



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110092830 B

(45) 授权公告日 2023.07.04

(21) 申请号 201910291444.8

C07K 16/28 (2006.01)

(22) 申请日 2017.02.01

G01N 33/569 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/40 (2006.01)

申请公布号 CN 110092830 A

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.08.06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

US 20130309237 A1, 2013.11.21

62/293,406 2016.02.10 US

CN 104144944 A, 2014.11.12

(62) 分案原申请数据

Rademacher等.Ligand Specificity of CS-35, a Monoclonal Antibody That Recognizes Mycobacterial Lipoarabinomannan: A Model System for Oligofuranoside-Protein Recognition. 《Journal of the American chemical society》.2007, 第129卷(第34期), 第10489-10502页.

201780017369.5 2017.02.01

(73) 专利权人 新泽西鲁特格斯州立大学

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 A·平特 A·超德瑞

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 吴小瑛 付文川

审查员 陈盛峰

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书45页

C07K 16/12 (2006.01)

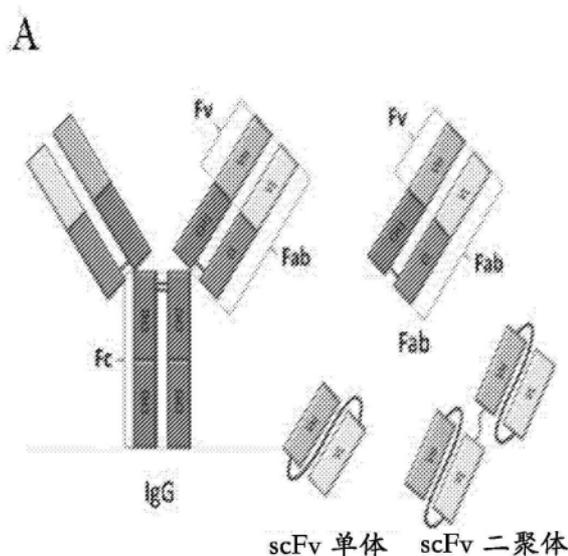
序列表16页 附图26页

(54) 发明名称

用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染的抗LAM和抗PIM6/LAM单克隆抗体

(57) 摘要

本发明广泛地提供了包括针对脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 和磷脂酰-肌-肌醇甘露糖苷6 (PIM6) 中发现的表位的单克隆抗体的不同的组合、试剂盒、载体和方法,用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染。



1. 一种抗脂阿拉伯甘露聚糖(抗LAM)单克隆抗体或其抗原结合部分,其与包含Ara4结构、Ara6结构或其组合的结核分枝杆菌(M.tb)LAM表位特异性结合,其中该抗LAM抗体包含SEQ ID NO:1所示的CDR1轻链可变区,SEQ ID NO:2所示的CDR2轻链可变区,SEQ ID NO:3所示的CDR3轻链可变区,SEQ ID NO:4所示的CDR1重链可变区,SEQ ID NO:5所示的CDR2重链可变区,和SEQ ID NO:6所示的CDR3重链可变区。

2. 如权利要求1所述的抗LAM单克隆抗体或其抗原结合部分,所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗LAM单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗LAM抗体是scFv-IgG、IgA或IgM抗体。

4. 一种用于检测至少一种LAM表位的试剂盒,该试剂盒包含:

(a) 与结核分枝杆菌LAM表位特异性结合的第一抗LAM抗体;

(b) 该第一抗LAM抗体结合的支持物;

(c) 检测抗体,其与相同或不同LAM表位特异性结合,其中该检测抗体用报道分子标记;  
和

(d) 缓冲剂,

其中该第一抗LAM抗体或检测抗体是如权利要求1至3任一项所述的抗LAM单克隆抗体。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其中该第一抗LAM抗体和该检测抗体中的至少一种是scFv-IgG或IgM抗体,并且包含SEQ ID NO:1所示的CDR1轻链可变区,SEQ ID NO:2所示的CDR2轻链可变区,SEQ ID NO:3所示的CDR3轻链可变区,SEQ ID NO:4所示的CDR1重链可变区,SEQ ID NO:5所示的CDR2重链可变区,和SEQ ID NO:6所示的CDR3重链可变区。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其中该第一抗LAM抗体和该检测抗体中的至少一种包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

7. 权利要求1-3任一项所述的抗LAM单克隆抗体或其抗原结合部分或者权利要求4-6任一项所述的试剂盒在制备用于诊断个体中活动性结核感染的试剂盒中的用途,其中该第一抗体对LAM的捕获表明活动性结核感染。

8. 如权利要求7所述的用途,其中该检测抗体是权利要求1-3任一项所述的抗LAM抗体。

9. 如权利要求8所述的用途,其中该检测抗体是特异性结合结核分枝杆菌LAM的抗LAM抗体,该第一抗体或该检测抗体包含SEQ ID NO:1所示的CDR1轻链可变区,SEQ ID NO:2所示的CDR2轻链可变区,SEQ ID NO:3所示的CDR3轻链可变区,SEQ ID NO:4所示的CDR1重链可变区,SEQ ID NO:5所示的CDR2重链可变区,和SEQ ID NO:6所示的CDR3重链可变区。

10. 如权利要求7所述的用途,其中该检测抗体是特异性结合结核分枝杆菌LAM的抗LAM抗体,并且其中该第一抗体或该检测抗体是scFv-IgG或IgM抗体,并且包含SEQ ID NO:1所示的CDR1轻链可变区,SEQ ID NO:2所示的CDR2轻链可变区,SEQ ID NO:3所示的CDR3轻链可变区,SEQ ID NO:4所示的CDR1重链可变区,SEQ ID NO:5所示的CDR2重链可变区,SEQ ID NO:6所示的CDR3重链可变区。

11. 如权利要求7所述的用途,其中该个体是人。

12. 权利要求1-3任一项所述的抗LAM单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗个

体中肺结核感染的试剂盒中的用途。

13. 如权利要求12所述的用途,进一步包括给予所述个体治疗有效量的至少一种抗生素。

14. 如权利要求12所述的用途,其中该结核感染是一种多重耐药性(MDR-TB)结核感染。

15. 如权利要求12所述的用途,其中该抗LAM单克隆抗体在其Fc结构域包含提高其针对一种或多种Fc受体的特异性和提高其治疗活性的修饰。

16. 如权利要求10所述的用途,其中还包括使用第一抗体预浓缩诊断样品的LAM,从而提高后续检测试验的敏感性。

17. 权利要求1-3任一项所述的抗LAM单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗LAM单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或者嵌合抗体。

18. 权利要求4-6任一项所述的试剂盒,其中该抗LAM单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或者嵌合抗体。

19. 权利要求7-16任一项所述的用途,其中该抗LAM单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或者嵌合抗体。

## 用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染的抗LAM和抗PIM6/LAM单克隆抗体

[0001] 本申请为申请号为2017800173695,申请日为2017年2月1日,发明名称为“用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染的新颖抗LAM和抗PIM6/LAM单克隆抗体”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2016年2月10日提交的美国临时申请号62/293,406的优先权,该临时申请通过援引以其全文并入本文。

### 技术领域

[0004] 本文描述了包括针对脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)脂甘露聚糖(LM)和磷脂酰-肌-肌醇甘露糖苷6(PIM6)中发现的表位的抗体的组合物、试剂盒、载体和方法,用于诊断、预防和治疗结核分枝杆菌感染。

[0005] 序列表

[0006] 本申请含有一份已经以ASCII格式经EFS-WEB递交的序列表并且该序列表通过援引以其全文并入本文。创建于2017年2月1日的所述ASCII副本名称为096747.00337\_ST25.txt并且大小为29,097字节。

### 背景技术

[0007] A. 结核分枝杆菌

[0008] 结核病(TB)仍然是世界上最致命的传染病之一,目前感染了世界上大约1/3的人口。根据2014年世卫组织全球结核病报告:结核病,在2013年,估计有900万人患上TB,并且150万人死于该疾病。尽管目前有可用于TB的有效药物,但这些需要用多种抗生素进行长时间治疗,并且越来越多地受到多重耐药性(MDR-TB)菌株的发展的影响,这些菌株目前导致约3.5%的近期感染。这些菌株难以治疗,并且具有明显较差的治愈率。同样广泛传播的是广泛耐药的TB(XDR-TB)菌株,它们比MDR-TB菌株甚至更昂贵且难以治疗,并且现在已在全世界100个国家报道。因此,需要早期诊断和治疗TB感染的新方法。

[0009] B. 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)

[0010] 糖脂脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)是结核分枝杆菌复合体的成员细胞壁的主要结构和抗原组分,并且它介导许多促进生产性感染和疾病发展的重要功能。LAM还是用于检测TB活性感染的重要免疫诊断靶标(特别是在共感染有HIV-1的患者中)和潜在的疫苗靶标。尽管存在LAM作为免疫诊断靶标的重要性及其在结核分枝杆菌(M. tb)感染和致病性的生理学中的重要作用,但令人惊讶的是,对于抗原的人体液应答的性质知之甚少。以前可用的LAM特异性单克隆抗体衍生自用从麻风分枝杆菌或结核分枝杆菌中纯化的LAM免疫的小鼠,并且没有描述任何针对LAM的人单克隆抗体,这些人单克隆抗体已经被诱导响应于免疫或响应于被结核分枝杆菌的感染。

[0011] 脂甘露聚糖(LM) - 是LAM的直接前体,并且含有由甘露聚糖结构域修饰的磷脂酰-肌-肌醇结构域,该甘露聚糖结构域由 $\alpha(1\rightarrow6)$ -连接的Manp骨架组成,该Manp骨架被短 $\alpha(1$

→2)-甘露吡喃糖侧链取代,但是没有被阿拉伯糖侧链取代。

[0012] C. 磷脂酰-肌-肌醇甘露糖苷6 (PIM6)

[0013] PIM6是PIM2的产物,LM和LAM的共同前体。这些分子的核心是在位置2和6处被Manp单元糖基化的肌-肌醇结构。在PIM6中,在位置6处的Manp单元进一步被与ManLAM上的甘露糖帽相同的两个末端 $\alpha$ -Manp(1→2)-连接的糖取代。这些分子被多达4个脂肪酸链酰化,附着于肌醇头部基团和核心Man残基,其将这些分子非共价地锚定在细胞包膜的内膜和外膜上。据报道,PIM6与C型凝集素和DC-SIGN,树突状细胞上的主要受体结合,并且是具有强效抗炎活性的强TLR2激动剂和HIV-1复制的增强子。

## 发明内容

[0014] 本文描述了用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染的新颖抗LAM和抗PIM6/LAM单克隆抗体(mAb)。下文描述了对结核分枝杆菌糖脂特异的这些新颖人抗体的分离和表征,这些新颖人抗体包括对LAM表位特异的人mAb,和对由LAM和PIM6共有的表位特异的人mAb。

[0015] 因此,本文描述了一种人单克隆抗脂阿拉伯甘露聚糖(抗LAM)抗体或其抗原结合部分,其与包括Ara4结构,Ara6结构或其组合的LAM表位特异性结合,其中该抗LAM抗体包括与SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。人单克隆抗LAM抗体或其抗原结合部分可以包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23的氨基酸序列,该轻链可变区包括SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26的氨基酸序列。该抗LAM抗体可以是scFv-IgG、和IgGa或IgM抗体。抗LAM抗体的实例是A194。

[0016] 本文还描述了一种人单克隆抗LAM抗体或其抗原结合部分,其与LAM表位特异性结合,该LAM表位包括以下中的至少一种:甘露糖封端的Ara4结构和甘露糖封端的Ara6结构。该抗LAM抗体可以包括与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:32具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:11具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。该抗体可以包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO:43的氨基酸序列,该轻链可变区包括SEQ ID NO:44的氨基酸序列。该抗LAM抗体可以是例如IgM或IgA抗体。抗LAM抗体的实例是P3B09。

[0017] 本文进一步描述了一种人单克隆抗LAM抗体或其抗原结合部分,其与LAM表位特异性结合,该LAM表位包括附接在Ara4或Ara6的非还原末端的 $\alpha$ -Manp(1→2)连接的结构,其中该抗LAM抗体包括与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:9具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的

CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:11具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:12具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。该抗LAM抗体(例如,P3B09)可以是例如IgM或IgA抗体。

[0018] 本文又进一步描述了一种人单克隆抗PIM6/LAM抗体或其抗原结合部分,其与LAM和PIM6中存在的表位特异性结合,该表位包括至少一个聚甘露糖结构。该表位在PIM6甘露聚糖结构域中,并且还存在于分枝杆菌脂质甘露聚糖(LM)中。该抗PIM6/LAM抗体可以包括与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:15具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:16具有至少80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:17具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。该抗体可以例如包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO:47的氨基酸序列,该轻链可变区包括SEQ ID NO:48的氨基酸序列。该抗PIM6/LAM抗体可以是例如IgM、IgA或IgG抗体。抗PIM6/LAM抗体的实例是P95C1。

[0019] 本文还描述了一种用于检测至少一种LAM表位的试剂盒。该试剂盒包括(a)与LAM表位特异性结合的至少第一抗LAM抗体;(b)该至少第一抗LAM抗体结合的支持物;(c)检测抗体,其与LAM特异性结合,或与该至少第一抗LAM抗体特异性结合,其中该检测抗体用报道分子标记;和(d)缓冲液。该至少第一抗LAM抗体是,例如,如本文所述的人单克隆抗LAM抗体。该检测抗体可以例如是与LAM特异性结合的第二抗LAM抗体。在一些实施例中,该第一抗LAM抗体和该第二抗LAM抗体中的至少一种是scFv-IgG或IgM抗体,并且包括与SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。在试剂盒的一些实施例中,该第一抗LAM抗体和该第二抗LAM抗体中的至少一种包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:23的氨基酸序列,该轻链可变区包括SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0020] 本文仍进一步描述了一种诊断个体中活动性结核感染的方法,该方法包括:(a)从包括或怀疑包括LAM的个体获取样品;(b)处理所述样品以暴露个体LAM表位;(c)使所述样品与至少第一抗体接触,该至少第一抗体与所述LAM上的第一表位特异性结合;(d)使所述样品与检测抗体接触,该检测抗体与LAM特异性结合,或与该至少第一抗体特异性结合;(e)检测该至少第一抗体与LAM上的所述第一表位的结合;和(f)诊断所述患者患有活动性结核感染,该至少第一抗体与LAM上的所述第一表位的结合表明活动性结核感染。该至少第一抗体是,例如,如本文所述的人单克隆抗LAM抗体或人单克隆抗PIM6/LAM抗体。该检测抗体可以例如是与LAM特异性结合的抗LAM抗体。在方法的一些实施例中,该至少第一抗体和该检测抗体各自包括与SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的CDR1可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:4具有至少

80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。在方法的一些实施例中,该第一抗体和该检测抗体中的至少一种是scFv-IgG或IgM抗体,并且包括具有与SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的可变轻区的CDR1区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR2可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的CDR3可变轻区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的CDR1可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR2可变重区或其抗原性片段,与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的CDR3可变重区或其抗原性片段。在一些实施例中,该个体是人。

[0021] 本文还描述了治疗个体中结核感染的方法。该方法包括给予所述个体治疗有效量的如本文所述的至少一种人单克隆抗LAM抗体或人单克隆抗PIM6/LAM抗体。该方法可以进一步包括给予所述个体治疗有效量的至少一种抗生素。该结核感染可以是多重耐药性(MDR-TB)结核感染。

[0022] 本文进一步描述了编码本文所述的抗体的重链和轻链(包括可变区)的核苷酸序列。

[0023] A. 抗LAM抗体和抗PIM6/LAM抗体

[0024] 在一些实施例中,本发明提供了抗LAM抗体或其抗原结合部分。在一些实施例中,本发明提供了抗PIM6/LAM抗体或其抗原结合部分。如本文所述的抗LAM抗体(或其抗原结合部分)与LAM表位特异性结合。如本文所述的抗PIM6/LAM抗体(或其抗原结合部分)与LAM表位和PIM6表位两者特异性结合。在一些实施例中,LAM和PIM6表位衍生自各种分枝杆菌物种。在另外的实施例中,各种分枝杆菌物种是结核分枝杆菌复合体的毒性成员。在另外的实施例中,分枝杆菌物种是结核分枝杆菌。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体是单克隆抗体(mAb)。在另外的实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体分别是人单克隆抗LAM抗体或人单克隆抗PIM6/LAM抗体。在其他实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体分别是人源化单克隆抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体。在一些实施例中,抗LAM抗体与Ara4和Ara6结构结合。

[0025] 在一些实施例中,LAM表位是未封端的阿拉伯糖链。在一些实施例中,LAM表位是未封端的或单甘露糖封端的阿拉伯糖链,具有或不具有末端MTX取代。

[0026] 在一些实施例中,LAM表位是甘露糖封端的Ara4结构和甘露糖封端的Ara6结构。在其他实施例中,抗LAM抗体与 $\alpha(1\rightarrow2)$ -连接的二甘露糖结构特异性结合,其可以与Ara4/Ara6结构连接,或与聚甘露糖结构连接(图8)。在一些实施例中,PIM6表位包括还存在于分枝杆菌脂质甘露聚糖(LM)中的至少一个聚甘露糖结构。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体与PIM6表位特异性结合,该PIM6表位在PIM6甘露聚糖结构域中包括至少一个聚甘露糖结构。在一些实施例中,LAM表位包括至少一个甲硫基木糖(MTX)或甲基亚磺酰基咪唑木糖基(MSX)取代。在一些实施例中,LAM表位包括至少一个磷脂酰-肌-肌醇取代(PILAM)。在一些实施例中,LAM表位是用至少一个甘露糖封端的阿拉伯糖链,即甘露糖基化的Man-LAM表位。在另外的实施例中,封端的阿拉伯糖链包括Ara4和/或Ara6结构。在一些实施例中,Man-LAM表位包括经单甘露糖取代的阿拉伯糖链、经二甘露糖取代的阿拉伯糖链、经三甘露糖取代的阿拉伯糖链或其组合。在一些实施例中,Man-LAM表位包括二甘露糖或三甘露糖封端的

Ara4和/或Ara6结构。在一些实施例中,Man-LAM表位是二甘露糖封端的Ara6。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括IgG抗体。在另外的实施例中,IgG抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括IgG1、IgG2或IgG3的亚类。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体不是IgG抗体。在其他实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括IgA抗体。在其他实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括IgM抗体。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括从最初分离的同种型转换的第二个同种型。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括重组抗体。在一些实施例中,重组抗体包括多价IgM抗体。在另外的实施例中,重组抗体包括五价IgM抗体。在其他实施例中,重组抗体包括ScFv-IgG抗体,其中一种抗体的单链Fv片段与该抗体的重链的N末端或不同的抗LAM mAb连接。在另外的实施例中,重组抗体包括多价ScFv-IgG抗体。在另外的实施例中,重组抗体包括同源四价ScFv-IgG抗体,其中scFv结构域衍生自构建体中存在的IgG的可变区。在又另外的实施例中,重组抗体包括异源四聚体scFv-IgG抗体,其中scFv区衍生自不同的抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体,如所包括的IgG区。在一些实施例中,scFv结构域包括与第二抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的可变重(VH)区连接的前导序列,该可变重(VH)区与所述抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的可变轻(VL)结构域连接。在其他实施例中,scFv结构域包括与第一抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的可变轻链区连接的前导序列,该可变轻链区与第二抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的可变重(VH)区连接。在一些实施例中,抗LAM抗体是分离的抗LAM抗体,该分离的抗LAM抗体与LAM表位特异性结合(例如,Ara4和Ara6之一或其组合, $\alpha(1\rightarrow2)$ -连接的二甘露糖结构,其可以与Ara4/Ara6结构连接,或与聚甘露糖结构连接)。在一些实施例中,抗LAM抗体不与CS-35和FIND25竞争。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是分离的抗PIM6/LAM抗体,其与分枝杆菌脂质甘露聚糖(LM)中的至少一个多甘露糖结构特异性结合。

[0027] 在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体包括柔性接头。在一些实施例中,柔性接头将对应的重链和轻链结构域连接成单链分子。在一些实施例中,柔性接头将免疫球蛋白轻链(IgVL)连接至免疫球蛋白重链(IgVH)。在另外的实施例中,柔性接头由式(GGSGG)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:19)组成,其中N是在如下范围之间的任何正整数:1与200以及在例如1至5、1至10、1至15、1至25、1至50、5至10、5至25、10至25、10至50、1至100、1至150之间的任何范围,以及所有介于之间的范围。

[0028] 在一些实施例中,抗LAM抗体(例如,P30B9、A194-01)具有至少一个(例如,一个、两个、三个)互补决定区(CDR)(例如CDR1、CDR2、CDR3)。在一些实施例中,CDR1的可变轻区基本上由SEQ ID NO:1或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR1区的可变轻区基本上由SEQ ID NO:7或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR1区的可变轻区基本上由SEQ ID NO:13或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR1的可变重区基本上由SEQ ID NO:4或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR1区的可变重区基本上由SEQ ID NO:10或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR1区的可变重区基本上由SEQ ID NO:16或其抗原性片段组成。

[0029] 在一些实施例中,CDR2的可变轻区基本上由SEQ ID NO:2或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR2的可变轻区基本上由SEQ ID NO:8或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR2的可变轻区基本上由SEQ ID NO:14或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR2的可变重区基本上由SEQ ID NO:5或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR2区的可变重区基本上由SEQ ID NO:11或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR2区的可变重区基本上

由SEQ ID NO:17或其抗原性片段组成。

[0030] 在一些实施例中,CDR3的可变轻区基本上由SEQ ID NO:3或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR3的可变轻区基本上由SEQ ID NO:9或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR3的可变轻区基本上由SEQ ID NO:15或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR3的可变重区基本上由SEQ ID NO:6或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR3区的可变重区基本上由SEQ ID NO:12或其抗原性片段组成。在其他实施例中,CDR3区的可变重区基本上由SEQ ID NO:18或其抗原性片段组成。

[0031] 在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体(例如,P95C1)具有至少一个(例如,一个、两个、三个)CDR(例如,CDR1、CDR2、CDR3)。在一些实施例中,CDR1的可变轻区基本上由SEQ ID NO:13或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR1的可变重区基本上由SEQ ID NO:16或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR2的可变轻区基本上由SEQ ID NO:14或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR2的可变重区基本上由SEQ ID NO:17或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR3的可变轻区基本上由SEQ ID NO:15或其抗原性片段组成。在一些实施例中,CDR3的可变重区基本上由SEQ ID NO:18或其抗原性片段组成。

[0032] B. 诊断试剂盒和方法

[0033] 在一些实施例中,本发明提供了用于检测人受试者的生物体液中LAM和/或PIM6的存在的试剂盒。在一些实施例中,该测定的组分在侧向流动装置中组装(参见世界卫生组织2015,使用侧流尿脂阿拉伯甘露聚糖测定(LF-LAM)用于诊断和筛选HIV携带者中的活动性结核)。在一些实施例中,试剂盒包括第一抗LAM(例如,A194-01、P30B9)或抗PIM6/LAM(例如,P95C1)捕获抗体、用报道分子标记的第二抗LAM或抗PIM6/LAM检测(detector、detection)抗体、第一抗LAM或抗PIM6/LAM抗体结合的载体和缓冲液。在一些实施例中,第一抗LAM或抗PIM6/LAM抗体和第二抗LAM或抗PIM6/LAM抗体中的至少一种是人单克隆抗LAM抗体或人单克隆抗PIM6/LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合,该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与LAM(和脂甘露聚糖(LM))的甘露聚糖结构域特异性结合。在一些实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体与相同的LAM表位结合,这些LAM表位在单个LAM分子上以多个拷贝存在。在其他实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体与单个LAM分子上存在的不同表位结合。LAM和PIM6表位可以是本文所述的任何LAM和PIM6表位。在其他实施例中,包括第三检测(detector、detection)抗体,其与第二抗体的非竞争位点结合。在一些实施例中,第一抗体和第二抗体具有相同的同种型。在其他实施例中,第一抗体和第二抗体是不同的同种型。在捕获测定的一些实施例中,仅捕获抗体或检测抗体是如本文所述的抗LAM抗体(例如,A194-01、P30B9)或抗PIM6/LAM抗体(例如,P95C1)。

[0034] 本文所述的抗体可用于另外的检测和诊断应用。例如,在一种诊断测定中,本文所述的抗体中的一种或多种(例如,A194-01、P30B9、P95C1)可用于染色从患者获得的组织,以检测怀疑含有TB或TB感染的细胞的病变(例如,肉芽肿)中LAM的存在。这可以例如用如本文所述的单一抗体(例如,A194-01、P30B9、P95C1)进行,该单一抗体与允许灵敏检测的标记缀合。在这种方法或测定中,可以在感染的组织中通过P95C1检测PIM6或相关分子。在另一个实例中,P95C1可用于PIM6竞争测定,其中通过固定化P95C1捕获标记形式的PIM6由存在于嫌疑人的生物体液(例如,血液或尿液)中的可溶性PIM6竞争。在没有可溶性PIM6的情况下,这将导致信号的捕获,这将通过可溶性PIM6的存在来竞争(参见世界卫生组织,2015年政策

指导-侧流尿脂阿拉伯甘露聚糖测定 (LF-LAM) 用于诊断和筛选HIV携带者中的活动性结核的用途)。

[0035] 在一些实施例中,本发明提供用于区分结核分枝杆菌复合体的致病成员和结核分枝杆菌复合体的非致病成员的试剂盒。在一些实施例中,抗LAM抗体是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6结构之一特异性结合,具有或不具有Man或MTX-Man取代或其组合,或抗PIM6/LAM抗体,该抗PIM6/LAM抗体特异性结合在PIM6或LAM甘露聚糖结构域中的至少一个聚甘露糖结构。在一些实施例中,抗LAM抗体与Man-LAM表位特意结合,该Man-LAM表位包括经二甘露糖取代的侧链、经三甘露糖取代的侧链或其组合。在另外的实施例中,抗LAM抗体与Man-LAM表位特意结合,这些Man-LAM表位包括二甘露糖或三甘露糖封端的Ara4和/或Ara6结构。在又另外的实施例中,抗LAM抗体与二甘露糖封端的Ara6结构特异性结合。

[0036] 在一些实施例中,本发明提供了用于诊断个体中活动性结核感染的方法。在一些实施例中,抗LAM或抗PIM6/LAM抗体可以用敏感标签修饰并用于鉴定组织样品中的分枝杆菌PIM6或LAM相关物质,作为TB感染的诊断和定位。在一些实施例中,该方法涉及捕获可溶性LAM,并且包括以下步骤:(a)从包括LAM的个体获得样品;(b)处理样品以分离或暴露所述LAM,(c)用与所述LAM上的第一表位结合的第一抗LAM抗体捕获所述分离的或暴露的LAM;(d)使所述分离的或暴露的LAM与第二抗LAM抗体接触,其中所述第二抗LAM抗体与所述LAM上的第二表位结合;(e)检测所述第一抗LAM抗体和所述第二抗LAM抗体中的至少一种与所述LAM的结合;和(f)诊断所述患者患有活动性结核感染,其中所述第一抗LAM抗体和所述第二抗LAM抗体中至少一种与所述LAM结合的所述存在表明活动性结核感染。在一些实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体中的至少一种是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在一些实施例中,第一和第二抗体中的至少一个是人单克隆抗PIM6/LAM抗体,该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与LAM甘露聚糖结构域中的至少一个聚甘露糖结构特异性结合。在另外的实施例中,第一抗体和第二抗体是不同的同种型。在一些实施例中,第一抗体和第二抗体中的至少一种是重组抗体。在其他实施例中,第一抗体和第二抗体都不是重组抗体。在又其他实施例中,第一抗体和第二抗体都是重组抗体。

[0037] 在一些实施例中,本发明提供了量化样品中存在的LAM和/或PIM6的量的方法。在一些实施例中,该方法包括以下步骤:(a)获得包括LAM和/或PIM6的样品;(b)使所述样品与抗LAM抗体和/或抗PIM6抗体接触;(c)检测抗LAM抗体与所述LAM的特异性结合和/或抗PIM6/LAM抗体与所述LAM或所述PIM6的结合的存在;和(d)量化所述样品中LAM或PIM6的量。在一些实施例中,抗LAM抗体是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是人单克隆抗PIM6/LAM抗体,该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与PIM6甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构(例如,与分枝杆菌脂质甘露聚糖(LM)中的至少一个多甘露糖结构)特异性结合。在一些实施例中,通过将信号强度与具有已知浓度的LAM和/或PIM6的连续稀释的对照样品的信号强度进行比较来实现量化所述LAM和/或PIM6的量。

[0038] 在一些实施例中,本发明提供了用于诊断个体感染结核分枝杆菌的方法。在一些实施例中,该方法包括以下步骤:(a)获得包括LAM或PIM6的样品;(b)使所述样品与抗LAM抗

体和/或抗PIM6抗体接触,其中抗LAM抗体与LAM表位特异性结合,该LAM表位包括具有至少一个5-脱氧-5-甲硫基咪喃戊糖基(MTX)取代的Man-LAM,并且抗PIM6/LAM抗体与表位特异性结合,该表位包括在LAM甘露聚糖结构域中的一个多甘露糖结构,和(c)检测抗LAM抗体与所述Man-LAM的特异性结合的存在和/或抗PIM6/LAM抗体与所述PIM6的特异性结合的存在。在一些实施例中,抗LAM抗体是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是人单克隆抗PIM6/LAM抗体(例如,P95C1),该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与PIM6甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合。

[0039] 在一些实施例中,该方法包括扩增步骤,该扩增步骤增加检测方法的灵敏度。实例涉及通过使用酪酰胺信号放大试剂盒(珀金埃尔默公司(Perkin-Elmer))产生另外的靶位点或通过使用ELISA扩增系统(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher))扩增初始信号。

[0040] 在一些实施例中,本发明提供用于区分结核分枝杆菌复合体的致病成员和结核分枝杆菌复合体的非致病成员的方法。在一些实施例中,该方法包括以下步骤:(a)获得包括LAM和/或PIM6的样品;(b)使所述样品与抗LAM抗体接触,该抗LAM抗体与Man-LAM表位特异性结合,该Man-LAM表位包括经二甘露糖取代的侧链、经三甘露糖取代的侧链或其组合,或者使所述样品与抗PIM6/LAM抗体接触,该抗PIM6/LAM抗体与PIM6甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合;和(c)检测抗LAM抗体与所述Man-LAM的特异性结合的存在,或抗PIM6/LAM抗体与PIM6甘露聚糖结构域中的所述至少一个多甘露糖结构的特异性结合的存在,其中所述特异性结合的存在表明存在结核分枝杆菌复合体的致病成员。在一些实施例中,抗LAM抗体是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在另外的实施例中,Man-LAM表位包括二甘露糖或三甘露糖封端的Ara4和/或Ara6结构。在又另外的实施例中,Man-LAM表位是二甘露糖封端的Ara6。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是人单克隆抗PIM6/LAM抗体,该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与PIM6甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合。

[0041] C. 治疗组合物、方法、疫苗和载体

[0042] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗个体中被结核分枝杆菌复合体的毒性成员感染的方法。在一些实施例中,该方法包括向暴露于感染性结核分枝杆菌的个体给予治疗有效量的至少一种抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体。在另外的实施例中,该方法包括给予至少一种抗生素。在一些实施例中,TB感染是活动性的。在其他实施例中,TB感染是潜伏的。在一些实施例中,感染是被结核病的多重耐药性(MDR)菌株。在其他实施例中,感染是被结核病的广泛耐药性(XDR)菌株。

