



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102482345 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

(21) 申请号 201080030975. 9

(22) 申请日 2010. 05. 12

(30) 优先权数据

61/177, 987 2009. 05. 13 US

61/228, 114 2009. 07. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/034604 2010. 05. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02010/132604 EN 2010. 11. 18

(71) 申请人 航道生物技术有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 L. 霍罗维茨 R. 巴特 A. 卡什亚普

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 40 页 附图 17 页

(54) 发明名称

针对流感病毒的中和分子

(57) 摘要

本发明涉及鉴别、制备和工程化针对甲型流感病毒的中和抗体的方法和手段以及所制备的中和抗体。具体来说,本发明涉及针对各种甲型流感病毒亚型的中和抗体,和制备所述抗体的方法和手段。

1. 一种结合分子,其包含一个、两个或三个选自由 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 组成的组的来自重链的高变区序列,或其功能活性片段。
2. 一种结合分子,其包含一个、两个或三个选自由 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 组成的组的来自重链的高变区序列,或其功能活性片段。
3. 根据权利要求 1 所述的结合分子,其包含来自 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :9 的所有高变区序列,或其功能活性片段。
4. 根据权利要求 2 所述的结合分子,其包含来自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 的所有高变区序列,或其功能活性片段。
5. 根据权利要求 1 所述的结合分子,当与轻链缔合时其能够结合靶标。
6. 根据权利要求 2 所述的结合分子,当与轻链缔合时其能够结合靶标。
7. 根据权利要求 5 所述的结合分子,其中所述轻链包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :15,或其功能活性片段。
8. 根据权利要求 5 所述的结合分子,其中所述轻链包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :18,或其功能活性片段。
9. 根据权利要求 5 所述的结合分子,其中所述轻链包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20 或 SEQ ID NO :21。
10. 根据权利要求 6 所述的结合分子,其中所述轻链包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24,或其功能活性片段。
11. 根据权利要求 7 所述的结合分子,其包含所有高变区序列 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :15,或其功能活性片段。
12. 根据权利要求 7 所述的结合分子,其包含所有高变区序列 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :18,或其功能活性片段。
13. 根据权利要求 7 所述的结合分子,其包含所有高变区序列 SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20 或 SEQ ID NO :21,或其功能活性片段。
14. 根据权利要求 8 所述的结合分子,其包含所有高变区序列 SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24,或其功能活性片段。
15. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合分子,其还包含含有 VpreB 序列和 / 或 λ 5 序列的多肽,或其功能活性片段。
16. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合分子,其还包含含有与 λ 5 序列融合的 VpreB 序列的多肽,或其功能活性片段。
17. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合分子,其还包含含有 V κ 样和 / 或 JC κ 序列的 κ 样替代轻链 (SLC) 构建体,或其功能活性片段。
18. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合分子,其是抗体或其功能活性片段。
19. 一种结合分子,其包含重链,所述重链包含如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列,或其功能活性片段。
20. 一种结合分子,其包含重链,所述重链包含如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列,或其功能活性片段。
21. 根据权利要求 19 所述的结合分子,其还包含轻链,所述轻链包含选自由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 组成的组的氨基酸序列,或其功能活性片段。

22. 根据权利要求 20 所述的结合分子,其还包含轻链,所述轻链包含如 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列,或其功能活性片段。

23. 根据权利要求 19 所述的结合分子,或其功能活性片段,其 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株, (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,和 (iii) 抑制血细胞凝集。

24. 根据权利要求 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其 (i) 中和甲型流感病毒的至少一种亚型和 / 或至少一种分离株,和 (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原。

25. 根据权利要求 19 或 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其结合 HA 抗原的 H1 亚型的表位。

26. 根据权利要求 19 或 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其结合 HA 抗原的 H3 亚型的表位。

27. 根据权利要求 19 或 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其结合 HA 抗原的 H1 亚型的表位和 HA 抗原的 H3 亚型的表位。

28. 根据权利要求 19 或 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其结合 HA 抗原的 H9 亚型的表位。

29. 根据权利要求 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其结合 HA 抗原的 H5 亚型的表位。

30. 根据权利要求 25-29 中任一项所述的结合分子,或其功能活性片段,其中所述表位呈现于甲型流感病毒的表面上。

31. 根据权利要求 19 或 20 所述的结合分子,或其功能活性片段,其可与 H1HA 抗原和 H3 抗原交叉反应。

32. 根据权利要求 19 所述的结合分子,或其功能活性片段,其中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型中的至少一者。

33. 根据权利要求 19 所述的结合分子,或其功能活性片段,其中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型。

