验室手册》, APS 出版社, St Paul, Minn.) 发表的文章中以及 Maddox, D. E. 等人(于 1983 年;在 *J. Exp. Med.* 《实验医学杂志》158 :1211-1216 中) 发表的文章中进行了描述。

[0295] 各种不同的标记物以及偶联技术是本领域技术人员已知的并且可以被用在各种不同的核酸检测以及氨基酸检测中。用于制备经过标记的杂交探针或者聚合酶链式反应 (PCR) 探针的方式包括寡核苷酸标记,切口平移,末端标记或者聚合酶链式反应扩增,其中

所述的探针用于对与多核苷酸相关的序列进行探测,所述的聚合酶链式反应扩增中使用了一种经过标记的核苷酸。可以选择的,将所述的序列或者是所述序列中的任何一部分克隆至一种载体之中,用来进行一种 mRNA 探针的制备。这样的载体是本领域中已知的,是可以通过商业购买获得的,并且可以用来进行 RNA 探针的体外合成,其中所述的体外合成是通过添加一种适宜的 RNA 聚合酶以及经过标记的核苷酸的方式来实现的,所述的 RNA 聚合酶是例如 T7, T3, 或者 SP6。使用各种不同的商业购买获得的试剂盒来执行这些操作步骤。可以使用的适合的报道分子或者标记物包括,但不局限于,放射性核, 酶, 荧光试剂, 化学发光试剂, 或者发色试剂以及底物, 辅因子, 抑制剂, 磁性粒子, 以及类似的物质。

[0296] 由一种重组细胞制备得到的所述多肽在细胞内进行分泌或者被容纳在细胞内,这取决于所使用的所述序列和 / 或所述载体。含有本发明中所述的多核苷酸的表达载体被设计成为含有信号序列,其中所述的信号序列经由一种原核细胞膜或者真核细胞膜对上述被编码的多肽的分泌进行指导。

[0297] 在某些实施方式中,本发明中所述的多肽是以一种融合多肽的形式被进行制备的,其中在所述的融合多肽中进一步的包括一种多肽结构域,所述的多肽结构域能够促进可溶性蛋白质的纯化。这样的促进纯化的结构域包括,但不局限于,金属螯合型肽例如组氨酸-色氨酸模块,所述的肽能够允许在固定化的金属上进行纯化;蛋白 A 结构域,所述的结构域能够允许在固定化的免疫球蛋白上进行纯化;以及那些在所述的 FLAGS 延展 / 亲和纯化系统 (Amgen, 西雅图, 华盛顿州) 中利用到的所述结构域。为了促进纯化,在所述的纯化结构域与所述的被编码的多肽之间纳入可切断的连接序列,其中所述的可切断的连接序列是例如那些对 XA 因子或者肠激酶具有特异性的序列 (Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)。一种范例性的表达载体提供了一种融合蛋白的表达,其中在所述的融合蛋白中含有一种感兴趣的多肽以及一种核酸,所述的核酸编码 6 个组氨酸残基,所述的组氨酸残基位于一个硫氧还蛋白或者肠激酶切割位点的前方。按照 Porath, J. 等人 (于 1992 年在 Prot. Exp. Purif. 《蛋白质的表达以及纯化》3 :263-281 中发表的文章中) 的描述,所述的组氨酸残基促进了在 IMIAC (固定化金属离子亲和色谱) 上进行的纯化,同时所述的肠激酶切割位点提供了一种从所述的融合蛋白中对所期望的多肽进行纯化的方式。在 Kroll, D. J. 等人 (于 1993 年在 DNA Cell Biol 《DNA 与细胞生物学》12 :441-453 中) 发表的文章中提供了对于载体的讨论,其中所述的载体被用来进行融合蛋白的制备。

[0298] 在某些实施方式中,将本发明中所述的一种多肽与一种异源的多肽进行融合,其中所述的异源多肽可以是一种信号序列或者是其他的多肽,其在所述的成熟蛋白或者多肽的 N- 末端上具有一个特异性的切割位点。所选择的异源性的信号序列优选的是一种由所述的宿主细胞进行识别以及加工 (即,由一种信号肽酶进行切割) 的信号序列。对于原核性的宿主细胞而言,所述的信号序列是从例如下面的组中选择出来的:碱性磷酸酶,青霉素酶,蛋白磷酸酯酶 1 (1pp), 或者热稳定的 II 型肠毒素的前导序列。对于酵母分泌物而言,所述的信号序列是从例如下述物质中选择出来的:酵母转化酶前导序列, α 因子前导序列 (包括啤酒酵母 α 因子前导序列以及克鲁维酵母 α 因子前导序列), 或者酸性磷酸酶前导序列,白色念珠菌 (C. albicans) 葡萄糖淀粉酶前导序列,或者在 W090/13646 中描述的信号序列。在哺乳动物细胞的表达中,哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如所述的单纯疱疹 gD 信号,是可以利用的。

[0299] 当使用重组技术时,所述的多肽或者抗体是在细胞内进行制备的,存在于所述的外周胞质间隙里,或者直接分泌在所述的介质之中。如果所述的多肽或者抗体是在细胞内进行制备的,作为第一个步骤,将所述的微粒碎片,无论是宿主细胞或者是溶解的片段,进行去除,其中所述的去除是例如通过离心或者超滤的手段来实现的。Carter 等人(于 1992 年)在 Bio/Technology 《生物/技术》10:163-167 中发表的文章中描述了一种分离抗体的操作步骤,其中所述的抗体在所述的大肠杆菌的外周胞质间隙内进行了分泌。简要的说,在有醋酸钠(pH3.5)、乙二胺四乙酸(EDTA)、以及苯甲基磺酰基氟(PMSF)存在的条件下,使细胞团进行大约 30 分钟的解冻。通过离心除去细胞碎片。当所述的多肽或者抗体在所述的介质之中进行分泌时,一般而言,首先使用一种可商业购买获得的蛋白质浓缩过滤器对来自于这样的表达系统中的上清液进行浓缩,其中所述的蛋白质浓缩过滤器是例如,一种 Amicon 或者 Millipore Pellicon 超滤单元。任选的,一种蛋白酶抑制剂被包括在上述步骤中的任何一个步骤中,用以抑制蛋白质的水解,并且抗生素是被包括在内的,用以防止所述的外来污染物的生长,其中所述的蛋白酶抑制剂是例如苯甲基磺酰基氟(PMSF)。

[0300] 使用例如下述方法对从所述的细胞中制备得到的所述的多肽组合物或者抗体组合物进行纯化:羟基磷灰石色谱法,凝胶电泳法,透析法,以及亲和色谱法,其中亲和色谱法是所述的优选的纯化技术。所述的蛋白质 A 作为一种亲和配位体所具有的适宜性取决于存在于所述的多肽或者抗体之中的任何免疫球蛋白的 Fc 结构域的种类以及同型体。蛋白质 A 被用来对抗体或者所述抗体的片段进行纯化,其中所述的抗体或其片段是以人类 $\gamma 1$ 重链、 $\gamma 2$ 重链、或者 $\gamma 4$ 重链为基础的(参见 Lindmark 等人(于 1983 年)在 J. Immunol. Meth. 《免疫学方法杂志》62:1-13 中发表的文章)。对于所有的小鼠同型体以及人类 $\gamma 3$ 而言,蛋白质 G 是推荐的(参见 Guss 等人(于 1986 年)在 EMBO J. 《欧洲分子生物学学会杂志》5:1567-1575 中发表的文章)。最为常见的与所述的亲和配位体发生连接的所述的基质是琼脂糖,但是其他的基质是可以利用的。与琼脂糖能够取得的效果相比,具有机械稳定性的基质能够允许更快的流动速度以及更短的处理时间,其中所述的具有机械稳定性的基质是例如孔度可控的玻璃或者聚(苯乙烯二乙烯基)苯。当所述的多肽或者抗体中包括一个重链恒定结构域 3(C_H3)时,所述的 Bakerbond ABX™ 树脂(J. T. Baker, 菲利普斯堡,新泽西州)可以被有效的用来进行纯化。用于进行蛋白质的纯化的其他技术同样是可以利用的,这取决于需要进行回收的所述的多肽或者抗体,其中所述的其他技术是例如在离子交换柱上进行的分馏法,乙醇沉淀法,逆相高效液相色谱法(HPLC),硅石色谱法,肝磷脂色谱法,在阴离子交换树脂或者阳离子交换树脂上进行的琼脂糖凝胶(SEPHAROSE™)色谱法(例如一种聚天冬氨酸柱),层析聚焦技术,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE),以及硫酸铵沉淀法。经过任意的初步纯化步骤之后,使包括所述的感兴趣的多肽或者抗体以及污染物的所述混合物进行低 pH 下的疏水作用层析处理,在所述的疏水作用层析处理中,使用一种 pH 在大约 2.5-4.5 的范围内的洗脱缓冲液,优选的在低盐浓度的条件下(例如,从大约 0-0.25M 的盐)进行所述的处理。

[0301] 药物组合物

[0302] 本发明中进一步的包括药物制剂,其中在所述的药物制剂中包括以一种期望的纯化程度存在的本发明所述的一种多肽、抗体、或者调节剂,以及一种药物可接受性的载体、赋形剂、或者稳定剂(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿氏药物科学》第

16 版, Oslo, A. (于 1980 年) 编著)。在某些实施方式中, 将药物制剂制成例如所述的冻干制剂或者水溶液的形式, 用以在存储的过程中增强所述多肽或者抗体的稳定性。可接受性的载体、赋形剂、或者稳定剂指的是在所使用的剂量以及浓度的条件下对接受者而言是无毒性的, 并且包括, 例如, 缓冲剂例如醋酸盐缓冲液, Tris 缓冲液, 磷酸盐缓冲液, 柠檬酸盐缓冲液以及其他的有机酸缓冲液; 抗氧化剂包括抗坏血酸以及蛋氨酸; 防腐剂 (例如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵; 六甲胺氯; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚, 丁醇或者苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或者对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 以及间甲酚); 低分子量 (小于大约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 例如血清白蛋白, 凝胶, 或者免疫球蛋白; 亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸例如甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 组氨酸, 精氨酸, 或者赖氨酸; 单糖, 二糖, 以及其他的碳水化合物包括葡萄糖, 甘露糖, 或者糊精; 螯合试剂例如乙二胺四乙酸 (EDTA); 激励剂 (tonicifier) 例如海藻糖以及氯化钠; 糖类例如蔗糖, 甘露醇, 海藻糖或者山梨醇; 表面活性剂例如聚山梨醇酯; 成盐反义离子例如钠; 金属复合物 (例如, 锌-蛋白质复合物); 和 / 或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™ (吐温), PLURONICS™ (聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物) 或者聚乙二醇 (PEG)。在某些实施方式中, 所述的治疗制剂中优选的包括以存在于 5-200 毫克 / 毫升的范围之间的浓度存在的所述多肽或者抗体, 优选的存在于 10-100 毫克 / 毫升的范围之间。

[0303] 在本发明中所述的制剂中同样含有一种或者多种另外的治疗试剂, 其中所述的治疗试剂适用于对所述特定的迹象所进行的治疗, 所述的特定的迹象是例如需要接受治疗的感染, 或者防止不期望的副作用的出现。优选的, 所述的另外的治疗试剂具有一种与本发明中所述的多肽或者抗体相互补的活性, 并且两者之间不会彼此产生负面影响。例如, 除了本发明中所述的多肽或者抗体之外, 向所述的制剂中加入一种另外的或者第二种抗体、抗病毒试剂、抗感染试剂和 / 或保心药。这样的分子适合于以能够有效的达到预期的目的的剂量存在于所述的药物制剂当中。

[0304] 同样可以将所述的活性成分包埋在微胶囊中, 胶状药物递送系统中 (例如, 脂质体, 白蛋白微球体, 微乳液, 纳米粒子以及纳米胶囊)、或者大分子乳液中, 其中, 所述的活性试剂例如是本发明中所述的多肽以及抗体以及其他的治疗试剂, 所述的微胶囊是通过例如凝聚技术或者通过分界面聚合作用来进行制备的, 所述的微胶囊是例如, 分别制成羟甲基纤维素微胶囊或者凝胶-微胶囊以及聚 (甲基丙烯酸) 微胶囊。在 Oslo, A. (于 1980 年) 编著的 Remington's Pharmaceutical Sciences 《雷明顿氏药物科学》第 16 版本中对这样的技术进行了公开。

[0305] 可以制备持续释放的制剂。适宜的持续释放的制剂的例子包括, 但不局限于, 固体疏水性聚合物的半渗透性基质, 其中在所述的固体疏水性聚合物中含有所述的抗体, 所述的基质是以成型的物体的形式存在的, 例如, 膜, 或者微胶囊。持续释放的基质的非限制性的例子包括聚酯, 水凝胶 (例如, 聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯), 或者聚 (乙烯醇)), 聚交酯 (参见美国专利 No. 3773919), L-谷氨酸与 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物, 非可降解型的乙烯-醋酸乙烯, 可降解型的乳酸-羟基乙酸共聚物例如所述的 LUPRON DEPOT™ (可注射型的微球体, 所述的微球体是由乳酸-羟基乙酸共聚物以及醋酸亮丙瑞林组成的), 以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0306] 用于进行体内施用的制剂优选的是无菌的。这可以通过过滤的方式来容易的进行

实现,其中所述的过滤是经由无菌性的过滤膜来实现的。

[0307] 诊断性的用途

[0308] 与普通的对照细胞以及组织相比较而言,本发明中所述的抗体以及抗体片段,以及治疗组合物,与被感染的细胞或者组织发生特异性的结合,或者优先的与被感染的细胞或者组织发生结合。因此,这些 A 型流行性感冒抗体被用来在一名患者中、在一种生物学样本中、或者在细胞种群中进行被感染细胞或者组织的探测,其中所述的探测使用到各种不同的诊断方法以及预测方法中的任意一种,包括那些在本发明中所描述的方法。一种抗基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 的特异性抗体所具有的探测被感染细胞的能力取决于它所具有的结合特异性,这可以通过下述方式来容易的进行确定:对所述的抗体与被感染细胞或者组织进行结合的能力进行测试,其中所述的被感染细胞或者组织是从不同的患者处获得的,和/或是从感染有不同的 A 型流行性感冒菌株的患者处获得的。诊断性的方法一般而言包括:将从一名患者处获得的一种生物学样本与一种 A 型流行性感冒进行接触,其中所述的生物学样本是例如,血液,血清,唾液,尿液,痰液,一种细胞涂抹样本,或者一种组织的生物学切片,其中所述的 A 型流行性感冒是例如一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体,并且确定与一种对照样本相比或者与预先确定的临界值相比,所述的抗体是否能够与所述的样本进行优选的结合,从而表明所述的被感染细胞是否存在。在特定的实施方式中,与一种适宜的对照普通细胞或者组织样本相比较而言,有至少两倍的、三倍的、或者五倍的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体与一种被感染的细胞进行了结合。一种预先确定的临界值是通过例如下述方式确定的:对所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体的数量取平均值,其中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体是与几种不同的适宜的对照样本进行结合的抗体,所述的结合是在与用来实现所述的诊断性检测相同的条件下所进行的结合,其中所述的诊断性检测是针对接受测试的所述的生物学样本来实施的。

[0309] 使用本发明中所描述的操作步骤以及本领域中已知的操作步骤对结合的抗体进行探测。在某些实施方式中,本发明中所述的诊断方法是使用人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体来进行实践的,其中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体与一种可探测性的标记物进行了偶联,所述的可探测性的标记物是例如一种荧光团,用以促进对结合抗体所进行的探测。然而,同样可以使用所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体的二级探测方法来实践本发明中所述的诊断方法。这些方法包括,例如,放射性免疫检测 (RIA),酶联免疫吸附检测 (ELISA),沉淀反应,凝集反应,补体结合以及荧光免疫检测。