[0043] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗个体中被结核分枝杆菌复合体的毒性成员感染的组合疗法。在一些实施例中,该方法包括给予治疗有效量的第一抗LAM抗体或第一抗PIM6/LAM抗体,该第一抗LAM抗体与第一LAM表位特异性结合,该第一LAM表位包括未经取代的LAM、单甘露糖基化的Man-LAM、经MSX取代的LAM及其组合,该第一抗PIM6/LAM抗体与PIM6和LAM甘露聚糖结构域中的至少一个聚甘露糖结构特异性结合;并且给予治疗有效量的第二抗LAM抗体,该第二抗LAM抗体与第二LAM表位特异性结合,该第二LAM表位包括经二甘露糖取代的Man-LAM、经三甘露糖取代的Man-LAM及其组合中的至少一种。在一些实施例中,同时给予第一抗体和第二抗体(例如,在单一组合物中,或在同时给予的两种组合物

中)。在其他实施例中,第一抗体和第二抗体在不同时间点给予。在一些实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体中的至少一种是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是人单克隆抗PIM6抗体,该人单克隆抗PIM6抗体与LAM的PIM6中和/或PIM6交叉反应甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合。在一些实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体、或抗PIM6/LAM抗体具有不同的同种型。在一些实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体中的至少一种和抗PIM6/LAM抗体是重组抗体。在其他实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体以及抗PIM6/LAM抗体都不是重组抗体。在又其他实施例中,第一抗LAM抗体和第二抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体都是重组抗体。在另外的实施例中,该方法包括给予至少一种抗生素。在这样的实施例中,至少一种抗生素可以与第一和第二抗体同时给予(例如,共同给予),或者至少一种抗生素可以在不同于给予第一和第二抗体的时间点给予。在一些实施例中,感染是活动性的。在其他实施例中,感染是潜伏的。在一些实施例中,感染是多重耐药性(MDR)结核感染。在其他实施例中,感染是广泛耐药性(XDR)结核感染。

[0044] 在一些实施例中,本发明提供了用于预防被结核分枝杆菌复合体的毒性成员感染的疫苗或药物组合物。在一些实施例中,本发明提供刺激患者中宿主免疫应答的方法,该方法包括给予所述患者治疗有效量的LAM抗原和/或PIM6抗原。在一些实施例中,这些抗原与免疫原性蛋白载体缀合,和/或与有效刺激对糖脂抗原的免疫应答的佐剂共同给予。在一些实施例中,疫苗或药物组合物诱导与Man-LAM表位特异性结合的抗LAM抗体,和/或与PIM6甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合的抗PIM6/LAM抗体。在另外的实施例中,疫苗或药物组合物中存在的Man-LAM表位包括二甘露糖或三甘露糖封端的Ara4和/或Ara6结构。在又另外的实施例中,Man-LAM表位是二甘露糖封端的Ara6。在一些实施例中,Man-LAM表位具有至少一个MTX取代。在一些实施例中,抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体是IgM抗体。在其他实施例中,抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体是重组抗体。

[0045] 在一些实施例中,本发明提供了通过被动给予保护性抗体预防个体中被结核分枝杆菌复合体的毒性成员感染的方法。在一些实施例中,抗LAM抗体是人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在一些实施例中,抗PIM6/LAM抗体是人单克隆抗PIM6/LAM抗体,该人单克隆抗PIM6/LAM抗体与PIM6和LAM甘露聚糖结构域中的至少一个多甘露糖结构特异性结合。在一些实施例中,该方法包括向个体给予治疗有效量的与Man-LAM表位特异性结合的抗LAM抗体,和/或与PIM6表位(例如,由PIM6和LAM共有的表位)特异性结合的抗PIM6抗体。在另外的实施例中,靶向的ManLAM表位包括二甘露糖或三甘露糖封端的Ara4和/或Ara6结构。在又另外的实施例中,ManLAM表位是二甘露糖封端的Ara6。在一些实施例中,ManLAM表位具有至少一个MTX取代。在一些实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体是IgM抗体。在其他实施例中,抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体是重组抗体。

[0046] 在一些实施例中,本发明提供了通过重组载体被动给予保护性抗体。在一些实施例中,重组载体包括编码抗LAM抗体的IgVL的第一核酸和编码抗LAM抗体的IgVH的第二核酸,其中每个核酸与启动子区可操作地连接。在一些实施例中,IgVL和IgVH中的至少一种衍生自人单克隆抗LAM抗体,该人单克隆抗LAM抗体与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合。在其他实施例中,重组载体包括编码抗PIM6/LAM抗体的IgVL的第一核酸和编码抗PIM6/LAM抗体的IgVH的第二核酸,其中每个核酸与启动子区可操作地连接。在一些实施例中,重组载

体包括另外的转录调节元件。在一些实施例中，第一核酸序列和第二核酸序列中的至少一个在操纵子中组织。在一些实施例中，第一核酸序列和第二核酸序列中的至少一个在表达盒中组织。在一些实施例中，第一核酸序列和第二核酸序列在单个表达盒中组织。在一些实施例中，第一核酸和第二核酸位于相同的克隆载体中。在其他实施例中，第一核酸和第二核酸位于不同的克隆载体中。在一些实施例中，第一核酸和第二核酸的表达可以是伴随的。在其他实施例中，第一核酸和第二核酸的表达是可分离诱导的。在一些实施例中，第一核酸的表达可以在时间上与第二核酸的表达分开。在一些实施例中，重组载体是质粒。在其他实施例中，重组载体是非复制病毒。在另外的实施例中，重组载体是腺相关病毒。

[0047] 在一些实施例中，本发明提供了治疗个体中被结核分枝杆菌复合体的毒性成员感染的方法。在一些实施例中，该方法包括向个体给予编码抗LAM抗体的IgVH的第一核酸，和编码抗LAM抗体的IgVL的第二核酸，其中每个核酸与启动子区可操作地连接。在其他实施例中，该方法包括向个体给予编码抗PIM6/LAM抗体的IgVH的第一核酸，和编码抗PIM6/LAM抗体的IgVL的第二核酸，其中每个核酸与启动子区可操作地连接。在一些实施例中，IgVL和IgVH中的至少一个衍生自与Ara4和Ara6之一或其组合特异性结合的人单克隆抗LAM抗体，或衍生自与在PIM6甘露聚糖结构域中至少一个聚甘露糖结构特异性结合的人单克隆抗PIM6/LAM抗体。在一些实施例中，第一核酸和第二核酸位于相同的克隆载体中。在其他实施例中，第一核酸和第二核酸位于不同的克隆载体中。在一些实施例中，重组载体是质粒。在其他实施例中，重组载体是非复制病毒。在另外的实施例中，重组载体是腺相关病毒。

[0048] 基于本文提供的披露内容，其他实施例、特征和优点对于本领域技术人员而言将是显而易见的。从以下描述和权利要求，其他特征对于包装所属领域的普通技术人员将变得更加明显。尽管与本文所述的抗体、组合物、试剂盒和方法类似或等同的抗体、组合物、试剂盒和方法可用于本发明的实践或测试中，但是在下面描述了合适的抗体、组合物、试剂盒和方法。本文提及的所有出版物、专利申请、以及专利通过援引以其全部内容并入。在发生冲突的情况下，以包括定义的本说明书为准。下文讨论的特定实施例仅是说明性的，并且不旨在进行限制。

## 附图说明

[0049] 图1A-用于结合竞争测定的IgG形式的A194-01及其片段的模型。这些包括单价scFv和Fab结构，以及二价scFv二聚体和天然IgG。1B-显示单价形式的A194-01比二价形式的竞争效率低的竞争曲线。1C-高价形式的A194-01的结构。这代表同源四价A194-01 scFv-IgG，其含有与每条正常重链的N末端连接的A194-01 scFv结构域。

[0050] 图2A-P30B9 IgG和IgM形式、以及IgM与衍生自结核分枝杆菌的ManLAM的结合活性，其中缺失VH区中的6个氨基酸的插入片段，或VH区中的9个体细胞突变 (mutatic mutation) 回复到最近的种系序列。6个氨基酸的插入片段比9个体细胞酸突变对反应性的贡献更大。图2B和2C比较了P30B9 IgM和IgG形式以及重链中具有6个氨基酸缺失的突变对来自结核分枝杆菌 (B) 的ManLAM和来自耻垢分枝杆菌 (C) 的PILAM的反应性。IgM形式，但不是IgG形式，与衍生自结核分枝杆菌 (2B) 但不是PILAM (2C) 的ManLAM特异性反应，并且  $\Delta$  6氨基酸突变体的反应性对于ManLAM是高度降低的而对于PILAM则为负。

[0051] 图3-比较2种人mAb和4种小鼠mAb比对左图中PILAM以及与右图中从结核分枝杆菌

的H37Rv菌株分离的ManLAM的反应性。使用抗体的摩尔浓度绘制曲线,以控制这些试剂的不同分子量

[0052] 图4A-代表与LAM中存在的基序相关的微生物聚糖结构的25种合成寡糖的结构。这些结构与BSA载体蛋白偶联并用于探测表位特异性。4B-针对一组25种合成寡糖的六种LAM特异性单克隆抗体的结合谱。显示了三种浓度的结合结果,并且通过滴定模式指示了抗体对这些抗原的相对亲和力。

[0053] 图5-左侧图-IgA1(A)、IgA2(B)和二聚体IgA1-J二聚体复合体(C)的结构。右侧图-在用DTT还原之前和之后,纯化的P30B9 IgA1、IgA2和IgA3蛋白的SDS-PAGE凝胶。后来揭示了P30B9 IgA3是具有较长铰链区的PCR的人工产物。

[0054] 图6-不同同种型的P30B9与ManLAM的结合曲线显示出对IgM形式的最大活性,随后是IgA形式,并且对IgG形式没有反应性。

[0055] 图7-比较生物素化单克隆抗体探针在CS-35捕获测定中检测可溶性ManLAM的效率,其中指示浓度的ManLAM被CS-35捕获并通过用生物素标记的指示mAb检测。

[0056] 图8-P30B9与各种甘露糖封端的Ara4结构,或与四甘露糖和五甘露糖结构的结合曲线。观察到结构3(二甘露糖-Ara4)和59的优先结合,其含有相关的 $\alpha$ -Manp(1 2)-Manp键。

[0057] 图9-针对各种未封端的LAM相关糖缀合物的单克隆抗LAM抗体的滴定,以确定反应性的结构要求。9A-Ara- $\alpha$ (1 5)-Ara键在从Ara4序列的非还原端的倒数第二位的重要性的分析。9B-Ara- $\beta$ (1 2)-Ara键在Ara4序列末端位置的依赖性的分析。

[0058] 图10A194-01 IgG和三种鼠抗LAM抗体针对各种含Ara6的糖缀合物的结合曲线,显示了不同封端基序对抗体反应性的影响。

[0059] 图11测量个体抗LAM抗体竞争探针抗体与ManLAM抗原结合的能力的结合竞争研究。当针对来自相同物种的抗体进行测试时,抗体被生物素化。注意A194-01无法竞争生物素化的P30B9。

[0060] 图12-抗LAM单克隆抗体与衍生自结核分枝杆菌的LAM(ManLAM)和衍生自耻垢分枝杆菌的LAM(PILAM)结合的竞争。在FIND25和P30B9之间对ManLAM的有效竞争与经二甘露糖取代的Ara6的优势一致,而A194对这两种mAb的竞争的缺乏与其与二甘露糖封端结构的不良反应性一致。A194对于FIND25比对PILAM的有效竞争与在此结构中的二甘露糖封端的不存在一致。

[0061] 图13-生物素化的探针单克隆抗体与针对天然LAM抗原和选择的糖缀合物的过量未修饰抗体的结合竞争。图13A-生物素化的A194-01 IgG、CS-35和FIND25与ManLAM的结合由四种mAb的竞争;13B-FIND25与ManLAM和PILAM的结合由三种mAb的竞争;13C-P30B9 IgM与ManLAM和两种合成糖缀合物抗原的结合由四种mAb的竞争。

[0062] 图14-A194-01的工程化变体和/或衍生物与更广范围的糖缀合物反应,这些糖缀合物包括被A194-01的IgG同种型很难识别的经二甘露糖和三甘露糖取代的形式。

[0063] 图15-A194-01 IgG和工程化变体和/或A194-01衍生物对于FIND25和P30B9 IgM与ManLAM的结合的差异竞争。尽管A194 IgG不与P30B9或FIND25竞争ManLAM,但多聚体形式确实竞争,与这些形式的更广泛的表位特异性一致。如上所示,A194 IgG确实很好地与FIND25竞争PILAM。

[0064] 图16-比较甘露糖封端对CS-40、A194-01和P30B9 mAb的反应性影响的分析。通过

ELISA针对含有不同甘露糖取代的特定糖缀合物(glyconjugate)测量抗体结合特异性。抗体滴定示于16A中,并且含甘露糖的聚糖抗原的结构示于16B中。

[0065] 图17-17A.同源scFv-IgG。在该实例中,IgG和scFv结构域均衍生自相同的抗体。这导致化合价增加(三价比对二价),但不直接改变靶特异性。17B.异源scFv-IgG。除了化合价的增加之外,还引入了扩大的特异性,其可以允许识别单个抗原分子中的不同表位。17C.异源scFv-IgM。在该配制品中,将不同的scFv与IgM构建体组合。一个实例是A194-01 scFv与P30B9 IgM的连接。除了化合价的增加之外,这将引入另外的表位特异性,其可以允许多价识别可能不被同源scFv-IgM识别的不同表位,并导致增加的亲和力。

[0066] 图18A-18C-被新的mAb识别的表位的映射。将P95C1的表位特异性与两种先前描述的mAb(A194-01和P30B9)以及两种新的mAb(P61H5和P83A8)的表位特异性进行比较,所述两种新的mAb识别与那两种先前描述的mAb相关的表位。18A.LAM特异性mAb对LAM前体分子的反应性。P30B9和P61H5对ManLAM特异优于PILAM,而A194-01、P83A8和P95C1识别两种形式的LAM。P95C1还与LM和PIM6有效结合。其他mAb对LM和PIM6的弱反应性至少部分地受到由ManLAM对这些材料的污染的影响。18B.合成的LAM衍生的糖缀合物的反应性。18C.与先前已知的mAb相比,P95C1是唯一不识别任何聚阿拉伯糖结构的抗体,但是与两种聚甘露糖结构(YB-BSA-05和YB-BSA-11)特异性反应,这两种聚甘露糖结构类似于PIM6中以及基于LM和LAM的甘露聚糖结构域中存在的结构。

[0067] 图19-同种型转换对P95C1和P30B9与ManLAM和PI-LAM结合的影响。对于P95C1,IgM、IgA和IgG同种型对ManLAM和PILAM都具有相当的结合活性,不同于P30B9,该P30B9仅与ManLAM反应且仅以IgM和IgA形式反应但不作为IgG反应。

[0068] 图20(A)-20(B)-P95C1与LAM和另外的结核分枝杆菌糖脂的交叉反应性的蛋白印迹分析。20(A)将纯化的LAM相关糖脂在12%SDS-PAGE凝胶上分离,然后用过碘酸-席夫染色对糖分子进行氧化和染色,以揭示含有反应性聚糖的物质。20(B)用mAb A194 IgG1、P30B9 IgM和P95C1 IgM探测平行印迹,然后用碱性磷酸酶缀合的抗人IgG和IgM第二抗体探测,并用bcip/nbt显色底物处理。A194-01与来自结核分枝杆菌的ManLAM和来自耻垢分枝杆菌(*M. smeg*)的PILAM交叉反应。P30B9对结核分枝杆菌ManLAM特异。P95C1识别两种LAM,以及从结核分枝杆菌分离的LM和PIM6。通过A194-01对LM和PIM6中与LAM共迁移的条带的弱染色显然是由于LAM对这些样品的轻微污染。

[0069] 图21-A194重链和轻链可变区序列的氨基酸序列的比对以及它们与其最接近的种系序列的比较。在顶部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(A194-VH)是不具有CDR3序列的A194重链可变区序列(SEQ ID NO:23)。不具有CDR3的重链可变区序列是SEQ ID NO:21。在顶部比对中,第二个氨基酸序列(种系Homsap IGHV3-20\*01)是SEQ ID NO:22。在顶部比对中,第三个氨基酸序列是A194重链可变区的CDR3,并且是SEQ ID NO:23。在底部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(A-194-Vk)是不具有CDR3序列的A194轻链可变区(SEQ ID NO:26)。不具有CDR3的轻链可变区序列是SEQ ID NO:24。在底部比对中,第二个氨基酸序列(种系Homsap IGKV3-15\*01)是SEQ ID NO:25。在底部比对中,第三个序列是A194轻链可变区的CDR3,并且是SEQ ID NO:26。

[0070] 图22-P30B9-IgM重链和轻链可变区序列的氨基酸序列及它们与其最接近的种系的比较。在顶部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(P30B9-Vh)是不具有CDR3序列的

P30B9-IgM重链可变区序列(SEQ ID NO:29)。不具有CDR3的重链可变区序列是SEQ ID NO:27。第二个氨基酸序列(Homsap IGHV4-34\*01F)是SEQ ID NO:28。第三个氨基酸序列是P30B9-IgM重链可变区的,并且是SEQ ID NO:29。在底部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(P30B9-Vk)是不具有CDR3序列的P30B9轻链可变区(SEQ ID NO:32)。不具有CDR3的轻链可变区序列是SEQ ID NO:30。在底部比对中,第二个氨基酸序列(种系Homsap IGKV1-5\*03)是SEQ ID NO:31。在底部比对中,第三个序列是P30B9轻链可变区的CDR3,并且是SEQ ID NO:32。

[0071] 图23-P95C1-IgM重链和轻链可变区序列的氨基酸序列的比对以及它们与其最接近的种系序列的比较。在顶部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(P95C1-VH)是不具有CDR3序列的P95C1重链可变区序列(SEQ ID NO:18)。不具有CDR3的重链可变区序列是SEQ ID NO:33。在顶部比对中,第二个氨基酸序列(种系Homsap IGHV4-4\*02)是SEQ ID NO:34。在顶部比对中,第三个氨基酸序列是P95C1-gM重链可变区的CDR3,并且是SEQ ID NO:18。在底部比对中,从顶部开始,第一个氨基酸序列(P95C1-Vk)是不具有CDR3序列的P95C1轻链可变区(SEQ ID NO:15)。不具有CDR3的轻链可变区序列是SEQ ID NO:36。在底部比对中,第二个氨基酸序列(种系Homsap IGKV4-1\*01F)是SEQ ID NO:37。在底部比对中,第三个序列是P95C1轻链可变区的CDR3,并且是SEQ ID NO:15。

## 具体实施方式

### [0072] A. 定义

[0073] 除非另外定义,本文中使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0074] 如本文所披露的,抗LAM抗体可以采用本领域中的多种形式之一。抗体部分地由它们结合的抗原定义,因此,“抗LAM抗体”是与如本文所述的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)中的至少一个表位特异性结合的任何此类抗体。本领域理解,抗体是一种包含通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1、CH2和CH3)组成。轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。重链和轻链的可变区包含框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。四个FWR区是相对保守的,而CDR区(CDR1、CDR2和CDR3)代表高变区,并且如下从NH<sub>2</sub>末端到COOH末端排列:FWR1,CDR1,FWR2,CDR2,FWR3,CDR3,FWR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域,而取决于同种型,恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合。

[0075] 如本文所披露的,抗PIM6/LAM抗体可以采用本领域中的多种形式之一。“抗PIM6/LAM抗体”是任何此类抗体,该任何此类抗体特异性结合如本文所述的磷脂酰肌醇甘露糖苷6(PIM6)和LAM共有的至少一个表位。对由本文所述的LAM和PIM6共有的表位特异的人mAb是P95C1,该P95C1与LM和LAM的PIM6中以及PIM6相关的甘露聚糖结构域中的至少一个聚甘露糖结构特异性结合。P95C1与LAM和PIM6结合,因为它看到共同的(共有的)表位,并且因此在本文中称为“抗PIM6/LAM抗体”或“抗PIM6/LAM单克隆抗体”、“人抗PIM6/LAM抗体”或“人抗PIM6/LAM单克隆抗体”。

[0076] 本领域已知可以操作单克隆抗体和其他抗体,并使用重组DNA技术的技术来产生保留原始抗体特异性的其他抗体或嵌合分子。此类技术可以发展将编码抗体的免疫球蛋白

可变区或CDR的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。

[0077] 如本文所使用的术语“抗体”(Ab)以最广义使用,并且具体地可包括任何免疫球蛋白,无论是天然的还是部分或完全合成产生的,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体和多反应性抗体)和抗体片段。因此,在本说明书中的任何上下文中所使用的术语“抗体”意指包括但不限于任何特异性结合成员,免疫球蛋白类和/或同种型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE)及其生物相关片段或其特异性结合成员,包括但不限于Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv(单链或相关实体)和(scFv)<sub>2</sub>。

[0078] 如本文所使用的术语“抗体片段”可包括使用本领域普通技术人员容易已知和可获得的技术获得的那些抗体片段,如本文所述。因此,术语“抗体”描述包含完整抗体的一部分的任何多肽或蛋白,例如完整抗体的抗原结合区或可变区。这些可以衍生自天然来源,或它们可以部分或全部经合成产生。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、和Fv片段;双抗体和线性抗体。特别地,如本文所使用的“单链Fv”(“sFv”或“scFv”)是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。sFv多肽可以进一步包含例如接头,例如VH和VL结构域之间的柔性多肽接头,该接头使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。

[0079] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”或“mAb”可以是指从基本上均质抗体群体中获得的抗体,即构成群体的单独抗体是相同的,除了可以少量存在的可能天然存在的突变。

[0080] 如本文所使用的,术语“变体”、“衍生物”和/或“变体和/或衍生物”可以是指抗体、抗体片段、重组抗体,无论是衍生自天然来源还是部分或完全合成产生的,以及蛋白、蛋白片段和多肽,因为前述化合物在结构上相似,即保与原始未修饰抗体至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少85%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%或更高序列同一性的同一性程度,和/或独立于结构同一性,可以在功能上类似于原始未修饰的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体,即,它们保留了分别与LAM的至少一个表位或与共有的PIM6/LAM表位特异性结合的能力。例如,此类变体和/或衍生物可包括具有变体Fc结构域的抗LAM或抗PIM6/LAM抗体、嵌合抗体、融合蛋白、双特异性抗体或其他重组抗体。此类变体和/或衍生抗体可以但不是必需地对LAM或PIM6的一个或多个表位具有更高的结合特异性,和/或可以能够与另外的LAM或PIM6表位结合。

[0081] 术语“生物样品”是指从生物体(例如,患者)或从生物体的组分(例如,细胞)获得的样品。样品可以是任何生物组织、细胞或液体的。样品可以是“临床样品”,该临床样品是衍生自受试者的样品,例如人患者。这些样品包括但不限于唾液、痰液、血液、血细胞(例如,白细胞)、羊水、血浆、精液、骨髓、和组织或细针活检样品、尿液、腹膜液、和胸膜液、或其细胞。生物样品还可包括组织切片,例如出于组织学目的采集的冷冻切片。生物样品还可称为“患者样品”。生物样品还可包括基本上纯化或分离的蛋白、膜制剂或细胞培养物。

[0082] 如本文所使用的术语“有效量”或“治疗有效量”可以是指能够在治疗的受试者中产生医学上期望的结果的化合物或药剂的量。治疗方法可以在体内或离体,单独或与其他药物或疗法联合进行。一个治疗有效量能以一次或多次给予、施用或剂量的形式给予并且并不旨在限于一种特定的配制品或给予途径。

[0083] 如本文所使用的术语“抗原结合片段”或“Fab”可以是指抗体上与抗原结合的区域。本领域普通技术人员将理解,Fab包含抗体的重链和轻链中的每一个的一个恒定结构域和一个可变结构域。

[0084] 如本文所使用的术语“特异性结合 (specific binding)”、“选择性结合 (selective binding)”、“选择性结合 (selectively bind)”和“特异性结合 (specifically bind)”可以是指与预定抗原上的表位但不与其他抗原的抗体结合。通常,抗体(i)当通过例如在BIACORE<sup>®</sup>2000表面等离子体共振仪中使用预定抗原(例如,LAM表位)作为分析物并且使用抗体作为配体的表面等离子体共振 (SPR) 技术,或通过Scatchard分析抗体与抗原阳性细胞的结合来进行测定时,以约小于 $10^{-6}$ M(例如,大约小于 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、或 $10^{-10}$ M或甚至更低)的平衡解离常数(KD)结合,并且(ii)与预定抗原以比其与除预定抗原或密切相关的抗原外非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力大至少两倍的亲和力结合。

[0085] 如本文所使用的术语“保守序列修饰”或“保守取代”可以是指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这种保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变以及PCR介导的诱变)将多种修饰引入本发明的抗体中。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的取代。在本领域中已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸),不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸), $\beta$ -支链的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明抗体的CDR区域内的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换,并且经改变的抗体可以使用本文所述的功能性测定法来测试所保留的功能。

[0086] 如本文所使用的术语“同一性”可以是指两种组合物之间共有结构的存在。在蛋白的上下文中,术语“同一性”可以是指两个或更多个氨基酸和/或肽序列之间重叠序列的量(例如,以百分比表示)。在核酸的上下文中,该术语可以是指两个或更多个核酸序列之间重叠序列的量(例如,以百分比表示)。如本文所使用的,两个序列之间的百分比(%)同一性等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是这些序列共有的多个同一性位置的一个函数(即,同一性% = 相同位置的数量/位置总数 $\times$  100),考虑了空位数目以及每个空位的长度,需要引入它以用于两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。这种同一性通过局部比对工具和/或算法在本领域中得到充分体现,并且可以包括成对比对、多序列比对方法、结构比对方法和/或系统发育分析方法。具体实例包括以下内容。两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用E.Meyers和W.Miller(Comput. Appl. Biosci. [生物科学中的计算机应用], 4:11-17 (1988))的算法,使用PAM120权重残基表,12的空位长度罚分,4的空位罚分确定,该算法已经并入ALIGN程序(版本2.0)。另外,可以使用Needleman和Wunsch(J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 48:444-453 (1970))算法使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,16、14、12、10、8、6或4的空位权重,1、2、3、4、5或6的长度权重确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已并入GCG软件包(可在www.gcg.com获得)中的GAP程序中。另外或可替代地,本发明的蛋白序列可进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等人,(1990) J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 215:403-10的XBLAST程序(版本2.0)来执行这样的搜索。可以用XBLAST程序(分值=50,字长=3)进行BLAST蛋白检索,以获得与

本发明的抗体同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目标的有缺口的比对,可以利用如在 Altschul 等人, (1997) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 25(17):3389-3402 中所述的有缺口的 BLAST。当使用 BLAST 和空位 BLAST 程序时,可以使用各程序(例如, NBLAST 和 XBLAST) 的默认参数。

[0087] 如本文所使用的,术语“共同给予”、“共同给予”和“与……组合”可以是指向受试者给予至少两种药剂或疗法。在一些实施例中,两种或更多种药剂/治疗的联合给予是同时发生的。在其他实施例中,第一药剂/疗法先于第二药剂/疗法给予。本领域的普通技术人员理解的是,所使用的配制品和/或多种药剂/治疗的给予途径可以变化。

[0088] 如本文所使用的,术语“载体”可包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,这些药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下,对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒。生理学上可接受的载体通常是含水 pH 缓冲溶液。生理学上可接受的载体的实例包括但不限于缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸;抗氧化剂,包括但不限于抗坏血酸;低分子量(少于约 10 个残基)的多肽;蛋白,例如但不限于血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如但不限于聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如但不限于甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括但不限于葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如但不限于 EDTA;糖醇,例如但不限于甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如但不限于钠;和/或非离子表面活性剂,例如但不限于 TWEEN;聚乙二醇 (PEG) 和 PLURONICS。

[0089] 术语疾病的“治疗”或“治疗”是指执行方案,该方案可以包括向患者(人或其他)给予一种或多种药物,以努力减轻疾病的迹象或症状。缓解可以在疾病的迹象或症状出现之前以及它们出现之后发生。因此,“治疗(treating或treatment)”包括疾病的“预防(preventing或prevention)”。术语“预防(preventing或prevention)”是指防病措施和/或预防措施,其中目的是预防或减缓目标病理状况或障碍。例如,在被结核分枝杆菌复合体的毒性菌株感染的情况下,为了预防或阻止结核分枝杆菌复合体的毒性菌株感染,可以在进行治疗过程的情况下例如通过接种疫苗或被动给予保护性抗体实现“预防”或“预防”。在结核分枝杆菌潜伏感染的情况下也实现这种“预防(preventing或prevention)”,其中目的是防止活动性感染和/或使患者清除所述潜伏感染。另外,“治疗(treating或treatment)”不需要完全缓解迹象或症状,不需要治愈,并且具体包括对患者仅具有轻微影响的方案。

[0090] 术语“患者”、“受试者”和“个体”在本文中可互换使用,并且可以是指可以给予治疗的生物系统。生物系统可包括例如个体细胞、一组细胞(例如,细胞培养物)、器官、组织或多细胞生物体。“患者”、“受试者”或“个体”可以是指人患者、受试者或个体,或非人患者、受试者或个体。

[0091] 如本文所使用的,术语“表位”可以是指抗体或 T 细胞结合的抗原的区域。“抗原”是指引发免疫反应或与该反应的产物结合的物质。

[0092] 如本文所使用的,术语“载体”意指能够转运它所连接的另一个核酸的核酸分子。能够指导它们可操作地连接的基因表达的载体在本文中称为“表达载体”。

[0093] 如本文所使用的,“蛋白”和“多肽”同义地用于意指任何肽连接的氨基酸链,而不管长度或翻译后修饰,例如糖基化或磷酸化。

[0094] 关于抗体、核酸、肽、多肽、细胞或探针,术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物

质与抗体、核酸、肽、多肽、细胞或探针偶联来直接标记(即,物理连接)抗体、核酸、肽、多肽、细胞或探针。

[0095] 术语“纯化的”或“分离的”肽、多肽或蛋白是指如本文所使用的肽、多肽或蛋白,可以是指已经从与其天然相关的其他蛋白、脂质和核酸分离的肽、多肽或蛋白。多肽/蛋白可构成按干重计至少10%(即,在10%与100%之间的任何百分比,例如20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、和99%)纯化的制剂。可以通过任何适当的标准方法,例如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析来测量纯度。本发明中描述的分离的多肽/蛋白(例如,抗LAM抗体)可以通过重组DNA技术产生。

[0096] B. 结核分枝杆菌

[0097] 结核病(TB)仍然是世界上最致命的传染病之一,目前感染了世界上大约三分之一的人口。在2013年,估计有900万人患上TB,并且估计有150万人死于该疾病。尽管目前有可用的抗生素治疗,但这些需要长时间治疗,并且越来越多地受到多重耐药性(MDR-TB)菌株的发展的影响,这些菌株目前导致约3.5%的近期感染。这些菌株难以治疗,并且具有明显较差的治愈率。同样广泛传播的是广泛耐药的TB(XDR-TB)菌株,它们比MDR-TB菌株甚至更昂贵且难以治疗,并且现在已在全世界100个国家报道。

[0098] 有一个历史悠久的范例,针对TB的免疫力仅依赖于细胞防御机制。然而,HIV领域的研究突出了体液免疫系统产生具有显著中和广度和效力的多种抗体的显著能力,并且本发明突出了体液免疫系统产生识别多个LAM表位的高亲和力抗体的能力。这表明过去在证明抗体介导的针对TB的保护作用的重要作用的许多困难可能是由于过去研究中使用的抗体的质量和来源的限制,以及应用本发明的方法产生更多来自慢性感染的人患者的高度进化的抗体可以说明体液应答在对TB免疫中的关键作用。

[0099] 本发明的一些实施例涉及用于体外培养来自感染的人的记忆B细胞和从单个细胞分子克隆IgG重(H)链和轻(L)链的可变区的方法。这些方法可用于产生针对主要表面抗原LAM的人单克隆抗体。本发明涉及这些抗体和这些抗体的工程化衍生物,其具有独特的表位特异性和结合性质,以及这些抗体的免疫诊断和免疫治疗应用。C. 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)