34. 根据权利要求 20 所述的结合分子,其中和所述 H1HA 抗原,或其功能活性片段。

35. 根据权利要求 20 所述的结合分子,其中和所述 H5HA 抗原,或其功能活性片段。

36. 根据权利要求 20 所述的结合分子,其中和所述 H1 和 H5 甲型流感病毒亚型,或其功能活性片段。

37. 根据权利要求 25 所述的结合分子,其中所述 H1 亚型是,或所述 HA 来自 H1 病毒的新喀里多尼亚 /20/99 分离株,或其功能活性片段。

38. 根据权利要求 25 所述的结合分子,其中所述 H1 亚型是,或所述 HA 来自 H1 病毒的索罗门群岛 /3/06 分离株,或其功能活性片段。

39. 根据权利要求 26 所述的结合分子,其中所述 H3 亚型是,或所述 HA 来自 H3 病毒的威斯康星州 /67/05 分离株,或其功能活性片段。

40. 根据权利要求 26 所述的结合分子,其中所述 H3 亚型是,或所述 HA 来自 H3 病毒的香港 /68 分离株,或其功能活性片段。

41. 根据权利要求 28 所述的结合分子,其中所述 H9 亚型是,或所述 HA 来自 H9 病毒的香港 /1073/99 分离株,或其功能活性片段。

42. 根据权利要求 29 所述的结合分子,其中所述 H5 亚型是,或所述 HA 来自 H5 病毒的越南 /1203/04 分离株,或其功能活性片段。

43. 根据权利要求 23 所述的结合分子,其阻止所述甲型流感病毒的所述球状头部区结合细胞的表面,或其功能活性片段。

44. 根据权利要求 23 所述的结合分子,其阻止所述甲型流感病毒附着于欲感染的细胞,或其功能活性片段。

45. 根据权利要求 23 或 24 所述的结合分子,其中至少一种所述病毒具有感染人的能力,或其功能活性片段。

46. 根据权利要求 23 或 24 所述的结合分子,其中至少一种所述分离株已从人受试者获得,或其功能活性片段。

47. 根据权利要求 23 或 24 所述的结合分子,其中至少一种所述分离株已从非人动物获得,或其功能活性片段。

48. 根据权利要求 47 所述的结合分子,其中所述非人动物是禽类,或其功能活性片段。

49. 根据权利要求 48 所述的结合分子,其中所述禽类是野禽或鸡,其功能活性片段。

50. 根据权利要求 47 所述的结合分子,其中所述非人动物是猪,或其功能活性片段。

51. 根据权利要求 19 所述的结合分子,其结合 H1HA 抗原,或其功能活性片段。

52. 根据权利要求 51 所述的结合分子,其结合至少一种另外的 HA 抗原,或其功能活性片段。

53. 根据权利要求 52 所述的结合分子,其中所述另外的 HA 抗原是 H3,或其功能活性片段。

54. 一种抗体,其结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列 ;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。

55. 根据权利要求 54 所述的抗体,其结合与对于包含轻链多肽的抗体的表位实质上相同的表位,所述轻链多肽包含选自由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 组成的组的氨基酸序列 ;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。

56. 一种抗体,其结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列 ;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。

57. 根据权利要求 56 所述的抗体,其结合与对于包含轻链多肽的抗体的表位实质上相同的表位,所述轻链多肽包含如 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列 ;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。

58. 根据权利要求 54 或 55 所述的抗体,其 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株, (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,和 (iii) 抑制血细胞凝集。

59. 根据权利要求 56 或 57 所述的抗体,其 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株,和 (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原。

60. 一种组合物,其包含根据权利要求 1-59 中任一项所述的结合分子或抗体。

61. 一种用于预防和 / 或治疗受试者的甲型流感病毒感染的方法,所述方法包括对所述受试者施用有效量的根据权利要求 60 所述的组合物。

62. 一种治疗受试者的甲型流感病毒感染的方法,所述方法包括对所述受试者施用有效量的根据权利要求 1-59 中任一项所述的中和抗体或结合分子。

63. 根据权利要求 61 或 62 所述的方法,其中所述受试者是人患者。
64. 一种有效针对甲型流感病毒的疫苗,其包含在功能上模拟由根据权利要求 1-59 中任一项所述的抗体或结合分子所结合的中和表位的肽或多肽。
65. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其是合成疫苗。
66. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其包含减毒的甲型流感病毒或其一部分。
67. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其包含灭活的甲型流感病毒或其一部分。
68. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其中所述抗体或结合分子选自以下组成的组:
- (a) 结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列;
- (b) 包含含有重链多肽的重链多肽的抗体,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列;
- (c) 结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列,或其片段;和
- (d) 包含重链多肽的抗体,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列;或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列,或其片段。
69. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其中所述抗体或结合分子结合 HA 抗原。
70. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述 HA 抗原是 H3 亚型。
71. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述 HA 抗原是 H1 亚型。
72. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述 HA 抗原是 H1 亚型和 H3 亚型。
73. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述 HA 抗原是 H5 亚型。
74. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述 HA 抗原是 H9 亚型。
75. 根据权利要求 69 所述的疫苗,其中所述抗原呈现于甲型流感病毒的表面上。
76. 根据权利要求 64 至 75 中任一项所述的疫苗,其中所述肽或多肽包含募集中和抗体的抗原决定簇。
77. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其适于口服施用。
78. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其适于经粘膜递送。
79. 根据权利要求 78 所述的疫苗,其中所述经粘膜递送是鼻内施用。
80. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其适于肠胃外施用。
81. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其适于经皮施用。
82. 根据权利要求 64 所述的疫苗,其中所述疫苗用于儿童期免疫。
83. 一种中和抗体或结合分子,其结合能够感染人的甲型流感病毒的血凝素,中和甲型流感病毒的至少一种分离株,包含长度经修饰的重链环。
84. 根据权利要求 83 所述的抗体或结合分子,其中所述延长的重链环是 CDR3 环。
85. 根据权利要求 84 所述的抗体或结合分子,其中所述 CDR3 环包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。
86. 根据权利要求 85 所述的抗体或结合分子,其中所述延长的重链环是 CDR1 环。
87. 根据权利要求 86 所述的抗体或结合分子,其中所述 CDR1 环包含氨基酸序列 SEQ ID

NO:7。

88. 根据权利要求 83 所述的抗体或结合分子,其中所述长度修饰包括延长的重链环。

89. 根据权利要求 83 所述的抗体或结合分子,其中所述长度修饰包括所述重链环中的缺失。

90. 一种具有降低的氧化电位的工程抗体或结合分子,其结合能够感染人的甲型流感病毒的血凝素,中和甲型流感病毒的至少一种分离株,在重链可变域中包含一个或多个蛋氨酸取代。