[0310] 在某些操作步骤中,所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体是经过标记的。所述的标记物可以直接被探测到。能够被直接探测到的范例性的标记物包括,但不局限于,放射性标记物以及荧光染料。可以选择,或者除此之外的,标记物是半族类物质,例如酶,其中所述的半族类物质必须要发生反应或者经过衍生才能被探测到。同位素标记物的非限制性的例子是 ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 以及 ^{35}S 。可以使用的荧光材料包括,但不局限于,例如,荧光素及其衍生物,若丹明及其衍生物,金胺,尸胺,伞形酮, luciferia, 2, 3-dihydrophthalazinediones, 辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,溶菌酶,以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0311] 可以使用当前可以利用的比色技术、分光光度技术、荧光分光光度技术或者气体定量分析技术中的任意一种,对一种酶标记物进行探测。用在这些操作步骤中的许多酶是

已知的并且是在本发明所述的方法中可以利用的。非限制性的例子是过氧化物酶,碱性磷酸酶, β -葡萄糖苷酸酶, β -D-葡萄糖苷酶, β -D-半乳糖苷酶,尿素酶,葡萄糖氧化酶/过氧化物酶,半乳糖氧化酶/过氧化物酶以及酸性磷酸酶。

[0312] 通过已知的方法利用这样的标记物对所述的抗体进行标记。例如,可以使用耦联试剂利用上文中描述的荧光标记物、化学发光标记物、以及酶标记物对所述的抗体进行标记,其中所述的耦联试剂是例如乙醛,碳二亚胺,马来酰亚胺,酰亚胺酯,琥珀酰亚胺,双-重氮联苯胺以及类似的试剂。通常情况下,使用桥接分子将一种酶与一种抗体分子进行结合,其中所述的桥接分子是例如碳二亚胺,高碘酸盐,二异氰酸盐,戊二醛以及类似的分子。在下述文章中对各种不同的标记技术进行了描述:Morrison(于1974年)在Methods in Enzymology《酶学方法》32b,103中发表的文章,Syvanen等人(于1973年)在J. Biol. Chem.《生物化学杂志》284,3762中发表的文章以及Bolton与Hunter(于1973年)在Biochem J.《生物化学杂志》133,529中发表的文章。

[0313] 本发明中所述的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体能够对患有A型流行性感胃感染的患者以及未患有A型流行性感胃感染的患者进行区分,并且能够确定出一名患者是否患有感染,其中所述的区分以及确定使用的是在本发明中所提供的代表性的检测方法。根据一种方法,一种生物学样本是从一名患者处获得的,所述的患者被怀疑为患有一种A型流行性感胃感染,或者已知所述的患者已经患有一种A型流行性感胃感染。在优选的实施方式中,所述的生物学样本包括来自于所述患者的细胞。将所述的样本与一种人类基质2蛋白细胞外结构域抗体进行接触,例如,在足以允许所述的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体与存在于所述的样本之中的被感染细胞进行结合的时间以及条件下使其发生接触。例如,将所述的样本与一种人类基质2蛋白细胞外结构域抗体进行10秒钟的接触,30秒钟的接触,1分钟的接触,5分钟的接触,10分钟的接触,30分钟的接触,1小时的接触,6小时的接触,12小时的接触,24小时的接触,3天的接触或者是存在于上述时间范围之间的任意时间点的接触。对上述发生结合的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体的数量进行确定并且将其与一种对照的数值进行比较,其中所述的对照数值可以是,例如,一个预先确定的数值或者是一个从普通的组织样本中确定的数值。与所述的对照样本相比较而言,与所述的患者样本发生结合的抗体的数量的增加则表明着在所述的患者样本中所述的被感染细胞的存在。

[0314] 在一种相关的方法中,将一种从一名患者处获得的生物学样本与一种人类基质2蛋白细胞外结构域抗体进行接触,其中进行接触的时间以及条件足以允许所述的抗体与被感染的细胞发生结合。之后对发生结合的抗体进行探测,并且所述的结合抗体的存在则表明着在所述的样本中含有被感染的细胞。当所述的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体并不能以一种可探测性的水平与普通的细胞进行结合时,这种实施方式是格外有效的。不同的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体拥有不同的结合特征以及特异性特征。依据这些特征,使用特定的人类基质2蛋白细胞外结构域抗体对一种或者多种A型流行性感胃的菌株的存在进行探测。例如,某些抗体仅仅与一种或者几种流行性感胃病毒的菌株进行特异性的结合,而其他的抗体能够与全部的或者绝大部分的流行性感胃的不同菌株进行结合。仅仅对一种A型流行性感胃菌株具有特异性的抗体被用来对由所述的一种菌株所带来的感染进行识别。

[0315] 在某些实施方式中,与一种被感染的细胞进行结合的抗体优选的生成一种信号,表明在参与进行所述感染的探测的患者中至少有大约 20% 的患者存在有这种感染,更加优选的为至少大约 30% 的患者。可以选择的,或者除此之外的,所述的抗体生成一种负性的信号,表明在参与进行所述感染的探测患者中至少有大约 90% 的个体不存在有这种感染。每一种抗体都满足上述的标准;然而,可以对本发明中所述的抗体进行组合使用,从而提高敏感性。

[0316] 本发明中同样包括能够有效的实现诊断性的检测以及预测性的检测的试剂盒,其中在所述的检测中使用到本发明中所述的抗体。本发明中所述的试剂盒中包括一种适合的容器,在所述的容器内装有本发明中所述的一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体,其中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体是以经过标记的形式或者未经标记的形式存在的。除此之外,当所述的抗体是以一种适合于进行间接性的结合检测的经过标记的形式来提供时,所述的试剂盒中进一步的包括用于实现所述的适宜的间接性检测的试剂。例如,所述的试剂盒中包括一个或者多个适当的容器,在所述的容器内装有酶底物或者衍生试剂,这取决于所述的标记物所具有的性质。对照样本和 / 或说明书是同样被包括在内的。

[0317] 治疗性的用途 / 预防性的用途

[0318] 对于病毒性疾病的预防以及治疗而言,被动免疫已经被证实是一种有效的并且安全的策略(参见 Keller 等人(于 2000 年)在 Clin. Microbiol. Rev. 《临床微生物学评论》13:602-14 中发表的文章;Casadevall(于 2002 年)在 Nat. Biotechnol. 《自然生物技术》20:114 中发表的文章;Shibata 等人(于 1999 年)在 Nat. Med. 《天然药理学》5:204-10 中发表的文章;以及 Igarashi 等人(于 1999 年)在 Nat. Med. 《天然药理学》5:211-16 中发表的文章,上述文章中的每一篇均在本发明中被引入作为参考)。使用人类单克隆抗体的被动免疫提供了一种直接的治疗策略,用于对流行性感冒进行紧急的预防以及治疗。

[0319] 与普通的对照的未经感染的细胞以及组织相比较而言,本发明中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体以及上述抗体的片段,以及治疗组合物,能够与被感染的细胞发生特异性的结合,或者优先的与被感染的细胞发生结合。因此,这些人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体被用来在一名患者中、在一种生物学样本中、或者在细胞种群中对被感染细胞或者组织进行特异性的作用。根据这些抗体所具有的与所述的感染进行特异性结合的性质,本发明提供了这样的方法:调节(例如,抑制)所述的被感染细胞的生长的方法,杀灭被感染细胞的方法,以及诱导被感染细胞的细胞凋亡的方法。这些方法包括将一种被感染的细胞与本发明中所述的一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体进行接触的步骤。可以在试管内、在活体外、或者在活体内对这些方法进行实践。

[0320] 在各种不同的实施方式中,本发明中所述的抗体本身是具有治疗活性的。可以选择的,或者除此之外的,本发明中所述的抗体可以与一种细胞毒性试剂或者生长抑制剂进行偶联,其中所述的细胞毒性试剂或者生长抑制剂是例如一种放射性同位素或者是一种毒素,被用来对与所述的抗体发生结合或者接触的被感染细胞进行治疗。

[0321] 在一种实施方式中,本发明提供了一种为患者治疗或者预防感染的方法,在所述的方法中包括下述的步骤:向一名患者提供本发明中所述的一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体,其中所述的患者被诊断为患有 A 型流行性感冒感染,或者所述的患者存在发展成为 A 型流行性感冒感染的危险,或者所述的患者被怀疑为患有 A 型流行性感冒感染。本

发明中所述的方法被用在所述感染的一线治疗之中,继续治疗之中,或者被用在一种复发性感染或者难以控制的感染的治疗之中。利用本发明中所述的抗体所进行的治疗是一种独立的治疗。可以选择的,利用本发明中所述的抗体所进行的治疗是一种组合治疗方案中的一个组成部分或者一个阶段,其中在所述的组合治疗方案中还使用到一种或者多种另外的治疗试剂对所述的患者进行治疗。

[0322] 具有患流行性感冒病毒相关性疾病或者障碍的危险的宿主包括这样的患者:所述的患者与一名被感染的人发生过接触,或者所述的患者通过某种其他方式被暴露于所述的流行性感冒病毒之中。可以在所述的症状显现之前进行一种预防性试剂的施用,其中所述的症状表现出所述的流行性感冒病毒相关性疾病或者障碍的特征,这样一来,所述的疾病或者障碍被得以预防,或者,可以选择的,所述的疾病或者障碍在其发展的过程中被得以延迟。

[0323] 在各种不同的方面中,所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域基本上是在所述的宿主发生感染的同时进行施用的,或者在所述的宿主发生感染之后进行施用,即,治疗性的处理方式。在另外一个方面,所述的抗体提供了一种治疗性的益处。在各种不同的方面中,一种治疗性的益处包括对流行性感冒感染所具有的一种或者多种症状或者并发症的发展形成、严重程度、频率、持续时间以及出现概率进行降低或者减轻,对病毒的滴定浓度进行降低或者减小,对病毒的复制进行降低或者减少,或者对一种或者多种流行性感冒菌株中的病毒性蛋白的剂量进行降低或者减少。在另外一个方面,一种治疗性的益处包括加速或者促进宿主在流行性感冒感染中的恢复。

[0324] 进一步的提供了这样的方法,所述的方法对存在于一名宿主体内的流行性感冒病毒的滴定浓度、病毒的复制、病毒的扩增或者流行性感冒病毒性蛋白的剂量的增加进行了预防。在一种实施方式中,一种方法包括了向所述的宿主施用一定剂量的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体,其中所述的剂量能够有效的预防存在于一名宿主体内的流行性感冒病毒的滴定浓度、病毒的复制、或者一种或者多种流行性感冒菌株或其分离物中的流行性感冒病毒性蛋白的剂量的增加。

[0325] 另外提供了一种用于预防宿主发生感染或者降低宿主对于感染所具有的易感性的方法,即,预防性的方法,其中所述的感染是由一种或者多种流行性感冒菌株/分离物或者亚类型来产生的。在一种实施方式中,一种方法包括了向所述的宿主施用一定剂量的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体,其中所述的抗体能够与流行性感冒基质 2 蛋白(M2)进行特异性的结合,所述的剂量能够有效的预防所述的宿主发生感染,或者能够有效的降低所述的宿主对于感染所具有的易感性,其中所述的感染是由一种或者多种流行性感冒菌株/分离物或者亚类型来产生的。

[0326] 任选的,进一步的向所述的宿主施用第二种试剂,其中所述的第二种试剂是例如,但不局限于,一种流行性感冒病毒抗体,一种抗病毒药物例如一种神经氨糖酸苷酶抑制剂,一种透明质酸(HA)抑制剂,一种唾液酸抑制剂或者一种基质 2 蛋白离子通道抑制剂,一种病毒侵入抑制剂或者一种病毒吸附抑制剂。所述的基质 2 蛋白离子通道抑制剂是例如金刚烷胺或者金刚乙胺。所述的神经氨糖酸苷酶抑制剂是例如扎那米韦,或者奥司他韦的磷酸盐。

[0327] 可以被减轻或者被减少的流行性感冒感染的症状或者并发症包括,例如,寒冷,发

热,咳嗽,喉咙痛,鼻塞,鼻窦阻塞,鼻内感染,鼻窦感染,身体疼痛,头痛,疲劳,肺炎,支气管炎,耳部感染,耳部疼痛或者死亡。

[0328] 为了对人类患者以及非人类患者进行体内的治疗,通常向所述的患者施用或者提供一种药物制剂,在所述的药物制剂中包括本发明中所述的一种人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体。当被用来进行体内的治疗时,将本发明中所述的抗体以治疗性的有效剂量(即,能够消除或者减轻所述患者的病毒负担的剂量)对所述的患者进行施用。依照已知的方法,向一名人类患者施用所述的抗体,其中所述的已知方法是例如静脉内施用,例如,作为一种大丸剂或者通过在一段时间内连续灌注的方式,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、或者吸入的途径进行施用。在可能的情况下,可以在所述的目标细胞位点上对所述的抗体进行肠胃外的施用,或者进行静脉内的施用。在某些实施方式中,所述抗体的静脉内施用或者皮下施用是优选的。可以以全身性的、肠胃外的、或者局部的方式向一名患者或者宿主施用本发明中所述的治疗性的组合物。

[0329] 为了进行肠胃外的施用,将所述的抗体与一种药物可接受性的肠胃外溶媒一同配制成为一种单位剂量的可注射形式(溶液,悬浮液,乳状液)。这样的溶媒的例子是水,盐水,罗格氏溶液,葡萄糖溶液,以及 5% 的人血清白蛋白。非水性的溶媒例如不挥发性油以及油酸乙酯同样是可以使用的。脂质体被用来作为载体。所述的溶媒中含有少剂量的添加剂,其中所述的添加剂是例如能够增强等渗性以及化学稳定性的物质,例如,缓冲剂以及防腐剂。所述的抗体在通常情况下是以大约 1 毫克/毫升至 10 毫克/毫升的浓度被配制在这样的溶媒之中的。

[0330] 所述的剂量以及给药方案取决于各种不同的因素,这些因素是内科医生能够容易的进行确定的,例如所述的感染所具有的性质以及与所述的抗体进行偶联的所述特定的细胞毒性试剂或者生长抑制剂(如果使用的话)所具有的特征,例如,它的治疗指数,所述的患者所具有的特征,以及所述患者的病史。一般而言,向一名患者施用治疗性的有效剂量的抗体。在特定的实施方式中,进行施用的所述抗体的剂量存在于大约 0.1 毫克/千克至大约 50 毫克/千克患者体重的范围之内。依据所述的感染所属于的类型以及严重程度,大约 0.1 毫克/千克至大约 50 毫克/千克患者体重(例如,大约 0.1-15 毫克/千克/剂量)的抗体是一种初始的候选剂量,用于向所述的患者进行施用,无论其中所述的施用是例如通过一种或者多种单独的施用还是通过连续灌注的形式来进行的。通过常规的方法以及检测,并且根据内科医师或者本领域的其他技术人员已知的标准,可以容易对这种治疗的进程进行监控。

[0331] 在一种特定的实施方式中,向所述的患者施用一种免疫偶联物,其中在所述的免疫偶联物中包括与一种细胞毒性试剂发生偶联的所述抗体。优选的,所述的免疫偶联物被所述的细胞进行了内在化处理,导致了所述的免疫偶联物在对所述细胞的杀伤方面具有增强了的治疗功效,其中所述的细胞是与所述的免疫偶联物进行结合的细胞。在一种实施方式中,所述的细胞毒性试剂对存在于所述的被感染细胞之中的所述核酸发挥作用,或者对存在于所述的被感染细胞之中的所述核酸进行干扰。这样的细胞毒性试剂的例子是在上文中所描述的那些并且包括,但不局限于,美登素类,卡奇霉素,核糖核酸酶以及 DNA 核酸内切酶。