[0100] 本发明抗体的一个突出的抗原靶标是表面糖脂,脂阿拉伯甘露聚糖(LAM),结核分枝杆菌复合体成员的细胞壁的主要结构组分。本发明鉴定了响应于感染和免疫的LAM的抗原结构和针对LAM的体液免疫应答中先前未被认可的异质性。LAM的结构详述于Khoo等人,“Variation in Mannose-capped Terminal Arabinan Motifs of Lipoarabinomannan from Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium Complex[来自结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌复合体的临床分离物的脂阿拉伯甘露聚糖的甘露糖封端的末端阿拉伯聚糖基序的变异]”,*Journal of Biological Chemistry*[生物化学杂志]第276卷,第6期,2001年2月9日,通过援引以其全文并入本文。LAM的结构复杂,呈现出具有四个不同结构域的整体三联结构;磷脂酰肌醇脂质锚(甘露糖基-磷脂酰-肌-肌醇)、具有末端 $\alpha(1\rightarrow2)$ -Manp-连接的侧链的 $\alpha(1\rightarrow6)$ -连接的D-甘露聚糖骨架、含有多个四-/六-阿拉伯呋喃糖苷分支的D-阿拉伯聚糖链、以及各种封端基序。LAM由异质的分子群组成,其可以分解成具有不同生物学性质的多种同种型。这种异质性是由于甘露聚糖和阿拉伯链的不同长度,不同的分支模式,不同数量的这种分支,以及通过甘露糖封端,MTX添加和脂肪酸、琥珀酸盐和乳酸的酰化对阿拉伯侧链的修饰。

[0101] 结核分枝杆菌复合体的毒性菌株广泛地被单、二和三 $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) -D-Manp糖单元封端,而快速生长的非致病菌株如耻垢分枝杆菌具有未封端的末端或磷脂酰-肌-肌醇肌醇帽(PILAM)。据估计,来自结核分枝杆菌复合体的致病菌株的LAM的非还原末端的40%-70%是甘露糖封端的,并且对毒性MT103临床菌株的不同帽基序的相对丰度的分析表明,二甘露糖基单位是主要结构基序(75%-80%),而甘露糖基和三甘露糖基序以较低浓度(10%-13%)存在。这种广泛的封端可以提供独特的标记,以区分结核分枝杆菌复合体的毒性株与非毒性/非致病菌株,例如耻垢分枝杆菌,并且还可以提供本发明的抗LAM抗体的用于治疗性用途的潜在抗原靶标。此外,在结核分枝杆菌菌株中发现的ManLAM中的一些末端甘露糖通过 $\alpha$  (14) 添加独特结构5-脱氧-5-甲基-硫代-戊呋喃糖(MTX)进一步修饰,其影响对封端基序(例如,A194-01和P30B9)敏感的不同mAb的免疫反应性;MTX添加增加了与A194-01的反应性并降低了对P30B9的反应性。这种取代以低丰度存在,并且可以提供一种独特的标记来鉴定结核分枝杆菌,该结核分枝杆菌甚至可能来自结核分枝杆菌复合体的其他致病成员,例如来自牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌,并且还可以提供本发明的抗LAM抗体的用于治疗性用途的潜在抗原靶标。

[0102] 分泌形式的LAM是结核分枝杆菌复合体的致病成员感染的免疫诊断测定的重要靶标。此外,大量证据表明,LAM是促进生产性感染和致病性的许多功能的重要调节剂。LAM参与维持细胞壁完整性和对 $\beta$ -内酰胺抗生素的抗性。LAM在与缺陷巨噬细胞进入有关的细菌表面上的表达减少、吞噬体-溶酶体融合的抑制、巨噬细胞的减弱、和对适应性免疫的敏感性增加、以及ManLAM的末端甘露糖基单元与巨噬细胞表面上的甘露糖受体的结合已被描述为将分枝杆菌摄入吞噬细胞的关键步骤。不希望受理论束缚,据信ManLAM与C型凝集素,例如树突状细胞特异性细胞间粘附分子-3(ICAM-3)捕捉非整联蛋白(DC-SIGN)、巨噬细胞甘露糖受体(MMR)和树突状细胞上的Dectin-2相互作用。一旦进入巨噬细胞,据信LAM抑制吞噬体-溶酶体融合,这将导致细菌的破坏,从而允许细菌在巨噬细胞内持续存在。

[0103] LAM也是从细菌表面分泌的,并且细胞外LAM与树突状细胞表面受体(包括DC-SIGN和Dectin-2)结合。据信这些相互作用抑制树突状细胞功能并干扰宿主免疫系统,从而导致免疫逃逸。因为LAM在活动性感染期间是相对大量的,所以它可以,例如,通过本发明的一种或多种抗LAM抗体在感染的患者的血液和尿液中检测到。这些可以用于例如诊断试剂盒和与所述诊断试剂盒相关的方法中。

#### [0104] D. 抗LAM和抗PIM6/LAM抗体

[0105] 本发明的抗LAM抗体可包含识别脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)上的至少一个表位的人单克隆抗体的分离的、培养的或工程化的变体和/或衍生物。如本文所述的抗PIM6/LAM抗体(例如,P95C1)特异性结合LAM的PIM6中的以及PIM6交叉反应性甘露聚糖结构域中的至少一个聚甘露糖结构。可以根据本领域已知的方法纯化本发明的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体。此类方法可包括,例如但不限于亲和色谱、离子交换色谱、固定化金属螯合色谱、亲疏吸附、生理化学分级或其他抗原特异性亲和方法,例如,包括蛋白A、G和L抗体结合配体的方法。这种纯化的抗体可以具有或不具有与未纯化的人单克隆抗体不同的结构特征。例如,人单克隆抗体的构象表位变化可在纯化时发生。抗体可以与另外的分子结合,所述另外的分子在纯化时被除去。因此,这种纯化的抗体可以具有或不具有不同的功能活性。本发明的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可具有许多结构修饰。例如,本发明的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可以

以影响稳定性、功能、生物利用度、表位识别或其他功能活性的方式被糖基化、PEG化或以其他方式化学修饰。本发明的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可以是下文描述的那些抗体的工程化变体和/或衍生物,并且可以具有或不具有功能或结构等同性。因此,这些变体和/或衍生物仍被认为在本发明的范围内,只要它们至少部分地是从分离的人单克隆抗LAM或抗PIM6/LAM抗体衍生或工程化的,和/或识别LAM上的至少一个表位。

[0106] 1.A194-01

[0107] 在一些实施例中,本发明涉及包括其变体和/或衍生物的人单克隆抗体A194-01。A194-01对LAM特异。A194-01对LAM具有非常高的结合活性,例如,A194-01的IgG同种型可以在约20ng/ml的浓度下表现出抗体的50%最大结合活性,因此预示对LAM的高亲和力。A194-01最初是作为IgG分离和纯化的,然而,A194-01可能以许多同种型,以及工程化和重组同种型存在,这些同种型包括但不限于IgG、IgA、IgM、单价单链Fv(scFv)片段、Fab蛋白、二价scFv片段、单链scFv片段(单体)(其中个体可变轻区和可变重区通过例如柔性接头连接)和二聚体scFv蛋白(其中两个scFv单体彼此连接)(图1A)。A194-01的一些特定工程化变体和/或衍生物包括但不限于以下。A194-01的一种工程化变体和/或衍生物包含通过将A194-01 scFv抗原连接至A194-01 IgG的N-末端而形成的四价scFv-IgG(图1B,图17),其可以增加结合亲和力并拓宽识别的表位范围(其实例在图14和15中给出)。四价scFv-IgG可包含前导-VH-VL-IgG,或可包含前导-VL-VH-IgG。本领域普通技术人员将理解,工程化的scFv-IgG变体和/或衍生物可具有仅超过四价的化合价。A194-01的另一种工程化变体和/或衍生物包含通过将二聚体A194-01 IgG转化为含有结构域的人IgM所产生的五价IgM,其中这种五价IgM含有10个结合位点(图1B)。本领域普通技术人员将理解,A194-01抗原片段的其他组合是可能的并且被认为在本发明的范围内,特别是那些显示对A194-01特异的互补决定区(CDR)的抗体片段。

[0108] A194-01的IgG同种型识别独特且复杂的表位,其在未修饰的Ara4和Ara6侧链上以及在带有单个甘露糖的侧链上表达。尽管A194-01不识别带有二甘露糖或三甘露糖取代的侧链,但如果它们用MSX取代基进一步修饰,它确实会与此类结构反应。因此,A194-01的IgG同种型以高亲和力结合PILAM和ManLAM,并且还和Ara4和Ara6结构的未封端形式强烈结合,并且与单甘露糖封端的和经MSX取代的Ara4/Ara6结构稍弱结合,但是,如果有的话,与经二取代和经三取代的ManLAM结合很差(图4)。不希望受理论束缚,甘露糖相对MSX与单甘露糖基化Ara4结构的末端甘露糖键的显著不同的影响可以反映了甘露糖的 $\alpha(1\rightarrow2)$ 键与MSX取代的 $\alpha(1\rightarrow4)$ 键之间的差异。A194-01的工程化变体和/或衍生物,包括具有更高化合价的那些,可以表现出比A194-01 IgG同种型更广的表位特异性(图14),并且可以进一步表现出对LAM的增强的亲和力(图15)。例如,四价scFv-IgG工程化A194-01和工程化IgA和IgM同种型以比A194-01 IgG同种型更高的亲和力结合Ara4和Ara6结构,并且此外,还识别IgG同种型结合不良的二甘露糖和三甘露糖封端的结构(图14)。因为结核分枝杆菌-复合体的致病物种主要表现出二甘露糖封端的结构,所以这些A194-01的工程化变体和/或衍生物,包括scFv-IgG和IgM同种型,可证明对于诊断试剂盒和方法,以及用于治疗用途是特别有用的。

[0109] A194-01的进一步工程化变体和/或衍生物包括如下那些抗体,其中通过用二聚体IgA或五聚体或六聚体IgM取代IgG1恒定结构域,通过产生多聚体形式,将IgG1 Fc结构域转化为IgG3,该IgG3更具抗原性。不希望受理论束缚,这可以通过增加二价和多价结合的灵活

性和范围来显著增强抗LAM抗体的亲合力,这有助于亲和力(图1)。这具有潜在的临床意义,因为治疗在暴露或感染结核分枝杆菌的MDR或X-MDR菌株的情况下特别有价值,其不能用传统抗生素有效治疗。

[0110] 表1.A194-01互补决定区(CDR)

[0111] 轻链

[0112] CDR1-RSIRSA(SEQ ID NO:1)

[0113] CDR2-GAS(SEQ ID NO:2)

[0114] CDR3-QQYDFWYTF(SEQ ID NO:3)

[0115] 重链

[0116] CDR1-GFNFEDFG(SEQ ID NO:4)

[0117] CDR2-ISWNGANI(SEQ ID NO:5)

[0118] CDR3-IDWYRDDYYKMDV(SEQ ID NO:6)

[0119] 本领域普通技术人员将理解,CDR对抗原特异性的多样性是至关重要的。本领域普通技术人员将进一步理解,CDR3是CDR区中变化最大的,并且因此具有最重要性,其中可变重链的CDR3区的多样性足以满足大多数抗体特异性。因此,在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:1、2和3具有高达95%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:1、2和3具有高达90%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:1、2和3具有高达85%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:1、2和3具有高达80%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:3中所示的可变轻链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:3中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:3具有高达95%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:3具有高达90%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:3具有高达85%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:3具有高达80%的同一性可变轻链的CDR3区。

[0120] 在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:4、5和6具有高达95%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:4、5和6具有高达90%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:4、5和6具有高达85%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:4、5和6具有高达80%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:6中所示的可变重链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:6中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗

体具有与SEQ ID NO:6具有高达95%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:6具有高达90%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:6具有高达85%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:6具有高达80%的同一性可变重链的CDR3区。

[0121] 在本文所述的实验中,通过在Expi293细胞中转染H和L链载体来表达A194-01抗体,并在标准Expi293无血清培养基中培养若干天。通过在与蛋白A或蛋白G配体缀合的柱上的亲和层析从培养上清液中纯化分泌的抗体。通过用低pH缓冲液(0.2M甘氨酸(glicine)-HCl,pH 2.5)处理从配体中释放结合的抗体,并用1/50体积的2M tris缓冲液(pH8.8)中和。通过透析或通过离心过滤器(Amicon Ultra离心过滤器,30K mw极限)上进行若干轮浓缩,用PBS交换缓冲液。

[0122] A194重链和轻链序列的氨基酸(aa)和核酸(nt)序列如下:

[0123] A194重链nt序列:

[0124] CAAGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTTGAAGATTTTGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCTAGTATTAGTTGGAATGGTGCTAATATAGGCTATGTAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACTCCCTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCGATAGA CTGGTACAGAGACGACTACTACAAGATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCGACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:39)

[0125] A194重链aa序列:

[0126] QVQLLESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFNFDGMSWVRQAPGKGLEWVSSISWNGANIGYVDSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAIDWYRDDYYKMDVWGKTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEV PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK\*(SEQ ID NO:40)

[0127] A194轻链nt序列( $\kappa$ ):

[0128] GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG  
CAGGGCCAGTCGGAGTATTCGCAGCGCCTTAGCCTGGTACCAGCACAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC  
TTTGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA  
CCGTCAGCAGCATAACGGTCTGAGGATTCTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGATTTCTGGTACACTTTTGGCCA  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG  
AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGC  
ACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG  
CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG  
AGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 41)

[0129] A194轻链aa序列( $\kappa$ ):

[0130] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASRSIRSLAWYQHKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSG  
TDFTLTVSSIRSEDSAVYYCQQYDFWYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK  
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (SEQ ID  
NO: 42)

[0131] 2.P30B9

[0132] 在一些实施例中,本发明涉及包括其变体和/或衍生物的重组人单克隆抗体P30B9。P30B9对LAM特异。P30B9最初是作为IgM分离和纯化的,然而,P30B9可能以许多同种型,以及工程化和重组同种型存在,这些同种型包括但不限于IgM、IgG、IgA、以及其抗原片段,包括但不限于单价单链Fv(scFv)片段、Fab蛋白、二价scFv片段、单链scFv片段(单体)(其中个体可变轻区和可变重区通过例如柔性接头连接)和二聚体scFv蛋白(其中两个scFv单体彼此连接)。

[0133] P30B9的IgM同种型最有效地结合具有Manp- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-Manp-(1 $\rightarrow$ 5)-Araf结构的经二甘露糖取代的Ara4和Ara6 LAM表位(图4、图16和图18),尽管其他经Manp- $\alpha$ 取代的结构(例如,图8中的结构2、4和59)也可以以较低的亲和力识别。P30B9对二甘露糖封端的LAM的优先识别具有潜在的临床相关性,因为据报道二甘露糖帽是对结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株的主要LAM修饰。不希望受理论束缚,据信末端甘露糖基单元介导LAM与结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株与人巨噬细胞和其他免疫细胞的结合,这些其他免疫细胞导致免疫功能的扰动和稳定感染的建立。不希望受理论束缚,据信甘露糖帽与甘露糖受体的结合限制了吞噬体-溶酶体(P-L)融合并促进细菌在受感染的巨噬细胞中的存活。P30B9对二甘露糖封端LAM的特异性通过该mAb对携带该结构的糖缀合物的特异性表明,并且事实上P30B9的IgM同种型与衍生自结核分枝杆菌的LAM特异性结合,但不与来自麻风分枝杆菌的LAM特异性结合,该来自麻风分枝杆菌的LAM不含有二甘露糖封端的LAM表位。这与A194-01的IgG同种型相反,该A194-01的IgG同种型结合PILAM,未封端的Ara4/Ara6残基和单甘露糖封端的LAM表位,所有这些在耻垢分枝杆菌和麻风分枝杆菌中是共有的。与P30B9的IgM同种型一样,A194-01的IgM同种型能够结合二甘露糖和三甘露糖封端的LAM表位(图14),这由于结合亲合力增加而可推测。

[0134] 因此,P30B9的IgM同种型可以作为重要的免疫诊断试剂,用于检测由结核分枝杆菌-复合体的毒性成员造成的感染,并区分所述毒性成员其他非致病性分枝杆菌物种,因为

它特异于二甘露糖封端的LAM。此外,P30B9抗体的IgM同种型以及A194-01的工程化变体和/或衍生物可具有免疫治疗活性,其限制结核分枝杆菌-复合体的毒性成员的感染和发病机理,并且可适用于疗法,或者与传统抗生素,另外抗体组合或单独使用,或可用作被动免疫治疗剂。P30B9的IgM同种型以高亲和力与衍生自结核分枝杆菌的ManLAM特异性结合(图2A、图2B),但不与衍生自耻垢分枝杆菌的PILAM特异性结合(图2C)。

[0135] P30B9的工程化变体和/或衍生物可包括例如在IgA同种型中表达的P30B9,包括二聚体IgA1和IgA2。不希望受理论束缚,据信需要针对P30B9功能的多价,因为该抗体作为IgM分离,并且当表达为IgG时无活性。本发明显示P30B9在工程化IgA同种型中具有活性,这些IgA同种型包括二聚体IgA1和IgA2。通过将P30B9 VH结构域移入IgA1和IgA2载体来测试这一点。IgA1与IgA2的不同之处主要在于存在16个氨基酸的插入片段,其由富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的8个氨基酸的重复序列组成,并用3-6个O-连接的寡糖修饰[图5]。将工程化的IgA形式的P30B9与ManLAM的结合活性与IgG和IgM形式的结合活性进行比较。IgM形式具有最高活性,而两种IgA形式还能够与ManLAM结合,其中IgA2形式显示出比IgA1形式更弱的活性,并且IgG形式在针对ManLAM的ELISA中无活性(图6)。

[0136] 表2.P30B9互补决定区(CDR)

[0137] 轻链

[0138] CDR1-QSINSN(SEQ ID NO:7)

[0139] CDR2-KAS(SEQ ID NO:8)

[0140] CDR3-QQYKAFKTF(SEQ ID NO:9)

[0141] 重链

[0142] CDR1-GGSFSGYY(SEQ ID NO:10)

[0143] CDR2-FDLGGSITHSRGT(SEQ ID NO:11)

[0144] CDR3-RGLAMGGTKEFDS(SEQ ID NO:12)

[0145] 本领域普通技术人员将理解,CDR对抗原特异性的多样性是至关重要的。本领域普通技术人员将进一步理解,CDR3是CDR区中变化最大的,并且因此具有最重要性,其中可变重链的CDR3区的多样性足以满足大多数抗体特异性。因此,在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:7、8和9中所示的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:7、8和9中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:7、8和9具有高达95%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:7、8和9具有高达90%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:7、8和9具有高达85%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:7、8和9具有高达80%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:9中所示的可变轻链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:9中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:9具有高达95%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:9具有高达90%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:9具有高达85%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:9具有高

达80%的同一性可变轻链的CDR3区。

[0146] 在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:10、11和12中所示的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:10、11和12中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:10、11和12具有高达95%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:10、11和12具有高达90%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:10、11和12具有高达85%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:10、11和12具有高达80%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:12中所示的可变重链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:12中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:12具有高达95%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:12具有高达90%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:12具有高达85%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:12具有高达80%的同一性可变重链的CDR3区。

[0147] 在本文所述的实验中,通过在Expi293细胞中转染H和L链载体来表达P30B9抗体,并在标准Expi293无血清培养基中培养若干天。通过在与蛋白L配体缀合的柱上的亲和层析从培养上清液中纯化分泌的抗体。通过用低pH缓冲液(0.2M甘氨酸(glycine)-HCl,pH 2.5)处理从配体中释放结合的抗体,并用1/50体积的2M tris缓冲液(pH8.8)中和。通过透析或通过离心过滤器(Amicon Ultra离心过滤器,30K mw极限)上进行若干轮浓缩,用PBS交换缓冲液。

[0148] P30B9重链和轻链的氨基酸序列以及它们与其最接近的种系的比较示于图22中。包括CDR3区的P30B9的氨基酸和核苷酸序列复制如下:

[0149] P30B9-重链可变区:QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQSPETGLEWLGE FDLGGS ITHSRGTNYNPSLKSRVTISGDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYC ARGLAMGGTKEFDS (SEQ ID NO:43)

[0150] P30B9-轻链可变区:DIQMTQSPDLSASVGDRIITICRAS QSINSLAWYQQKPGKAPKLLIY KAS DLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQYKAFKT (SEQ ID NO:44)

[0151] P30B9-重链DNA序列:

[0152] caggtgcagctacagcagtgaggcgcaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgc tgtctatggtgg

[0153] gtccttcagtggttactactggagctggatccgccagtccccagagacgggctggagtggttgcg gaaTTCGATCTTG

[0154] GTGGAAGCatacactcatagtagaggcaccactacaaccgcgctcaagagtcgagtcaccatctca ggagacacgtcc

[0155] aagaaccagttctccctgaaactgacctctgtgaccgccgacacggctgtctattactgtgcgag aggttttagcaat

[0156] gggtggaactaaggagtttgactcctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcag (SEQ ID

NO:45)

[0157] P30B9-轻链:

[0158] gacatccagatgacccagtcctccagactccctgtctgcatctgtaggagacagaatcacatcacttgccgggccagtcagagtattaatagtaatttggcctggtatcagcagaaaccggggaaagcccctaagctcctgatctataaggcgtctgatttagaaagtgggggtcccatcaaggttcagcggcagtgatctgggacagaattcactctccatcagcagcctgcagcctgatgattttgcaacttattattgccaacagtataaagcattcaagacgttcggccacgggaccaaggtggaaatcaaac (SEQ ID NO:46)

[0159] 3.P95C1

[0160] 在一些实施例中,本发明涉及包括其变体和/或衍生物的重组人单克隆抗体P95C1。P95C1对由LAM、LM和PIM6共有的表位特异。尽管P95C1最初是作为IgM分离和纯化的,但当以其他同种型表达时,P95C1还是有活性的,包括但不限于IgG和IgA形式。

[0161] 本领域普通技术人员将理解,CDR对抗原特异性的多样性是至关重要的。本领域普通技术人员将进一步理解,CDR3是CDR区中变化最大的,并且因此具有最重要性,其中可变重链的CDR3区的多样性足以满足大多数抗体特异性。因此,在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:13、14和15中所示的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:13、14和15中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:13、14和15具有高达95%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:13、14和15具有高达90%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:13、14和15具有高达85%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:13、14和15具有高达80%的同一性可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:15中所示的可变轻链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:15中所示的具有保守序列修饰的可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:15具有高达95%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:15具有高达90%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:15具有高达85%的同一性可变轻链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:15具有高达80%的同一性可变轻链的CDR3区。

[0162] 在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:16、17和18中所示的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别如SEQ ID NO:16、17和18中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:16、17和18具有高达95%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:16、17和18具有高达90%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:16、17和18具有高达85%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有分别与SEQ ID NO:16、17和18具有高达80%的同一性可变重链的CDR1、CDR2和CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:18中所示的可变重链的CDR3区。在一些实施例中,抗LAM抗体具有如SEQ ID NO:18中所示的具有保守序列修饰的可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:18具有高达95%的同一性可变重链的CDR3区。在其

他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:18具有高达90%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:18具有高达85%的同一性可变重链的CDR3区。在其他实施例中,抗LAM抗体具有与SEQ ID NO:18具有高达80%的同一性可变重链的CDR3区。

[0163] 表3.P95C1互补决定区 (CDR)

[0164] 轻链

[0165] CDR1:QNVLDSANNRNY (SEQ ID NO:13)

[0166] CDR2:WAS (SEQ ID NO:14)

[0167] CDR3:TQYHRLPHT (SEQ ID NO:15)

[0168] 重链

[0169] CDR1:GGSINTNNW (SEQ ID NO:16)

[0170] CDR2:IHRHGDT (SEQ ID NO:17)

[0171] CDR3:CPLGYCSGDDCHRVA (SEQ ID NO:18)

[0172] 最初在BCL6/Bcl-xL转导的记忆B细胞的上清液中鉴定P95C1 IgM/ $\kappa$ 抗体,并使用标准RT-PCR方案从这些细胞克隆到IgM/ $\kappa$ 表达载体中。通过在Expi293细胞中转染H和L链载体来表达抗体,并在标准Expi293无血清培养基中培养若干天。通过在与蛋白L配体缀合的柱上的亲和层析从培养上清液中纯化分泌的抗体。通过用低pH缓冲液(0.2M甘氨酸(glycine)-HCl,pH 2.5)处理从配体中释放结合的抗体,并用1/50体积的2M tris缓冲液(pH8.8)中和。通过透析或通过离心过滤器(Amicon Ultra离心过滤器,30K mw极限)上进行若干轮浓缩,用PBS交换缓冲液。

[0173] P95C1重链和轻链的氨基酸序列以及它们与其最接近的种系的比较示于图23中。包括CDR3区的P95C1的氨基酸和核苷酸序列复制如下:

[0174] P95C1-重链可变区:EVQLLESGLVLRPWTLSLTCAVS GGSINTNNWWSWVRQSPGKGLEWIGE IHRHGDTNYPNPSLKRRVSI SMDESMNQFSLRLISVTAADTAVYYC CPLGYCSGDDCHRVA (SEQ ID NO:47)

[0175] P95C1-轻链可变区:DIQMTQSPSSLSVSLGERATINCKSS QNVLDSANNRNYFGWYQQKPGQPPKLLIS WAS TRESGVPDRFSGSGTDFTLIISGLQVEDVAVYYCTQYHRL PHT (SEQ ID NO:48)

[0176] P95C1-重链:

[0177] gaggtgcagctcttggagtcgggccaggactggtgaggccttgggggactctgtccctcacctgcgctgtctctggtggctccatcaactaataactggtggagttgggtccgccagtcgccgggaaggggctggagtgattggagaaatccatcgatcgtcatggggacaccaactacaaccgctcactcaagaggcgagtcctcatatcgatggacagtcctcatgaaccagttctccctgaggttatctctgtgaccgccgacacggcctgtattactgttgtccctaggatattgtagtggtgatgactgtcaccgagttgcctggggccggggaatcctgggtcaccgtctcttctcag (SEQ ID NO:49)

[0178] P95C1-轻链:

[0179] gacatccagatgaccagtcctccatcctcctgtctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagccagaatgttttagacagcgcacaacaataggaactacttcggttggtaccagcagaaccagggcagcctcctaagctgctcatttctgggcatctacacgggaatccgggtccctgaccgattcagtgccagcggctctggacagacttactctcatcatcagcggcctgcaggttgaagatgtggcagtttattactgtacacagtatcatag

acttcctcacaccttcggccaagggacacgactggaaattaac (SEQ ID NO:50)

#### [0180] E. 另外的变体和/或衍生物

[0181] 本领域普通技术人员将理解,给定A194-01、P30B9和P95C1的CDR区,可构建本文披露的抗LAM抗体的大量工程化变体和/或衍生物。例如,可以将本发明的抗LAM抗体工程化为嵌合抗体、人源化抗体和对一种或多种LAM表位表现出亲和力的嵌合/人源化抗体。可以将抗体工程化为双特异性抗体,或者可以将抗体工程化使得单个抗体构建体结合多个LAM表位。

[0182] 如本文所述,本发明的抗LAM抗体可以被工程化为同源scFv-IgG构建体或异源scFv-IgG构建体。在本申请中详述了A194-01的同源scFv-IgG构建体(图17A)。异源scFv-IgG构建体的一个非限制性实例是P30B9的VH和VL链通过接头与A194-01 IgG连接(图17B),尽管可以使用其他VH/VL链,例如其他抗LAM抗体,例如鼠抗LAM抗体。这可以允许识别单个抗原分子中的不同表位,并且可以增强多价结合并导致增加的亲和力。可替代地,如果另外的VH/VL链靶向除LAM之外的抗原,则异源scFv-IgG构建体可以产生双特异性抗体。

[0183] 还可以工程化本发明的抗LAM抗体以产生scFv-IgM构建体,包括同源和异源scFv-IgM构建体。同源scFv-IgM的非限制性实例是P30B9 VH/VL链与P30B9 IgM连接的位置。在该构建体中,所有结合位点都具有相同的表位特异性。异源scFv-IgM构建体的非限制性实例是A194-01 scFv与P30B9 IgM连接的位置,与IgG恒定结构域相反[图17C]。这种工程化变体和/或衍生物构建体将保留亲本P30B9 mAb的二甘露糖表位的IgM依赖性识别,并添加A194-01 scFv的另外结合特异性。这可以允许识别独特的表位阵列并导致增强的亲和力,这可能对于改进的护理点抗原检测测定是有价值的。

#### [0184] F. 诊断试剂盒和方法

[0185] 本发明的一个实施例涉及用于检测和/或定量样品中LAM和/或PIM6的诊断试剂盒和方法。如本文所述,抗LAM抗体A194-01和P30B9,以及抗PIM6/LAM抗体P95C1,包括其工程化变体和/或衍生物,可有效检测和/或定量LAM的量和/或样品中存在的LAM和/或PIM6的量。LAM或PIM6可以衍生自任何来源,例如衍生自结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌,或衍生自来自患者(被结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株感染的患者)的血清或尿液样品。LAM可以是例如PILAM、ManLAM、或来自其他分枝杆菌菌株如麻风分枝杆菌的未封端/未修饰的AraLAM。这些菌株在本质与发生的封端程度上不同,并且因此不同的抗体组合对不同的形式具有不同的特异性,允许进行一定水平的分化或分型。特别是,P30B9的IgM和工程化IgA1同种型、以及A194-01的工程化IgM和scFv-IgG同种型非常适合于检测和/或定量来自TB患者的样品中的经二甘露糖取代的ManLAM,在某些情况下,该样品可能包含80%所述LAM,并且P30B9的各种同种型在检测和/或定量携带经二甘露糖取代的Ara6残基的LAM方面特别有效,如本文所述,这些Ara6残基在衍生自结核分枝杆菌的LAM上特别普遍。由于P95C1表位在所有LAM种类中都是高度保守的,因此当该抗体与具有适当特异性的第二抗体偶联时,该抗体非常适合于检测和/或定量样品中各种类型的LAM。A194-01的IgG同种型非常有效地结合各种形式的LAM,尤其是未经取代的LAM,单甘露糖基化的LAM和PILAM,并且因此在检测和/或定量衍生自各种分枝杆菌菌株的LAM方面特别有效。工程化IgM和scFv-IgG同种型在检测和/或定量未经取代的LAM、单甘露糖基化的LAM和PILAM的量方面也非常有效,并且还可以结合二甘露糖和三甘露糖取代的LAM。这使得A194-01的工程化变体和/或衍生物具有比A194-01的

IgG同种型或P30B9的IgM同种型更大的表位识别,但仅以对结核分枝杆菌的毒性菌株特异的那些LAM表位的特异性为代价。在一些实施例中,通过将在各种直接结合测定或抗原捕获测定中的具有已知浓度的LAM和/或PIM6的连续稀释的对照样品的信号强度进行比较来实现量化对LAM和/或PIM6的所述特异性。

[0186] 因为A194-01的IgG同种型、P30B9的IgM/IgA同种型、以及P95C1的各种同种型结合不同的LAM表位,这些LAM表位在结核分枝杆菌的不同菌株中可变地表达,因此这些特定的同种型可用于区分LAM来源的起源;经二甘露糖取代的LAM,特别是经二甘露糖取代的Ara6残基构成结核分枝杆菌的毒性菌株中的大部分LAM残基,而未经取代的LAM/PILAM残基构成快速生长的非毒性菌株如耻垢分枝杆菌中的大部分LAM残基。例如,包含仅与A194-01 IgG而非P30B9 IgM结合的LAM的样品可能不是源自结核分枝杆菌的毒性菌株,而与P30B0 IgM和A194-01 IgG结合的样品可能确实源自结核分枝杆菌的毒性菌株或一种引入类似加盖基序的分枝杆菌的物种。