91. 根据权利要求 90 所述的工程抗体或结合分子,其中所述重链可变域是 CDR3 区。

92. 根据权利要求 90 所述的工程抗体或结合分子,其中所述蛋氨酸取代根据 Kabat 编号系统位于位置 96 处。

93. 根据权利要求 90 所述的工程抗体或结合分子,其中所述蛋氨酸取代根据 Kabat 编号系统位于位置 98 处。

94. 根据权利要求 90 所述的工程抗体或结合分子,其中所述蛋氨酸取代根据 Kabat 编号系统位于位置 96 和 98 处。

95. 根据权利要求 90 至 94 中任一项所述的工程抗体或结合分子,其中所述蛋氨酸被亮氨酸取代。

96. 根据权利要求 90 所述的工程抗体或结合分子,其中所述重链可变域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29。

针对流感病毒的中和分子

发明领域

[0001] 本发明涉及鉴别、制备和工程化针对甲型流感病毒的中和分子的方法和手段以及所制备的中和分子。本发明还涉及所制备的分子的各种用途,包括利用靶甲型流感病毒上的本发明的中和分子的结合位点来设计和生产疫苗。

[0002] 发明背景

[0003] 流感是由流感病毒引起的传染性呼吸道疾病。其引起轻度至重度疾病,且有时会导致死亡。美国每年有 5-20% 的人口染上流感,约 200,000 人住院,且引起约 36,000 人死亡。

[0004] 流感病毒通过咳嗽和打喷嚏所产生的呼吸飞沫传播,其通常在人之间传播。对流感表面抗原(尤其是血凝素)的免疫降低感染的可能性和疾病的严重性(如果发生感染)。虽然有流感疫苗可用,但因为针对一种流感病毒类型或亚型的疫苗对于保护免于另一类型或亚型的流感有限或无效,所以有必要在每年的流感疫苗中并入一种或多种新菌株。

[0005] 流感病毒是片段型负链 RNA 病毒且属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae)家族。甲型流感病毒由 9 种结构蛋白质组成且另外编码一种具有调节功能的非结构 NS1 蛋白质。非结构 NS1 蛋白质在复制周期期间大量合成且定位于受感染细胞的细胞溶质和细胞核中。病毒基因组的片段性质使得在细胞受不同病毒菌株混合感染期间发生基因重排(基因组片段的交换)的机制。依据其表面上所呈现的不同血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)病毒蛋白质,甲型流感病毒可进一步分为各种亚型。通过两种病毒表面糖蛋白,血凝素(HA 或 H)和神经氨酸酶(NA 或 N),来鉴别甲型流感病毒亚型。各流感病毒亚型通过它的 H 和 N 蛋白质的组合来鉴别。有 16 种已知的 HA 亚型和 9 种已知的 NA 亚型。甲型流感病毒可感染人、禽类、猪、马和其它动物,但野生禽类是这些病毒的天然宿主。虽然目前仅一些甲型流感亚型(即, H1N1、H1N2 和 H3N2)在人群中传播,但在鸟类物种,尤其野生水禽和沙禽中已鉴别到 16 种 H 和 9 种 NA 亚型的所有组合。另外,越来越多的证据表明, H5 和 H7 流感病毒也可引起人疾病。

[0006] 甲型流感病毒的 HA 包含两个结构不同的区,即,球状头部区和茎部区。球状头部区含有负责病毒附着于靶细胞且参与 HA 的血细胞凝集活性的受体结合位点。茎部区含有对于病毒包膜与细胞内吞体膜之间的膜融合所必需的融合肽,且因此与融合活性有关(Wiley 等, Ann. Rev. Biochem., 56:365-394(1987))。

[0007] 大流行是全球性疾病爆发。当新甲型流感病毒:(1) 出现,而人群体对此几乎没有免疫性,(2) 开始引发严重疾病,并接着(3) 在世界范围内容易地在人之间传播时,则发生流感大流行。20 世纪期间,曾有三这样的流感大流行。第一次,在 1918 年,“西班牙流感”流感大流行,引起美国至少 500,000 人死亡且在世界范围内多达 40,000,000 人死亡。这次大流行由甲型流感 H1N1 亚型引起。第二次,在 1957 年,“亚洲流感”流感大流行,由甲型流感 H2N2 亚型引起,导致美国至少 70,000 人死亡,且在世界范围内导致 1-2 百万人死亡。最近,在 1968 年,“香港流感”流感大流行,由甲型流感 H3N2 亚型引起,导致美国约 34,000 人死亡且在世界范围内导致 700,000 人死亡。

[0008] 在 1997 年,香港报道了第一起甲型流感 H5N1 病例。虽然这是这一类型的鸟类病毒第一次直接感染人,但是未发生大流行,因为未观察到人之间的传播。

[0009] Lu 等, Resp. Res. 7 :43 (2006) (doi :10. 1186/1465-992-7-43) 报道从接种灭活的 H5N1 病毒的疫苗的马制备抗 H5N1IgG,和制备 H5N1 特异性 F(ab')₂ 片段,描述所述抗 H5N1IgG 和 H5N1 特异性 F(ab')₂ 片段可保护感染有 H5N1 病毒的 BALB/c 小鼠。

[0010] Hanson 等, Resp. Res. 7 :126 (doi :10. 1186/1465-9921-7-126) 描述对甲型流感 H5 病毒血凝素具有特异性的嵌合单克隆抗体用于小鼠的被动免疫的用途。