[0332] 将其他的治疗方案与本发明中所述的人类基质 2 蛋白细胞外结构域抗体的施用

进行组合。所述的组合施用包括同时使用,其中使用单独的制剂或者一种单一的药物制剂,以及以任意的顺序进行的连续施用,其中优选的,在一个时间段内,两种(或者全部)活性试剂同时发挥它们的生物学活性。优选的,这样的组合治疗产生了一种协同性的治疗作用。

[0333] 在某些实施方式中,将本发明中所述的一种抗体与另外一种抗体进行的组合施用是令人期望的,其中所述的另外一种抗体直接作用于与所述的感染性试剂有关的另外一种抗原。

[0334] 除了向所述的患者进行所述的抗体蛋白的施用之外,本发明中提供了通过基因治疗的方式对所述的抗体进行施用的方法。这种对编码所述抗体的核酸所进行的施用被涵盖在所述的表述“施用治疗性的有效剂量的抗体”的范围之内。参见,例如,PCT 专利申请公开 W096/07321,其中涉及到基因治疗的使用,用来生成细胞内的抗体。

[0335] 在另外一种实施方式中,本发明中所述的一种抗基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2e) 的抗体被用来确定所述的结合抗原所具有的结构,例如,构象型表位,之后,所述的结构被用来制成一种疫苗,其中所述的疫苗具有这种结构或者模拟这种结构,这是通过例如化学建模的方法以及 SAR 的方法来实现的。这样的一种疫苗随后可以被用来预防 A 型流行性感冒的感染。

[0336] 在本说明书中所涉及到的和/或在所述的 Application Data Sheet(申请记录表)上所列出的上述所有的美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请以及非专利公开物中的全部内容在本发明中被引入作为参考。

[0337] 实施例

[0338] 实施例 1:使用表达重组的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白的细胞对存在于人类血浆中的基质 2 蛋白细胞外结构域特异性抗体进行的筛选以及鉴定

[0339] 按照下文中的描述,在患者的血清中识别完全人类单克隆抗体以及所述的流行性感冒病毒本身,其中所述的完全人类单克隆抗体对基质 2 蛋白 (M2) 具有特异性并且能够与感染有 A 型流行性感冒的细胞进行结合。

[0340] 基质 2 蛋白在细胞系中的表达

[0341] 向 293 细胞内进行一种表达构建体的转染,其中在所述的表达构建体中含有所述的基质 2 蛋白完整长度的 cDNA,所述的 cDNA 与在流行性感冒 H3N2 亚类型中发现的基质 2 蛋白的导出序列相对应。

[0342] 所述的基质 2 蛋白的 cDNA 是由下述的多核苷酸序列以及序列识别号 53 中所述的序列进行编码的:

[0343] ATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGT
GATCCTCTTGTTGTTGCCGCAAGTATCATTGGGATCCTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTTCAA
ATGCATTTATCGTCTCTTTAAACACGGTCTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACCAGAGTCTATGAGGGAAG
AATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATAGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAG

[0344] 使用对所述的抗基质 2 蛋白细胞外结构域肽具有特异性的单克隆抗体 14C2 对所述的基质 2 蛋白在细胞表面上进行的表达进行确认。两种其他的基质 2 蛋白变体,来自于 A/ 香港 /483/1997(HK483) 以及 A/ 越南 /1203/2004(VN1203),被用来进行随后的分析,并且使用本发明中所述的对基质 2 蛋白细胞外结构域具有特异性的单克隆抗体对它们的表达进行确定,因为 14C2 的结合可能被发生在基质 2 蛋白的细胞外结构域中的各种不同的氨

基酸取代进行废除。

[0345] 在外周血中对抗体进行的筛选

[0346] 对超过 120 份的各种血浆样本进行抗体的测试,其中所述的抗体与基质 2 蛋白进行了结合。这些样本之中没有一个表现出对所述的基质 2 蛋白细胞外结构域肽的特异性结合。然而,上述含有抗体的所述血浆样本中有 10%与所述的 293- 基质 2 蛋白 H3N2 细胞系发生了特异性的结合。这表明,可以对所述的抗体进行分类,将其分成与一种基质 2 蛋白的同型四聚体中的构象抗原决定簇进行结合的抗体,以及与所述的基质 2 蛋白的同型四聚体的多个变体中的构象抗原决定簇进行结合的抗体;它们不会对所述的线性的基质 2 蛋白细胞外结构域肽产生特异性。

[0347] 抗 - 基质 2 蛋白的单克隆抗体的鉴定

[0348] 通过这种方法识别得到的所述的人类单克隆抗体已经被证实能够与存在于所述的基质 2 蛋白的同型四聚体之上的构象型表位进行结合。它们与所述的初始的 293- 基质 2 蛋白转染体进行结合,也与所述的其他两种细胞表达的基质 2 蛋白变体进行结合。所述的 14C2 单克隆抗体除了与所述的基质 2 蛋白细胞外结构域肽进行结合之外,已经被证实其对于所述的基质 2 蛋白的变体序列更为敏感。并且,14C2 不会轻易的与流行性感冒的病毒粒子进行结合,而所述的构象特异性的抗 - 基质 2 蛋白的单克隆抗体则会。

[0349] 这些结果表明,本发明中所述的方法提供了对于所述的基质 2 蛋白的单克隆抗体的识别,其中所述的单克隆抗体来自于对流行性感冒的正常的人类免疫应答,而不需要对基质 2 蛋白进行特异性的免疫。如果作为免疫治疗被进行使用,与人源化的小鼠抗体相比,这些完全人类单克隆抗体具有能够被患者更好的耐受的可能性。除此之外,并且与 14C2 以及所述的 Gemini Biosciences 单克隆抗体相反的是,本发明中所述的单克隆抗体能够与基质 2 蛋白的构象型表位进行结合,并且其不仅仅对于感染有 A 型流行性感冒菌株的细胞具有特异性,对于所述的病毒本身同样具有特异性,其中所述的 14C2 以及所述的 Gemini Biosciences 单克隆抗体与线性的基质 2 蛋白细胞外结构域肽进行结合。本发明中所述的单克隆抗体所具有的另外一项优点是:它们能够分别与接受测试的所述的全部的基质 2 蛋白的变体进行结合,这表明它们不会受到一种具体的线性氨基酸序列的限制。

[0350] 实施例 2:基质 2 蛋白特异性抗体的识别

[0351] 将表达如实施例 1 中所描述的从人类血清中识别出的三种单克隆抗体的单核细胞或者 B 细胞在克隆种群中进行稀释并且对其进行诱导使其生成抗体。对含有上清液的抗体进行筛选,针对与 293FT 细胞进行的结合进行筛选,其中利用了完整长度的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白对所述的 FT 细胞进行了稳定的转染,所述的完整长度的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白来自于流行性感冒菌株 H3N2 流行性感冒亚类型。再一次在 293FT 细胞上对表现出阳性染色 / 结合的上清液进行重新筛选,其中利用了完整长度的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白对所述的 FT 细胞进行了稳定的转染,所述的完整长度的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白来自于流行性感冒菌株 H3N2 流行性感冒亚类型,并且在单独的载体之上,使用被转染的细胞作为一种对照。

[0352] 之后从所述的 B 细胞孔中对所述抗体的各个不同的区域进行补救克隆 (rescue clone),其中在所述的 B 细胞孔中的上清液呈现出了阳性结合。在 293FT 细胞中进行瞬间转染,从而重新构建并且制备这些抗体。对重新构建的抗体上清液进行筛选,针对与 293FT

细胞进行的结合进行筛选,其中利用了完整长度的基质 2 蛋白细胞外结构域蛋白对所述的 FT 细胞进行了稳定的转染,正如上文中所详细描述,从而对所述的补救性的抗-基质 2 蛋白细胞外结构域抗体进行识别。三种不同的抗体被得以识别出来:8i10,21B15 以及 23K12。第四个另外的抗体克隆物是从所述的补救筛选(rescue screen)中分离得到的,4C2。然而,它不是独一无二的并且其与克隆 8i10 具有完全相同的序列,即使它与克隆 8i10 来自于不同的供体。

[0353] 下文中提供了这些抗体的 κ 可变区域以及 γ 可变区域中的所述序列。

[0354] 克隆 8i10:

[0355] 将所述的抗基质 2 蛋白的克隆 8i10 的 κ LC 可变区域作为 Hind III 片段至 BsiWI 片段进行克隆(见下),并且所述的可变区域是由下述的多核苷酸序列进行编码的,并且为序列识别号 54(上端)以及序列识别号 55(下端):

[0356] AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
TTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCACCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAGGTCTACACTGTAGGT
CTACTGGGTGAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGTTCACCTGCCGGGCGAGTCAGAACA
TTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCAGTGAACGGCCCGCTCAGTCTTGTAATGTTC
ATAAATTTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTTCGGGCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGG
GGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATGATTCCCGGACTAGAGACGACGTAGGCCAACGTTTACCCAGGGTA
GTTCCAAGTCACCGTCACCTACTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACT
TACTACTGTCAACGACCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGGTCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGAATGATGAC
AGTTGAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAACGTACGTCTCAATGTCAGG
GGGAGAGTGAAAGCCGCCTCCCTGGTCCCACCTCTAGTTTGCATGC

[0357] 所述的克隆 8i10 的 κ LC 可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号 54,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号 56):

[0358]

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
M D M R V L A Q L L G L L L L W L R G
CCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
TCACTTGCCGGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCC
I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
CTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAC
S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q

BsiWI

AGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAACGTACG
Q S Y S P P L T F G G G T R V E I K R T

[0359] 所述的克隆 8i10 的 κ LC 可变区域的氨基酸序列如下所示,在下文中对特异性的结构域进行了识别(依照 Kabat 方法定义的互补决定区域):

[0360]

MDMRVLAQLLGLLLLWLRGARC VK 前导序列(序列识别号: 57)

[0361]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

骨架区域 1 (序列识别号: 58)

RASQNIYKYLN

互补决定区域 1 (序列识别号: 59)

WYQQRPGKAPKGLIS

骨架区域 2 (序列识别号: 60)

AASGLQS

互补决定区域 2 (序列识别号: 61)

GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYC 骨架区域 3 (序列识别号: 62)QQSYSPPLT

互补决定区域 3 (序列识别号: 63)

FGGGTRVEIK

骨架区域 4 (序列识别号: 64)

RT

κ 恒定区域的开始

[0362] 下面是一个例子,所述的 8i10 的 κ LC 可变区域被克隆至所述的表达载体 pcDNA3.1 之中,在所述的表达载体之中已经含有所述的 κ LC 恒定区域(上面的多核苷酸序列与序列识别号 65 相对应,下面的多核苷酸序列与序列识别号 66 相对应,氨基酸序列与上文中所示出的序列识别号 56 相对应)。用黑色表示的碱基代表 pcDNA3.1 的载体序列,蓝色的碱基代表所述的克隆抗体序列。在本发明中所描述的所述抗体同样被克隆至所述的表达载体 pCEP4 之中。

[0363]

TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCTCTC
AGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTGACCGATCGCAAATTTGAATT CGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAG
■ M D M R V L
GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCT
■ CGAGTCGAGGACCCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCACGGTCTACACTGTAGGTCTACTGGGTGAGA
■ A Q L L G L L L L W L R G A R C D I Q M T Q S
CCATCCTCCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGGCGAGTCAGAACATTTAC
■ GGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGGCCCGCTCAGTCTTGTAATG
■ P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q N I Y
AAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGG
■ TTCATAAATTTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTTCGGGGATTCCTCGGACTAGAGACGACGTAGGCC
■ K Y L N W Y Q Q R P G K A P K G L I S A A S G
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACC
■ AACGTTTCACCCCAGGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGG
■ L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T
AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGC
■ TCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGAATGATGACAGTTGTCTCAATGTCAGGGGGAGAGTGAAAGCCG
■ S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S P P L T F G
BsiWI
GGAGGGACACAGGTGGAGATCAAAACGTAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
■ CCTCCCTGGTCCCACCTCTAGTTTGCAATGCCACGAGCTGTAGACAGAGTAGAAGGGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACC
■ G G T R V E I K R T V A A P S V F I F P P S A D E Q L K S G
AAGTCCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
TTGACGGAGACACACACGACGACTTATTGAAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCCATTTAGGGG
T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TCCTCTCAGAGTGTCTCGTCTGTCTGCTGCTGCTGGAGTGTGCGAGTGTGCTGGGACTGCGACTCGTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAG
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V
Drall (1641)
XbaI (1636) Apal (1642)
TAGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGTCTAGAGGGCCCGTTTAAA
ATGCGGACGCTTCAGTGGGTAGTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTCTCGAAGTTGTCCCTCTCACAATCTCCAGATCTCCCGGGCAAATTT
Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[0364] 将所述的8i10的 γ HC可变区域作为Hind III片段至Xho I片段进行克隆,并且所述的可变区域是由下述的多核苷酸序列进行编码的,并且为序列识别号67(上端)以及序列识别号68(下端):

[0365] HindIII

[0366] AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTTTTCGAAGG
TGGTACTTTGTGGACACCAAGAAGGAAGAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCACCTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGA
GTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGAGAGACCTGGGACAGGGTCCACGTTAACGTCCTCAGCCCGGGTCTGAC
CACTTCGGAAGCCTCTGGGACTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCCGAGTCCCCAGGG
AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTATCAGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCT
AACCCAAATAGATAATGCCACCTTTGTGGTTCATCAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCTCACCATATCACAAGACACT
TCCAAGAGTCAGGTCTCCGTTAGGGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTGAAGGTTCTCAGTCCAGA
GGCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTTGACTGCTACTCGAG
ACACTGGCGACGCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAA Xho IGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTG
ACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCATCACCACCAATGACATAGGAAGTATGACCCCGGTCCC
TTGGGACCAGTGGCAGAGCTC

[0367] 所述的克隆8i10的 γ HC可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号67,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号69):

[0368]

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGAGCTCCCAGCTGGGTCT
M K H L W F F L L L V A A P S W V

CTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L

TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGG
S L T C T V S G S S I S N Y Y W S W I R

CAGTCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAG
Q S P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K

TACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTC
Y N P S L K S R V T I S Q D T S K S Q V

TCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCG
S L T M S S V T A A E S A V Y F C A R A

TCTTGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTC
S C S G G Y C I L D Y W G Q G T L V T V

TCGAG
S

[0370]

YWGQGTLVTVS 骨架区域4 (序列识别号: 77)

[0372]

PmeI (900)
NheI (894) HindIII (910)

TGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTT
ACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTTCGACCGATCGCAAATTTGAATTCGAGAGGTGGTACTTTGTGGACACCAA
CTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTCTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCCA
GAAGGAAGAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCAGGACAGGGTCCACGTTAACGTCCTCAGCCCCGGT
GGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATT
CCTGACCACCTTCGGAAGCCTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAA
ACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGG
TGATGACCTCGACCTAGGCCGTGAGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTAACCCAAATAGATAATGCC
TGGAAACACCAAGTACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGT
ACCTTTGTGGTTTATGTTAGGGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTGAAGGTTCTCA
CAGGTCTCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGT
GTCCAGAGGGACTGCTACTCGAGACACTGGCGACGCCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCA

[0373]

XhoI (1331)

CTTGTTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGAGCCTCCA
GAACATCACCACCAATGACATAGGAAGTATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTCGGAGGT
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGAC
GGTTCCCGGTAGCCAGAGGGGGAACCGTGGGAGGAGTTCTCGTGGAGACCCCGTGTGCGCGGACCCGACGGACAGTTCCTGATGAAGGGGCTTGGCCACTG
TGGAAACACCAAGTACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGT
ACCTTTGTGGTTTATGTTAGGGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTGAAGGTTCTCA
CAGGTCTCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGT
GTCCAGAGGGACTGCTACTCGAGACACTGGCGACGCCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCA
CTTGTTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGAGCCTCCA
GAACATCACCACCAATGACATAGGAAGTATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTCGGAGGT
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGAC
GGTTCCCGGTAGCCAGAGGGGGAACCGTGGGAGGAGTTCTCGTGGAGACCCCGTGTGCGCGGACCCGACGGACAGTTCCTGATGAAGGGGCTTGGCCACTG
TGGAAACACCAAGTACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGT
ACCTTTGTGGTTTATGTTAGGGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTGAAGGTTCTCA
CAGGTCTCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGT
GTCCAGAGGGACTGCTACTCGAGACACTGGCGACGCCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCA
AGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGATTCACAAGCCGACCAACCAAGGTGGCAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACCTCACACAT
TCGTGCAACCCGTGGGTCTGGATGTAGACGTTGCACTTAGTGTTCGGGTCTGTGTGTTCCACCTGTTCTCTCAACTCGGGTTTAGAACACTGTTTGTAGTGTGTA
S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T
GCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATG
CGGGTGGCAGGGTCTGTGACTTGAAGGACCCCTGTCAGTTCAGAGGAGAGGGGGGTTTGGGTTCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCCTGGGAGCTCCAGTGTAC
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGTTGACGTGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTAC
GCACCAACCACTGCACCTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCACTGCACTGCCGACCTCCACGTATTACGGTTCTGTTTCGGCGCCCTCTCGTCACTG
V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
AACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCA
TTGTGTCATGTCACACCACTGCGAGGAGTGGCAGGACGTGTCCTGACCGACTTACCGTTCCTCATGTTCAAGTCCAGAGGTGTTTTCGGGAGGGTTCGGGGT
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTG
AGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCGGTTCGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTCCTCTACTGGTTCTTGGTCCAGTGGAGTGGAC
I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGGCAATGGGACGCGGAGACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGC
GGACCAAGTTTCCAGAGATAGGTTGCTGTAGCGGCACCTCAACCTCTCGTTACCGGTGGGCTCTTGTGTGATGTTCTGGTGGGAGGGCAGCACTGAGGTGCGG
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
TCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGACGCTCTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAAACCTACACGC
AGGAGAAAGGAGATATCGTTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGTCCTTGCAGAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGAGCTGTTGGTGTGTCG
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
ApaI (2339)
DraI (2338)
XbaI (2333) PmeI (2345)

AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGTTCTAGAGGGGCGGTTTAAACCCGTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
TCTTCTCGAGAGGGGACAGAGGCCATTTACTCAAGATCTCCCGGGCAAAATTTGGGCGACTAGTCGGAGCTGACACGGAAGATCAACGGTCCGTAGACAAACAAAG
Q K S L S L S P G K

[0374] 正常情况下,所述的 γ HC 中的骨架区域 4 (FR4) 是以两个丝氨酸作为结束的,这样一来所述的完整的骨架区域 4 应当是 WGQGLTVTVSS (序列识别号:80)。在所述的载体中,所

述的 Xho1 接受性位点以及位于所述的 Xho1 位点下游的一个另外的碱基提供了所述的最后的碱基,其编码骨架区域 4 中的这最后一个氨基酸,其中,在所述的载体之中,所述的 γ HC 恒定区域以及 γ HC 可变区域被进行了克隆。然而,所述的初始的载体不会对所述的沉默突变进行调整,其中所述的沉默突变是在当生成所述的 Xho1 位点 (CTCGAG, 序列识别号 :81) 并且其中在所述的 Xho1 位点的下游包含一个“A”核苷时所发生的,这使得在所述的骨架区域 4 的末端处发生了一种氨基酸的变化:在上述所有的运行的 γ HC 克隆中出现了由丝氨酸到精氨酸的取代 (S 到 R)。因此,所述的完整的骨架区域 4 被读取为 WGQGTLVTSR (序列识别号 :82)。可以生成未来的构建体,其中位于所述的 Xho1 位点下游处的所述碱基是一个“C”核苷。因此,在可供选择的实施方式中,所述的 Xho1 位点的生成是一种沉默突变,并且所述的突变能够将所述的骨架区域 4 中的氨基酸序列恢复至其恰当的 WGQGTLVTVSS (序列识别号 :80),其中所述的 Xho1 位点被用来进行所述的 γ HC 可变区域序列的克隆。这一点对于在本发明中所描述的所有基质 2 蛋白 γ HC 克隆而言是真实的。

[0375] 克隆 21B15:

[0376] 将所述的抗基质 2 蛋白的克隆 21B15 的 κ LC 可变区域作为 Hind III 片段至 BsiW1 片段进行克隆,并且所述的可变区域是由下述的多核苷酸序列进行编码的,并且为序列识别号 83 以及序列识别号 84:

[0377] HindIII

[0378] AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCTTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCACGCAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCGTCTACACTGTAGGTCCACTGGGTGAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGACTTGCCGCGCGAGTCAGAA CATTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCCCTATGAACGGCGCGCTCAGTCTTGTAATG TTCATAAATTTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTTCGGGGATAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTCCCGGACTAGAGACGACGTAGGCCAACGTTTCACCCAG GGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGACCGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC AACTTACTACTGTCAACAGAGTCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGGTCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGAATG ATGACAGTTGTCTCA BsiWITACAGTCCCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACGA TGTCAGGGGGAGAGTGAAAGCCGCCTCCCTGGTCCACCTATAGTTTGCATGC

[0379] 所述的 21B15 的 κ LC 可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号 83,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号 56):

[0380]

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCTCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGT
M D M R V L A Q L L G L L L L W L R G
GCCAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
A R C D I Q V T Q S P S S L S A S V G D R V T
ATCACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCC
I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
CCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGA
P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAA
S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q
BsiWI
CAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACG
Q S Y S P P L T F G G G T R V D I K R T

[0382]

RT κ 恒定区域的开始

[0385] HindIII

[0386] AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTCCTTCGAA
GGTGGTACTTTGTGGACACCAAGAAGGAAGAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCAGGTGTCCCAGGTGCAATTGCAG
GAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCACAGGGTCCACGTTAACGTCCTCAGCCCGGGTCC
TGACCACTTCGGAAGCCTCTGGGACAGGGTCACCTGCACTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGC
TGGATCCGGCAGTCCCAGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCCGTCA
GGGCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCTGTCCCTTCCCT
GACCTCACCTAACCCAAATAGATAATGCCACCTTTGTGGTTCATGTTAGGGACCCTCAAGAGCCGCGTCACCATAT
CACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTGAAG
GTTCTCAGTCCAGAGGGACTGCTACTGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCT
TGTAAGTGGTGGTTCGAGACACTGGCGACGCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAACATCACCACCAA
Xho1ACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGACATAGGAACTGATGACCCCGG
TCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTC

[0387] 所述的 21B15 的 γ HC 可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号 87,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号 69):

[0388]

HindIII
AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTC
M K H L W F F L L L V A A P S W V
CTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCC
L T C T V S G S S I S N Y Y W S W I R Q S
CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCC
P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K Y N P
TCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATG
S L K S R V T I S Q D T S K S Q V S L T M
AGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGT
S S V T A A E S A V Y F C A R A S C S G G
XhoI
TACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAG
Y C I L D Y W G Q G T L V T V S

[0389] 所述的 21B15 的 γ HC 可变区域的氨基酸序列如下所示,在下文中对特异性的结构域进行了识别(依照 Kabat 方法定义的互补决定区域):

[0390]

MKHLWFFLLLVAAPSWVLS VH 前导序列(序列识别号: 70)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIS 骨架区域 1(序列识别号: 71)

NYYWS 互补决定区域 1(序列识别号: 72)

WIRQSPGKGLEWIG 骨架区域 2(序列识别号: 73)

FIYYGGNTKYNPSLKS 互补决定区域 2(序列识别号: 74)

RVTISQDTSKSQVSLTMSSVTAAESA VYFCAR 骨架区域 3(序列识别号: 75)

ASCSGGYCILD 互补决定区域 3(序列识别号: 76)

YWGQGT LVTVS 骨架区域 4(序列识别号: 77)

[0391] 克隆 23K12:

[0392] 将所述的抗基质 2 蛋白的克隆 23K12 的 κ LC 可变区域作为 Hind III 片段至 BsiW1 片段进行克隆(见下),并且所述的可变区域是由下述的多核苷酸序列进行编码的,为序列识别号 88(上端)以及序列识别号 89(下端):

[0393] HindIII

[0394] AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGT
TCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCTGCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACGGTCTACACTGTAGGT
CTACTGGGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGAG
CATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGATGGTAGTGAACGGCCTGTTCACTCTCGTAATCGT
CGATAAATTTAACCATAGTCGTCTTTGGTCCCTAAGCCCCTAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAA
GTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGTTTCGGGGATTTGAGGACTAGATACGACGTAGGTCAAACGTTTCACCCAG
GGTAGTTCCAAGTCACCCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTT
GCAACCTACGTCACCTAGACCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTCGCCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGGATG
BsiWITACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGATGACA
GTTGTCTCAATGTACATACGGACGGAAACCGGTCCCCTGGTTTCGACCTCTAGTTTGCATGC

[0395] 所述的 23K12 的 κ LC 可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号 90,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号 91):

[0396]

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGG
 M D M R V L A Q L L G L L L L W L R G
 TGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
 A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V
 ACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 T I T C R T S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G
 AAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGG
 K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G
 CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACCTAC
 S G S G T D F T L T I S G L Q P E D F A T Y
 BsiWI
 TACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
 Y C Q Q S Y S M P A F G Q G T K L E I K R T

[0397] 所述的 23K12 的 κ LC 可变区域的氨基酸序列如下所示,在下文中对特异性的结构域进行了识别(依照 Kabat 方法定义的互补决定区域):

[0398]

MDMRVLAQLLGLLLLWLRGARC VK 前导序列(序列识别号: 57)

[0399]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC 骨架区域 1(序列识别号: 58)

RTSQSISSYLN 互补决定区域 1(序列识别号: 92)

WYQQKPGKAPKLLIY 骨架区域 2(序列识别号: 93)

AASSLQSGVPSRF 互补决定区域 2(序列识别号: 94)

SGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC 骨架区域 3(序列识别号: 95)

QQSYSPMA 互补决定区域 3(序列识别号: 96)

FGQGTKLEIK 骨架区域 4(序列识别号: 114)

RT κ 恒定区域的开始

[0400] 将所述的 23K12 的 γ HC 可变区域作为 Hind III 片段至 XhoI 片段进行克隆,并且所述的可变区域是由下述的多核苷酸序列进行编码的,并且为序列识别号 97(上端)以及序列识别号 98(下端):

[0401] HindIII

[0402] AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAAAGGTGTCCAGTTTC
 GAAGGTGGTACCTCAACCCGACACGACCCAAAAGGAACAACGATAAAATTTCCACAGGTCACTGAGGTGCAGCTG
 GTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTCCTCACTCCACGTCGACCACCTCAGACC
 CCCTCCGAACCAGGTCGGACCCCCCAGGGACTCTTAGAGGAGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACA
 TGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGCACGTCGGAGACCTAAGTGGCAGTCATCGTTGATGTACTCAACCCAG
 GCGGTCCGAGGTCCCTTCCGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCACCGACCTCACCAGAGTCAATAAATATCACCACCATCGTGTATGATGCGTCTGAGGCACTTCCCGTGAT
 TCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTTTCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGCTAAGAGGAAGAGG
 TCTCTGTTGAGGTTCTTGTGTCAAAAGAAGTTTACTTGTGCGACTCTCGGCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC

GAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGTTACGGTTTAGACGTCTTCCTGTGCCGACACATAATGACACGCTCTACAGACT
CGTCCTACGCCCCAATGCCAAATCTGCAGA Xho1GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGCCCCGGTTCC
CTGGTGCCAGTGGCAGAGCTC

[0403] 所述的 23K12 的 γ HC 可变区域的翻译如下所示,多核苷酸序列(见上,序列识别号 99,上端)以及氨基酸序列(见下,相应于序列识别号 100):

[0404]

HindIII
AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
M E L G L C W V F L V A I L K G V Q
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTCC
C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S
TGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
C A A S G F T V S S N Y M S W V R Q A P G K
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
G L E W V S V I Y S G G S T Y Y A D S V K G
AGATTCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTTTCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
R F S F S R D N S K N T V F L Q M N S L R A
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGGTTACGGTTTACGCTC
E D T A V Y Y C A R C L S R M R G Y G L D V
XhoI
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAG
W G Q G T T V T V S

[0405] 所述的 23K12 的 γ HC 可变区域的氨基酸序列如下所示,在下文中对特异性的结构域进行了识别(依照 Kabat 方法定义的互补决定区域):

[0406]

MELGLCWVFLVAILKGVQC VH 前导序列(序列识别号: 101)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAASGFTVS 骨架区域 1(序列
识别号: 102)

SNYMS 互补决定区域 1(序列识别号: 103)

WVRQAPGKGLEWVS 骨架区域 2(序列识别号: 104)

VIYSGGSTYYADSVK 互补决定区域 2(序列识别号: 105)

GRFSFSRDNSKNTVFLQMNSLRAEDTAVYYCAR 骨架区域 3
(序列识别号: 106)

CLSRMRGYGLDV 互补决定区域 3(序列识别号: 107)

WGQGTTVTVS 骨架区域 4(序列识别号: 108)

[0407] 实施例 3:保守性的抗体可变区域的识别

[0408] 按照下文中所示,为了对保守性的区域以及残基进行识别,将所述的三种抗体的 κ LC 可变区域以及 γ HC 可变区域中的氨基酸序列进行比对。

[0409] 所述的三种克隆物的 κ LC 可变区域中的氨基酸序列的比对:

[0410]

mp 73 21B15 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 147 8i10 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 137 23K12 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S

mp 73 21B15 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 147 8i10 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 137 23K12 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S

mp 73 21B15 _L 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S
mp 147 8i10 _L 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S
mp 137 23K12 _L 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S

mp 73 21B15 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 147 8i10 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 137 23K12 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S

[0411] 所述的三种克隆物的 γ HC 可变区域中的氨基酸序列的比对：

[0412]

mp 81 21B15 _{F2} 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 145 23K12 _L 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S
mp 153 8i10 _{ga} 的翻译	A	S	T	M	L	L	L	V	A	A	F	S	V	L	S	L	G	S

mp 81 21B15 _{F2} 的翻译	G	P	G	L	V	P	S	S	L	L	T	C	T	V	S	G	I	S	N	S	S	S	V
mp 145 23K12 _L 的翻译	G	P	G	L	V	P	S	S	L	L	T	C	T	V	S	G	I	S	N	S	S	S	V
mp 153 8i10 _{ga} 的翻译	G	P	G	L	V	P	S	S	L	L	T	C	T	V	S	G	I	S	N	S	S	S	V

mp 81 21B15 _{F2} 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S
mp 145 23K12 _L 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S
mp 153 8i10 _{ga} 的翻译	I	A	A	S	G	L	S	G	V	F	S	F	S	G	G	G	F	L	I	T	S	L	S

mp 81 21B15 _{F2} 的翻译	V	T	I	S	G	S	S	S	V	L	T	M	S	S	V	T	A	A	S	A	V	S	S
mp 145 23K12 _L 的翻译	V	T	I	S	G	S	S	S	V	L	T	M	S	S	V	T	A	A	S	A	V	S	S
mp 153 8i10 _{ga} 的翻译	V	T	I	S	G	S	S	S	V	L	T	M	S	S	V	T	A	A	S	A	V	S	S

mp 81 21B15 _{F2} 的翻译	C	A	A	C	S	G	G	C	I	L	S	G	G	T	L	V	S	V	S
mp 145 23K12 _L 的翻译	C	A	A	C	S	G	G	C	I	L	S	G	G	T	L	V	S	V	S
mp 153 8i10 _{ga} 的翻译	C	A	A	C	S	G	G	C	I	L	S	G	G	T	L	V	S	V	S