[0187] 因为P30B9的IgM/IgA同种型对经二甘露糖取代的ManLAM特异,这些同种型如在本文中详述的是结核分枝杆菌的毒性菌株的主要形式,P30B9的所述同种型是诊断试剂盒和用于诊断患者感染分枝杆菌的毒性菌株的方法的理想候选者。此外,工程化的IgM和scFv-IgG变体和/或A194-01的衍生物可适用于这种用途,因为它们还识别经二甘露糖和经三甘露糖取代的ManLAM表位。这样的患者可能具有持续性或活动性感染,或感染可能是潜伏的。该菌株可以是多重耐药性的(MDR)或可以是广泛耐药性的(XDR)。特别是对于具有潜伏感染的患者,血清或尿液中LAM浓度的变化可能特别重要,因为浓度的增加可能意味着活动性感染的变化。可替代地,患有活动性感染的个体的浓度降低可能表示治疗有效并且应该继续,或者治疗期间浓度的增加可能表明目前的治疗无效,应予以消除、改变和/或修改。

[0188] 用于诊断感染的方法可以包括使来自所述患者的生物样品(例如血液,血浆,尿液,痰液或其他体液)与本发明的至少一种抗LAM抗体和/或至少一种抗PIM6/LAM抗体接触,特别是那些识别经二甘露糖取代的ManLAM的抗LAM抗体和识别PIM6甘露聚糖结构域中至少一种多甘露糖结构的那些抗PIM6/LAM抗体。这些包括,例如,P30B9的IgM和IgA同种型,A194-01的工程化的IgA、IgM和scFv-IgG同种型,以及P95C1的各种同种型(IgG、IgM、IgA)。

[0189] 用作检测试剂的抗体可以与报告分子结合,例如本领域已知的那些。抗体可以是试剂盒的一部分,例如与底物结合,或夹心法分析的一部分。该试剂盒可包括第一抗LAM或抗PIM6/LAM捕获抗体,与报告分子结合的第二抗LAM或抗PIM6/LAM检测(detector、detection)抗体,以及捕获抗LAM或抗PIM6/LAM抗体的支持物。第一和第二抗LAM抗体可以结合在单个LAM分子上以多个拷贝存在的相同LAM表位,或者优选它们可以结合单个LAM分子上存在的不同表位。LAM和PIM6表位可以是本文所述的任何表位。试剂盒可包括第三捕获或检测(detector、detection)抗体,该抗体结合第一和第二抗体的非竞争位点。这可以增加捕获的分子数量和结合的检测分子数量以及对应信号的强度。

[0190] 试剂盒可包括使用说明,并可进一步含有各种试剂、溶剂、稀释剂和/或药学上可接受的防腐剂。在这种测定中进行不同生物素标记的抗LAM单克隆抗体的敏感性[图7]。在该测定中,使用鼠抗LAM抗体CS-35从溶液中捕获ManLAM。选择该抗体是因为其广泛的特异性。使用CS-35(250ng/孔)从含有不同浓度的溶液中捕获ManLAM,并且然后使用不同的生物素化单克隆抗体探测捕获孔中ManLAM的存在。使用3x SD背景的截止值,最敏感的探针是

A194-01 IgM, 其为ManLAM的最高稀释度(0.016ng/孔)提供强信号(1.80D)。这优于两种FIND鼠抗体, 这些抗体以前被认为是这类检测的最佳可用探针。

#### [0191] G. 治疗组合物、方法、疫苗和载体

[0192] 本发明的一个实施例涉及包含至少一种本发明的抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的药物组合物, 以及它们用于治疗对其有需要的患者的方法。患者可能具有由结核分枝杆菌的毒性菌株造成的潜伏或活动性感染, 并且特别有用的是, 该菌株可以是多重耐药性的(MDR)或对传统疗法/抗生素时广泛耐药性的(XDR)。在这些组合物和方法中使用的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可以是本发明的任何抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体, 但特别有用的可能是识别二甘露糖封端的ManLAM(特别是二甘露糖封端的Ara6残基)的抗LAM抗体, 例如, P30B9 IgM或IgA1/IgA2同种型和五价A194-01 IgM或四价scFv-IgG同种型和P95C1的各种同种型。

[0193] 适于患者给予的药学上可接受的抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体组合物将在配制品中含有有效量的一种或多种抗LAM或抗PIM6/LAM抗体, 其既保留生物活性同时又在可接受的温度范围内促进储存期间的最大稳定性。取决于所需的配制品, 药物组合物还可包括药学上可接受的稀释剂, 药学上可接受的载体和/或药学上可接受的赋形剂, 或通常用于配制用于动物或人给予的药物组合物的任何此类载体。选择稀释剂以便不影响组合的生物活性。这种稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和Hank溶液。可用于本发明的药物组合物或配制品中的赋形剂的量是用于使抗体在整个组合物中均匀分布的量, 使得该组合物在递送至对其有需要的受试者时均匀分散。它可用于将抗体稀释至提供所需有益的姑息结果或治愈结果的浓度, 同时最小化由于浓度过高可能发生的任何不良副作用。它还可能具有防腐作用。因此, 对于具有高生理活性的抗体, 将使用更多的赋形剂。另一方面, 对于任何表现出较低生理活性的活性成分, 将使用较少量的赋形剂。

[0194] 药学上可接受的抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体组合物可以处于液体形式或固体形式。通常将固体配制品冻干并且在单剂量或多剂量给予之前, 添加溶液中。配制品不应暴露于极端温度或pH值以避免热变性。因此, 必须在生物学相关的pH范围内配制本发明的抗体组合物。示出了在储存期间缓冲以维持适当pH范围的溶液, 特别是对于在配制和给予之间储存较长时间的液体配制品。迄今为止, 液体和固体配制品都需要在较低温度(通常为2°C-8°C)下储存, 以便保持较长时间的稳定性。配制的抗体组合物, 尤其是液体配制品, 可以含有抑菌剂以防止或最小化储存期间的蛋白水解, 包括但不限于有效浓度(通常<1%w/v)的苯醇、苯酚、间甲酚、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和/或对羟基苯甲酸丙酯。对于一些患者, 抑菌剂可能是忌用的。因此, 冻干配制品可以在含有或不含有这种组分的溶液中重构。可以将另外的组分添加到缓冲液体或固体抗体配制品中, 包括但不限于作为冷冻保护剂的糖(包括但不必限于多羟基烃, 例如山梨糖醇、甘露糖醇、甘油和卫矛醇和/或二糖, 例如蔗糖、乳糖、麦芽糖或海藻糖), 以及在某些情况下, 相关的盐(包括但不限于NaCl、KCl或LiCl)。这种抗体配制品, 特别是计划长期储存的液体配制品, 将依赖于有用的总渗透压范围, 以促进2°C-8°C或更高温度的长期稳定性, 同时还使该配制品可用于肠胃外注射。总渗透压的有效范围(溶液中的分子总数)为从约200mO<sub>s</sub>/L至约800mO<sub>s</sub>/L。显而易见的是, 细胞保护剂如蔗糖或山梨糖醇的量将取决于配制品中盐的量, 以使溶液的总渗透压保持在合适的范围内。因此, 无盐配制品可含有从约5%至约25%的蔗糖, 优选的蔗糖范围为从约7%至约15%, 无盐配制品中特别优选的蔗糖浓度为从10%至12%。可替代地, 不含盐的山梨糖醇

基配制品可含有范围从约3%至约12%的山梨糖醇,优选的范围为从约4%至7%,并且特别优选的范围为在无盐配制品中从约5%至约6%山梨醇。当然,无盐配制品将保证各个冷冻保护剂的范围增加,以便保持有效的渗透压水平。这些配制品还可含有二价阳离子(包括但不限于MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>和MnCl<sub>2</sub>);和非32离子表面活性剂(包括但不限于聚山梨酯-80(Tween80®)、聚山梨酯-60(Tween 60®)、聚山梨酯-40(Tween 40®)和聚山梨酯-20(Tween 20®),聚氧乙烯烷基醚,包括但不限于Brij58®、Brij35®,以及其他如Triton X-100®,Triton X114®, NP40®,Span 85和Pluronic系列非离子表面活性剂(例如,Pluronic 121))。这些组分的任何组合,包括可能包含抑菌剂,可用于填充本发明的含抗体的配制品。本发明的抗体组合物还可以是“化学衍生物”,其描述了含有另外化学部分的抗体,所述化学部分通常不是免疫球蛋白分子的一部分(例如,聚乙二醇化)。这些部分可以改进基础分子的溶解度、半衰期、吸收等。可替代地,所述部分可以减弱基础分子的不良副作用或降低基础分子的毒性。

[0195] 具体实施例包括如本文所讨论和本领域进一步已知的PLGA微球,以及包含聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)(PEVAc)的聚合物基的不可降解载体。另外,抗体基的治疗产品的控释和局部递送在Grainger等人,2004,Expert Opin.Biol.Ther.[生物治疗专家意见]4(7):1029-1044中进行综述,通过援引以其全文并入本文。能够包封抗体的合适的微胶囊还可以包括通过凝聚技术或通过界面聚合制备的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊。参见题为“Method for Producing IGF-1 Sustained-Release Formulations [生产IGF-1缓释配制品的方法]”的PCT公开WO 99/24061,其中蛋白被包封在PLGA微球体中,该参考文献通过援引以其全文并入本文。此外,还可以使用微乳液或胶体药物递送系统,例如脂质体和白蛋白微球。其他优选的缓释组合物使用生物粘附剂将抗体保留在给予部位。如上所述,缓释配制品可包含抗体可置于其中的可生物降解的聚合物,其可提供非立即释放。非可注射装置在本文中可描述为“植入物”、“药物贮库植入物”、“贮库植入物”、“不可注射的贮库”或一些这样的类似术语。常见的贮库植入物可包括但不限于固体可生物降解和不可生物降解的聚合物装置(例如延伸的聚合物或同轴杆状装置),以及本领域中已知的许多泵系统。将可注射装置分成大剂量注射(注射后药物的释放和消散),以及储存库或贮库注射,其在注射部位提供储存容器,允许生物制剂随时间缓释。可以通过外科手术将贮库植入物束缚至递送点,以为抗体随时间的延长释放提供足够的储存库。这种装置能够在预定时期内以治疗性或防病性治疗所需的量携带药物配制品。贮库植入物还可以对配制品提供保护免受通过身体过程(如蛋白酶)的降解持续治疗的持续时间。如本领域所知,术语“缓释”是指这种药剂在延长的时间内从嵌段聚合物基质中逐渐(连续或不连续)释放。无论具体装置如何,抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体组合物的缓释将产生局部生物学有效浓度的抗体。生物制剂的缓释将持续一天,若干天,一周或更长时间;但最有可能是一个月或更长时间,或最多约六个月,具体取决于配制品。由于诸如通用降解动力学、安全性和生物相容性的特性,本领域已知的天然或合成聚合物可用作贮库植入物。可以操纵这些共聚物以改变活性成分的药代动力学,保护药剂免受酶攻击,以及在附着或注射部位随时间降解。技术人员将理解,本领域有足够的教导来操纵这些共聚物的性质,包括各自的产生方法、所用的催化剂和缓释的贮库植入物或贮库注射的最终分子量。天然聚合物包括但不限于蛋白(例如胶原蛋白、白蛋白或明胶);多糖(纤维素、淀粉、藻酸盐、甲壳质、壳聚糖、环糊精、葡聚

糖、透明质酸)和脂质。可生物降解的合成聚合物可包括但不限于各种聚酯、L-谷氨酸和 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman等人,1983,Biopolymers[生物聚合物]22:547-556)、聚乳酸([PLA];美国专利号3,773,919和EP 058,481)、聚乳酸-聚乙醇酸(PLGA)如聚乳酸-共-乙交酯(参见,例如,美国专利号4,767,628和5,654,008)、聚乙交酯(PG)、聚( $\alpha$ -羟基酸)的聚乙二醇(PEG)缀合物、聚原酸酯、聚阿司匹林、聚磷酸原、乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇(PVA)、PVA-g-PLGA、PEGT-PBT共聚物(多活性)、甲基丙烯酸酯、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、PEO-PP0-PEO(普朗尼克)、PEO-PP0-PAA共聚物、PLGA-PE0-PLGA、聚原酸酯(POE)、或其任何组合,如上所述(参见,例如,美国专利号6,991,654和美国专利申请号20050187631,这些文献中各自的内容通过援引以其全文并入本文)、水凝胶(参见,例如,Langer等人,1981,J.Biomed.Mater.Res.[生物医学材料研究杂志]15:167-277;Langer,1982,Chem.Tech.[化学工艺学]12:98-105)、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯(例如,乙烯乙酸乙烯酯盘和聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯))、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如Lupron Depot<sup>TM</sup>、聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)、透明质酸凝胶(参见,例如,美国专利号4,636,524)、藻酸悬浮液、聚原酸酯(POE)等。聚乳酸(PLA)及其与乙交酯的共聚物(PLGA)在本领域中是熟知的,因为Lupron Depot<sup>TM</sup>的商业化在1989年被批准为使用PLA聚合物的第一种肠胃外缓释配制品。使用PLA和PLGA作为赋形剂以实现活性成分缓释的产品的另外实例包括Amidox(PLA;牙周病)、Nutropin Depot(PLGA;具有hGH)和Trelstar Depot(PLGA;前列腺癌)。其他合成聚合物包括但不限于聚(c-己内酯)、聚3-羟基丁酸酯、聚( $\beta$ -苹果酸)和聚(二噁烷酮)];聚酸酐、聚氨酯(参见WO 2005/013936)、聚酰胺、环癸烷、聚原酸酯、n-乙醇醇、聚环氧乙烷/聚对苯二甲酸乙二醇酯、多磷酸酯、聚磷酸酯、聚原酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚乙二醇、聚二氢吡喃和聚缩醛。不可生物降解的装置包括但不限于各种纤维素衍生物(羧甲基纤维素、乙酸纤维素、乙酸丙酸纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)硅基植入物(聚二甲基硅氧烷)、丙烯酸聚合物、(聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、多羟基(乙基甲基丙烯酸酯)、以及聚乙烯-共-(乙酸乙烯酯)、泊洛沙姆、聚乙烯吡咯烷酮、泊洛沙胺、聚丙烯、聚酰胺、聚缩醛、聚酯、聚乙烯-三氟氯乙烯、聚四氟乙烯(PTFE或“Teflon<sup>TM</sup>”)、丁苯橡胶、聚乙烯、聚丙烯、聚苯醚-聚苯乙烯、聚- $\alpha$ -氯-对二甲苯、聚甲基戊烯、聚砜和其他相关的生物稳定聚合物。适用于缓释贮库配制品的载体包括但不限于微球、膜、胶囊、颗粒、凝胶、包衣、基质、薄片、丸剂或其他药物递送组合物。上文描述了这种缓释配制品的实例。还参见美国专利号6,953,593;6,946,146;6,656,508;6,541,033;和6,451,346,将其每一个的内容通过援引并入本文。剂型必须能够在预选期间内以治疗性治疗所需的量和浓度携带药物配制品,并且必须对配制品提供足够的保护免受通过身体过程的降解持续治疗的持续时间。例如,剂型可以由材料制成的外部包围,该材料具有防止来自代谢过程的降解和例如泄漏、开裂、破损或变形的风险的性质。这可以防止配制品内容物在使用过程中受到的应力下以不受控制的方式排出,例如,由于受试者的正常关节咬合和其他运动而施加在药物释放装置上的物理力,或者例如,在对流药物递送装置中,与储存库内产生的压力相关的物理力。用于容纳或含有药物的药物储存库或其他装置还必须是这样的材料,以避免与活性剂配制品的非预期反应,并且优选是生物相容的(例如,在植入剂型的情况下,它对于受试者的身体或体液基本上是非反应性的)。通常,将一种或多种相应的生物制剂给予至个体至少12小时至至少一周,并且最有可能通过设计用于递送药物的植入物持续至少10、20、30、100天或至少4个月,或至少6个月

或更久,根据需要。抗LAM抗体和/或抗PIM6/LAM抗体可以以相对低的体积速率递送,例如,从约0.001ml/天至1ml/天,以最小化释放配制品的部位附近的组织紊乱或创伤。取决于一种或多种具体的生物制剂,配制品可以以低剂量的速率释放,例如从约0.01 $\mu$ g/hr或0.1 $\mu$ g/hr、0.25 $\mu$ g/hr、1 $\mu$ g/hr、通常高达约200 $\mu$ g/hr,或者制剂以低体积速率递送,例如体积速率为从约0.001ml/day至约1ml/天,例如,0.01微克/天高达约20微克/天。剂量取决于许多因素,例如所用活性成分(例如,IgG抗体)的效力、生物利用度和毒性以及受试者的要求。

[0196] 对于人和非人患者的体内治疗,对患者给予或提供包括至少一种本发明的抗LAM抗体和/或至少一种抗PIM6/LAM抗体的药物配制品。当用于体内疗法时,本发明的抗LAM或抗PIM6/LAM抗体以治疗有效量(即消除或减少总细菌负荷的量)给予至患者。根据已知方法将抗体给予至人患者,这些已知方法如静脉内给予,例如,作为推注或通过一段时间的连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。如果可能,抗体可以在靶细胞部位肠胃外给予,或静脉内给予。在一些实施例中,通过静脉内或皮下给予来给予抗体。本发明的治疗组合物可以全身、胃肠外或局部给予至患者或受试者。用于评估成功治疗和改善疾病的上述参数可通过医师熟悉的常规程序容易地测量。

[0197] 对于肠胃外给予,抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可以被配制为一种单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液),与一种药学上可接受的肠胃外运载体结合。此类载体的实例包括但不限于:水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。非水性载体包括但不限于固定油和油酸乙酯。脂质体可以用作载体。该运载体可以含有少量的添加剂,例如增强等渗性和化学稳定性的物质,例如像,缓冲液和防腐剂。

[0198] 本发明的抗LAM和抗PIM6/LAM抗体可以以足以提供针对由结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株造成的感染的治疗性治疗的量以本领域可用的任何方式、策略和/或组合给予至宿主。这些组合物可以通过本领域已知的各种途径提供给个体,尤其是肠胃外途径,包括但不限于肠胃外途径,例如静脉内(IV)、肌肉内(IM)、或皮下(SC)给予,其中IV给予是治疗性抗体给予领域内的标准。这些组合物可以作为单独剂量或多剂量给予(即,通过维持配制品的无菌条件经治疗方案,在交错时间给予抗体)。

[0199] 剂量和剂量方案取决于医师容易确定的各种因素,例如感染的性质,例如其治疗指数、患者和患者的病史。通常,将治疗有效量的抗体给予至患者。在一些实施例中,给予的抗体的量在约0.01mg/kg至约1000mg/kg患者体重的范围内,以及其间的任何范围。根据感染的类型和严重程度,约0.1mg/kg至约50mg/kg体重(例如,约0.1-15mg/kg/剂量)的抗体是用于给予至患者的初始候选剂量,无论是例如通过一个或多个单独的给予,还是通过连续输注。通过常规方法和测定并且基于医师或本领域其他技术人员已知的标准,可以容易地监测该疗法的进展。用于评估成功治疗和改善疾病的上述参数可通过医师熟悉的常规程序容易地测量。

[0200] 这些抗体还可以通过表达给定抗体的成对重链和轻链的遗传载体给予。这可以包括有效表达这些基因的质粒或病毒载体,例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。这些载体可以通过注射到肌肉组织中来递送,并且取决于剂量,可以在相对长的时间段内将相对大量分泌的抗体分泌到循环中。

[0201] 其他治疗方案可以与本发明的抗LAM和/或抗PIM6/LAM抗体的给予组合,例如,与另一种抗LAM抗体组合,该另一种抗LAM抗体包括但不限于本领域已知的那些抗LAM抗体,例

如,鼠抗LAM抗体或其人源化形式,或与药物化合物组合,该药物化合物例如但不限于抗生素。适合与本发明的抗LAM和/或抗PIM6/LAM抗体共同给予的抗生素包括但不限于异烟肼、利福平、利福喷汀、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、贝达喹啉、卷曲霉素、环丝氨酸、地塞米松、卡那霉素和tinocordin。联合给予包括共同给予,使用单独的配制品或单一药物配制品,并以任何顺序连续给予,其中优选地,存在两个(或所有)活性剂同时发挥其生物活性的时间段。这种联合疗法可以产生协同治疗效果。用于评估成功治疗和改进行病的上述参数可通过医师熟悉的常规程序容易地测量。

[0202] 根据另一个实施例,本发明提供了被动疫苗或药物组合物,该被动疫苗或药物组合物包括至少一种本发明的抗LAM和/或抗PIM6/LAM抗体和药学上可接受的载体。根据一个实施例,疫苗或药物组合物是包括至少一种本文所述抗体和药学上可接受的载体的组合物。疫苗可以包括具有本文所述特征的多种抗体以任何组合,并且可以进一步包括其他抗LAM抗体,包括本发明的那些和本领域已知的抗体,例如鼠抗LAM抗体或其人源化形式。被动疫苗可包括一种或多种本领域已知的药学上可接受的防腐剂、载体和/或赋形剂。

[0203] 根据另一个实施例,本发明覆盖活性疫苗或药物组合物,包括向患者给予至少一种抗原性LAM或PIM6表位。待使用的特定表位可以通过在针对TB感染和/或发病机制的适当的动物模型中测试该专利中描述的抗体的治疗活性来确定。该模型物种可以是小鼠、或豚鼠、或兔子、或灵长类动物。例如,如果A194-01是最具保护性的,那么将使用具有A194-01表位形式的疫苗,而如果P30B9是最具保护性的,则经二甘露糖取代的Ara6残基可能在产生适当的体液应答方面最有效。活性疫苗可包括一种或多种本领域已知的佐剂,例如明矾,氢氧化铝,磷酸铝,石蜡油和细胞因子,例如IL-1、IL-2、IL-12。活性疫苗可包含一种或多种本领域已知的药学上可接受的防腐剂、载体和/或赋形剂。

[0204] 在一些实施例中,本发明涉及重组载体,例如质粒,其包括编码抗LAM抗体或抗PIM6/LAM抗体的免疫球蛋白重链(Ig VH)的核酸,和编码免疫球蛋白轻链(Ig VL)的第二核酸。在其他实施例中,第一核酸和第二核酸在两种不同的重组载体中。根据另一个实施例,本发明覆盖治疗个体中结核感染的方法,该方法包括向所述个体给予编码抗LAM或抗PIM6/LAM抗体的免疫球蛋白重链(Ig VH)的第一核酸,和编码抗LAM或抗PIM6/LAM抗体的免疫球蛋白轻链(Ig VL)的第二核酸,其中每个核酸与启动子区可操作地连接。第一核酸和第二核酸可以在相同的重组载体中或在两种不同的重组载体中。重组载体可以是非复制型病毒载体,例如腺相关病毒(AAV),或可以是质粒。在某些实施例中,本发明涉及用本文披露的一种或多种载体转化的细胞。

[0205] 可以给予上述抗体和抗体组合物、疫苗组合物和载体,用于防病性和治疗性治疗由结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株造成的感染。

[0206] H. 当量

[0207] 在提供取值范围的情况下,应当理解的是,在所述范围的上限与下限之间的每个插入值(到下限的十分之一单位除非上下文清楚地另外指明)以及在所陈述范围内的任何其他所陈述的值或插入值均被涵盖在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在这些较小范围之内、也涵盖在本发明之内,受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述的范围包括限制中的一者或两者的情况下,排除了那些包括的限制中的任一者或两者的范围也包括在本发明之内。

[0208] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的意义相同的意义。虽然与本文所述的那些方法和材料相似或等同的任意方法和材料也可以用于实施或测试本发明中,但是现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物,将其以其全部内容通过援引并入本文。

[0209] 当在本文和附带的权利要求中使用,单数形式“一个/种(a)”、“和(and)”和“所述/该(the)”包括复数指代物,除非上下文明确地指示其他的情况。

[0210] 术语“约”是指本领域普通技术人员不认为与基线值显著不同的一系列值。例如,术语“约”可以是指是在所述值的20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%的范围内的值,以及介于这些所述值之间的值。

[0211] 仅提供在此讨论的这些出版物在本发明的提交日期之前的披露内容。本文中的任何内容均不应被视为承认本发明因现有发明而无权先于这些披露。另外,所提供的披露日期可能与实际披露日期不同,实际披露日期可能需要独立地确定。

[0212] 本文中引用的每个申请和专利,以及每个申请和专利中引用的每个文献或参考文献、患者或非患者文献(包括在每个已发布专利的起诉期间;“申请引用的文献”),以及与这些申请和专利中的任何一个相对应和/或要求优先权的每个PCT和外国申请或专利,以及在每个申请引用的文献中引用或参考的每个文献,特此明确地以其全部内容通过援引并入本文。更一般地,文献或参考文献在本文中引用,或者在权利要求之前的参考文献列表中引用;或者在本文自身中;并且这些文献或参考文献中的每一个(“本文引用的参考文献”),以及本文引用的参考文献的每篇中引用的每篇文献或参考文献(包括任何制造商的说明书,说明书等)特此明确地通过援引并入本文。

[0213] 以下非限制性实例用于进一步说明本发明。

#### [0214] 实例

[0215] 实例1-本文所述的方法用于体外培养记忆B细胞和分子克隆免疫球蛋白可变区基因以分离对LAM特异的若干种新颖人单克隆抗体(mAb)。本领域普通技术人员将认识到,可调节本文所述的这些方法以选择性地鉴定具有非常高亲和力的稀有抗体,其可以作为在患者血液中循环的100,000个记忆B细胞中的至少1个存在。

#### [0216] 单克隆抗体

[0217] 鼠单克隆抗体:将从Delphi Chatterjee博士实验室获得的产生LAM特异的鼠单克隆抗体CS-35和CS-40的杂交瘤细胞系重新克隆至同质,并且通过蛋白A层析纯化抗体。

[0218] 抗体906.41、906.7、908.1和922.5由John Spencer博士提供,并且FIND25和FIND170由Tobias Broger在FIND提供。

#### [0219] 抗原

[0220] 结核分枝杆菌衍生的H37Rv脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)(NR-14848)和耻垢分枝杆菌衍生的LAM(NR-14860)通过BEI资源从科罗拉多州立大学获得。LAM衍生的糖缀合物在Lowary实验室中合成。

#### [0221] ELISA测定

[0222] 将Man-LAM(H37Rv)和PI-LAM(衍生自耻垢分枝杆菌)在CBC缓冲液(7.5mM碳酸钠,17.4mM碳酸氢钠,pH 9.0)中稀释,并以100ng/孔的浓度铺板在96孔ELISA板中。在4°C孵育板过夜后,将孔用含有0.05%Tween-20(PBST)的PBS pH 7.4洗涤,然后用PBS缓冲液中的

1%BSA(西格玛(Sigma))封闭。将PBST洗涤的板在37℃与衍生自感染结核分枝杆菌的个体的血浆和在含有2%FBS的RPMI培养基中稀释的对照血浆一起孵育1小时。然后将PBST洗涤的板与1:1000稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG( $\gamma$ -特异性)(密理博(Millipore))或IgM( $\mu$ -特异性)(密理博(Millipore))或IgA( $\alpha$ -特异性)孵育1小时。在PBST洗涤后,用50 $\mu$ L的DEA缓冲液显色。通过分光光度计在405nm处测量OD。滴度定义为相减稀释度,其在减去BSA涂布板所得的背景OD后产生OD,并通过指数插值确定。

#### [0223] 血浆滴定

[0224] 从BEI储存库获得两个纯化的抗原,并在4℃在96孔ELISA板上以2 $\mu$ g/ml的浓度铺板过夜,并将该板然后用在1X PBS中的1%BSA封闭。血浆的LAM特异性滴度通过在37℃孵育1小时系列稀释的样品,随后将板用PBS+0.1%Tween 20洗涤三次进行测试。在PBS中的1%BSA中以1:1,000稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗人 $\kappa$ 和山羊抗人 $\lambda$ 的混合物检测结合的抗体,并且通过在DEA缓冲液中添加碱性磷酸盐底物来产生信号。在30分钟时测量反应性为OD405。

#### [0225] 人受试者

[0226] 患有结核分枝杆菌的活动性感染的患者参加了全球结核病研究所的Lattimore实践。活动性感染由培养证实的结核病或临床结核病的诊断来定义。该组包括最近结核病诊断的患者,即疗法第二个月的患者。未感染的患者为HIV血清反应阴性的,结核菌素皮肤试验阴性,健康志愿者,没有卡介苗(BCG)疫苗接种史的健康志愿者和对干扰素- $\gamma$ 释放测定(IGRA)呈阴性(Quantiferon Gold In-Tube[管中的Quantiferon金],Cellestis公司,巴伦西亚,加利福尼亚州)。从参与者获得知情同意,并且该研究得到了罗格斯大学机构审查委员会的批准。

#### [0227] 表4. 本研究中使用的TB患者的临床表征

样品ID	抽血日期	治疗开始日期	诊断	疾病水平
TB194	3/3/14	1/15/14	TST(+), AFB 涂片 (-), NAAT (+)	肺结核
TB210	4/2/14	3/12/14	TST(+), AFB 涂片 (+), 异常 X-射线	肺结核
TB256	6/30/14	5/19/14	TST(+), TBD (+), 异常 X-射线	肺结核
TB260	6/10/14	7/3/14	TBD(+), AFB 涂片 (+), 异常 X-射线	肺结核
HC261	7/3/14	NA	LTBI(-), TST (-)	LTBI(-), 非接触性
[0228] TB310	11/13/14	10/11/14	TBD(-), AFB 涂片 (-), IGRA(+)	肺结核
TB314	11/18/14	10/13/14	TBD(-), AFB 涂片 (-), IGRA(+)	肺结核
TB320	12/1/14	10/31/14	TBD(+), TST (+), 异常 X-射线	肺结核
TB366	4/10/15	3/17/15	TBD(+), TST (+), 异常 X-射线	肺结核
TB372	4/15/15	2/27/15	TBD(+), TST (+), 异常 X-射线	肺结核
TB373	4/22/15	3/3/15	TBD(+), TST (+), 异常 X-射线	肺结核
TB384	5/5/15	3/6/15	TBD(+), TST (+), 异常 X-射线	肺结核

#### [0229] 表4. 人受试者的人口统计学

##### [0230] 1. 培养和分离A194-01(IgG同种型)

[0231] 从获自TB感染的患者TB-194的培养的内存B细胞中分离人单克隆抗LAM抗体A194-01,同种型IgG。体外培养系统的一个关键组分是存在合适的饲养细胞,这些饲养细胞可以通过CD40L(CD40的配体,TNF受体超家族的成员)提供刺激,该CD40L在B细胞表面表达,并在介导T细胞依赖性免疫球蛋白类转换和内存B细胞发育中起重要作用。将内存B细胞接种在表达CD40L的MS40L-低细胞的饲养层上。这些细胞表达低水平的CD40L,并且先前已显示有效支持内存B细胞的复制及其成熟为浆细胞(Luo, X. 等人, Blood[血液], 2009. 113(7))。通过用FUW-CD40L感染提供B谱系生长因子IL-7的鼠基质MS5细胞产生这些细胞, FUW-CD40L是

转导人CD40L的病毒,最初从Origene(罗克维尔市,马里兰州)获得。用来自Miltenyi的MACS人记忆B细胞分离试剂盒(目录号130-093-546)分离记忆B细胞。通过用含有针对细胞表面标记CD2、CD3、CD14、CD16、CD36、CD43、CD56、CD66b和血型糖蛋白A的抗体的磁珠进行阴性选择,从PBMC排除非B细胞。为了进一步消除天然B细胞,记忆B细胞亚群被与针对细胞表面标记CD27的抗体偶联的磁珠进行阳性选择,该细胞表面标记CD27是记忆B细胞的标记,该标记也在浆细胞上以低水平表达,但在天然B细胞上不表达。在表达CD40L的饲养细胞的存在下,这些条件支持记忆B细胞的复制及其分化成浆母细胞,这些浆母细胞将相对高滴度的Ig分泌到培养物上清液中。