[0011] 2008 年 1 月 17 日公布的美国申请公布第 20080014205 号公开了针对流感病毒的中和抗体。

[0012] 鉴于由某些甲型流感病毒引起的呼吸道疾病的严重性和潜在大流行的威胁,极需要有效的预防和治疗方案。本发明通过提供针对所述病毒的各种 H 亚型的甲型流感中和分子解决这一需要,所述 H 亚型包含但不限于甲型流感病毒的 H1 和 H3 亚型以及 H5 亚型。本发明还提供能够中和甲型流感病毒的给定亚型的一种以上且优选所有分离株(菌株)的分子,所述分离株包含但不限于从各种人和非人物种获得的分离株和来自各种流感流行病和/或大流行的受害者和/或存活者的分离株。

[0013] 所述交叉反应性中和分子可用于预防和/或治疗流感病毒感染,包括已感染或有风险感染流行病或大流行的人群的被动免疫。另外,交叉反应性抗体可用作未来疫苗发现的设计指导和当前疫苗临床开发的评估工具。

发明概要

[0014] 在一方面,本发明提供包含来自重链和轻链多肽的高变区的结合分子。在一个实施方案中,结合分子包含一个、两个或三个选自由 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 组成的组的来自重链的高变区序列,或其功能活性片段。在另一实施方案中,结合分子包含所有高变区序列 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9。在一个其它实施方案中,结合分子是当与轻链缔合时能够结合靶标的结合分子。在一个实施方案中,轻链或结合分子包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15。在另一实施方案中,轻链或结合分子包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18。在一个其它实施方案中,轻链或结合分子包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20 和 SEQ ID NO :21。在另一实施方案中,轻链或结合分子包含所有高变区序列 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15。在另一实施方案中,轻链或结合分子包含所有高变区序列 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18。在一个其它实施方案中,轻链或结合分子包含所有高变区序列 SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20 和 SEQ ID NO :21。

[0015] 在另一实施方案中,结合分子包含一个、两个或三个选自由 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 组成的组的来自重链的高变区序列,或其功能活性片段。在一个其它实施方案中,结合分子包含所有高变区序列 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12。在一个其它实施方案中,结合分子是当与轻链缔合时能够结合靶标的结合分子。在一个实施方案中,轻链或结合分子包含多肽序列的一个、两个或三个高变序列 SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 和 SEQ ID NO :24。在一其它实施方案中,轻链或结合分子包含所有高变区序

列 SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 和 SEQ ID NO :24。

[0016] 在一个实施方案中,结合分子是抗体。在另一实施方案中,结合分子是替代抗体(surrobody)。

[0017] 在另一方面,本发明提供包含 VpreB 序列和 / 或 λ 5 序列的结合分子。在一个实施方案中,结合分子包含含有 VpreB 序列和 / 或 λ 5 序列的多肽。在另一实施方案中,结合分子还包含含有与 λ 5 序列融合的 VpreB 序列的多肽。在一个其它实施方案中,结合分子还包含含有 V κ 样和 / 或 JC κ 序列的 κ 样替代轻链 (SLC) 的构建体。

[0018] 在所有实施方案中,结合分子 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株, (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,和 (iii) 抑制血细胞凝集。在另一实施方案中,结合分子中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型中的至少一者。在一实施方案中,结合分子中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型。在另一实施方案中,结合分子阻止甲型流感病毒的球状头部区结合细胞的表面。在一个其它实施方案中,结合分子阻止甲型流感病毒附着于欲感染的细胞。在另一实施方案中,结合分子结合 H1HA 抗原。在一个实施方案中,结合分子结合至少一种另外的 HA 抗原。在另一实施方案中,另外的 HA 抗原是 H3。在另一实施方案中,结合分子结合 H2HA 抗原。

[0019] 在一个实施方案中,本发明提供包含重链的抗体,所述重链包含如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗体还包含轻链,所述轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 组成的组的氨基酸序列。在一个其它实施方案中,抗体是 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株, (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,和 (iii) 抑制血细胞凝集的抗体。在另一实施方案中,抗体是中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型中至少一者的抗体。在一个实施方案中,抗体是中和 H1 和 H3 甲型流感病毒亚型的抗体。在另一实施方案中,抗体是阻止甲型流感病毒的球状头部区结合细胞的表面的抗体。在一个其它实施方案中,抗体是阻止甲型流感病毒附着于欲感染的细胞的抗体。在另一实施方案中,抗体是结合 H1HA 抗原的抗体。在一个实施方案中,抗体是结合至少一种另外的 HA 抗原的抗体。在另一实施方案中,另外的 HA 抗原是 H3。

[0020] 在另一实施方案中,抗体包含重链,所述重链包含如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。在一个其它实施方案中,抗体还包含轻链,所述轻链包含如 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列。在一个其它实施方案中,抗体是 (i) 中和甲型流感病毒的至少一种亚型和 / 或至少一种分离株,和 (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原的抗体。在一个实施方案中,抗体是结合 HA 抗原的 H5 亚型的表位的抗体。在另一实施方案中,抗体是中和 H1HA 抗原、中和 H5HA 抗原或中和 H1 和 H5 甲型流感病毒亚型的抗体。

[0021] 在另一实施方案中,抗体或结合分子结合和 / 或中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株和 / 或与甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株反应。在一个实施方案中,病毒是具有感染人的能力的病毒。在另一实施方案中,分离株是已从人受试者获得的分离株。在一个其它实施方案中,分离株是已从非人动物获得的分离株。在另一实施方案中,非人动物是禽类。在一个实施方案中,禽类是野禽或鸡。在一个其它实施方案中,非人动物是猪。