[0413] 克隆 8i10 以及 21B15 来自于两个不同的供体,但是它们具有完全相同的 γ HC,并且它们在所述的 κ LC 上的差异仅仅在于存在于所述的骨架区域 1 之内的位置 4 上的一个氨基酸(氨基酸 M 与 V,见上),(除了存在于所述的 κ CL 的骨架区域 4 之中的不稳定位置上的 D 与 E 之外)。

[0414] 所述的抗体的可变区域中的氨基酸之间的比较揭示了:所述的克隆 8i10 中的重链来自于生殖系序列免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 并且所述的轻链来自于所述的生殖系序列免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1)。

[0415] 所述的抗体的可变区域中的氨基酸之间的比较揭示了:所述的克隆 21B15 中的重链来自于生殖系序列免疫球蛋白重链可变区域 4(IgHV4) 并且所述的轻链来自于所述的生殖系序列免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1)。

[0416] 所述的抗体的可变区域中的氨基酸之间的比较揭示了:所述的克隆 23K12 中的重链来自于生殖系序列免疫球蛋白重链可变区域 3(IgHV3) 并且所述的轻链来自于所述的生殖系序列免疫球蛋白 kappa 可变区域 1(IgKV1)。

[0417] 实施例 4:基质 2 蛋白抗体的制备以及鉴定

[0418] 在上文中所描述的抗体是以毫克的数量水平、通过在 293PEAK 细胞中进行的较大

规模的瞬间转染来制备得到的。粗的未经纯化的抗体上清液被用来进行抗体的检查,其中所述的抗体与 A 型流行性感 冒 /PR/8/1932 (PR8) 进行了结合,所述的检查是在酶联免疫吸附检测 (ELISA) 培养板上进行的,并且将所述的结果与所述的对照抗体 14C2 所进行的结合进行比较,其中所述的对照抗体 14C2 同样是通过较大规模的瞬间转染来制备得到的。所述的抗 - 基质 2 蛋白的重组人类单克隆抗体与流行性感 冒进行了结合而所述的对照抗体没有进行结合 (附图 9)。

[0419] 同样利用犬肾 (MDCK) 细胞对结合进行了测试,其中所述的犬肾细胞利用所述的 A 型流行性感 冒 /PR/8/1932 (PR8) 病毒进行了感染 (附图 10)。所述的对照抗体 14C2 以及所述的三种抗基质 2 蛋白细胞外结构域 (M2E) 的克隆物 :8i10,21B15 以及 23K12 全部表现出与所述的基质 2 蛋白之间的特异性的结合,其中所述的基质 2 蛋白是在所述的 A 型流行性感 冒 /PR/8/1932 (PR8) 感染型细胞的表面上进行表达的。在未被感染的细胞中没有观察到结合。

[0420] 所述的抗体是通过蛋白质 A 柱从所述的上清液中被纯化出来的。使用以 1 微克每升的浓度水平存在的纯化抗体来进行荧光激活的细胞分拣器 (FACs) 分析,从而对所述的抗体与经过瞬间转染的 293PEAK 细胞之间发生的结合进行检查,其中所述的 293PEAK 细胞在其细胞表面上进行所述的基质 2 蛋白的表达。对结合进行测量,测试其与模拟的转染细胞以及利用所述的流行性感 冒亚类型 H3N2、A/ 越南 /1203/2004 (VN1203)、或者 A/ 香港 /483/1993HK483 基质 2 蛋白进行瞬间转染的细胞之间所发生的结合。作为一种阳性对照,使用的是所述的抗体 14C2。单独使用未被染色的抗体以及二级抗体来帮助进行背景的确定。在所有的三种克隆物中,均观察到了细胞的特异性染色,其中所述的细胞是被所述的基质 2 蛋白进行转染了的细胞。而且,所有的三种克隆物均与所述的高通道 (high path) 菌株 A/ 越南 /1203/2004 基质 2 蛋白以及 A/ 香港 /483/1993HK483 基质 2 蛋白进行了非常良好的结合,而所述的阳性对照 14C2 与 H3N2 基质 2 蛋白进行了良好的结合,但其与所述的 A/ 越南 /1203/2004 基质 2 蛋白的结合明显减弱并且其不与所述的 A/ 香港 /483/1993HK483 基质 2 蛋白进行结合。参见附图 11。

[0421] 抗体 21B15、23K12、以及 8i10 能够与所述的 293- 人胚肾 (HEK) 细胞的表面进行结合,但是不能够与载体转染的细胞进行结合,其中所述的 293- 人胚肾 (HEK) 细胞能够稳定的表达所述的基质 2 蛋白 (参见附图 1)。除此之外,这些抗体所进行的结合不会受到由于所述的 5 毫克 / 毫升的 24-mer 基质 2 蛋白肽的存在而产生的竞争,而所述的对照的嵌合型小鼠可变区域 / 人类免疫球蛋白 G1 κ 14C2 抗体 (hu14C2) 所进行的结合完全受到所述的基质 2 蛋白肽的抑制,其中所述的对照的嵌合型小鼠可变区域 / 人类免疫球蛋白 G1 κ 14C2 抗体 (hu14C2) 是针对所述的线性基质 2 蛋白肽而生成的 (参见附图 1)。这些数据证实了:与所述的线性基质 2 蛋白细胞外结构域肽相反,这些抗体能够与存在于基质 2 蛋白细胞外结构域内的构象型表位进行结合,其中所述的基质 2 蛋白细胞外结构域是在所述的细胞表面或者病毒表面上进行表达的。

[0422] 实施例 5:人类抗 - 流行性感 冒单克隆抗体的病毒结合

[0423] 将通过紫外光 (UV) 灭活的 A 型流行性感 冒病毒 (A/PR/8/34) (Applied Biotechnologies) 放置于 384 孔的 MaxiSorp 培养板 (Nunc) 中,其中所述的 A 型流行性感 冒病毒是以 1.2 微克 / 毫升的水平存在于磷酸盐缓冲液 (PBS) 之中的,并且以 25 微升 / 孔

的水平进行添加,并且使其在 4℃ 下培养过夜。之后利用磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的培养板进行三次洗涤,并且使用存在于磷酸盐缓冲液之中的 1% 的脱脂无水牛乳对其进行阻滞,添加量为 50 微升 / 孔,并且在此之后将其在室温下进行 1 小时的培养。在利用磷酸盐缓冲液进行第二次的洗涤之后,以指定的浓度水平向其中一式三份的添加单克隆抗体,并且将所述的培养板在室温下进行 1 小时的培养。在利用磷酸盐缓冲液进行了又一次的洗涤之后,向每个孔中加入 25 微升经过 1/5000 的稀释的辣根过氧化物酶 (HRP),并且将所述的培养板在室温下放置 1 小时,其中所述的辣根过氧化物酶 (HRP) 与一种山羊抗 - 人类免疫球蛋白 G (IgG)Fc (Pierce) 进行了偶联,所述的经过偶联的辣根过氧化物酶存在于磷酸盐缓冲液 / 1% 的牛乳之中。在利用所述的磷酸盐缓冲液进行了最后一次的洗涤之后,以 25 微升 / 孔的水平向其中加入所述的辣根过氧化物酶底物 1-Step™ Ultra-TMB-ELISA (Pierce),并且使所述的反应在黑暗环境中在室温下进行。通过以 25 微升 / 孔的水平加入 1N 的硫酸对所述的检测进行终止,并且在一个 SpectroMax Plus 培养板阅读器上对 450 纳米下的光吸收率进行读取 (A450)。使用所述的单克隆抗体 8i10 所具有的吸收率对数据进行正态化 (normalized),其中所述的单克隆抗体 8i10 是以 10 微克 / 毫升的水平进行结合的。结果在附图 2A 以及 2B 中被表示出来。

[0424] 实施例 6 : 人类抗 - 流行性感动的单克隆抗体与完整长度的基

[0425] 质 2 蛋白变体之间的结合

[0426] 选取基质 2 蛋白的变体 (包括那些在体内具有高病理学显型的变体) 来用于进行分析。其中的序列可以参见附图 3A。

[0427] 将基质 2 蛋白的 cDNA 瞬间转染至人胚肾 (HEK) 293 细胞之中并且按照如下所述的方式进行分析:为了通过荧光激活的细胞分选器 (FACS) 对所述的瞬间转染进行分析,利用 0.5 毫升的细胞解离缓冲液 (Cell Dissociation Buffer) (Invitrogen) 对存在于 10 厘米的组织培养板上的细胞进行处理,并且收集所述的细胞。在磷酸缓冲液中对细胞进行洗涤,其中在所述的磷酸缓冲液中含有 1% 的胎牛血清 (FBS), 0.2% 的叠氮化钠 (NaN_3) (荧光激活的细胞分选缓冲液),并且将其重新悬浮在 0.6 毫升的荧光激活的细胞分选缓冲液 (FACS buffer) 中,其中在所述的荧光激活的细胞分选缓冲液 (FACS buffer) 中补充有 100 微克 / 毫升的兔免疫球蛋白 G。将每一种转染体与指定的单克隆抗体进行混合,其中所述的单克隆抗体是以 1 微克 / 毫升的水平存在于 0.2 毫升的荧光激活的细胞分选缓冲液之中的,每一种样本中使用 5×10^5 至 5×10^6 个细胞。利用荧光激活的细胞分选缓冲液对细胞进行三次的洗涤,并且将每一种样本重新悬浮在 0.1 毫升的含有 1 微克 / 毫升的红外荧光素 (alexa fluor) (AF) 647 的抗人类免疫球蛋白 G H&L (Invitrogen) 中。对细胞进行再一次的洗涤并且在 FACSCanto 设备 (Becton-Dickenson) 中进行流式细胞术。所述的数值被表示为所述的基质 2 蛋白 -D20 瞬间转染体的平均荧光性的百分数。表示变体结合的数值是两个试验的代表值。表示丙氨酸突变的数值是来自于三个单独的试验的平均读数,其中带有标准误差。结果在附图 3B 以及 3C 中被表示出来。

[0428] 实施例 7 : 为评价基质 2 蛋白的结合而进行的丙氨酸扫描突变

[0429] 为了对所述的抗体结合位点进行评价,在由定点突变所指示的各个氨基酸位置上进行丙氨酸的取代。

[0430] 将基质 2 蛋白的 cDNA 构建体瞬间转染至人胚肾 (HEK) 293 细胞之中并且按照上文

中在实施例 6 中所进行的描述来进行分析。结果在附图 4A 以及 4B 中被表示出来。附图 8 表示的是所述的表位存在于所述的基质 2 蛋白多肽的氨基末端的一个高度保守的区域内。正如附图 4A、4B 以及附图 8 中所表示出的,所述的表位包括存在于所述的基质 2 蛋白多肽中的下述位置上的下述氨基酸:存在于位置 2 上的丝氨酸,存在于位置 5 上的苏氨酸以及存在于位置 6 上的谷氨酸。

[0431] 实施例 8:表位的阻滞

[0432] 为了确定所述的单克隆抗体 8i10 以及 23K12 是否在相同的位点上结合,使代表流行性感冒菌株 A/ 香港 /483/1997 序列的基质 2 蛋白在所述的 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞系 DG44 内进行稳定的表达。利用细胞解离缓冲液(Cell Dissociation Buffer)(Invitrogen)对细胞进行处理,并且收集所述的细胞。在磷酸缓冲液中对细胞进行洗涤,其中在所述的磷酸缓冲液中含有 1% 的胎牛血清(FBS),0.2% 的叠氮化钠(NaN_3)(荧光激活的细胞分选缓冲液),并且将其以 10^7 个细胞/毫升的水平重新悬浮在荧光激活的细胞分选缓冲液(FACS buffer)中,其中在所述的荧光激活的细胞分选缓冲液(FACS buffer)中补充有 100 微克/毫升的兔免疫球蛋白 G。在 4°C 下,以 10 微克/毫升的水平使用任意的单克隆抗体(或者所述的 2N9 对照)对所述的细胞进行 1 小时的预先结合,并且在此之后利用荧光激活的细胞分选缓冲液对所述的细胞进行洗涤。之后,利用直接偶联的红外荧光素(AF)647-8i10 或者红外荧光素(AF)647-23K12(使用所述的 AlexaFluor® 647 蛋白标记试剂盒(Invitrogen)进行了标记)以 1 微克/毫升的水平对所述的三个预先阻滞的细胞样本进行染色,每个样本中存在 10^6 个细胞。使用所述的 FACSCanto,按照先前的方法进行流式细胞术分析。数值是来自于三个单独的试验的平均读数,其中带有标准误差。结果在附图 5 中被表示出来。

[0433] 实施例 9:人类抗-流行性感感冒单克隆抗体与基质 2 蛋白的变体以及与截短型基质 2 蛋白肽之间进行的结合

[0434] 通过酶联免疫吸附检测(ELISA)对所述的单克隆抗体 8i10 以及 23K12 与其他的基质 2 蛋白肽之间的交叉反应原性进行了评价。肽序列在附图 6A 以及 6B 中被表示出来。除此之外,使用一种类似的酶联免疫吸附检测对其与基质 2 蛋白截短型肽的结合活性进行确定。

[0435] 简要的说,将每一种肽以 2 微克/毫升的水平涂覆在一个平底的 384 孔培养板(Nunc)内,其中在所述的培养板内存在 25 微升/孔的磷酸盐缓冲液,在 4°C 下进行过夜反应。对培养板进行三次洗涤并且在室温下,使用 1% 的牛乳/磷酸盐缓冲液进行一个小时的阻滞。在进行了三次洗涤之后,加入滴定量的单克隆抗体并且在室温下对其进行一个小时的培养。在进行了三次洗涤之后,向每个孔中加入经过稀释的辣根过氧化物酶(HRP),其中所述的辣根过氧化物酶与山羊抗-人类免疫球蛋白 FC(Pierce)进行了偶联。将培养板在室温下进行一个小时的培养并且对其进行三次洗涤。以 25 微升/孔的水平向其中加入 1-Step™ Ultra-TMB-ELISA(Pierce),并且使所述的反应在黑暗环境中在室温下进行。通过以 25 微升/孔的水平加入 1N 的硫酸对所述的检测进行终止,并且在一个 SpectroMax Plus 培养板阅读器上对 450 纳米下的光吸收率进行读取(A450)。结果在附图 6A 以及 6B 中被表示出来。

[0436] 实施例 10:对所述的人类抗-流行性感感冒单克隆抗体在保护致命性的病毒挑战方

面所具备的能力而进行的体内评价

[0437] 对所述的抗体 23K12 以及 8i10 在保护小鼠免受致命性的病毒挑战方面所具备的能力进行测试,其中所述的致病性的病毒挑战是由一种高通道 (high path) 的鸟类流行性感冒病毒而引发的。