[0232] 每周一次通过用新鲜培养基替换一半培养上清液重新进料培养物。2-3周后,有足够的B细胞产生约1-5 $\mu$ g/ml分泌的抗体。假设每个孔中存在100-1,000个不同的克隆,这相当于每个B细胞克隆的平均浓度为1-10ng/mL的Ig。该浓度相当低,并且因此该方法偏向于对靶抗原具有相对高亲和力的抗体。从该患者的血液中纯化大约80,000个细胞的记忆B细胞,并在96孔培养板的96个孔中培养,初始密度为约800个细胞/孔。

[0233] 对于针对结核分枝杆菌衍生的LAM的抗体的存在,通过ELISA筛选培养物上清液。将LAM以2 $\mu$ g/mL的浓度涂布在96孔ELISA板的每孔50 $\mu$ L碳酸氢盐包被缓冲液中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将板用PBST(0.1%Tween 20在1X PBS中)洗涤4次,并用200 $\mu$ L的在1X PBS中的2%脱脂乳在37 $^{\circ}$ C封闭1小时。将100 $\mu$ L培养上清液添加到含有LAM的ELISA板的对应孔中,并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。在另外的洗涤步骤后,添加AP缀合的小鼠抗人Fab抗体以检测结合的人抗体。在37 $^{\circ}$ C孵育半小时后,将100 $\mu$ L在DEA缓冲液中的AP底物添加ELISA孔中,并且通过测量405nm处的吸光度比色测定反应性。

[0234] 仅在96孔的1个孔中检测到阳性信号(在1hr,OD为约1),表明该样品中这些细胞的稀有性。将来自阳性细胞的细胞以5-10个细胞/孔的密度在96孔板的10个孔中再培养,并且针对LAM的活性重新筛选。这导致约6个阳性孔(在1hr,OD为约1),再次与LAM反应性细胞的低频率一致,并且表明原始阳性孔仅含有单个LAM阳性B细胞克隆。将来自若干个阳性亚克隆的细胞裂解并用于分离H链和L链的可变区,然后将这些可变区克隆到H链和L链表达载体中。从这些孔中分离总共10种不同的VH和9种VL序列,并且然后通过293细胞中转染各个组合来测试这些序列的活性。在测试的90种组合中,只有重链(p9045-IgG1-VH)和轻链(p9044-Vk)的单个组合给出针对LAM的阳性信号。如制造商所述,通过在Expi-292细胞中共转染对应的重链和轻链质粒来表达抗体,并在无血清培养基中生长。将抗体通过在蛋白A珠(用于IgG)或蛋白L珠(用于IgG)上的亲和层析纯化,并用低pH缓冲液洗脱。将纯化的抗体浓缩并通过SS-PAGE表征大小和纯度。

[0235] 2. 分离和培养P30B9的IgM同种型

[0236] 从获自TB感染的患者TB-314的培养的B细胞中分离人单克隆抗LAM抗体P30B9,同种型IgM。通过在ficoll梯度上离心从患者TB-314的血液中分离PBMC,并如上所述用来自Miltenyi的MACS人记忆B细胞分离试剂盒纯化约30,000个记忆B细胞。在IL-21(100ng/mL)、IL-10(100ng/mL)、IL-2(10ng/mL)、IL-4(2ng/mL)、和CpG(1 $\mu$ M)、和通过ELISA筛选结合H37Rv ManLAM的细胞上清液的存在下,通过以400个细胞/孔接种在96孔板中生长的单层MS40-L细胞上培养纯化的记忆B细胞14天。将ManLAM以2 $\mu$ g/mL的浓度涂布在96孔ELISA板的每孔50 $\mu$ L碳酸氢盐包被缓冲液中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将板用PBST(0.1%Tween

20在1X PBS中)洗涤4次,并用100 $\mu$ L的在1X PBS中的1%BSA在37 $^{\circ}$ C封闭1小时。将50 $\mu$ L培养上清液或稀释的抗体添加到含有LAM的ELISA板的对应孔中,并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。在另外的洗涤步骤后,添加AP缀合的山羊抗人IgG(H+L)-抗体以检测结合的人抗体。在37 $^{\circ}$ C孵育半小时后,将50 $\mu$ L在DEA缓冲液中的AP底物添加ELISA孔中,并且通过测量405nm处的黄颜色测定反应性。当用二级山羊抗人IgG、IgA、IgM、 $\kappa$ 链试剂探测时,78个孔中只有1个给出阳性信号。扩增后,将该孔针对BCL6和Bcl-xL进行转导,通过自切割猪捷申病毒(teschovirus)-1(P2A)肽序列连接,并且然后通过IRES驱动GFP报告基因。这两个基因稳定记忆B细胞以进行长期复制,并且即使在通过BCR的参与选择抗原阳性细胞后还允许培养细胞。逆转录病毒载体用长臂猿白血病毒(GaLV)包膜糖蛋白假型化,其中R肽从C末端TM结构域缺失。原代B细胞的成功转导导致BCL-6、Bcl-xL和标记蛋白GFP的表达。通过在荧光显微镜下计数GFP阳性293T细胞来确定病毒滴度。在聚凝胺/纤维连接蛋白存在下用逆转录病毒载体转导激活的B细胞。

[0237] 进一步扩增后,在IL-21(100ng/mL)和IL-2(10ng/mL)存在下,将转导的细胞在有限稀释度下传代培养。基于其强LAM结合活性和显微镜证明单个克隆的存在,选择板30上的孔B9(P30B9)。P30B9上清液仅与涂布有H37Rv-LAM的孔结合,而不与涂有衍生自耻垢分枝杆菌或 $\alpha$ 晶状体蛋白的LAM的孔结合。裂解来自该孔的细胞,并且使用RNeasy mini试剂盒(Qiagen)分离RNA,然后使用上标III cDNA合成系统(Invitrogen)用寡核苷酸(dT)进行cDNA合成。通过使用Smith-Tiller的引物扩增抗体重链和轻链可变区,并克隆到人重链和轻链表达载体中。最初将重链可变区克隆到标准IgG载体中。然而,当与克隆到人 $\kappa$ 链表达载体中的轻链序列组合时,未检测到LAM结合活性。此时,在原始稳定转导的多克隆孔中产生的ManLAM反应性抗体用同种型特异性试剂重新探测,并且发现仅为IgM。随后将P30B9 VH序列克隆到IgM H链恒定区表达载体中,并且在与对应的 $\kappa$ 链共转染时获得良好的结合活性。

[0238] 3. 表征A194-01 IgG和P30B9 IgM以及针对LAM的鼠抗LAM抗体的表位特异性

[0239] A. 为了定义被A194-01 IgG和P30B9 IgM识别的表位,将所述抗体的结合活性与许多针对一系列25个糖缀合物的鼠LAM特异性单克隆抗体(CS-35、CS-40、FIND25、FIND170和由908.1代表的900个系列的单克隆抗体)的结合活性进行比较,在这些糖缀合物中代表LAM中存在的不同结构的合成聚糖与牛血清白蛋白缀合(图4A)。它们的大小范围为从4到26个碳水化合物环,并且代表了已知存在于各种分枝杆菌LAM中的结构基序的范围,分枝杆菌LAM包括许多中用磷酸肌醇封端的或未封端的聚阿拉伯糖结构, $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-连接的单Manp甘露糖、二Manp甘露糖和三Manp甘露糖结构,和5-脱氧-5-甲硫基戊呋喃糖基(MTX)基序和各种封端的Ara4和Ara6结构。

[0240] 对于这些单克隆抗体,用该抗原组获得了六种不同的反应性模式(图4B)。通过滴定曲线表明单克隆抗体对这些抗原的相对亲和力;高亲和力反应在中间稀释度下保持高反应性,而反应性的快速下降表明低亲和力。对于小鼠mAb CS-35,观察到最广泛的模式,该小鼠mAb CS-35与衍生自结核分枝杆菌的LAM和衍生自耻垢分枝杆菌的LAM以适度的亲和力进行反应,并且识别含有基本Ara4和Ara6基序的封端的或未封端的结构,与该mAb对the $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf基序的已知特异性一致。

[0241] 人单克隆抗LAM抗体A194-01 IgG还识别这些结构的大部分,并且在许多情况下具有最强的亲和力。A109-01 IgG与所有未封端的Ara4和Ara6结构以及与磷酸肌醇封端的

Ara4结构强烈结合,并且与甘露糖封端的结构子集强度较小结合。A109-01 IgG与单甘露糖封端的结构良好结合,但与二甘露糖和三甘露糖结构非常弱,尽管当存在MTX取代时,与后者结构的反应性增强。900个系列小鼠单克隆抗体中的四种(由908.1代表的)与所有未封端的Ara4和Ara6结构以相对弱的亲和力反应,但不与任何封端的结构反应。来自FIND的两种小鼠单克隆抗体(FIND25,又称为KI25)与所有Ara6结构强烈结合,不管是否存在封端,但不识别任何Ara4结构。已知与ManLAM特异性反应的CS-40与衍生自结核分枝杆菌的LAM反应微弱,并且优先与单甘露糖封端的Ara4和Ara6结构结合。

[0242] 人单克隆抗LAM抗体P30B9 IgM与衍生自结核分枝杆菌的ManLAM并且与二甘露糖封端的Ara4和Ara6结构以高特异性强烈反应,并且与其他含甘露糖的结构以相当弱的活性反应。该残余活性的可视化取决于测定条件,并且以某些测定形式(例如,图4b,图8)显示,但以其他测定形式不显示(例如,图16,图18)。不希望受理论束缚,P30B9 IgM对二甘露糖封端的结构相对特异性具有潜在的临床相关性,因为已知来自结核分枝杆菌复合体的毒性菌株的末端甘露糖基单元介导脂阿拉伯甘露聚糖与人巨噬细胞的结合,并且此外,已知二甘露糖帽是衍生自结核分枝杆菌的LAM的主要修饰。

[0243] 当A104-01 IgG和P30B9 IgM的表位特异性在针对更大的碳水化合物抗原组的微阵列测定中进一步映射时,获得了类似的结果。该组包括若干种另外的多聚糖结构,这些多聚糖结构被P30B9 IgM识别,但不被任何其他测试的抗体识别(图8)。这与二甘露糖封端的Ara4和Ara6结构的P30B9 IgM偏好一致,特别是但不一定是含有与末端阿拉伯糖连接的Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 5)的那些。P30B9 IgM还与含有Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)的五甘露糖结构(59.AS-3-71)强烈反应,但仅与含有Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)-Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)的类似结构(50.YB-BSA-18)弱反应。尽管它偏爱 $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)键,但P30B9 IgM不与AS-2-91反应,该AS-2-91是含有Man- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)键连同与第二甘露糖 $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)连接的另外的甘露糖的四甘露糖结构。不希望受理论束缚,这表明P30B9的IgM同种型的特异性可能要求不含任何另外的取代的二甘露糖基序的两种糖。

[0244] B. 将映射这些单克隆抗体对LAM衍生的聚糖的优良的特异性的更精确的滴定证明了末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)二糖在Ara4结构抗体识别中的关键作用。Ara4结构由 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf四糖组成,而Ara6结构在第二糖处含有另外的 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)二糖分支。单克隆抗体与Ara4和Ara6结构结合,不依赖于甘露糖封端。所有三种单克隆抗体都与Ara4结构(YB-8-099)以及与YB-BSA-03结合,对应于在还原端具有另外的 $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)糖的Ara4结构(图9A)。然而,没有单克隆抗体与含有末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)二糖的相关的八糖(MJ-LZ-2)结合,对应于Ara6结构的下部分支。这表明Ara6结构的上部分支含有 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)键合,这些上部分支被单克隆抗体识别,而含有 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)二糖的下部分支没有。

[0245] 通过探测这些单克隆抗体和依赖于Ara6的FIND25抗体与含有截短形式的末端二糖的三种相关聚 $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)结构的反应性来检查末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)键在抗体识别中作用(图9B)。所有三种结构还含有内部 $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)分支。YB-BSA-07以线性 $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)结构结尾,并且与所有抗LAM抗体完全不反应。YB-BSA-09在两个较长分支的倒数第二个糖处含有通过(1 $\rightarrow$ 3)分支附加的另外的 $\alpha$ -D-Araf糖,类似于Ara6分支的结构。该

结构仅被所测试的较高浓度的A194-01的IgG同种型并且被CS-35微弱地识别。YB-BSA-10在每个分支处包括末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)糖,在多糖的非还原末端处形成两个完整的Ara6结构。所有单克隆抗体都识别该结构,其中相对结合强度与它们对天然LAM抗原的亲合力一致。这些测定表明末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)二糖是所有可用的阿拉伯糖反应性LAM特异性单克隆抗体的关键组分。

[0246] C. 结核分枝杆菌-复合体的致病菌株如结核分枝杆菌和牛分枝杆菌与非致病性快速增长的菌株如耻垢分枝杆菌之间的一个关键的区别是致病菌株上存在甘露糖封端的末端。因此,对不同的甘露糖基化结构特异的单克隆抗体可用于结构研究和用于确定这些修饰的功能贡献。在该研究中表征的两种单克隆抗体CS-35和FIND25/170的活性完全不受甘露糖帽存在或不存在的影响。另一方面,900个系列单克隆抗体的结合被任何种类的甘露糖基化完全消除(图4)。

[0247] 另一方面,CS-40仅与未修饰的Ara4聚糖(YB-8-099)弱结合,但与含有单甘露糖帽的Ara4(YB-8-101)和Ara6(YB-8-149)结构强烈结合。该实验使用修饰的CS-40,其中小鼠重链结构域被人IgG1恒定序列取代,因为与图4中使用的天然小鼠抗体相比,这导致更敏感的结合检测。与结核分枝杆菌LAM相比,CS-40与未封端的阿拉伯呋喃糖结构的弱反应性反映在其与耻垢分枝杆菌LAM的弱反应性中。 $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)连接的MSX糖与末端甘露糖(即,YB-8-141和YB-8-149)的附接对结合亲合力没有影响,而产生二甘露糖帽的第二 $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)连接的甘露糖(YB-8-111和YB-8-125)的附接完全消除了CS-40的反应性(图16)。

[0248] A194-01具有更复杂的反应模式。A194-01与未封端的阿拉伯呋喃糖基侧链以及与单甘露糖封端的Ara4(YB-8-101)和Ara6(YB-8-123)结构强烈结合,但该mAb与二甘露糖封端的Ara4(YB-8-111)仅微弱反应,并且与三甘露糖封端的Ara4(YB-8-113)反应甚至更差,并且对于二甘露糖封端的Ara6(YB-8-125)几乎完全没有反应。如对于CS-40所见,对单甘露糖结构(YB-8-141、YB-8-149)的MTX取代没有抑制A104-01的结合,并且特别感兴趣的是,MSX添加显著提高了对二甘露糖和三甘露糖封端的Ara4结构(YB-8-133、YB-8-143)的识别。与P30B9对ManLAM的高选择性一致,mAb与二甘露糖封端的Ara4(YB-111)和Ara6(YB-8-125)结构特异性结合。与MSX取代对CS-40和A194-01的结合的良性或有益作用相反,该取代导致P30B9的反应性完全丧失,如添加另外的甘露糖以形成三甘露糖封端的结构一样。这些结果表明,不同的单克隆抗体识别LAM结构的不同区域和结构方面,其中一些仅与阿拉伯呋喃糖侧链结合,而另一些结合对于封端基序具有不同水平的特异性。

[0249] 比较代表性糖缀合物的Ara6反应性抗体的相对结合特异性和亲合力(图11)。总体模式与天然抗原PILAM和ManLAM(图3)和针对糖缀合物的初步滴定(图4)获得的模式一致。人A194-01 IgG对所有未封端的结构以及对经MSX取代的Ara6-单甘露糖结构(YB-8-149)具有更高的相对亲合力,与具有单一甘露糖帽的Ara6结构以同等的亲合力反应,但没有识别具有二甘露糖或三甘露糖帽的结构。FIND25与具有标准Ara6结构的所有结构以与CS-35相似或略高的亲合力结合,二者都处于封端形式或未封端形式,但是不结合两种结构(YB-BSA-06和YB-BSA-08),其中这些分支中的一个在非还原端延伸远离分支点。908.1与所有未封端的结构以较弱亲合力结合,包括后两者,但不识别任何甘露糖封端的结构4。

[0250] 涉及抗LAM单克隆抗体A的竞争研究,综述

[0251] 通过ELISA滴定单个抗体竞争生物素化的探针mAb与LAM结合的能力。抗LAM抗体中

四种(A194-01、CS-35、FIND25和P30B9)的典型竞争曲线示于图16中。正如预期的那样,生物素化的抗体都被过量的其未标记的版本所竞争。如果有的话,小鼠抗LAM抗体908.6与其他抗体的竞争很差。这在一定程度上归因于该抗体的弱亲和力,但还反映了与未封端结构的908.6结合的限制,并且表明封端的结构是被CS-35和FIND25识别的ManLAM中的主要靶标。

[0252] 与其广泛的反应性一致,CS-35完全竞争所有探针抗体的结合,尽管它与生物素化A194-01的竞争自身不如A194-01强,但与CS-35对LAM的亲和力较低一致。尽管CS-35完全与生物素化的FIND25竞争,但FIND25仅部分地与标记的CS-35竞争(最大竞争的约74%),而与A194-01的竞争甚至更低(约50%)。不希望受理论束缚,该结果可能反映了被A194-01和CS-35识别而不被FIND25识别的Ara4结构的存在,该FIND25仅与Ara6基序结合。FIND25与大多数CS-35结合竞争的事实表明Ara6结构比Ara4结构更常见。尽管A194-01具有很强的亲和力,但它只能与自身竞争,不会与CS-35或FIND25竞争,进一步表明被后两种抗体识别的LAM中的靶标主要被A194-01未识别的结构(例如二甘露糖和三甘露糖封端的结构)组成。与该结果相反,A194-01确实完全有效地竞争FIND25与非甘露糖基化的PILAM的结合,这与在ManLAM中缺乏竞争的情况下Ara6结构的有效甘露糖封端的作用一致。

[0253] 使用抗体P30B9的竞争研究进一步支持了以下结论:ManLAM中的绝大多数Ara6结构被二甘露糖封端,并且大部分二甘露糖帽驻留在Ara6结构上。P30B9与FIND25竞争与ManLAM的约70%的结合并且与CS-35竞争与ManLAM的约80%的结合,证实被这些小鼠mAb识别的大多数结构也被P30B9识别。P30B9与ManLAM的结合被自身,以及被CS-35和FIND25有效竞争FIND25对P30B9的竞争水平接近100%,表明基本上所有依赖于二甘露糖的P30B9结合位点都位于Ara6位点,而Ara4结构上很少。正如预期的那样,A194-01对P30B9与ManLAM的结合竞争非常差,并且908.7完全没有竞争,与这些抗体对二聚糖封端的结构不良识别一致。后者抗体不能有效竞争P30B9的结合,证实该效应需要竞争性mAb与探针mAb结合相同的分支,并且与位于相同分子的相邻分支上的异源表位的结合不会导致有效竞争。

[0254] B.通过竞争测定的相对A194-01 IgG和P30B9 IgM亲和力

[0255] 映射单个单克隆抗LAM抗体(包括A194-01的IgG同种型和P30B9的IgM同种型)与特定的聚糖结构的反应性允许通过抗体竞争研究表征LAM中所述特定聚糖结构的分布(图10)。这些竞争测定假设为了使一种抗体竞争第二种(生物素化的,在它们来自相同物种的情况下)抗体的结合,两种表位必须在天然分子中彼此非常接近,可能,但不一定,在相同或相邻的阿拉伯聚糖分支上。这种模型得到了不对称竞争模式的支持,其中例如,结合未封端的、单甘露糖基化的和MSX取代的Ara4和Ara6结构二者的生物素化的IgG A194-01被自身以及被A194-01的工程化变体和/或衍生物有效竞争,但是仅部分被鼠单克隆抗体FIND25,鼠单克隆抗体FIND25仅结合Ara6结构。另一方面,结合所有Ara4和Ara6结构的鼠单克隆抗体CS-35给出更完全的竞争,尽管效率较低,可能是由于其相对低的亲和力。

[0256] 这些测定的结果揭示了一些令人惊讶和意想不到的性质。例如,与所有二甘露糖封端的ManLAM结构结合的P30B9的IgM同种型被自身、CS-35和FIND170强烈且完全竞争。不希望受理论束缚,鼠单克隆抗LAM抗体FIND25对P30B9的有效竞争表明天然LAM中的二甘露糖封端的结构主要定位于被FIND抗体识别的Ara6结构,并且在Ara4结构上没有明显表达。这提高了能够靶向并特异性结合二甘露糖封端的Ara6残基的重要性,因为二甘露糖封端被认为是在结核分枝杆菌-复合体的毒性菌株中发现的LAM的主要形式。生物素化的FIND25被

A194-01的工程化变体IgM同种型高效的竞争进一步证明甘露糖基化结构被A194-01的IgM同种型的识别的增加。

[0257] C. A194-01 IgG和P30B9 IgM以及鼠抗LAM抗体对ManLAM和PILAM的竞争研究

[0258] 使用不同抗LAM单克隆抗体之间的结合竞争测定来分析LAM中各种结构形式的分布。A194-01的IgG同种型识别未修饰的Ara4和Ara6侧链或含有单个甘露糖帽的链,但不与具有二甘露糖或三甘露糖封端基序的侧链结合。两种FIND鼠抗体与所有形式的Ara6反应,但不与任何Ara4结构反应。P30B9 IgM对于含有二甘露糖帽的Ara4和Ara6结构是相对特异的。

[0259] 与具有增加的化合价的A194-01构建体的反应性的扩大一致,这些构建体在抗体竞争活性中表现出增加的效力。当测试竞争生物素化的A194-01 IgG与ManLAM结合的能力时,十聚体A194-01 IgM和四聚体scFv-IgG变体比A194-01 IgG同种型自身竞争更有效(图11),因此表示增加潜在的治疗和诊断效用,而单体Fab和scFv形式竞争不太有效(图1)。A194-01的二聚体scFv工程化变体和/或衍生物与A194-01 IgG同种型等同竞争。

[0260] 当将A194-01的工程化变体和/或衍生物的表位特异性与A194-01 IgG的表位特异性进行比较时,观察到它们具有更宽的反应性(图14)。然而IgG同种型与经二甘露糖(YB-8-123、YB-8-125)和经三甘露糖(YB-BSA-113、YB-BSA-13)取代的结构没有明显的结合,但IgM识别这些结构,并且scFv-IgG形式对这些结构中的一些也具有增加的活性。因为二甘露糖封端,以及尤其是二甘露糖封端的Ara6,是毒性结核分枝杆菌中的主要LAM基序,这表明这些工程形式的A194-01在治疗和诊断应用中的潜在增强效用。

[0261] 未标记的A194-01 IgG竞争生物素化的A194-01 IgG与衍生自结核分枝杆菌(ManLAM)(图12A)或耻垢分枝杆菌(PILAM)(图12D)的LAM的结合,而鼠单克隆抗体FIND170和P30B9不是能够竞争A194-01与任一抗原的结合(图12A、图12D)。这与被A194-01 IgG同种型识别的但不被对Ara6特异的FIND170或P30B9 IgM识别的Ara4结构的主要识别一致,取决于二甘露糖封端残基。类似地,A194-01不竞争生物素化的FIND25(图12B)或P30B9 IgM(图12C)与ManLAM的结合,与这些抗体的不同表位特异性一致。与A194-01 IgG不能竞争FIND25与ManLAM的结合相反,A194-01 IgG与FIND25竞争与PILAM的约90%的结合(图12E),与PILAM中已知的甘露糖封端不存在以及与A194-01对未封端的Ara4和Ara6结构的高亲和力一致。

[0262] 与被A194-01 IgG的低效竞争相反,P30B9 IgM与FIND25竞争约80%的结合,并且FIND170几乎完全竞争P30B9的结合(图12B、图12C)。这强烈表明,被FIND鼠抗体识别的绝大多数Ara6结构具有二甘露糖帽,并且因此还被P30B9 IgM识别,并且被P30B9识别的大多数二甘露糖封端的结构存在于Ara6结构上。这表明二甘露糖封端的Ara6是来自毒性结核分枝杆菌的LAM基序中的主要免疫基序。

[0263] D. 另外的竞争研究

[0264] 进行了另外的竞争研究以突出LAM是具有未定义异质性的复合抗原的事实。LAM反应性单克隆抗体的不同表位特异性的定义允许使用结合竞争测定来检查天然LAM中各种表位的分布。通过ELISA滴定单个抗体竞争生物素化的探针单克隆抗体与LAM和合成糖缀合物结合的能力。三种单克隆抗LAM抗体A194-01 IgG、CS-35和FIND25的典型竞争曲线示于图13A中。生物素化的探针单克隆抗体当以大量过剩存在时被其未标记的形式竞争。如果有的

话,鼠单克隆抗体908.6与其他抗体的竞争很差。这在一定程度上归因于该抗体的弱亲和力,但还反映了与未封端结构的908.6结合的限制,并且进一步表明甘露糖封端的结构是被CS-35和FIND25识别的ManLAM中的主要靶标。与其广泛的反应性一致,CS-35竞争生物素化的A194-01 IgG的结合,尽管效率低于A194-01 IgG自身,与A104-01 IgG对LAM的更高亲和力一致。CS-35还完全与生物素化的FIND25竞争,然而FIND25仅部分地与标记的CS-35竞争(最大竞争的约74%),而与A194-01 IgG的竞争甚至更低(约50%)。该结果可能反映了被A194-01 IgG和CS-35识别而不被FIND25识别的Ara4结构的存在,该FIND25仅与含有Ara6骨架的结构结合。尽管A194-01 IgG与LAM具有整体高度亲和力,但它仅与自身竞争,但不与CS-35或FIND25竞争。这表明被鼠单克隆抗体识别的LAM中的位点被二甘露糖和三甘露糖封端的结构支配,这些结构不被A194-01 IgG识别。

[0265] 使用与二甘露糖封端的ManLAM特异性结合的P30B9 IgM的另外竞争研究进一步支持了临床上显著的结论,将ManLAM中的绝大多数Ara6结构用二甘露糖封端,并且大部分二甘露糖帽驻留在结核分枝杆菌衍生的ManLAM中的Ara6结构上。P30B9 IgM与FIND25竞争与ManLAM的约80%的结合(图13B),与被FIND25识别的也被P30B9 IgM识别的大多数Ara6结构一致。由于PILAM中缺乏甘露糖基化,P30B9 IgM不竞争FIND25与PILAM的结合,与PILAM中P30B9二甘露糖表位的不存在一致。此外,A194-01 IgG不竞争FIND25与ManLAM的结合,再次与具有二甘露糖帽的大多数Ara6结构一致,这些帽不被A194-01 IgG识别。确认甘露糖基化在该作用中的作用,A194-01 IgG非常有效地竞争FIND25与PILAM的结合,与A194-01对PILAM的高亲和力和该抗原中不存在甘露糖封端一致。

[0266] 生物素化的P30B9 IgM结合的竞争数据进一步支持了这一结论。生物素化的P30B9 IgM的结合被自身以及以与CS-35和FIND25同等的效率最有效地竞争,但是被A194-01 IgG仅微弱且不完全地竞争(图13C)。FIND25的竞争水平接近100%,表明基本上所有依赖于二甘露糖的P30B9 IgM结合位点都位于Ara6结构。与此解释一致,CS-35还竞争P30B9与二甘露糖封端的Ara4(YB-8-111)和二甘露糖封端的Ara6(YB-8-125)的结合,然而FIND170仅竞争后一种抗原,并且A194-01 IgG对两者都不竞争。ManLAM和同源YB-8-125糖缀合物的竞争曲线之间的一般相似性表明竞争结果与单个碳水化合物侧链上相关表位的存在或不存在相关,并且表明由于抗体与更远的异源位点结合而产生的空间效应在竞争中几乎没有任何作用。

[0267] 一个令人惊讶和意想不到的结果是A194-01 IgG相对CS-35和FIND25之间完全缺乏竞争。由于CS-35对所有A194-01 IgG靶标的识别,预期CS-35竞争A194-01 IgG与ManLAM结合的能力,与A194-01 IgG自身相比,CS-35的竞争效率较低与这些抗体对ManLAM的相对亲和力一致(图3)。类似地,FIND25对A194-01 IgG结合的不完全竞争可以通过前者识别的Ara4靶标的存在而不是后一种抗体的存在来解释。

[0268] CS-35和FIND170对生物素化P30B9 IgM结合的有效和完全竞争表明被P30B9 IgM识别的二甘露糖帽几乎完全存在被FIND mAb识别的Ara6结构,其具有临床和诊断意义。这得到了P30B9 IgM对FIND25的结合的相对有效竞争的支持,其阻断了FIND25与ManLAM的约80%的结合活性,但对PILAM没有影响。这强烈表明,被FIND25识别的ManLAM中约80%的Ara6位点含有二甘露糖帽,并且基本上所有的二甘露糖帽都存在于Ara6上,而不存在于Ara4结构上。结合A194-01 IgG不能与CS-35或FIND25竞争,这些结果表明,经二甘露糖取代

的Ara6是衍生自结核分枝杆菌的ManLAM的主要免疫原性结构,并且因此代表了非常重要的抗原靶标。

[0269] 对患者血浆中LAM特异性抗体应答的研究表明,该应答受针对线性Ara4/Ara6结构的IgG2同种型的支配,与映射无关。P30B9 IgM被对阿拉伯呋喃糖依赖性表位(如CS-35和FIND25)特异的IgG单克隆抗LAM抗体的有效竞争表明针对在患者血浆中此类表位的主要IgG2应答也将竞争二甘露糖依赖性的任何可以较低滴度产生的ManLAM特异性抗体。因此,即使后一类抗体可能具有更有效的抗细菌活性,这些作用可能受限于针对患者血清中存在的阿拉伯糖依赖性表位的主要非功能性IgG2抗体对结合的竞争。不希望受理论束缚,主要的体液反应实际上可以保护细菌免受稀有抗体(例如多价抗体像P30B9 IgM,或A194-01的工程化变体和/或衍生物,例如可提供针对感染和致病性的免疫控制的五价IgM同种型或四价scFv-IgG)的潜在影响。

[0270] 5. 化合价对A194-01结合的影响

[0271] 发现二甘露糖反应性P30B9对其IgM同种型的依赖性的反应性表明多价可以促成抗体对LAM的亲合力。不希望受理论束缚,这表明单个LAM分子具有多个抗体结合位点或表位,与已知的分支结构和LAM的复杂性一致,并且表明具有更高化合价的抗体能够与更多的二价抗体结合,从而产生更大的亲合力。使用生物素化的A194-01 IgG作为靶标,在结合竞争测定中,针对人单克隆抗体A194-01的各种工程化变体和/或衍生形式和/或同种型,检查抗体化合价对与LAM的结合效率的影响。抗体形式包括单价单链scFv(其中VH和VL区通过柔性肽接头连接)、单价Fab蛋白、二聚体scFv蛋白(其中两个scFv结构域通过柔性接头连接)、天然二聚体IgG(图1A)、和两种更高化合价形式(四价A194-01 scFv-IgG和五价(结合位点的十价)IgM同种型)(图1B)。将完整的二价IgG转化为单价Fab导致非常大的结合活性的丧失,其中与针对自身的IgG相比,竞争生物素化的A194-01IgG的50%结合活性所需的浓度增加>100倍(图1C)。单链还竞争效率低下,其中活性减少了33倍。另一方面,scFv二聚体以与A194-01的IgG同种型相似的效率竞争。不希望受理论束缚,这表明二价形式的A194-01与LAM的有效结合需要将两个结合位点附接到单个抗原分子中的相邻靶标上。更高化合价形式在摩尔基础上更有效地竞争。这可能仅仅是由于存在另外的结合位点,但还可能反映了更高化合价形式的增加的亲合力。