[0022] 在另一实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H1 亚型的表位的抗体或结合分子。在一个其它实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H3 亚型的表位的抗体

或结合分子。在另一实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H1 亚型的表位和结合 HA 抗原的 H3 亚型的表位的抗体或结合分子。在一个实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H9 亚型的表位的抗体或结合分子。在另一实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H5 亚型的表位的抗体或结合分子。在另一实施方案中,抗体或结合分子是结合 HA 抗原的 H2 亚型的表位的抗体或结合分子。

[0023] 在所有实施方案中,抗体或结合分子结合呈现于甲型流感病毒表面的表位。

[0024] 在所有实施方案中,H1 亚型是,或 HA 来自 H1 病毒的新喀里多尼亚 /20/99 分离株; H1 亚型是,或 HA 来自 H1 病毒的索罗门群岛 /3/06 分离株或 H1 病毒的孟菲斯 /3/2008 分离株。

[0025] 在所有实施方案中, H3 亚型是,或 HA 来自 H3 病毒的威斯康星州 /67/05 分离株; 或 H3 亚型是,或 HA 来自 H3 病毒的香港 /68 分离株。

[0026] 在所有实施方案中, H9 亚型是,或 HA 来自 H9 病毒的香港 /1073/99 分离株。

[0027] 在所有实施方案中, H5 亚型是,或 HA 来自 H5 病毒的越南 /1203/04 分离株。

[0028] 在所有实施方案中, H2 亚型是,或 HA 来自 H2 病毒的 Adachi/1/1957 分离株。

[0029] 在所有实施方案中,抗体或结合分子是与 H1HA 抗原和 H3 抗原交叉反应的抗体或结合分子。

[0030] 在一个其它实施方案中,本发明提供结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。在另一实施方案中,抗体或结合分子结合与对于包含轻链多肽的抗体的表位实质上相同的表位,所述轻链多肽包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 组成的组的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。在一个其它实施方案中,抗体或结合分子是 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株, (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,和 (iii) 抑制血细胞凝集的抗体或结合分子。

[0031] 在一个实施方案中,本发明提供结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。在另一实施方案中,抗体或结合分子结合与对于包含轻链多肽的抗体的表位实质相同的表位,所述轻链多肽包含如 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列。在一个其它实施方案中,抗体或结合分子是 (i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株和 (ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原的抗体或结合分子。

[0032] 在另一实施方案中,本发明提供包含本文所述的结合分子或抗体的组合物。

[0033] 在另一方面,本发明提供在治疗和 / 或预防有需要的受试者体内甲型流感病毒感染的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对所述受试者施用有效量的本文所述的组合物。在另一实施方案中,所述方法包括对所述受试者施用有效量的本文所述的中和抗体或结合分子。在一个其它实施方案中,受试者是人患者。

[0034] 在另一方面,本发明提供有效针对甲型流感病毒感染的疫苗。在一实施方案中,疫苗包含在功能上模拟由本文所述的抗体或结合分子所结合的中和表位的肽或多肽。在另一实施方案中,疫苗是合成疫苗。在一个其它实施方案中,疫苗包含减毒的甲型流感病毒或

其一部分。在另一实施方案中,疫苗包含灭活的甲型流感病毒或其一部分。在一个其它实施方案中,抗体或结合分子选自由以下组成的组:(a) 结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列;(b) 包含含有重链多肽的重链多肽的抗体,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列;(c) 结合与对于包含重链多肽的抗体的表位实质上相同的表位的抗体或结合分子,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列,或其片段;和 (d) 包含重链多肽的抗体,所述重链多肽包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或基于所述氨基酸序列的共有或变体序列,或其片段。

[0035] 在所有实施方案中,抗体结合 HA 抗原。HA 抗原可选自由 H3 亚型、H1 亚型、H2 亚型、H1 亚型和 H3 亚型、H5 亚型、H9 亚型和其任何组合组成的组。在一个实施方案中,抗原呈现于甲型流感病毒的表面上。在另一实施方案中,在功能上模拟由本文所述的抗体或结合分子所结合的中和表位的肽或多肽包含募集中和抗体的抗原决定簇。在另一实施方案中,疫苗适用于口服施用;经皮施用或肠胃外施用。在另一实施方案中,疫苗适用于经粘膜递送。在一个其它实施方案中,经粘膜递送是鼻内施用。在另一实施方案中,疫苗用于儿童期免疫。

[0036] 在一方面,本发明提供具有长度经修饰的重链环的流感中和抗体或结合分子。长度经修饰的链可为延长的重链环或缩短的重链环。在一个实施方案中,抗体或结合分子是结合能够感染人的甲型流感病毒的血凝素的中和抗体或结合分子,其中和甲型流感病毒的至少一种分离株,抗体具有延长的重链环。在一个其它实施方案中,长度经修饰的重链环是 CDR3 环或 CDR1 环。在另一实施方案中,CDR3 环包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。在又一抗体中,CDR1 环包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7。

[0037] 在另一方面,本发明提供具有降低的氧化电位的工程抗体或结合分子。在一个实施方案中,具有降低的氧化电位的工程抗体或结合分子是结合能够感染人的甲型流感病毒的血凝素的抗体,其中和甲型流感病毒的至少一种分离株,在重链可变域中具有一个或多个蛋氨酸取代。在另一实施方案中,重链可变域是 CDR3 区。在一个其它实施方案中,根据 Kabat 编号系统,蛋氨酸取代位于位置 96 和 / 或 98 处。在又一实施方案中,蛋氨酸被亮氨酸取代。在一个实施方案中,重链可变域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29。