[0438] 将雌性的 BALB/c 小鼠随机划分成 5 个组,每组 10 只小鼠。在感染之前的一天 (第 -1 天 (-1)) 以及感染之后的两天 (第 +2 天 (+2)),经由 200 微升的腹膜内注射方式提供 200 微克的抗体。在第 0 天 (0) 时,将近似于 LD90 (致死剂量 90) 的 A/ 越南 /1203/04 流行性感冒病毒以 30 微升的体积通过鼻内的方式进行提供。在经过感染之后的第 1 天直至第 28 天,对死亡率进行观察。结果在附图 7 中被表示出来。

[0439] 其他的实施方式

[0440] 尽管出于描述的目的,已经在本发明中描述了本发明的具体实施方式,但在不背离本发明所述的精神以及范围的前提下,可以进行各种不同的修饰。因此,除了后附的权利要求之外,本发明不会受到其他的限制。

[0441] 尽管本发明已经连同其中的详细说明内容被进行了描述,前述的说明意在进行描述而不构成对本发明所具有的范围的限制,本发明所具有的范围是由所述后附的权利要求的范围来定义的。其他的方面、优点、以及修饰存在于下述的权利要求的范围之内。

[0442] 在本发明中所涉及的专利文献以及科技文献建立了本领域技术人员可以利用的知识。在本发明中所引用的全部的美国专利以及公开的美国专利申请或者未被公开的美国专利申请均被引入作为参考。在本发明中所引用的全部的公开的外国专利以及专利申请均在此被引入作为参考。在本发明中所引用的由登录号 (accession number) 所表征的 Genbank 以及 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 中的观点在此被引入作为参考。在本发明中所引用的所有其他的公开参考书、文献、手抄本以及科技文献均在此被引入作为参考。

[0443] 尽管本发明已经就其中的优选的实施方式进行了详细的表示以及描述,但本领域技术人员能够理解的是,在不背离由所述后附的权利要求所涵盖的本发明的范围的前提下,可以对其进行形式上的以及细节上的各种改变。

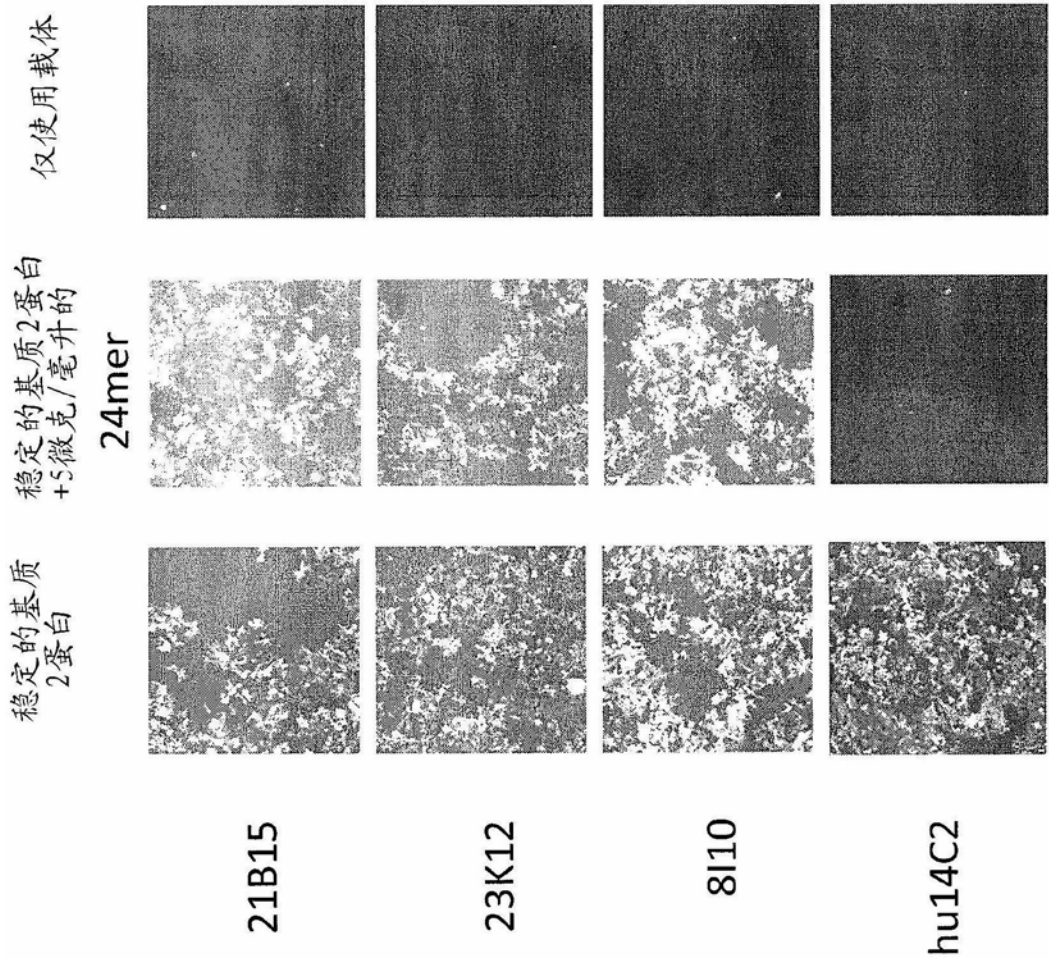


图 1

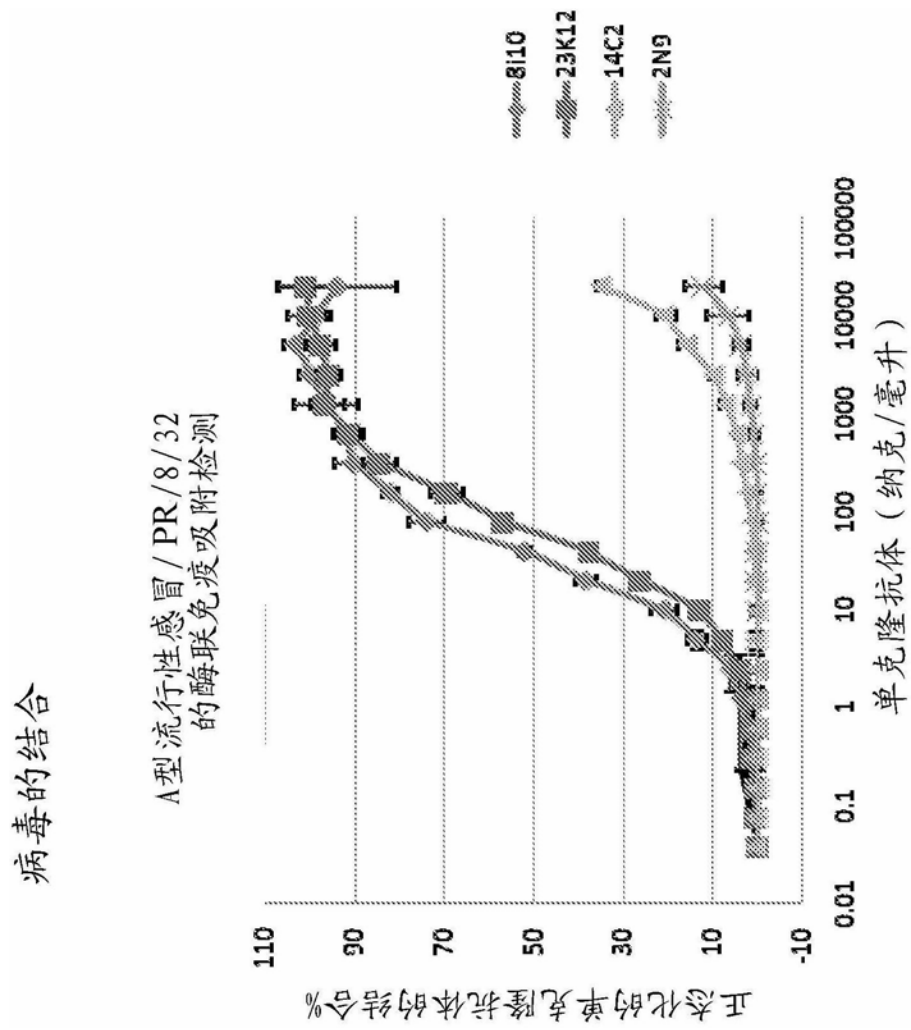


图 2A

(带有 Z3G1)

病毒的结合

A型流行性感冒/PR/8/32
的酶联免疫吸附检测

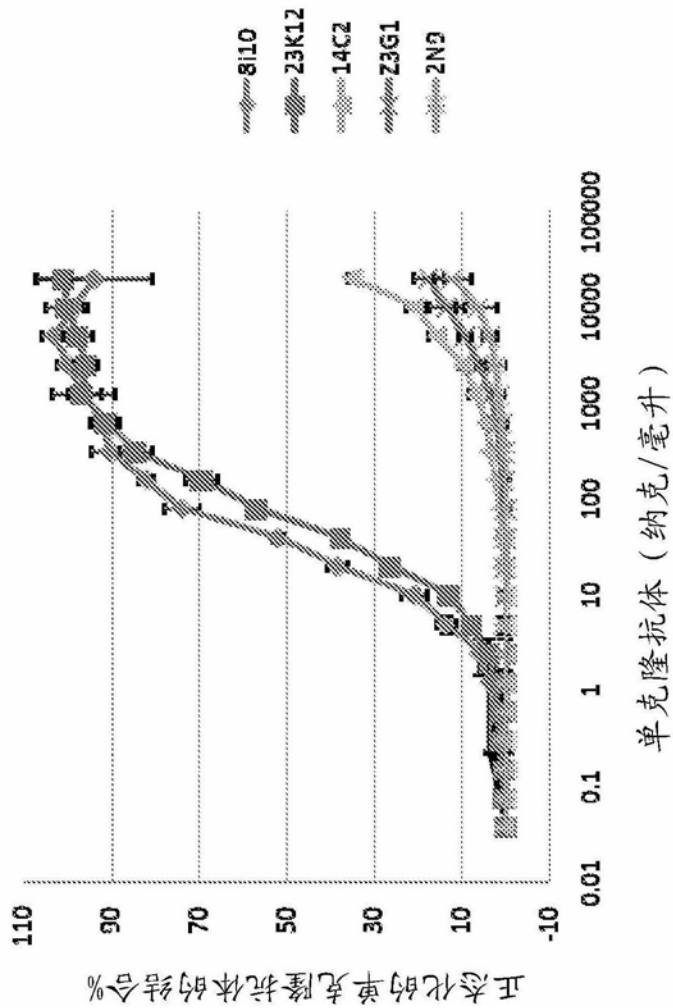


图 2B

完整长度的基质2蛋白变体的结合

基质2蛋白变体的细胞外结构域的氨基酸序列

1	A/Brevig Mission/1.1918 H1N1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									</
---	------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