[0272] 将A194-01的四聚体scFv-IgG变体和/或衍生物与A194-01的十聚体IgM同种型的特异性与针对上述合成糖缀合物组的A194-01的IgG同种型的特异性进行比较(图14)。这揭示了工程化的scFv-IgG变体和工程化的IgM同种型与IgG同种型仅弱识别或根本不识别的一些聚糖具有更广泛的反应性。在二甘露糖封端的结构(YB-8-111、YB-8-125、YB-8-133)的情况下并且在一些三甘露糖封端的结构(YB-8-113、YB-8-143、YB-BSA-13)的情况下,看到增强的结合,其中A194-01的工程化IgM同种型具有最广泛的反应性小组。鉴于二甘露糖封端的重要性,这具有显著的诊断和治疗潜力。有趣的是,针对具有缺失末端 $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)键(YB-BSA-09)的阿拉伯糖结构的A194-01 IgM同种型,看到增强的反应性,该阿拉伯糖结构没有被任何所测试的单克隆抗LAM抗体识别。不希望受理论束缚,这表明增加的化合价导致A194-01的IgM同种型对其含基本阿拉伯糖的表位的亲合力增强,到了终端取代的抑制作用被克服的程度。

[0273] 通过针对ManLAM或PILAM的相互结合竞争实验进一步分析A194-01 IgG和A194-01

的工程化IgM和scFv-IgG形式的反应性特征。然而所有三种形式交叉竞争生物素化抗体与PILAM的结合以及A194-01 IgG与ManLAM的结合,只有较高化合价的scFv-IgG和IgM形式的A194-01与修饰的抗体与ManLAM的结合有效竞争。竞争活性的这些差异与工程化形式的更广泛的结合特征一致,并且表明它们与LAM上未被IgG形式识别的位点结合。

[0274] 这一结论得到了相互竞争研究的进一步支持,其中A194-01的不同同种型竞争生物素化的FIND25 IgG和P30B9 IgM与ManLAM的结合。然而A194-01 IgG不竞争P30B9 IgM和FIND25与ManLAM的结合,但scFv-IgG和IgM形式的A194-01几乎完全竞争这两种单克隆抗体的结合(图15A、图15B)。如所预期的,所有三种形式的A194-01竞争FIND25与PILAM的结合(图15C),与PILAM中甘露糖基化的不存在一致。这种增强的活性表明这些修饰将增强该抗体用于免疫诊断应用的潜在效用,并且还可以增加这些试剂作为免疫治疗目的的有效性。

[0275] 实例2-分离和表征对结核分枝杆菌的糖脂特异的新颖的人单克隆抗体-分离对LAM和PIM6共有的表位特异的第一mAb。

[0276] 通过筛选与来自患有潜伏性结核感染(LTBI)的患者的ManLAM的反应性,从单个B细胞克隆中分离P95C1抗体重链和轻链。P95C1是IgM同种型抗体,其与ManLAM和PILAM结合。这通过糖缀合物结合研究显示,表明P95C1不与任何表达各种阿拉伯糖侧链的分子结合,所述侧链未封端或用各种甘露糖结构封端。唯一被识别的结构是两个具有结构基序的多聚糖结构,这些结构基序存在于甘露聚糖基中,在PIM6和各种LAM之间是保守的(图18(A)、图18(B)、图18(C))。通过蛋白质印迹测定证实该LAM-PIM6交叉反应性,显示出A194-01和P30B9仅与LAM结合,P95C1也与LAM前体糖脂分子(LM和PIM6)反应(图20(A)、图20(B))。

[0277] 尽管P95C1与P30B9一样,天然表达为IgM,但与P30B9相反,它当转化为IgA或IgG同种型时保留了反应性(图19)。这可能反映了LAM分子的甘露聚糖区域中表位或其位置的性质,或者可能与P95C1可变区中更高数量的突变有关,与更成熟的抗体序列一致。P95C1重链和轻链的可变区分别从其最近种系抗体序列中具有19和13个氨基酸点突变。

[0278] 最近已经表明,患有潜伏性疾病的个体产生的抗体在促进吞噬溶酶体融合炎症小体激活和内化分枝杆菌的巨噬细胞杀伤方面在功能上优于患有活动性结核病产生的抗体(Lu等人,2016)。因此,感兴趣的是,P95C1从LTBI患者中分离,并且它在其可变区比P30B9和另外两种LAM特异性mAb具有更多的突变,该另外两种LAM特异性mAb分离自具有不同ManLAM表位特异性的相同LTBI患者。

[0279] 关于针对结核分枝杆菌感染的人体液免疫应答的性质知之甚少。尽管众所周知,结核分枝杆菌的表面糖脂有助于抑制巨噬细胞和树突状细胞的活性,但是关于甘露糖封端的脂阿拉伯甘露聚糖(ManLAM)或磷脂酰肌醇甘露糖苷6(PIM6)是否是结核分枝杆菌的主要免疫抑制表面组分,存在矛盾的信息。ManLAM对PIM6的纯化制剂的常见污染进一步加剧了这个问题,反之亦然。解决该问题的一种方法是测试对这两种调节剂特异的抗体抑制这些抑制活性的能力。然而,由于对这两种抗原特异的充分表征的抗体的不存在,这是不可能的。迄今为止,还没有报道识别PIM6的抗体,并且本发明描述了识别PIM6的第一种高亲和力mAb。PIM(PIM2和PIM4)是ManLAM的前体,并且ManLAM的甘露聚糖结构域与PIM6的多甘露糖结构之间存在一些结构关系。

[0280] 抗体可以两种方式发挥其功能:1)通过直接阻断宿主细胞的侵袭和中和细菌产物,2)间接通过Fc介导的补体和通过Fc受体的细胞激活机制。抗体介导的效应子功能受抗

体同种型的极大影响。最近的一项研究显示人同种型依赖性抑制抗体对结核分枝杆菌的应答,并证明对不同结核分枝杆菌表面抗原特异的IgA而非IgG抗体可以阻断肺上皮细胞对结核分枝杆菌的摄取,而与IgA Fc受体的表达无关。为了测试P95C1同种型对LAM结合的影响,用CH-IgA和CH-IgG替换P95C1-IgM重链的恒定区以产生P95C1-IgA和P95C1-IgG。P95C1同种型(IgM、IgA、IgG)与ManLAM和PILAM的结合亲和力是相当的(图19)。

#### [0281] 其他实施例

[0282] 可以在部分或全部抗体、组合物、试剂盒和方法中进行任何改进。本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过援引并入本文。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“例如”)的应用旨在说明本发明,而不对另外要求保护的本发明范围做出限制。本文关于本发明的或优选实施例的性质或益处的任何陈述并非旨在进行限制,并且所附权利要求不应被视为受这些陈述的限制。更一般地,说明书中的语言不应当被解释为指示任何未要求保护的要素为实践本发明所必需的。本发明包括如适用法律允许的本文所附权利要求中所述主题的所有变更和等效物。此外,在所有可能的变体中上述元件的任何组合涵盖于本发明中,除非本文另外说明或另外与上下文明显矛盾。

## 序列表

- <110> 新泽西鲁特格斯州立大学
- <120> 用于诊断和治疗结核分枝杆菌感染的新颖抗LAM和抗PIM6/LAM单克隆抗体
- <130> 096747.00337
- <150> 62/293,406
- <151> 2016-02-10
- <160> 50
- <170> PatentIn版本3.5
- <210> 1
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)
- <400> 1
- Arg Ser Ile Arg Ser Ala  
1 5
- <210> 2
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)
- <400> 2
- Gly Ala Ser  
1
- [0001]
- <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)
- <400> 3
- Gln Gln Tyr Asp Phe Trp Tyr Thr Phe  
1 5
- <210> 4
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)
- <400> 4
- Gly Phe Asn Phe Glu Asp Phe Gly  
1 5
- <210> 5
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)
- <400> 5
- Ile Ser Trp Asn Gly Ala Asn Ile  
1 5
- <210> 6
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> 智人(homo sapiens)

<400> 6

Ile Asp Trp Tyr Arg Asp Asp Tyr Tyr Lys Met Asp Val  
1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 7

Gln Ser Ile Asn Ser Asn  
1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 8

Lys Ala Ser  
1

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 9

Gln Gln Tyr Lys Ala Phe Lys Thr Phe  
1 5

[0002]

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 10

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 11

Phe Asp Leu Gly Gly Ser Ile Thr His Ser Arg Gly Thr  
1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 12

Arg Gly Leu Ala Met Gly Gly Thr Lys Glu Phe Asp Ser  
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 13

Gln Asn Val Leu Asp Ser Ala Asn Asn Arg Asn Tyr  
1 5 10

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 14

Trp Ala Ser

1

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 15

Thr Gln Tyr His Arg Leu Pro His Thr

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 16

Gly Gly Ser Ile Asn Thr Asn Asn Trp

1

5

[0003]

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 17

Ile His Arg His Gly Asp Thr

1

5

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 18

Cys Pro Leu Gly Tyr Cys Ser Gly Asp Asp Cys His Arg Val Ala

1

5

10

15

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Glu Asp Phe  
 20 25 30

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

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

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

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

<210> 22  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

[0004]

&lt;400&gt; 22

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

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

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

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

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

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

<210> 23  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 23

Ala Ile Asp Trp Tyr Arg Asp Asp Tyr Tyr Lys Met Asp Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 24

<211> 88  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 24  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Ile Arg Ser Ala  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Ile Arg Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85

[0005]

<210> 25  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 25  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85

<210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 26  
 Gln Gln Tyr Asp Phe Trp Tyr Thr  
 1 5

<210> 27  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 27

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Thr Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Glu Phe Asp Leu Gly Gly Ser Ile Thr His Ser Arg Gly Thr Asn  
 50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Val Tyr Tyr Cys  
 100

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 95

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 28

[0006]

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 29

Ala Arg Gly Leu Ala Met Gly Gly Thr Lys Glu Phe Asp Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 88

&lt;212&gt; PRT

<213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 30  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85

<210> 31  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 31  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85

[0007]

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 32  
 Gln Gln Tyr Lys Ala Phe Lys Thr  
 1 5

<210> 33  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Thr Asn  
20 25 30

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

Ile Gly Glu Ile His Arg His Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Arg Arg Val Ser Ile Ser Met Asp Glu Ser Met Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

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

<210> 34

<211> 96

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 34

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

[0008]

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

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

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<211> 94

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Asp Ser  
20 25 30

Ala Asn Asn Arg Asn Tyr Phe Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Gly Leu Gln Val Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90

<210> 37  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

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

[0009]

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90

<210> 38  
 <400> 38  
 000

<210> 39  
 <211> 1356  
 <212> DNA  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 39

caagtgcagc tgttgagtc tgggggaggt gtggtacggc cgggggggct cctgagactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt caactttgaa gattttggca tgagctgggt ccgccaagct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctctagt attagttgga atggtgctaa tataggctat 180  
 gtagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcctatat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttat attactgtgc gatagactgg 300  
 tacagagacg actactacaa gatggacgtc tggggcaaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tcagcctcga ccaagggcc ctcggtcttc ccgctagcgc cctctccaa gagcacctct 420  
 gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc tgtgacggtc 480  
 tegtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc 540

```

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc      780
ctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agcccgggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc cggagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aagcttcta tcccagcgac     1140
atgccctgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaage tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctc gtgatcatg aggtctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt aatga                                  1356
    
```

```

<210> 40
<211> 451
<212> PRT
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 40
    
```

[0010]

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Glu Asp Phe
                20           25           30

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

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

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

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

Ala Ile Asp Trp Tyr Arg Asp Asp Tyr Tyr Lys Met Asp Val Trp Gly
                100          105          110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

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

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

[0011] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 450

<210> 41  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 41  
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtct ctcagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtcg gagtattcgc agcgccttag cctggtacca gcacaaacct 120  
 ggcagagctc ccaggtcctc catcttttgt gcatccaeca gggccactgg tateccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccgtcagcag catacggctt 240  
 gaggattctg cagtttatta ctgtcagcag tatgatttct ggtacacttt tggccagggg 300  
 accaagctgg agatcaaagc aactgtggct gcaccatctg tcttcactct cccgccatct 360  
 gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420  
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtcgac aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480  
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540  
 agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600  
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 42  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 42

[0012]

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Ile Arg Ser Ala  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Phe Trp Tyr Thr  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 43  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 智人(homo sapiens)

<400> 43

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Thr Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Glu Phe Asp Leu Gly Gly Ser Ile Thr His Ser Arg Gly Thr Asn  
50 55 60

[0013]

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser  
65 70 75 80

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Ala Met Gly Gly Thr Lys Glu  
100 105 110

Phe Asp Ser  
115

<210> 44  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> 智人(homo sapiens)

<400> 44

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ala Phe Lys Thr  
85 90 95

<210> 45  
<211> 379  
<212> DNA  
<213> 智人(homo sapiens)

<400> 45  
caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60  
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagtcc 120  
ccagagacgg ggctggagtg gcttggcgaa ttcgatcttg gtggaagcat cactcatagt 180  
agaggcacca actacaacc gtcgtcaag agtcgagtc ccatctcagg agacacgtcc 240  
aagaaccagt tctccctgaa actgacctct gtgaccgccg cggacacggc tgtctattac 300  
tgtcgcagag gtttagcaat ggggtggaact aaggagttag actcctgggg ccaggggaacc 360  
ctggtcaccg tctcctcag 379

<210> 46  
<211> 319  
<212> DNA  
<213> 智人(homo sapiens)

[0014]

<400> 46  
gacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60  
atcacttgcc gggccagtca gactattaat agtaatttgg cctggtatca gcagaaaccg 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctgatt tagaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gatgattttg caacttatta ttgccaacag tataaagcat tcaagacgtt cggccacggg 300  
accaaggtgg aatcaaac 319

<210> 47  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> 智人(homo sapiens)

<400> 47  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Trp Gly  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Thr Asn  
20 25 30  
Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45  
Ile Gly Glu Ile His Arg His Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60  
Lys Arg Arg Val Ser Ile Ser Met Asp Glu Ser Met Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ile Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Cys Pro Leu Gly Tyr Cys Ser Gly Asp Asp Cys His Arg Val Ala  
 100 105 110

<210> 48  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Asp Ser  
 20 25 30

Ala Asn Asn Arg Asn Tyr Phe Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

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

Ile Ser Gly Leu Gln Val Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gln  
 85 90 95

[0015]

Tyr His Arg Leu Pro His Thr  
 100

<210> 49  
 <211> 367  
 <212> DNA  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 49  
 gaggtgcagc tcttggagtc gggcccagga ctggtgagge cttgggggac tctgtccctc 60  
 acctgcgctg tctctggttg ctccatcaat actaataact ggtggagttg ggtccgccag 120  
 tccccgggga aggggctgga gtggattgga gaaatccatc gtcattggga caccaactac 180  
 aaccctcac tcaagaggcg agtctccata tcgatggacg agtccatgaa ccagttctcc 240  
 ctgaggctta tctctgtgac ccccgggac acggccgtgt attactgttg tcccctagga 300  
 tattgtagtg gtgatgactg tcaccgagtt gctggggccc ggggaatcct ggtcacctgc 360  
 tcttcag 367

<210> 50  
 <211> 340  
 <212> DNA  
 <213> 智人(homo sapiens)

<400> 50  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gaatgtttta gacagcgcca acaataggaa ctacttcggt 120  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca tttctgggc atctacacgg 180

---

	gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcggctctg ggacagactt cactctcatc	240
[0016]	atcagcggcc tgcaggttga agatgtggca gtttattact gtacacagta tcatagactt	300
	cctcacacct tcggccaagg gacacgactg gaaattaaac	340