附图说明

[0038] 图 1 说明通过重组平行发现的池以产生 / 增加交叉反应性来增加对两个不同靶标 (靶标 A 和 B) 的反应强度的策略。重组抗体文库的每一轮选择增加所得池对两个靶标的反应强度。

[0039] 图 2 说明增加与靶标 B 的交叉反应性同时维持与靶标 A 的反应性的策略。首先,选择与靶标 A 反应的克隆,然后制备与靶标 A 反应的克隆的诱变文库,且如同所示进行选择,得到一个或多个显示与靶标 A 和靶标 B 的强反应性的抗体克隆。

[0040] 图 3 说明通过“目的性诱变”方法产生不同多功能抗体集合的代表性诱变方法。

[0041] 图 4 示出 1286-C5 抗体对来自 H1、H3 和 H9 的血凝素抗原的结合能力。

[0042] 图 5 示出 1286-A11 抗体对来自 H1、H3、H5 和 H9 的血凝素抗原的结合能力。

[0043] 图 6 说明产生合并的抗体文库的代表性方法。

[0044] 图 7A-E 说明流感中和抗体的治疗和保护作用。图 7A-B 示出 C05 抗体针对高效价致命性 H3N2 病毒激发的预防作用。图 7C-D 示出 C05 抗体针对致命性 H3N2 病毒激发的治疗作用。图 7E 示出 C05 抗体针对高效价季节性 H1N1 病毒激发的预防作用。

[0045] 图 8 说明 C05 变体维持 H1 和 H3HA 蛋白质的识别。

[0046] 图 9 说明 C05 变体维持 H1 和 H3HA 蛋白质的识别。

[0047] 发明详述

[0048] A. 定义

[0049] 除非另外定义,否则本文所使用的技术和科学术语具有与本发明本领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第 2 版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994) 向本领域的技术人员提供本申请中所用的许多术语的一般指导。

[0050] 本领域的技术人员应认可可用于实践本发明的与本文所述的方法和材料类似或等价的许多方法和材料。实际上,本发明无论如何不局限于所述方法和材料。出于本发明的目的,以下术语定义如下。

[0051] 术语“甲型流感亚型”或“甲型流感病毒亚型”可互换使用,且指以血凝素(H)病毒表面蛋白质为特征的甲型流感病毒变体,且因此用 H 编号标记,诸如 H1、H3、H5 和 H9。另外,亚型还可以神经氨酸酶(N)病毒表面蛋白质为特征,用 N 编号指示,诸如 N1 和 N2。同样,亚型可用 H 与 N 编号提及,诸如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H5N2 和 H9N2。该术语特别包括各亚型内的所有菌株(包括灭绝的菌株),通常由突变造成且显示不同病原概况。所述菌株还将指病毒亚型的各种“分离株”,包含所有过去、现在和未来的分离株。因此,于此,术语“菌株”和“分离株”可互换使用。亚型含有基于甲型流感病毒的抗原。抗原可基于血凝素病毒表面蛋白质且可称为“HA 抗原”。在一些情况下,所述抗原基于特定亚型的蛋白质,诸如 H1 亚型和 H3 亚型,其可分别称为 H1 抗原和 H3 抗原。

[0052] 术语“流感”用于指由流感病毒引起的传染性疾病。

[0053] 在本发明的情况下,术语“结合分子”以广义使用且包括包含特异性结合靶标的多肽序列的任何分子。所述定义包括但不限于抗体和抗体片段、抗体样分子和其片段,无论呈单体还是多聚形式,诸如同二聚或异二聚形式。多聚结合分子可通过共价和/或非共价相互作用保持其构形,且可彼此缀合和/或与分子或部分缀合,只要其保持结合靶标(例如,在抗体的情况下,是抗原)的必需性质。

[0054] “特异性结合”特定多肽或特定多肽上的表位或“对特定多肽或特定多肽上的表位特异的”的结合分子是结合特定多肽或特定多肽上的表位而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位的分子。

[0055] 术语“缀合”是指共价或非共价键的任何和所有形式,且包括但不限于直接基因或化学融合、通过连接子或交联剂偶合和例如通过范德华力或使用亮氨酸拉链的非共价缔合。

[0056] 术语“抗体”(Ab)以广义使用且包括对特定抗原表现结合特异性的多肽以及缺乏抗原特异性的免疫球蛋白和其它抗体样分子。后种多肽例如由淋巴系统以低水平产生且由骨髓瘤以高水平产生。在本申请中,术语“抗体”特别涵盖但不限于单克隆抗体、多克隆抗

体和抗体片段。

[0057] 术语“降低的氧化电位”或“降低的氧化异质性电位”是指含有具有至少一个从可氧化氨基酸取代为不可氧化氨基酸的氨基酸取代的多肽的抗体。氨基酸序列可为取代蛋氨酸的取代。抗体多肽可被选择性地工程化以用不可氧化的氨基酸残基置换蛋氨酸氨基酸残基,从而提供具有降低的氧化电位的抗体。举例来说,蛋氨酸可经亮氨酸、丝氨酸或丙氨酸取代。

[0058] “天然抗体”通常是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白,包含两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链。各轻链通过共价二硫键连接重链,而不同免疫球蛋白同种型的重链的二硫键的数目不同。各重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫键。各重链在一端具有可变域(VH),接着是许多恒定域。各轻链在一端具有可变域(VL)且在它的另一端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准,且轻链可变域与重链的可变域对准。认为特定氨基酸残基在轻链可变域与重链可变域之间形成界面,Chothia 等, J. Mol. Biol. 186 : 651 (1985); Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 : 4592 (1985)。