图 3A

D20的细胞外序列与#19相同，HK483的细胞外序列与#29相同，并且VN 1203的细胞外序列相同于

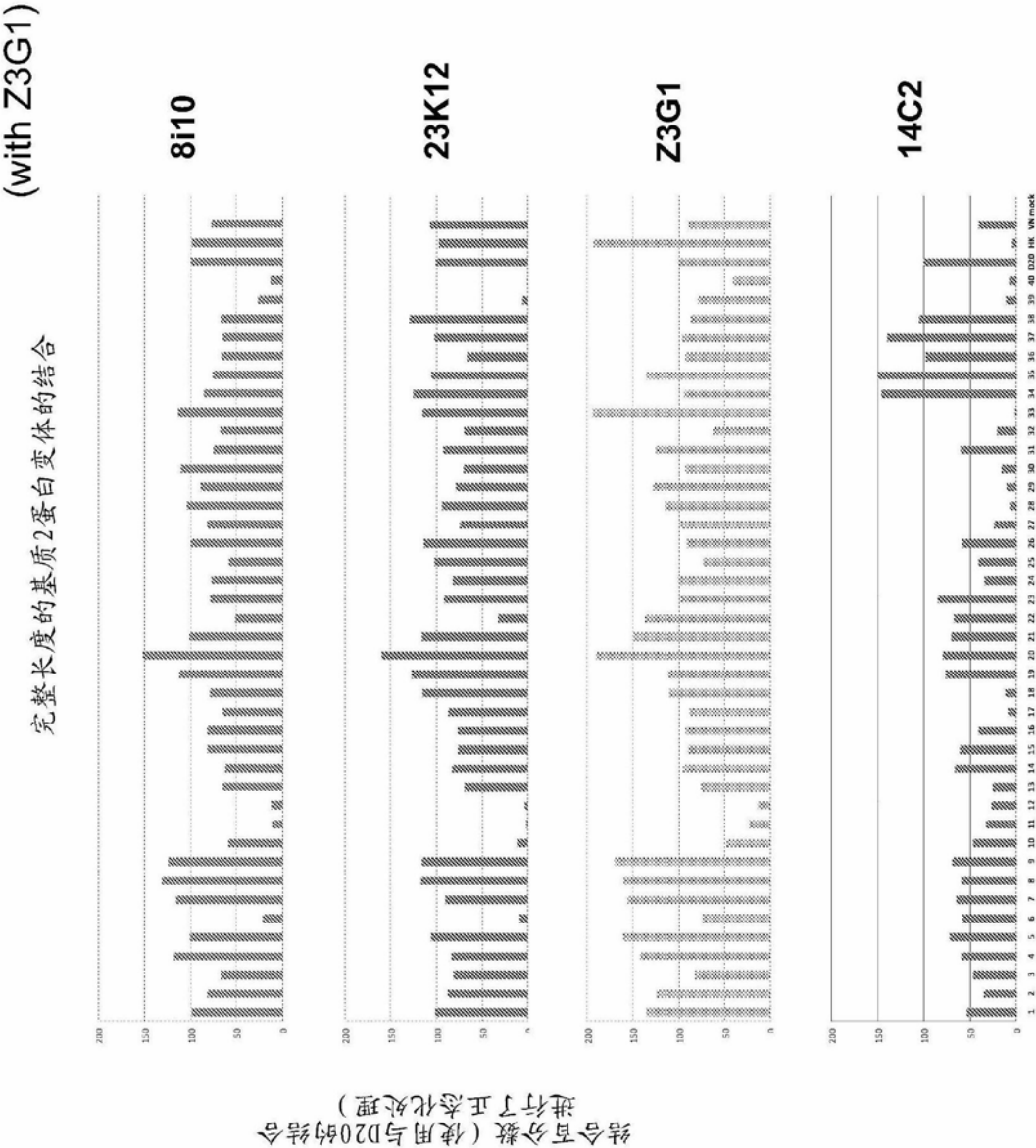


图 3B

完整长度的基质2蛋白变体的结合

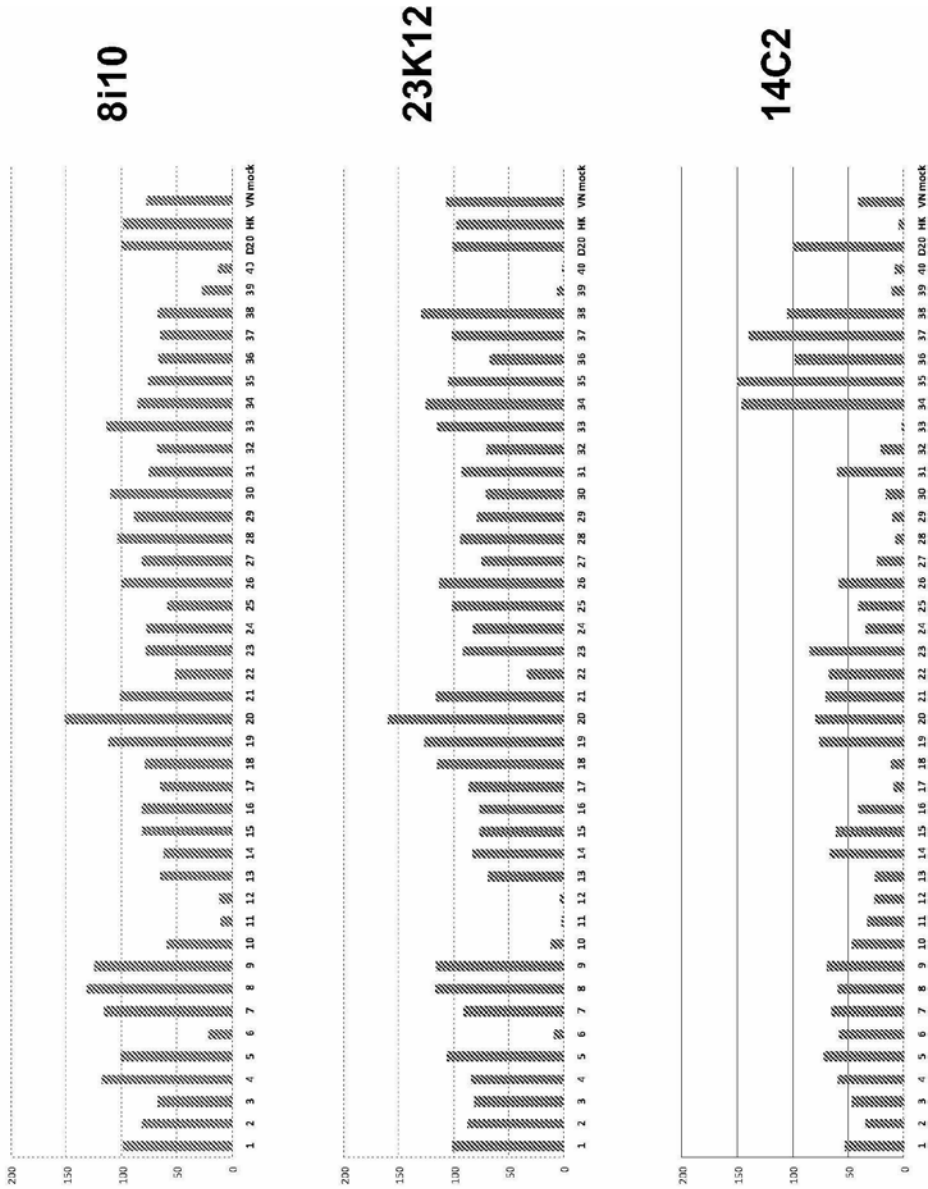


图 3C

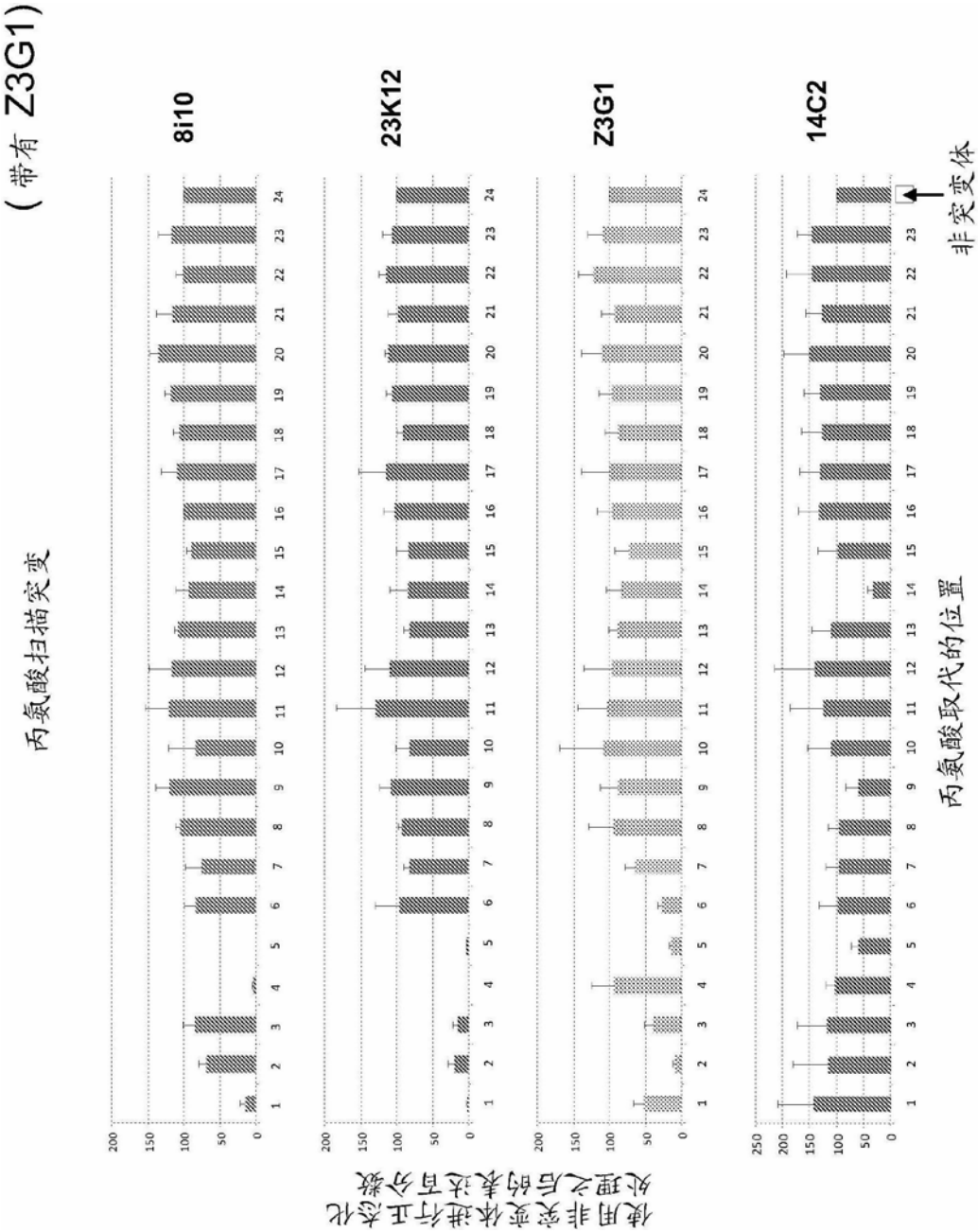


图 4A

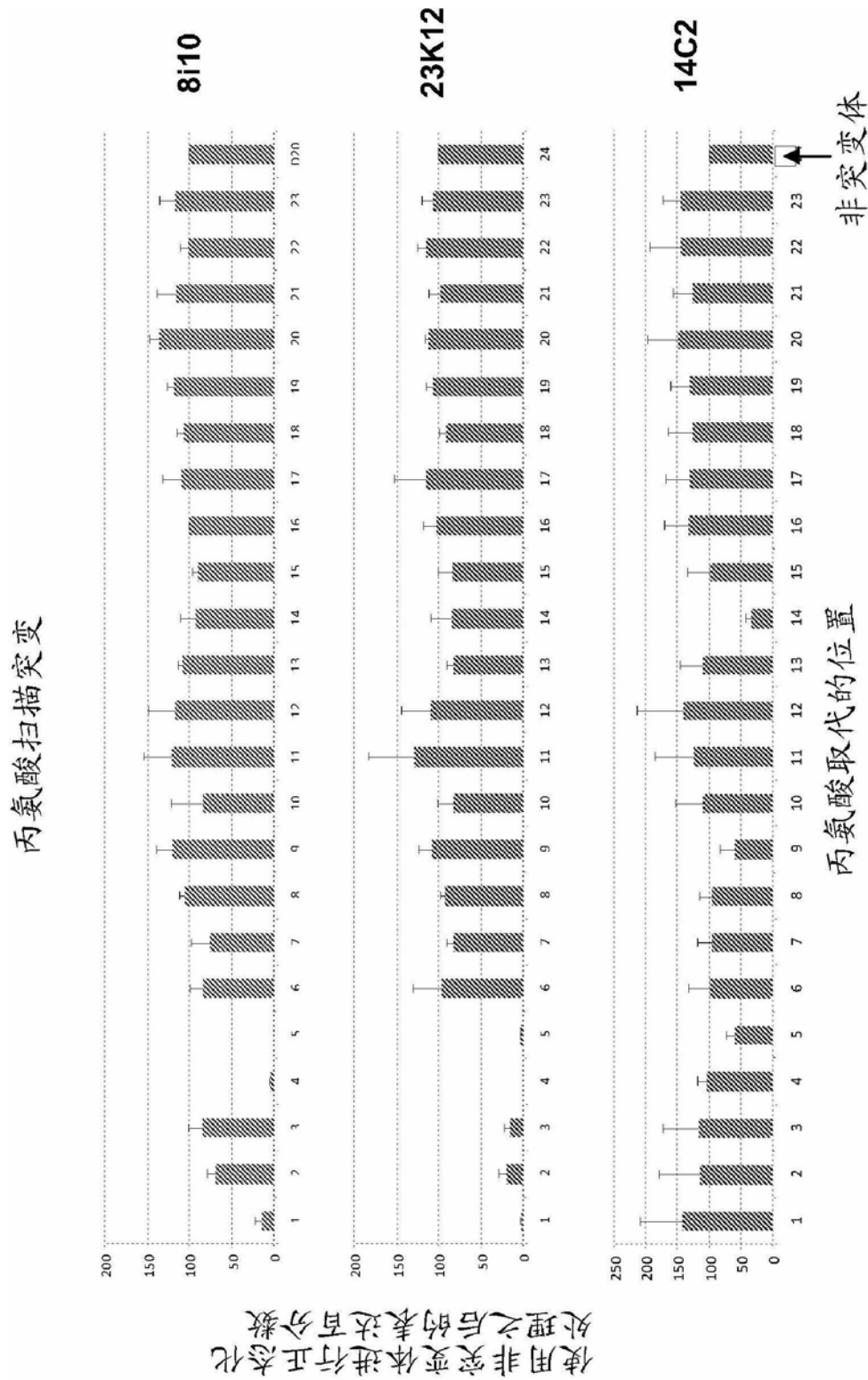


图 4B

表位的阻滞

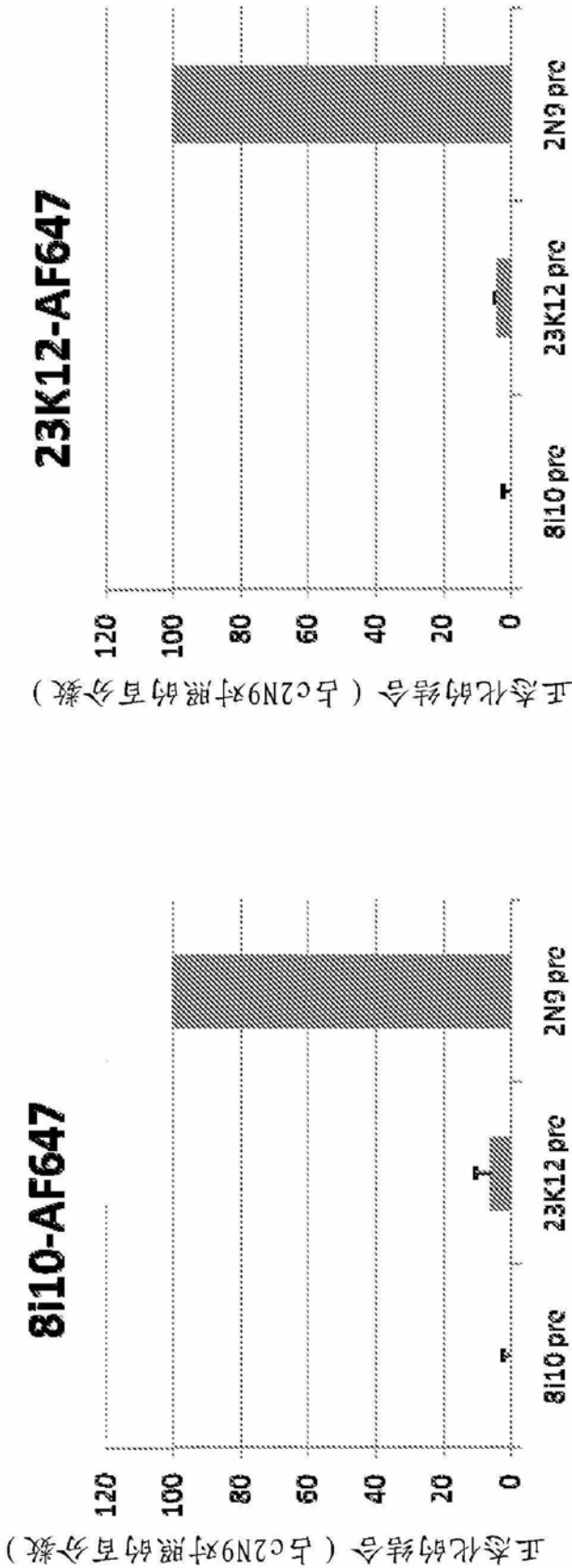


图 5

抗-基质2蛋白抗体与变体基质2蛋白肽之间的交叉反应性结合

序列编号	名称	大小	详细描述	酶联免疫吸附检测 (吸光度450)			
				14C	81C	73K12	2N9
1	M2	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCRCDSSD	+	-	-	-
2	M2SG	23 aa	SLLTEVETPIRSEWGCRCDSDG	+	-	-	-
3	M2EG	23 aa	SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	+	-	-	-
4	M2P	23 aa	SLPTEVETPIRNEWGCRCDSSD	+	-	-	-
5	M2G	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCRCDSSD	+	-	-	-
6	M2DLTGS	23 aa	SLLTEVDLTRNGWGCRCDSSD	-	-	+	-
7	M2KNS	23 aa	SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD	+	-	-	-
8	M2LGS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWGCRCDSSD	-	-	-	-
9	M2LTGS	23 aa	SLLTEVETLTNGWGCRCDSSD	-	-	-	-
10	M2SY	23 aa	SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD	+	-	-	-
11	M2TGEKS	23 aa	SLLTEVETPTRNGWECKCDSSD	+	-	-	-
12	M2HTGEKS	23 aa	SLLTEVETHTRNGWECKCDSSD	-	-	-	-
13	M2KTGEKS	23 aa	SLLTEVKTPTNGWECKCDSSD	-	-	-	-
14	M2LTGS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWGCRCDSSD	-	-	+	-
15	M2TDGEKS	23 aa	SLLTEVETPTRDGWECKCDSSD	+	-	-	-
16	M2TGS	23 aa	SLLTEVETPTRNGWGCRCDSSD	+	-	W	-
17	M2TGEK	23 aa	SLLTEVETPTRNGWECKNDSSD	+	-	-	-
18	M2LTGEKS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWECKCDSSD	-	-	W	-
19	M2K	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCKNDSSD	+	W	+	-
20	M2FG	23 aa	SFLTEVETPIRNEWGCRNGSSD	+	W	-	-
21	M2TGE	23 aa	SLLTEVETPTRNGWECDNDSSD	+	-	-	-
22	M2KGENS	23 aa	SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD	+	-	-	-
23	M2TES	23 aa	SLLTEVETPIRNEWECRCSDSSD	+	-	-	-
24	M2GHTGKS	23 aa	SLLTGVEHTRNGWGCKCDSSD	-	-	-	-
25	M2PHTGS	23 aa	SLLPEVETHTRNGWGCRCDSSD	-	-	-	-