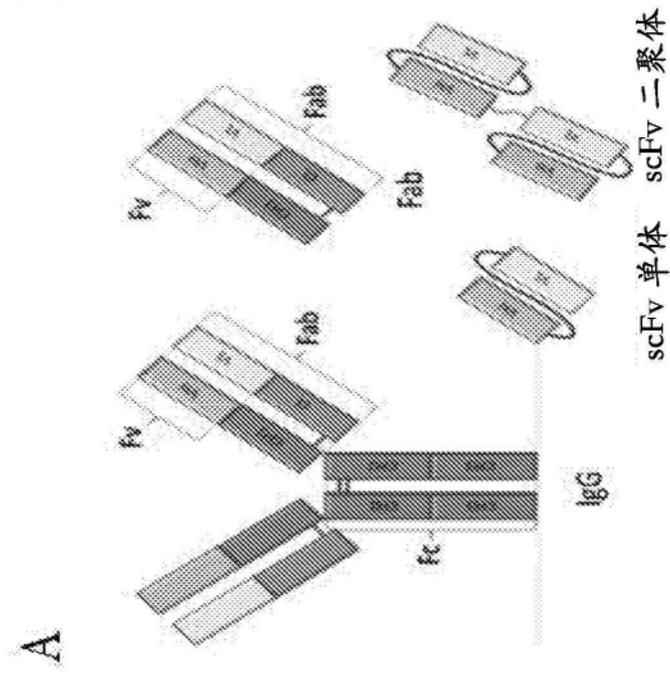


图1A

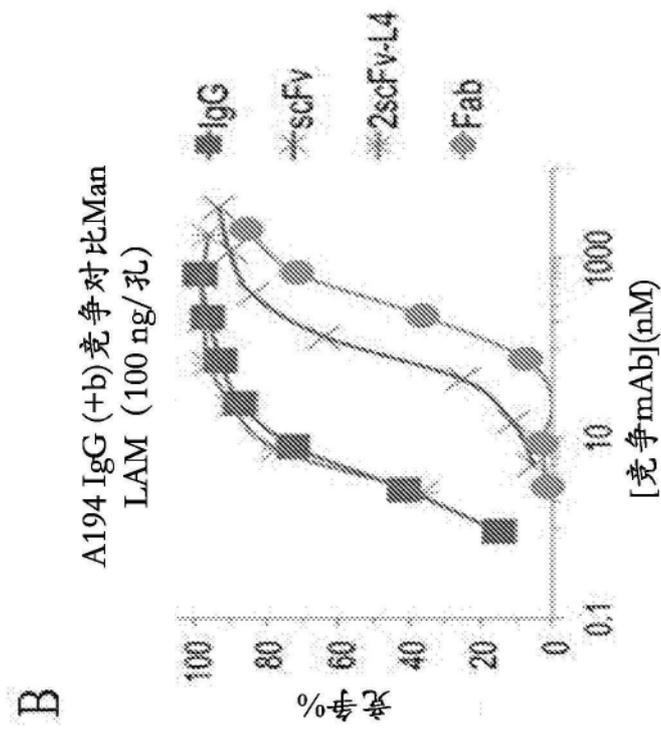


图1B

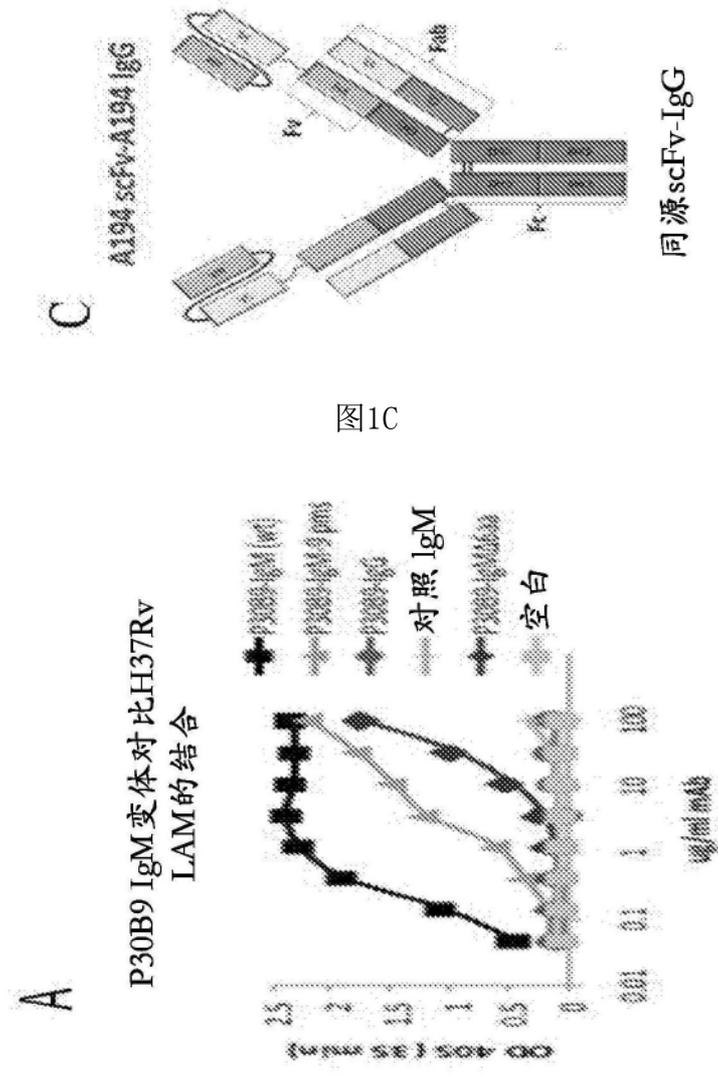


图1C

图2A

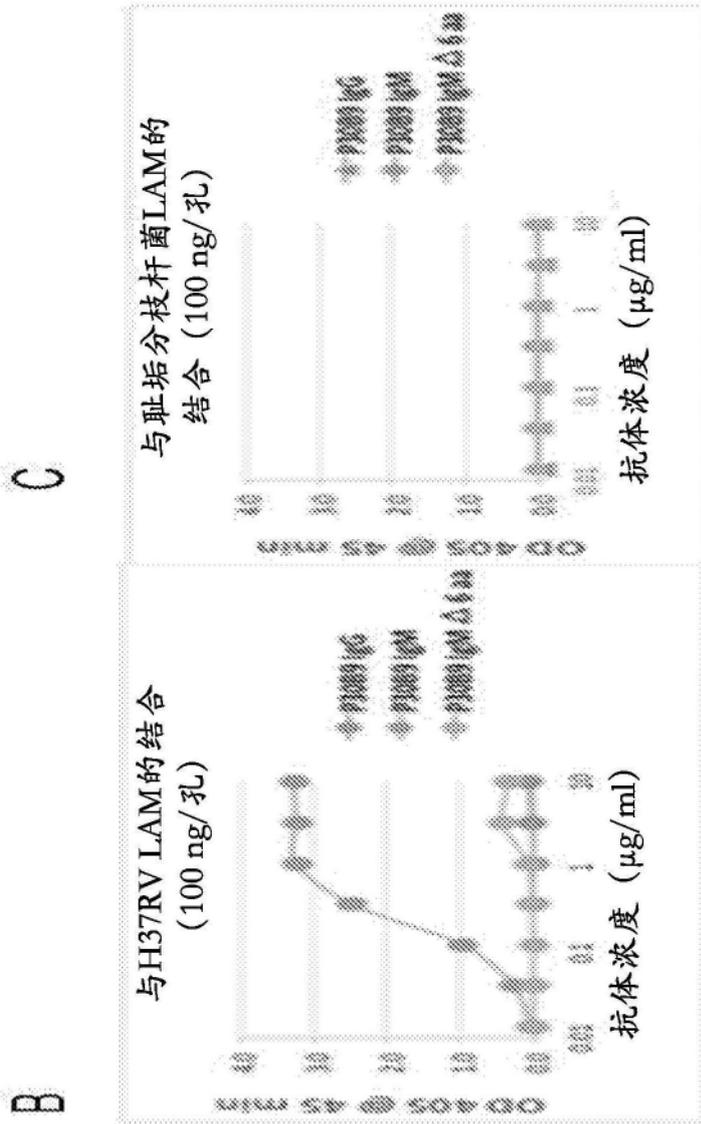


图2C

图2B

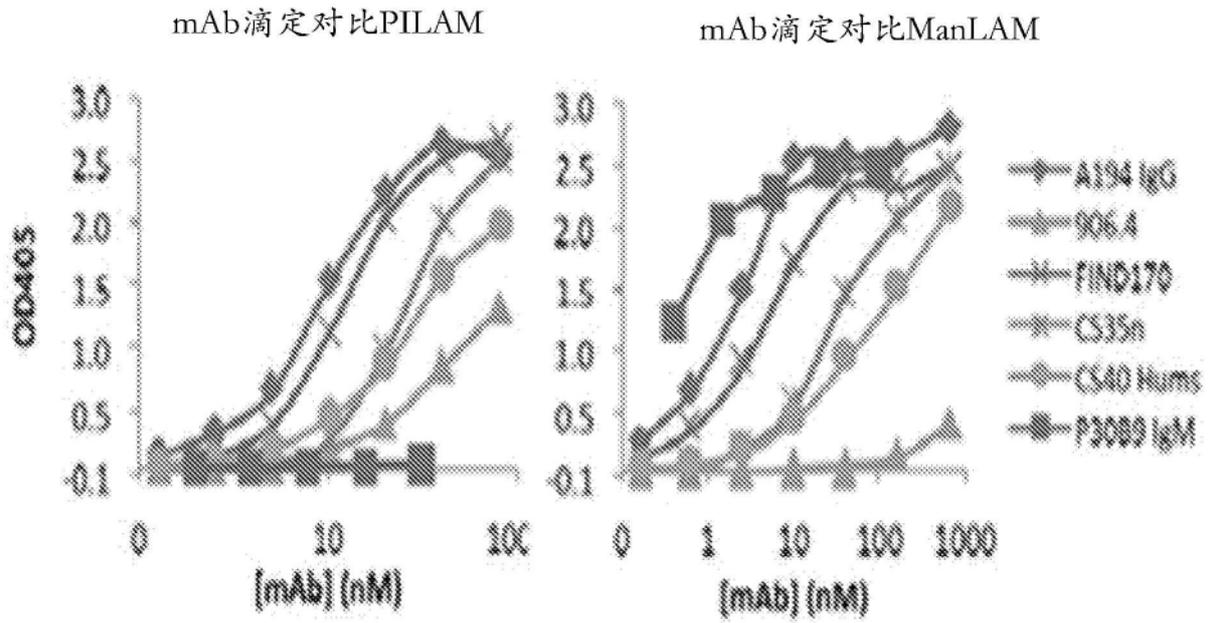


图3

4A

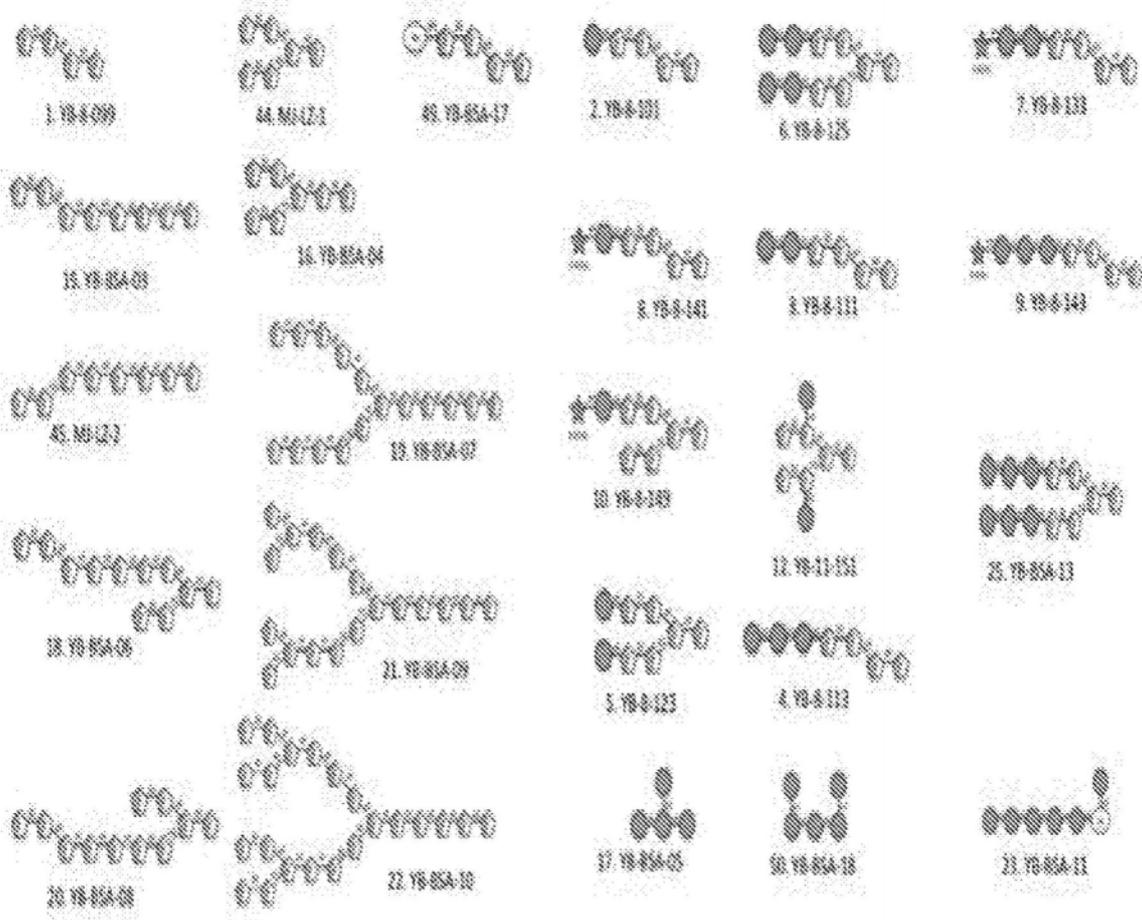


图4A



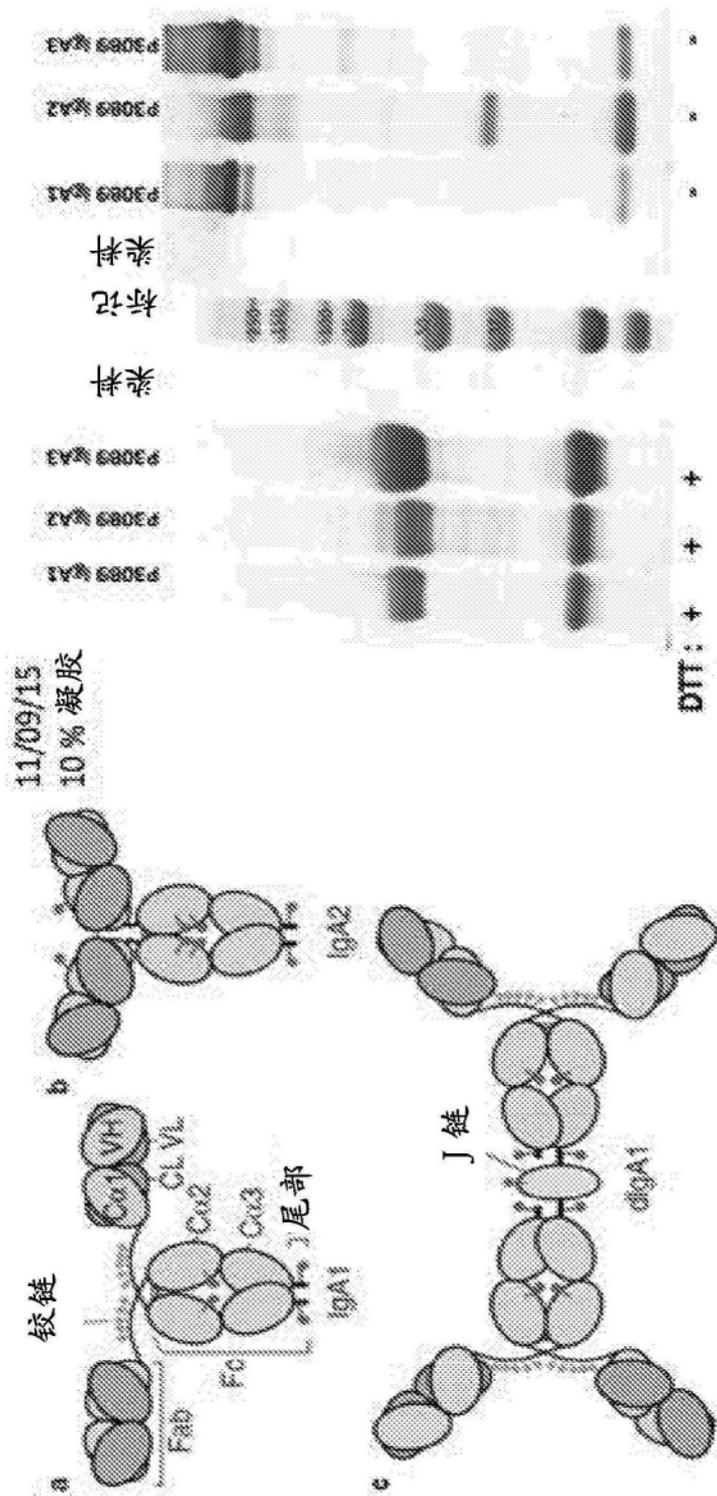


图5

在manLAM上P30B9的结合

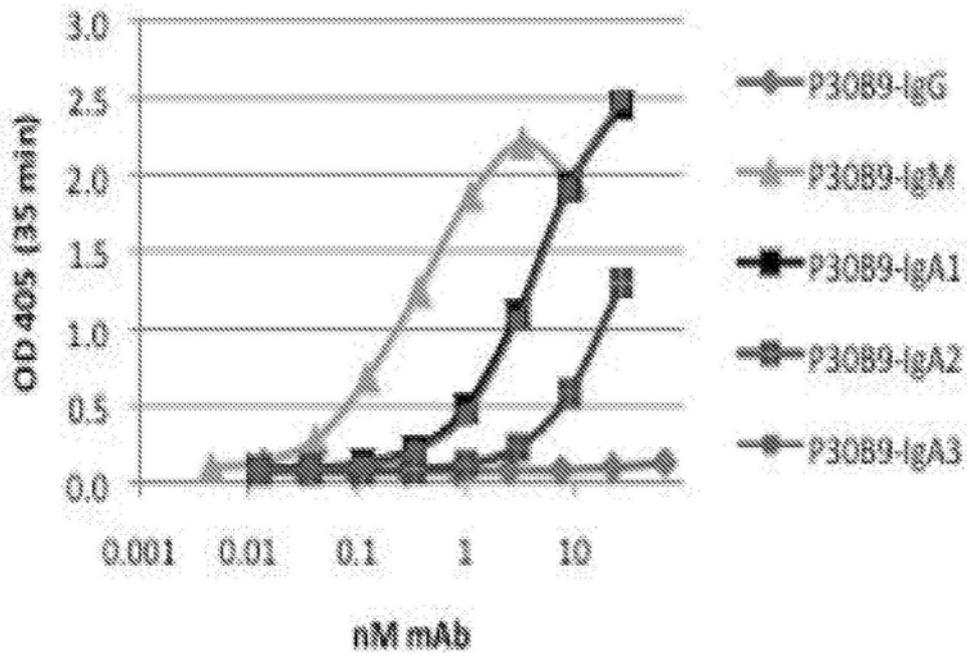


图6

在捕获测定中ManLAM的检测的灵敏度

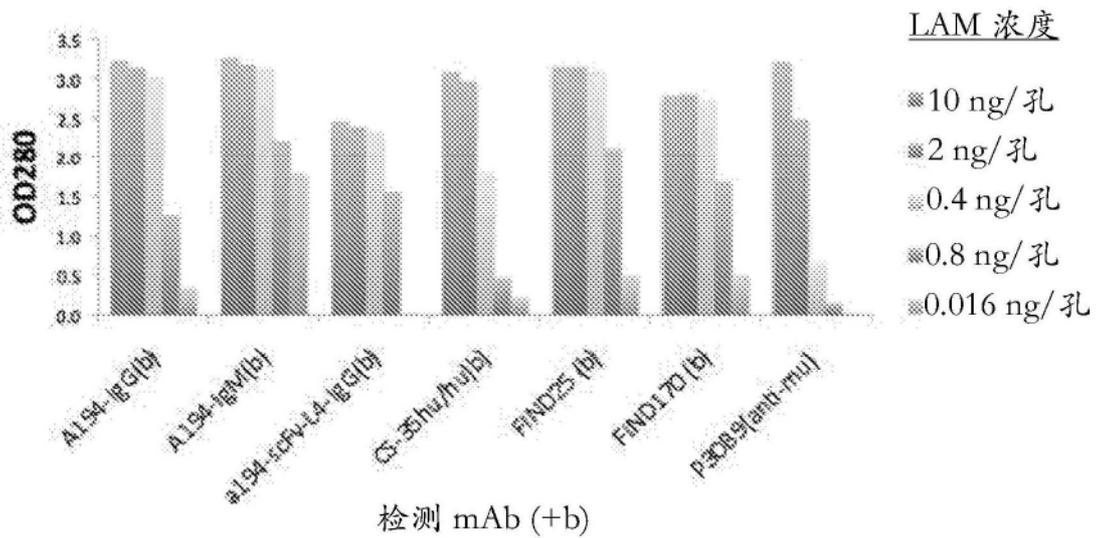


图7

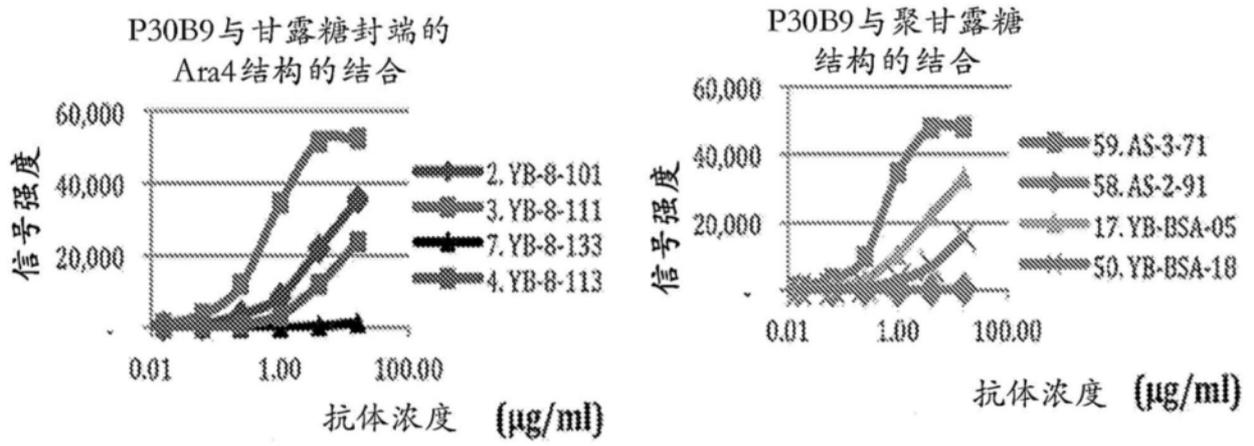


图8A

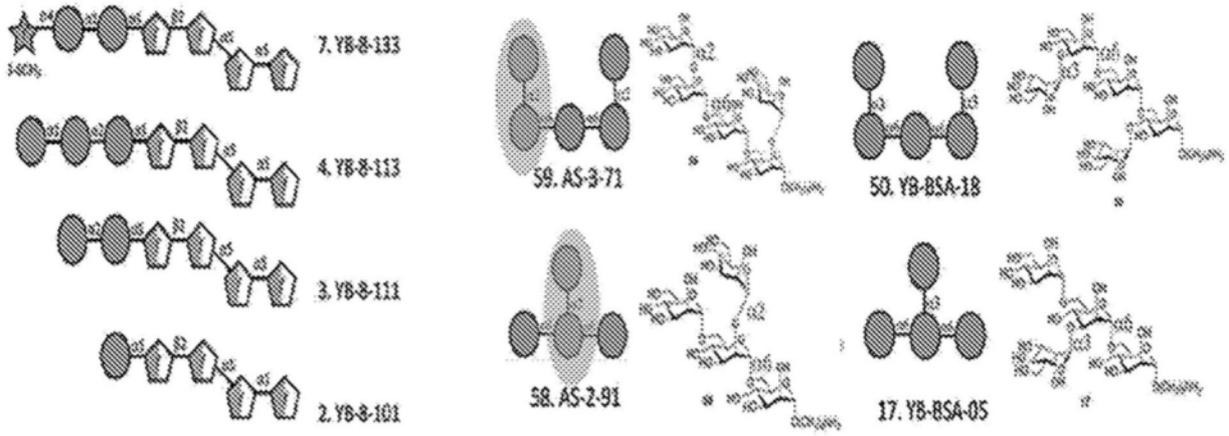


图8B

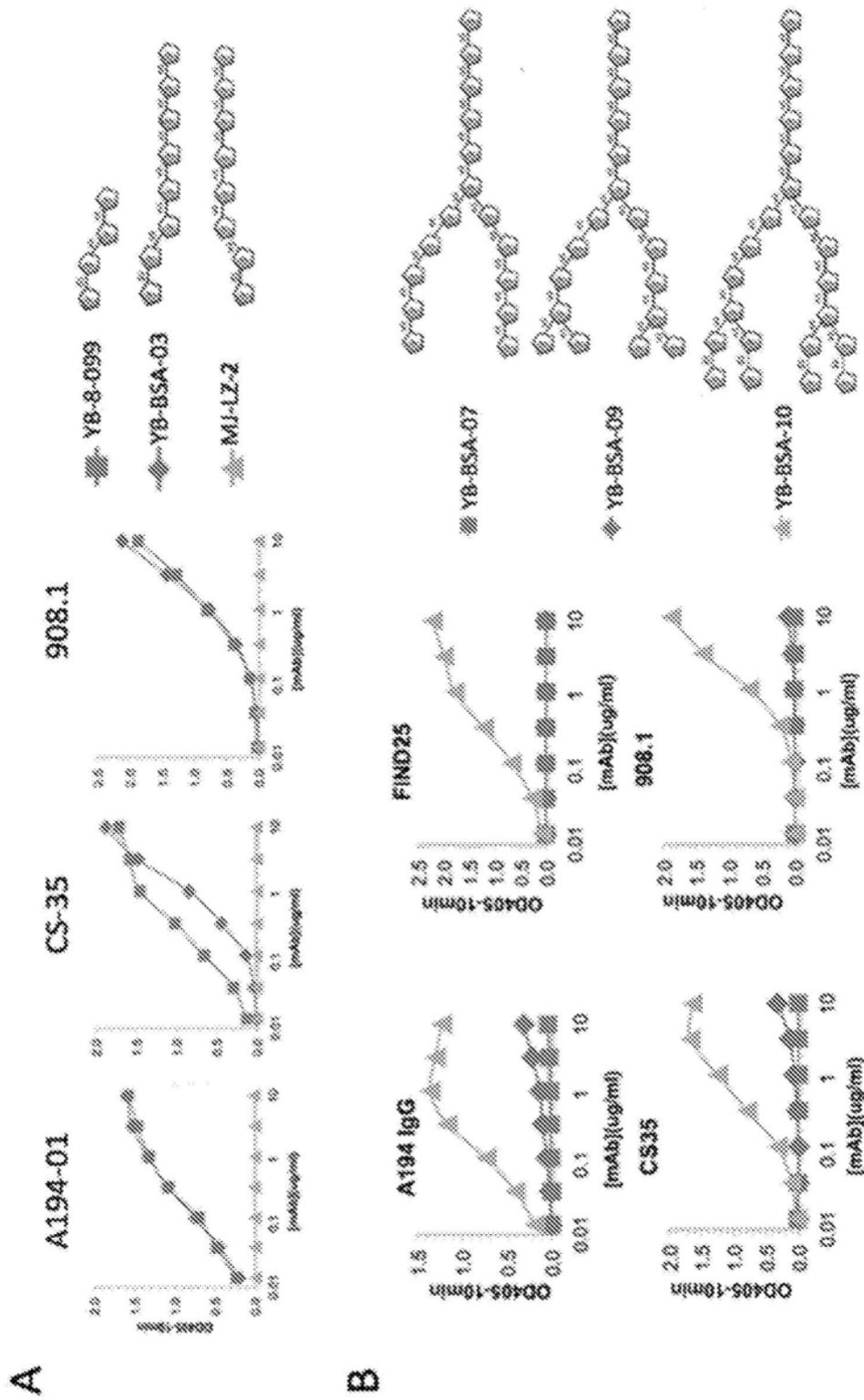


图9

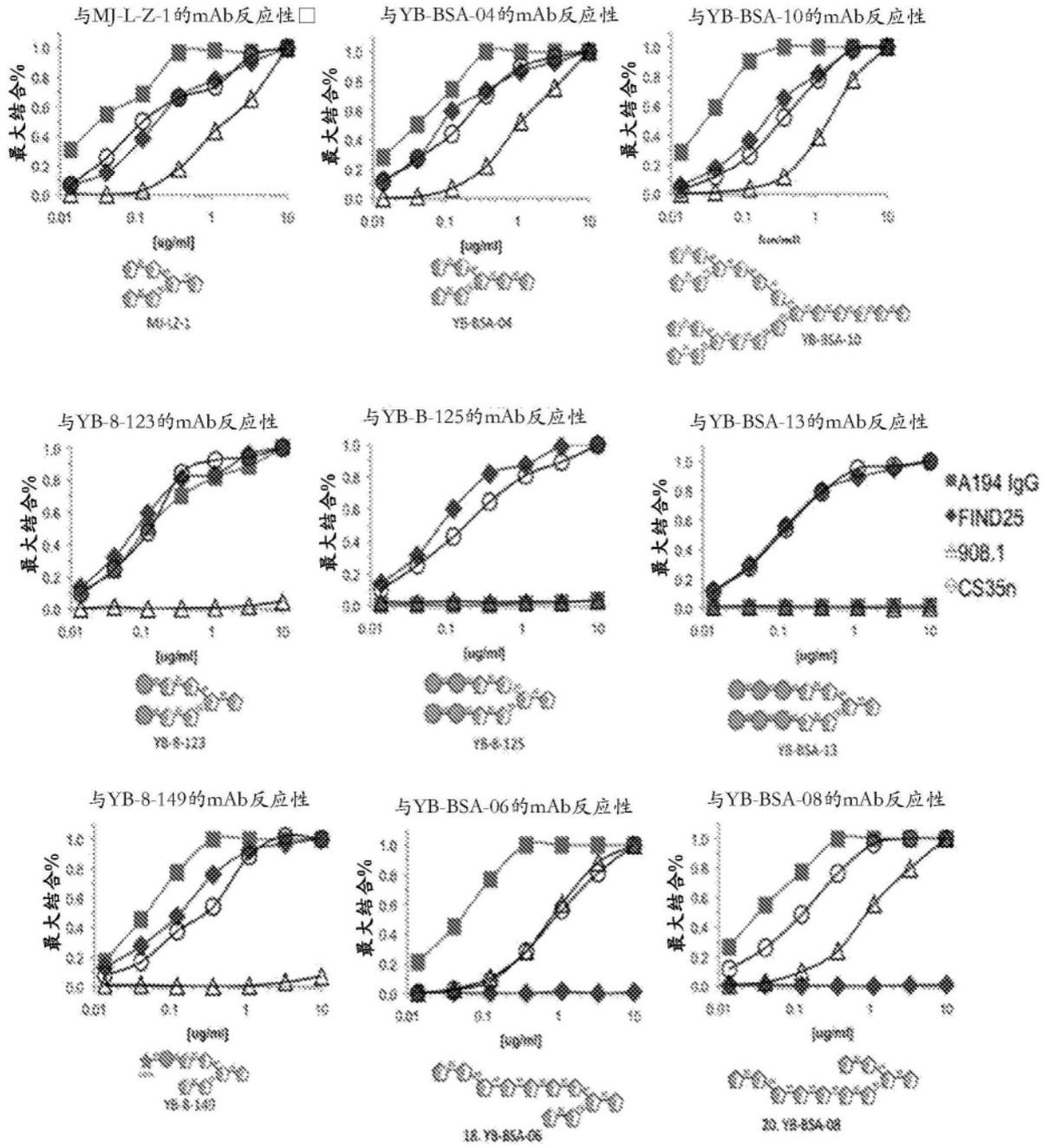


图10

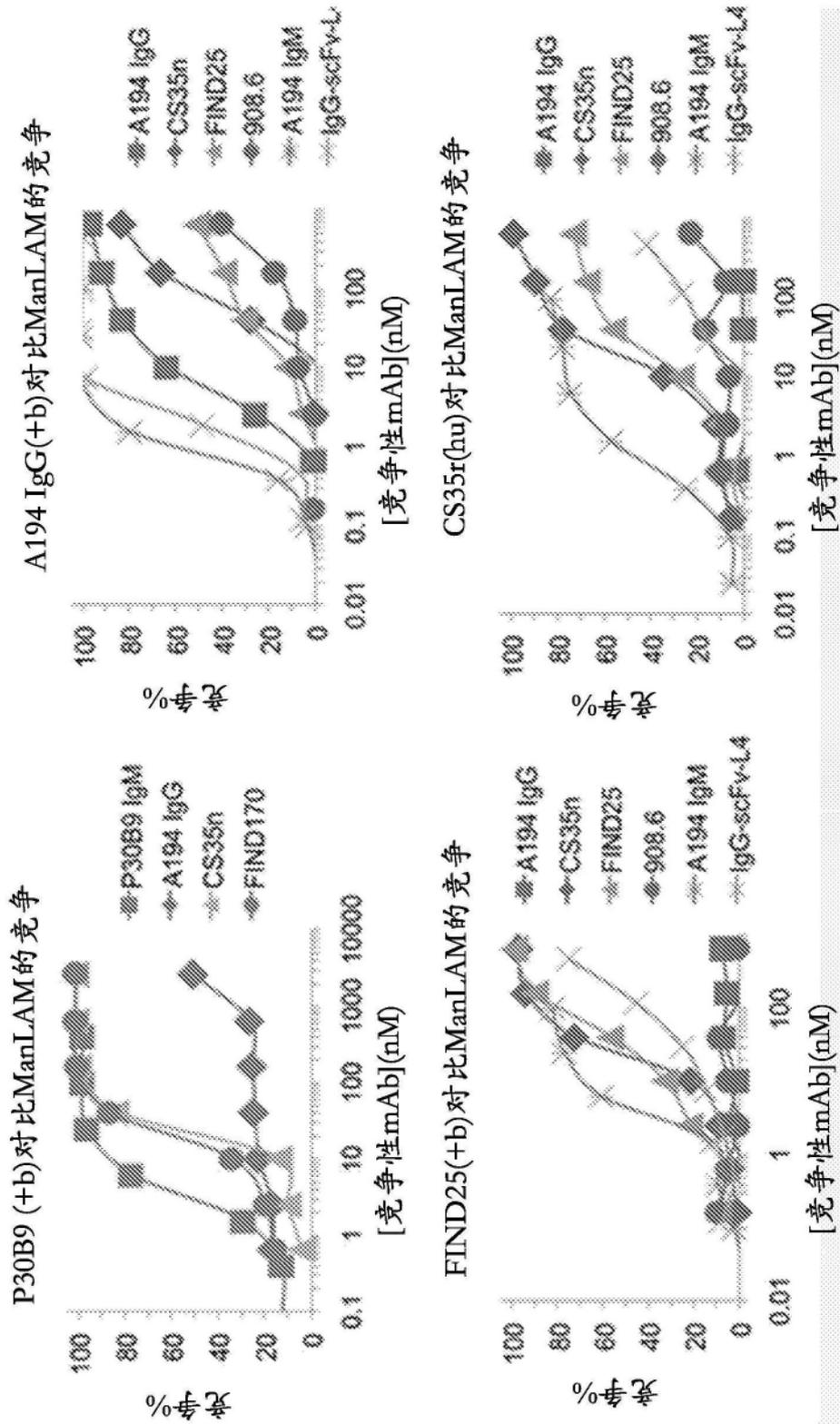


图11

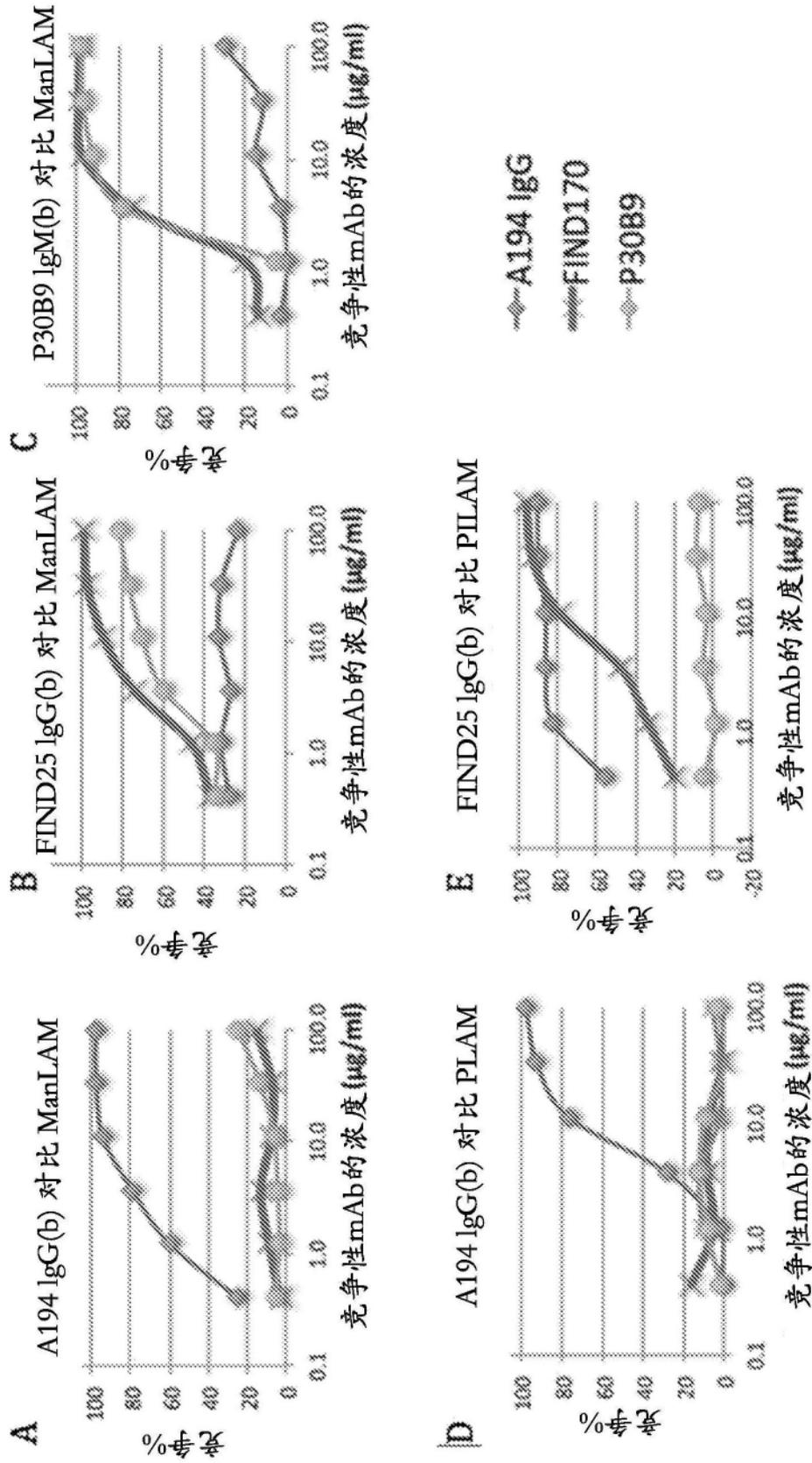


图12

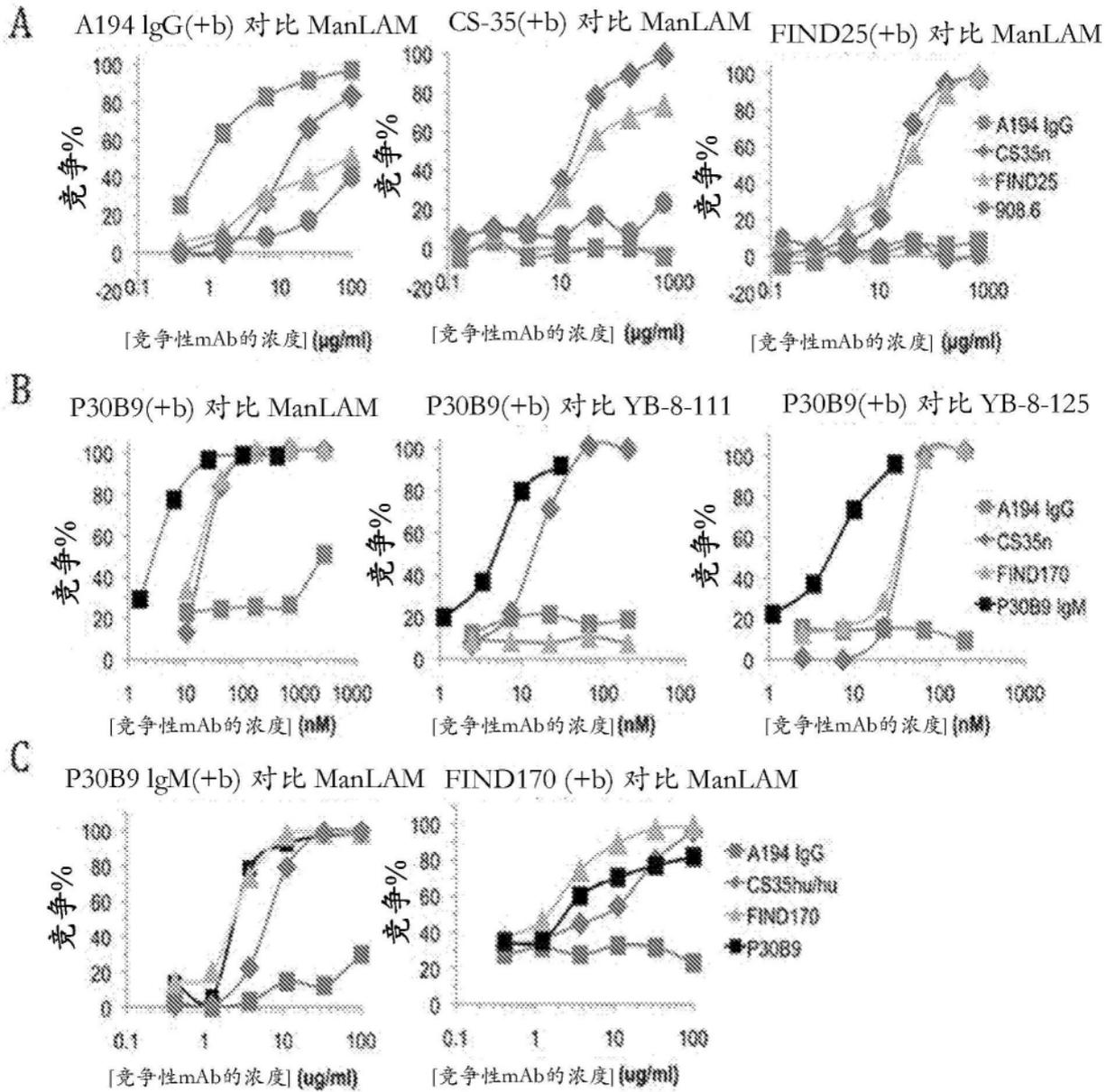


图13

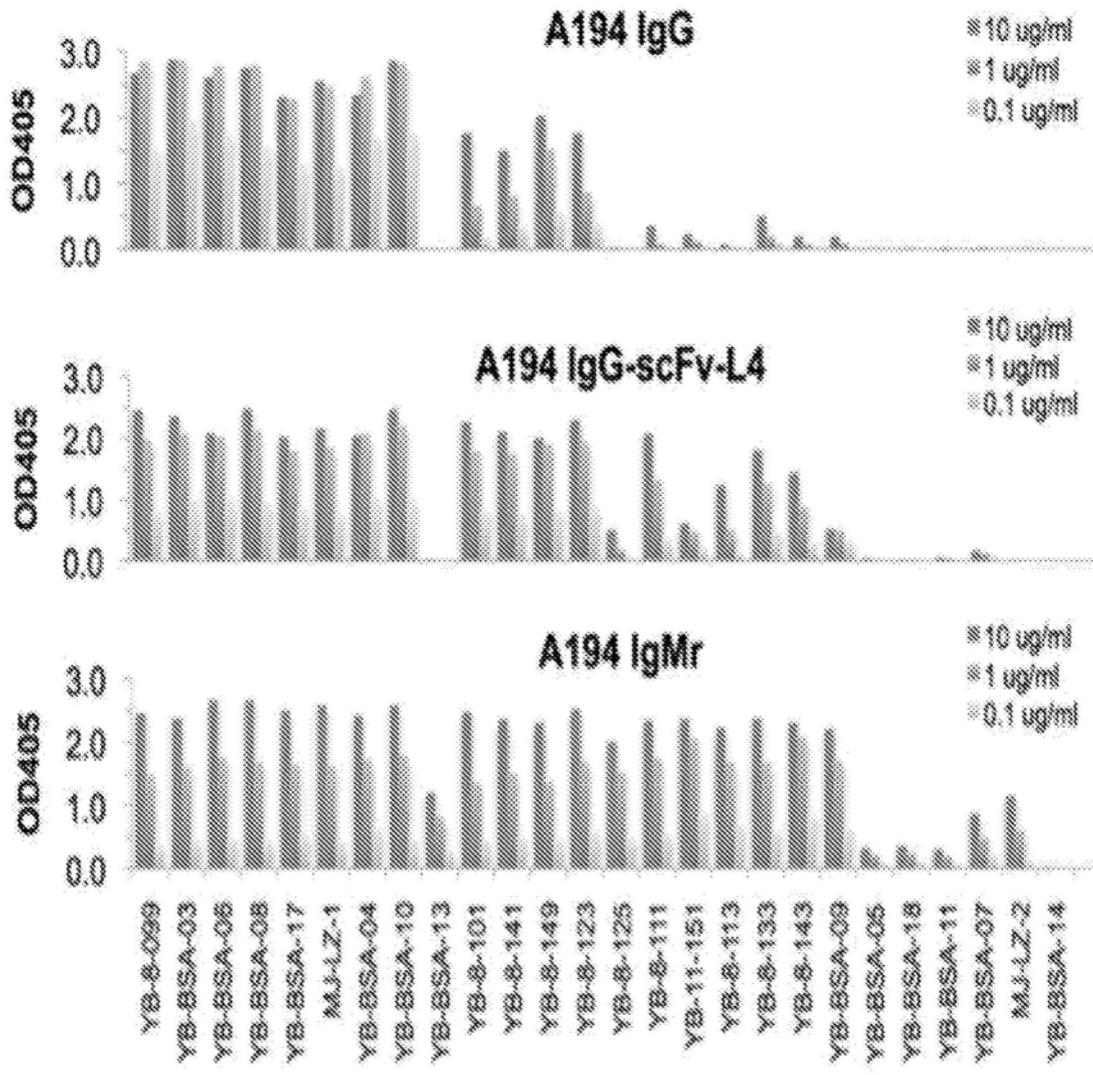


图14

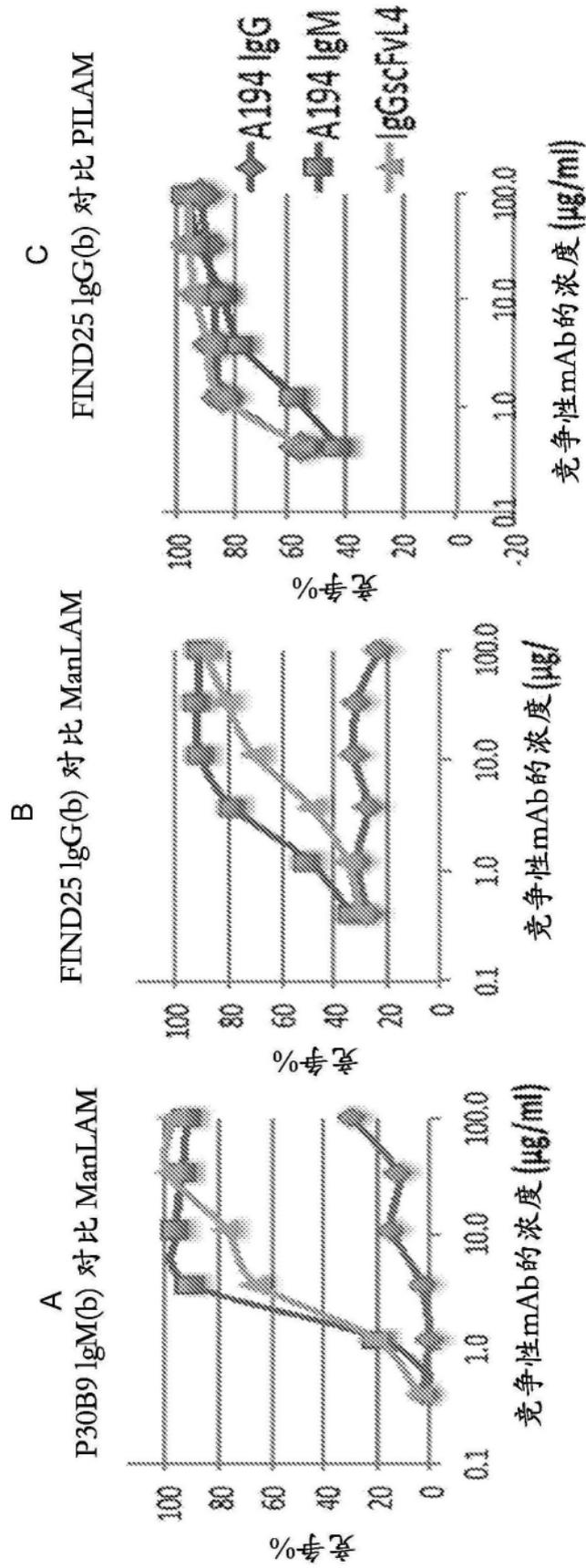


图15

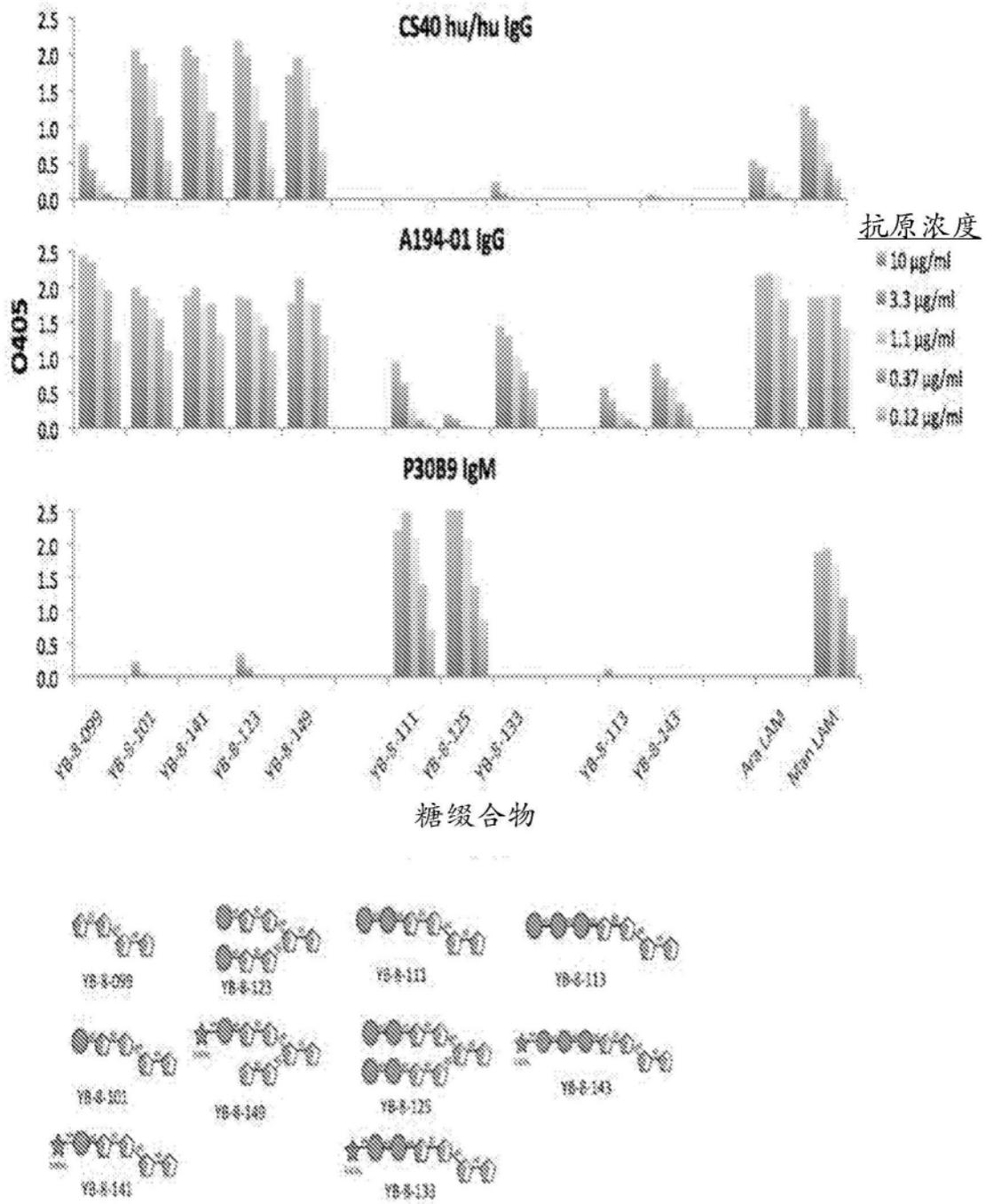


图16

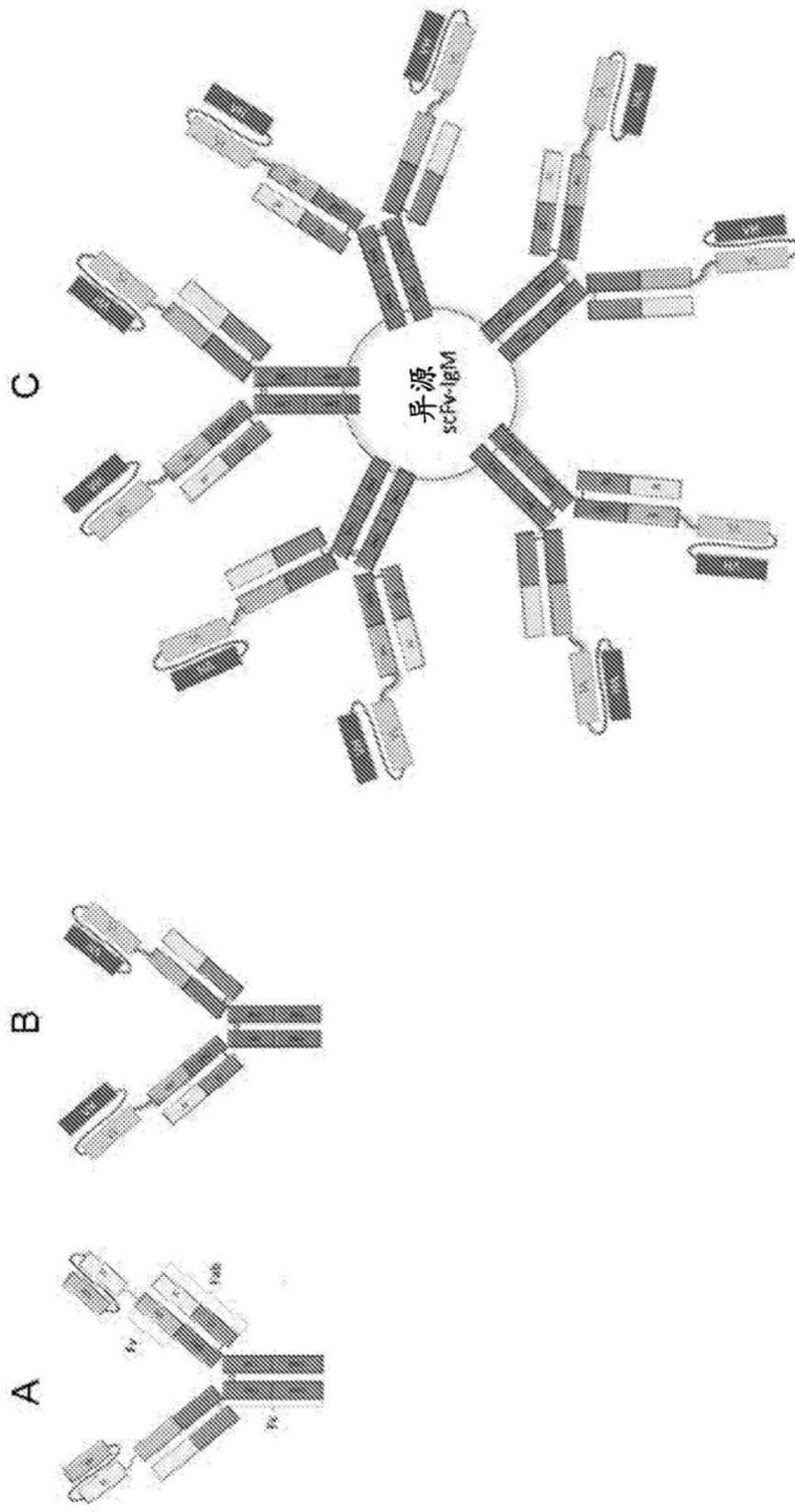


图17

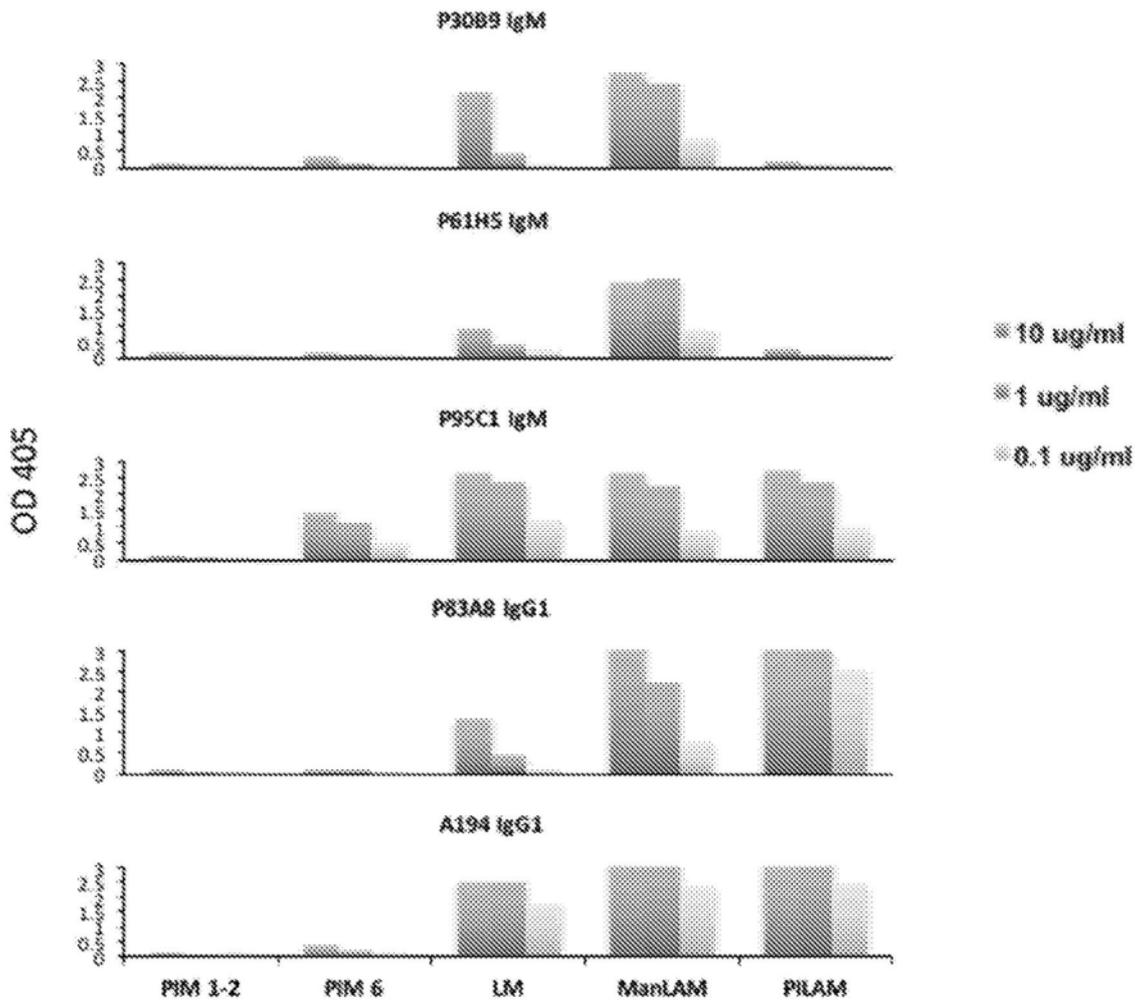


图18A

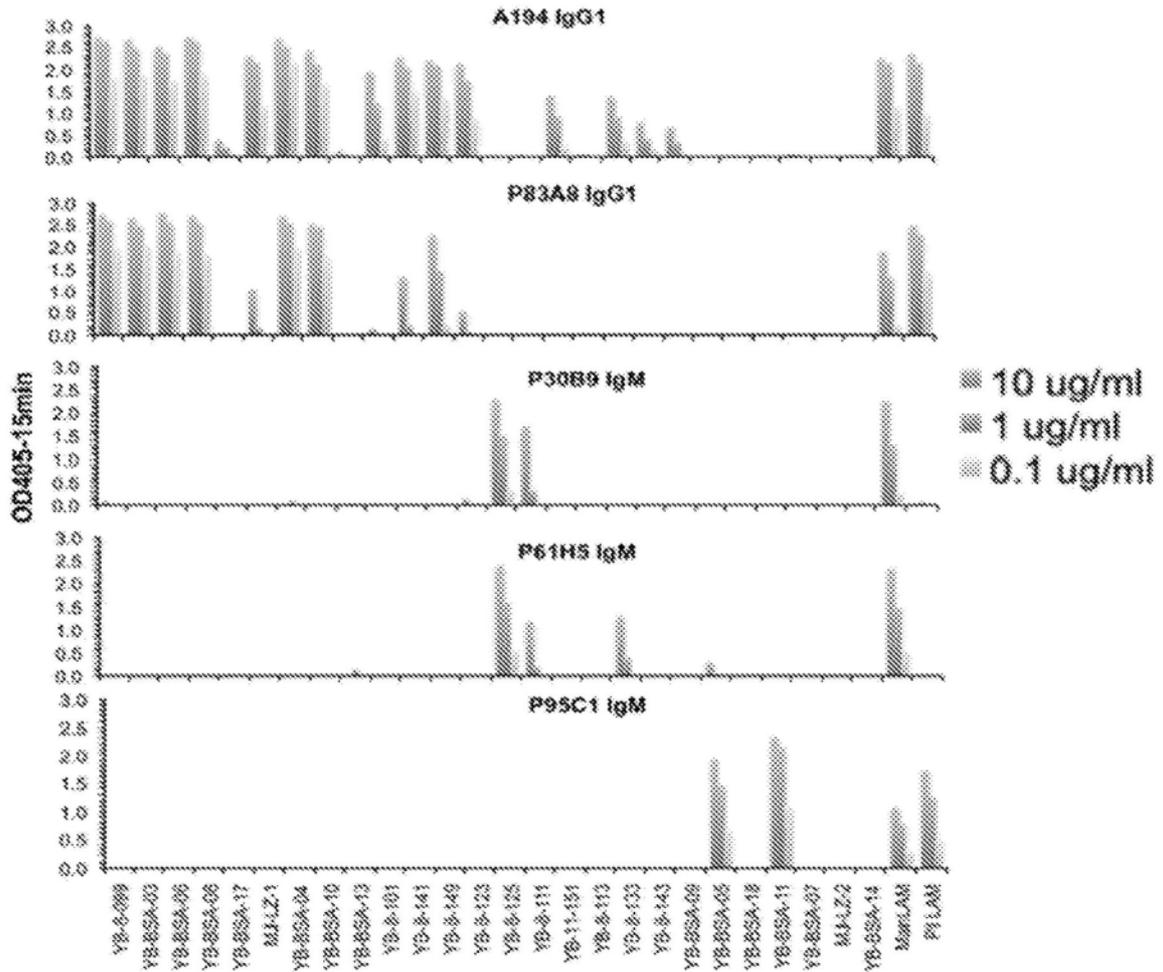


图18B

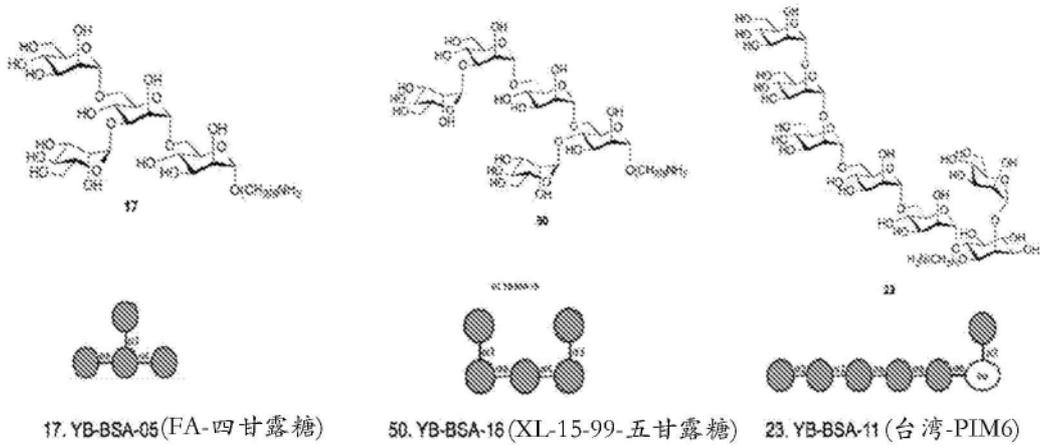
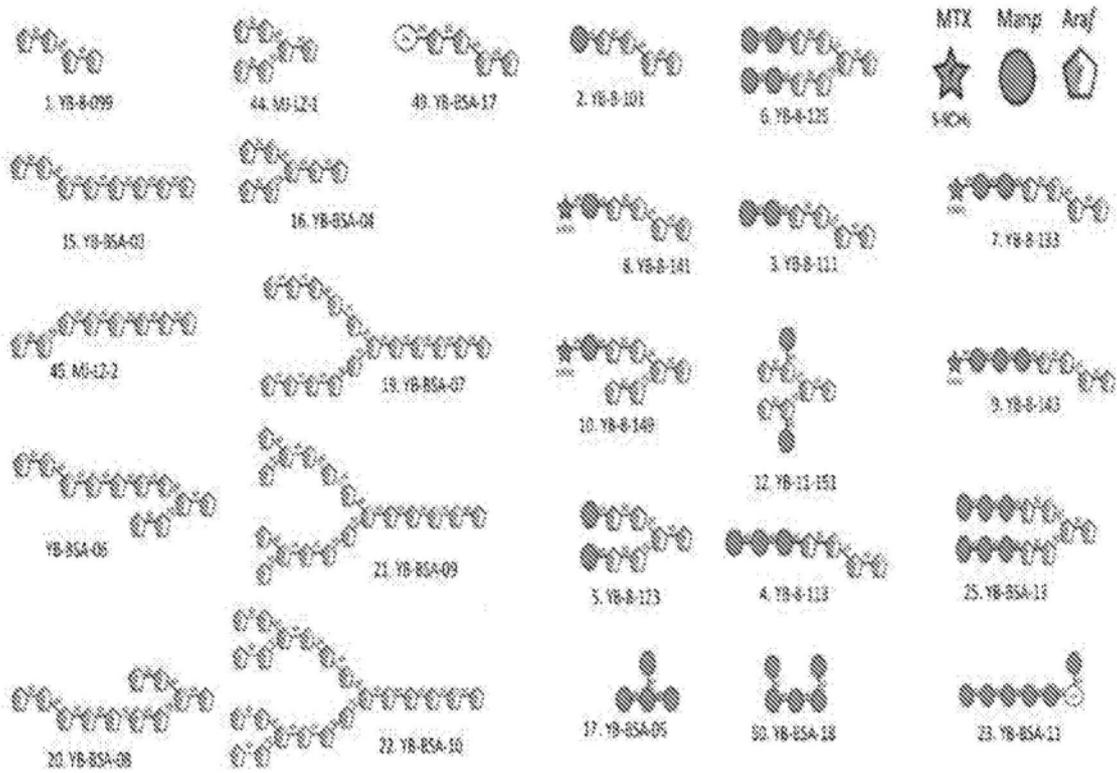


图18C

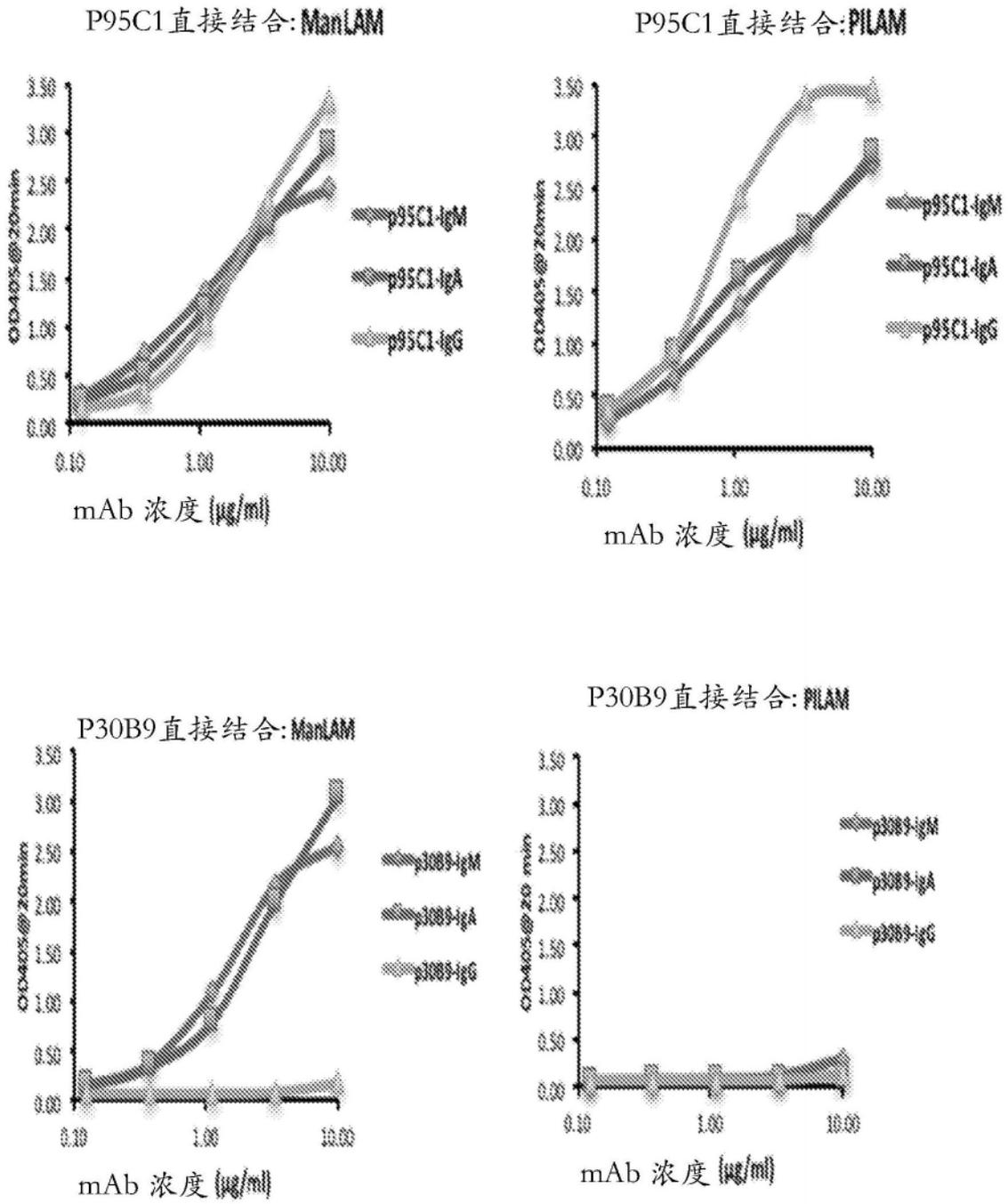


图19

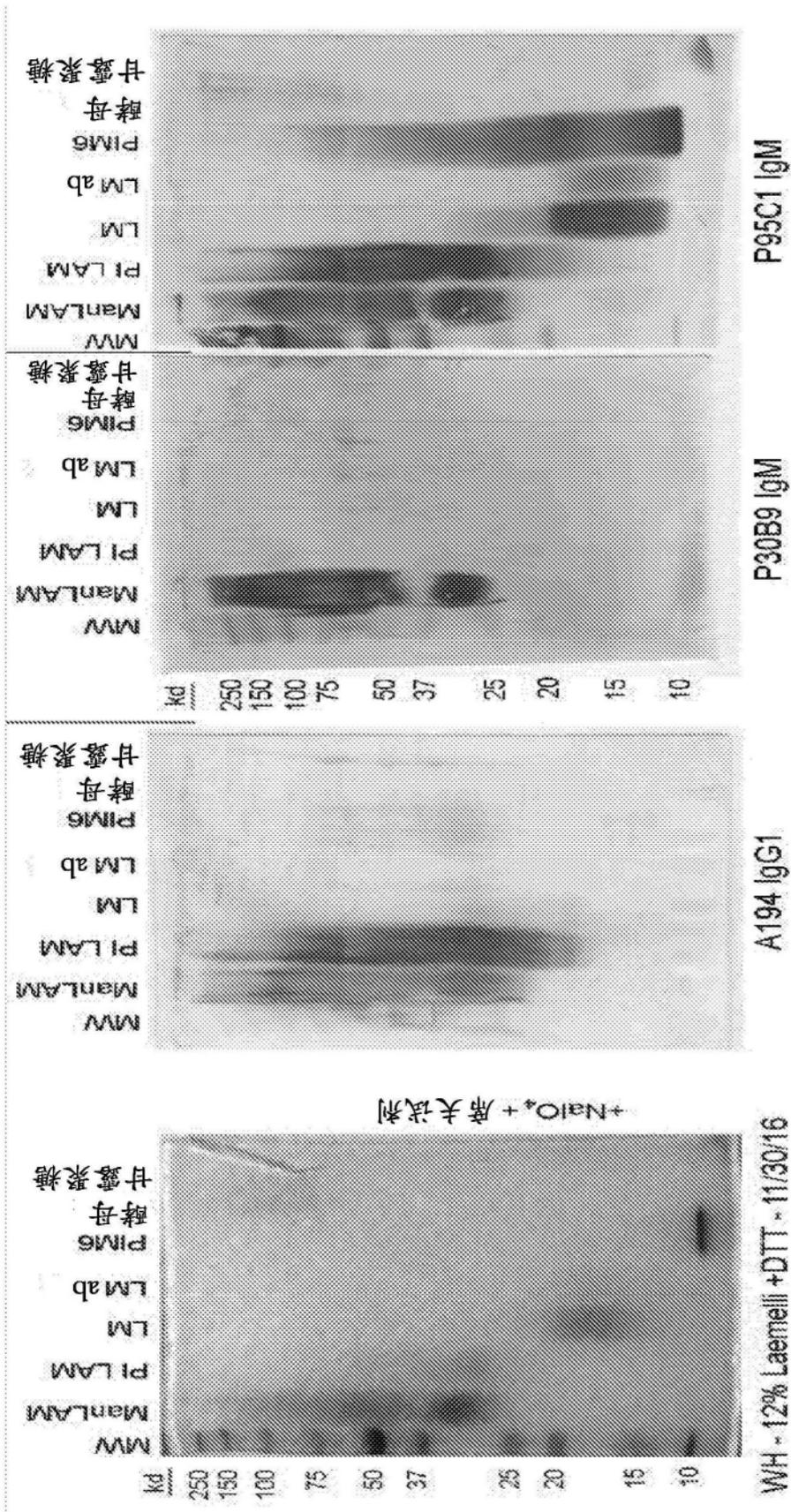


图20B

图20A

A194 序列

A194-VH  
 IGHV3-20\*01  
 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 FR1-IMGY (1-26) CDR1-IMGY (27-38) FR2-IMGY (39-55) CDR2-IMGY (56-65) FR3-IMGY (66-104)  