[0059] 提及抗体链时术语“可变”用于指抗体链的在抗体间于序列方面广泛不同且参与各特定抗体对它的特定抗原的结合和特异性的部分。在轻链与重链可变域中,所述可变性集中在三个称为高变区的片段中。可变域的更高度保守的部分称为骨架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各包含四个 FR(分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4),主要采用由形成环连接的三个高变区连接的 β -折叠构型,且在一些情况下,形成 β -折叠结构的一部分。各链的高变区由 FR 紧密靠近地结合在一起,且与来自其它链的高变区一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参看 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 第 647-669 页)。虽然恒定域并不直接参与抗体与抗原结合,但表现各种效应功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0060] 术语“高变区”当在本文使用时是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基,即在轻链可变域中,指残基 30-36(L1)、46-55(L2) 和 86-96(L3) 且在重链可变域中,指残基 30-35(H1)、47-58(H2) 和 93-101(H3); MacCallum 等, J Mol Biol. 1996。“骨架”或“FR”残基是除如本文所定义的高变区残基以外的那些可变域残基。

[0061] 取决于其重链的恒定域的氨基酸序列,抗体可归属于不同的类别。有 5 种主要类别的抗体 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,且其中数个可进一步分成亚类(同种型),例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。

[0062] 对应于免疫球蛋白不同类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0063] 来自任何脊椎动物物种的“轻链”,基于其恒定域的氨基酸序列,可归属于两个称为 κ 和 λ 的明显不同类型中的一个。

[0064] 术语“抗体片段”是全长抗体的一部分,一般是其抗原结合域或可变域。抗体片段的实例包含但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和由抗体片段形成的 Fv 片段、线性抗体、单链抗体分子、双链抗体和多特异性抗体。抗体片段的其它实例包含但不限于 scFv、(scFv)₂、dAb(单域抗体)和互补决定区(CDR)片段和微抗体,微抗体是两个环能够组合诱变的最小可变域。

[0065] 术语“单克隆抗体”用于指由 B 细胞的单个克隆合成的抗体分子。修饰语“单克隆”指示从基本上均一的抗体群获得的抗体特性,且不应理解为需要由任何特定方法来制备抗体。因此,单克隆抗体可由 Kohler 和 Milstein, Nature 256 :495 (1975) ;Eur. J. Immunol. 6 : 511 (1976) 第一次描述的杂交瘤方法通过重组 DNA 技术制备,或还可从噬菌体抗体文库中分离出来。

[0066] 术语“多克隆抗体”用于指由 B 细胞群合成的抗体分子群。

[0067] “单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 域,其中这些域存在于单个多肽链中。Fv 多肽一般还包含 VH 与 VL 域之间的多肽连接子,该连接子使得 sFv 能够形成抗原结合所需的结构。关于 sFv 之综述,参看 Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenburg 和 Moore 编著 Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。单链抗体例如公开在 WO 88/06630 和 WO 92/01047 中。

[0068] 术语“双链抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含于同一多肽链 (V_H - V_L) 中与轻链可变域 (V_L) 连接的重链可变域 (V_H)。通过使用太短而不允许在同一链上的两个域之间配对的连接子,迫使这些域与另一链的互补域配对并建立两个抗原结合位点。双链抗体更全面地描述于例如 EP 404,097 ;WO 93/11161 ;和 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 (1993) 中。

[0069] 术语“微抗体”用于指自装配成 80kDa 的二价二聚物 (scFv-CH3)₂ 的 scFv-CH3 融合蛋白。

[0070] 术语“适体”在本文中用于指以高特异性和亲和力结合蛋白质靶标的合成核酸配体。适体被认为是具有蛋白质功能的有效抑制剂。

[0071] dAb 片段 (Ward 等, Nature 341 :544546 (1989)) 由 V_H 域或 V_L 域组成。

[0072] 如本文所用的术语“抗体结合区”是指能够结合抗原的免疫球蛋白的一个或多个部分或抗体可变区。抗体结合区通常是例如抗体轻链 (VL) (或其可变区)、抗体重链 (VH) (或其可变区)、重链 Fd 区、组合的抗体轻链和重链 (或其可变区),诸如 Fab、F(ab')₂、单域或单链抗体 (scFv),或全长抗体,例如 IgG (例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体。

[0073] 术语“双特异性抗体”是指对两种不同类型的抗原显示特异性的抗体。如本文所用的术语特别包括但不限于对靶抗原和促进向特定组织递送的另一靶标显示结合特异性的抗体。类似地,多特异性抗体具有两种或多种结合特异性。

[0074] 表述“线性抗体”用于指包含一对串联 Fd 片段 (V_H - C_H1 - V_H - C_H1),所述片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的,且由例如 Zapata 等, Protein Eng. 8 (10) :1057-1062 (1995) 描述。

[0075] 出于本发明的目的,术语“抗体样分子”包括除如上文所定义的抗体片段以外的能够结合和中和病毒抗原的任何分子。所述术语特别包括但不限于前 B 细胞受体 (pre-BCR) 样结构,称为“替代抗体”,包含替代轻链 (SLC) 元件,如例如以下中所描述:2008 年 10 月 2 日公开的 PCT 公开第 WO 2008/118970 号,和 Xu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 (31) : 10756-61 (2008)。SLC 是包含非共价缔合的 V_{pre-B} 和 $\lambda 5$ 蛋白质的非多样性的异二聚体。分别地, V_{pre-B} 链与 V_{λ} Ig 域同源,且 $\lambda 5$ 链与典型的抗体的 C_{λ} 域同源。在前 BCR 复合物中,异二聚 SLC 通过 C_{λ} 域与前 BCR HC 的第一恒定域之间的二硫键与重链共价缔合。SLC