相比较于与野生型肽 (序列1) 的结合而得到的百分数

> 25 %
25 - 40 %
> 40 %

-
W
+

未进行结合
较弱的结合
阳性结合

注释: 单克隆抗体是在5微克/毫升的水平下进行测试的。

图 6A

基质2蛋白抗体与截短型的基质2蛋白肽之间的结合活性

序列编号	名称	大小	详细描述	14C2	8A10	23A02	2A09
1	M2	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGRCRCNDSSD	3.85	0.11	0.22	0.06
26	M16	16 aa	LLTEVETPIRNEWGCR	3.94	0.09	0.21	0.09
27	M15	15 aa	LTEVETPIRNEWGCR	3.95	0.09	0.21	0.09
28	M12	12 aa	VETPIRNEWGCR	0.15	0.09	0.20	0.09
29	CM17	17 aa	ETPIRNEWGRCRCNDSSD	0.19	0.11	0.34	0.11
30	CM16	16 aa	TPIRNEWGRCRCNDSSD	0.23	0.13	0.35	0.12
31	CM15	15 aa	PIRNEWGRCRCNDSSD	0.19	0.12	0.34	0.11
32	CM14	14 aa	IRNEWGRCRCNDSSD	0.23	0.14	0.36	0.13
33	CM13	13 aa	RNEWGRCRCNDSSD	0.22	0.14	0.34	0.13
34	CM12	12 aa	NEWGRCRCNDSSD	0.27	0.14	0.39	0.14
35	NM17	17 aa	SLLTEVETPIRNEWGCR	3.99	0.26	0.58	0.10
36	NM16	16 aa	SLLTEVETPIRNEWGC	3.90	0.29	0.62	0.09
37	NM15	15 aa	SLLTEVETPIRNEWG	3.97	0.12	0.30	0.11
38	NM14	14 aa	SLLTEVETPIRNEW	3.97	0.11	0.24	0.09
39	NM13	13 aa	SLLTEVETPIRNE	0.18	0.11	0.25	0.10
40	NM12	12 aa	SLLTEVETPIRN	0.20	0.10	0.24	0.09
41	NM11	11 aa	SLLTEVETPIR	0.21	0.13	0.30	0.12
42	NM10	10 aa	SLLTEVETPI	0.17	0.10	0.24	0.10
43	NM8	8 aa	SLLTEVET	0.15	0.10	0.20	0.09
44	NM7	7 aa	SLLTEVE	0.14	0.10	0.20	0.08
45	NM9	9 aa	SLLTEVETP	0.21	0.12	0.30	0.19
46	M2e	24 aa	MSLLTEVETPIRNEWGRCRCNDSSD	3.98	0.13	0.43	0.10
CMV	HVIR1			0.16	0.11	0.21	3.99

注释：单克隆抗体是在5微克/毫升的水平下进行测试的。

图 6B

高通量的预防性的体内研究

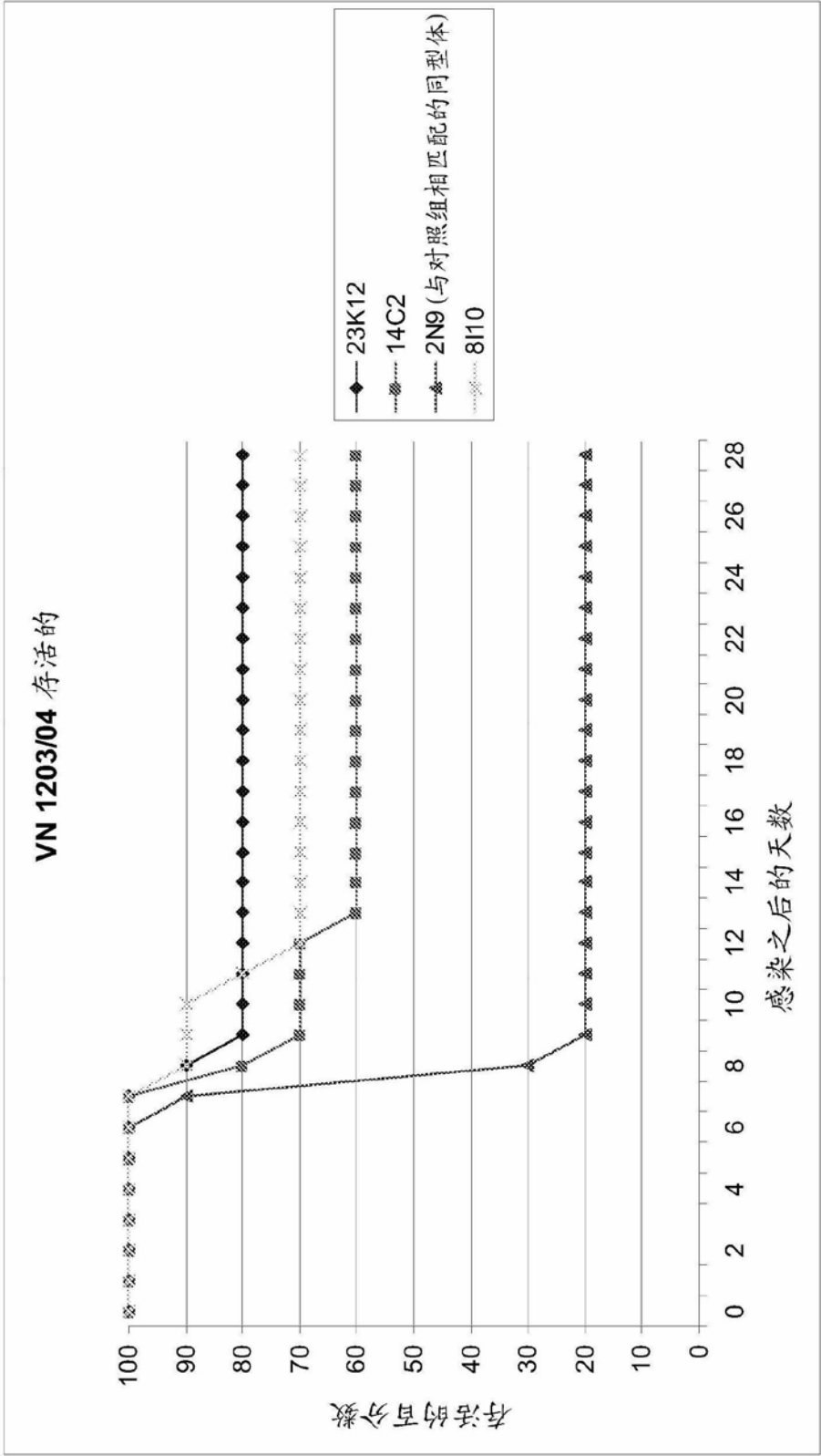
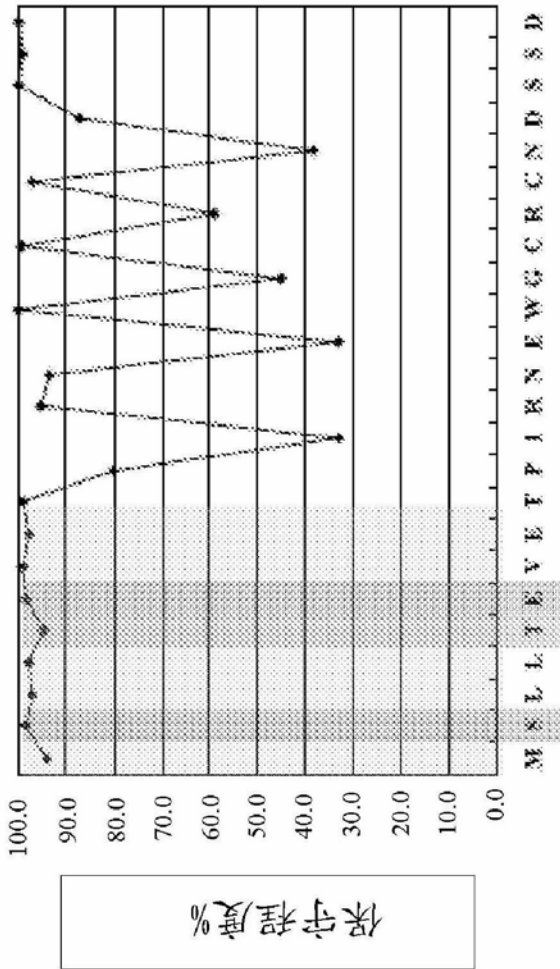


图 7

基质2蛋白的细胞外结构域单克隆抗体表现出与基质2蛋白细胞外结构域内的高度保守的N-末端区域进行结合



氨基-基质2蛋白细胞外结构域序列-羧基

图 8

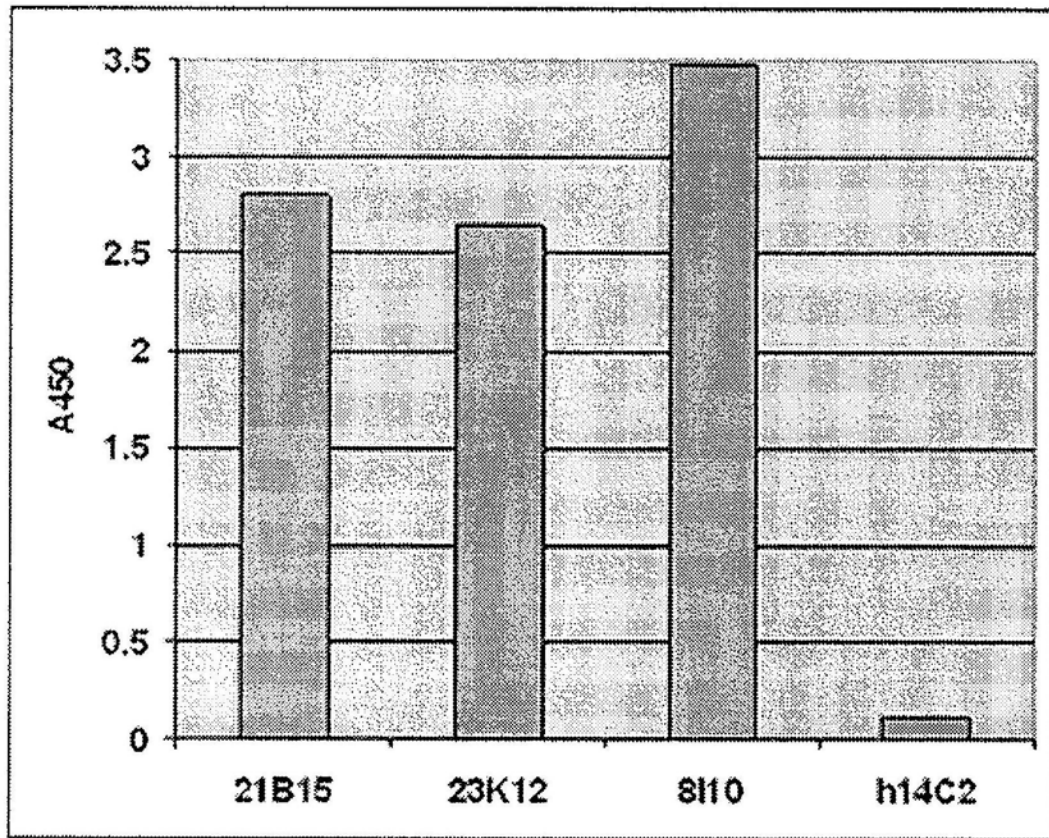


图 9

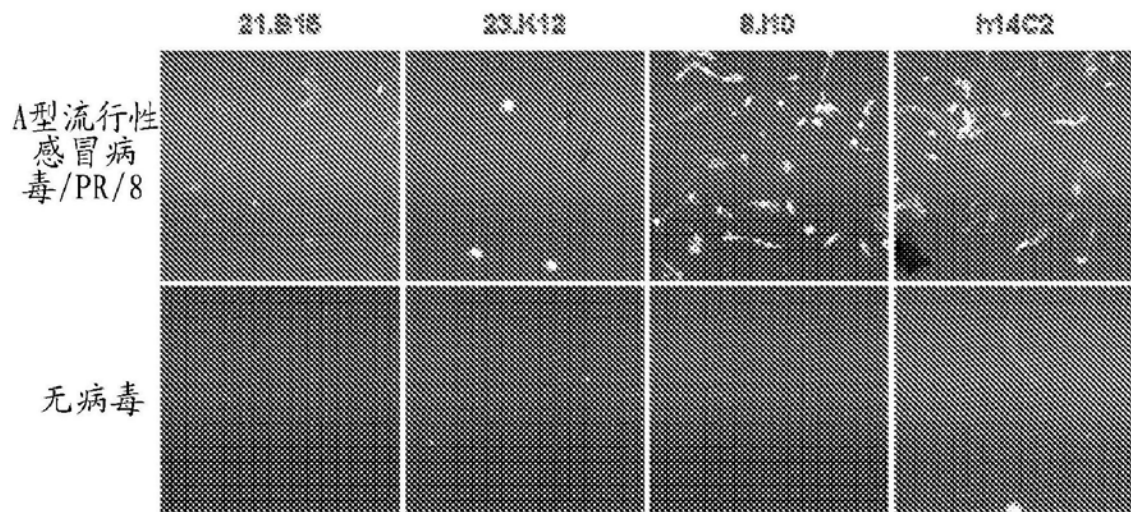


图 10

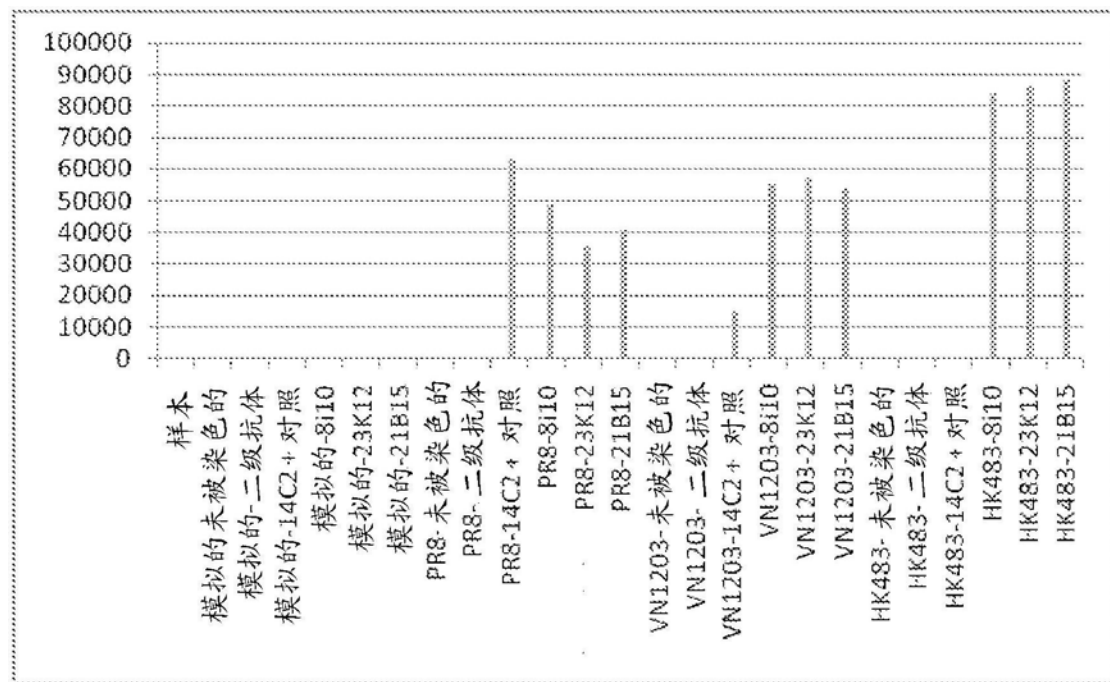


图 11

Abstract

The present invention provides novel human anti-influenza antibodies binding to conformational determinants of an M2 homotetramer and related compositions and methods. These antibodies are used in the diagnosis and treatment of influenza infection.