 QVQLLESGG.GVVRFGGSLRISCAS GFNF...EDFG MSWVRQAPGKLEWVSE ISWN..GAMT GIYDSVK.GRFTISRDNKAKNSLYLQMNLSLRRAETALTYC  
 EVQLVESGG.GVVRFGGSLRISCAS GFTF...DDYG MSWVRQAPGKLEWVSG INWN..CGST GYADSVK.GRFTISRDNKAKNSLYLQMNLSLRRAETALTYC

CDR3 长度: 14 aa

A  
 D K Y P D P Y Y X D  
 (with shaded boxes)

A194-Vk  
 IGHV3-15\*01  
 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 FR1-IMGY (1-26) CDR1-IMGY (27-38) FR2-IMGY (39-55) CDR2-IMGY (56-65) FR3-IMGY (66-104)  
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS RSI...RSA LAMYQKPKQAPPELLIF GA...S TRATGIP.ARFSGSG..SGTDFLTVSSIRSEDSAVYIC  
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSV...SSN LAMYQKPKQAPPELLIF GA...S TRATGIP.ARFSGSG..SGTEFTLTISSLSQSEDFAVYIC

CDR3 长度: 8 aa

Q Q Q Y D F W Y T  
 (with shaded boxes)

A194-IgG

图21



P95C1 序列

P95C1-VH  
 IGHV4-4\*02 F  
 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 EVQLLESGP.GLVRFPMGTLSTCAVS GGSIN...TNNW MSWVRQPGKLEWIGE IHRH...GDT NINPSLK.RRVYSIMDESNQFSLRLISVTAADTAVYYC  
 QVQLDQESGP.GLVKPSGTLSTLCAVS GGSIS...SSNW MSWVRQPGKLEWIGE IYHS...GST NINPSLK.SRVTISVDKSNQFSLRLISVTAADTAVYYC

智人

P95C1-IgM

CDR3 长度: 15 aa

C P L L L Y C S S D D C S S V A

P95C1-Vk  
 IGHV4-1\*01 F  
 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 DIQMTQSPSSLSVSLGERATINCKSS QNVLDSANNRY FGYVQKPGQPKLLIS WA...S TRMSGVP.DRFSGSG..SGTDFTLIISLQVEDVAVYYC  
 DIVMTQSPDLSAVLGERATINCKSS QSVLYSSNNKY LAMVQKPGQPKLLIY WA.....S TRMSGVP.DRFSGSG..SGTDFTLIISLQVEDVAVYYC

智人

CDR3 长度: 8 aa

T Q Y E R L F H T

图23