的独特特征在于 VpreB 1 和 λ 5 域各具有非典型的肽延伸。VpreB1 在它的 C 末端具有另外的 21 个残基,且 λ 5 在它的 N 末端具有 50 个氨基酸长的尾(参看例如 Vettermann 等, Semin. Immunol. 18 :44-55(2006))。替代抗体结构特别包含但不限于前 BCR 的天然三聚前 BCR 样功能单元、VpreB1 与 λ 5 的融合物和消除 λ 5N 末端 50 个氨基酸或 VpreB1C 末端 21 个氨基酸或这两个肽延伸的三聚物。另外,替代抗体的定义内特别包括使用典型抗体轻链的恒定组分的嵌合构建体。

[0076] 如本文所定义的“抗体样分子”的其它代表物具有类似结构,包含抗体替代 κ 轻链序列,其中 κ 轻链序列任选地与另一多肽(诸如抗体重链和/或轻链域序列)搭配。已利用 κ 样替代轻链(κ 样 SLC)鉴别 κ 样 B 细胞受体(κ 样 BCR)(Frances 等, EMBO J 13 :5937-43(1994);Thompson 等, Immunogenetics 48 :305-11(1998);Rangel 等, J Biol Chem 280 :17807-14(2005))。Rangel 等, J Biol Chem 280(18) :17807-17814(2005)报道了 V κ 样蛋白质的鉴别和分子表征,该 V κ 样蛋白质是未重排的 V κ 基因的产物,其证明与 Thompson 等, Immunogenetics 48 :305-311(1998) 先前报道的 cDNA 序列一致。而 Frances 等, EMBO J 13 :5937-43(1994) 报道了重排生殖系 JC κ 的鉴别和表征,该重排生殖系 JC κ 能够在 B 细胞前体的表面与 μ 重链缔合,从而提供 B 细胞发育的 λ 5 通路的替代物。已提出, κ 样和 λ 样 pre-BCR 协同作用以促进轻链重排且确保 B 细胞祖细胞的突变。对于综述,参看 McKeller 和 Martinez-Valdez Seminars in Immunology 18 :4043(2006)。

[0077] 术语“ λ 5”在本文中以广义使用且是指任何天然的序列或变体 λ 5 多肽,特别包括但不限于天然序列人和其它哺乳动物 λ 5 多肽和由翻译后修饰形成的变体以及所述天然序列多肽的变体。

[0078] 术语“变体 VpreB 多肽”和“VpreB 多肽的变体”可互换使用,且在本文中定义为因氨基酸修饰而在一个或多个氨基酸位置与天然序列 VpreB 多肽不同的多肽。如本文所定义的“变体 VpreB 多肽”将与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列或其片段不同。“变体 VpreB 多肽”优选将保留至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 98% 的与天然序列 VpreB 多肽的序列同一性。在另一优选的实施方案中,“变体 VpreB 多肽”在它的氨基酸序列与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列的同一性方面将小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%或小于 60%。变体 VpreB 多肽特别包含但不限于 VpreB 多肽,其中 VpreB 序列的 C 末端的非 Ig 样独特的尾部被部分或完全去除。术语“变体 λ 5 多肽”和“ λ 5 多肽的变体”可互换使用,且在本文中定义为因氨基酸修饰而在一个或多个氨基酸位置与天然序列 λ 5 多肽不同的多肽。如本文所定义的“变体 λ 5 多肽”将与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列或其片段不同。“变体 λ 5 多肽”优选将保留至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%或至少约 98% 的与天然序列 λ 5 多肽的序列同一性。在另一优选的实施方案中,“变体 λ 5 多肽”在它的氨基酸序列与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列的同一性方面将小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%或小于 60%。变体 λ 5 多肽特别包含但不限于 λ 5 多肽,其中 λ 5 序列的 N 末端的独特的尾部被部分或完全去除。

[0079] 术语“VpreB 序列”在本文中用于指如上文所定义的“VpreB”序列或其片段。

[0080] 术语“ λ 5 序列”在本文中用于指如上文所定义的“ λ 5”序列或其片段。

[0081] 如本文所定义的术语“替代轻链序列”意指包含如上文所定义的“VpreB 序列”和 / 或“ λ 5 序列”的任何多肽序列。

[0082] 术语“ κ 样替代轻链可变域”、“V κ 样 SLC”和“V κ 样”可互换使用,且指未重排 V κ 基因的产物的任何天然的序列多肽和其变体。在一个实施方案中,天然序列 V κ 样多肽的变体包含相对于抗体 κ 轻链序列的 C 末端延伸(尾部)。在一特定的实施方案中,天然序列 V κ 样多肽的变体保留区分 V κ 样多肽与相应抗体 κ 轻链的独特 C 末端延伸(尾部)的至少一部分且优选全部。在另一实施方案中,变体 V κ 样多肽的 C 末端尾部是与序列的剩余部分非天然缔合的序列。在后者实施方案中,天然 V κ 样序列与变体序列中天然存在的 C 末端尾部之间的差异可由一个或多个氨基酸变化(取代、插入、缺失和 / 或添加)造成,或 C 末端尾部可与不同的 V κ 样蛋白质中天然存在的尾部相同。V κ 样多肽可在对应于一个或多个抗体 κ 轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的区中含有氨基酸变化。在所有情况下,相对于天然抗体 κ 轻链可变区序列,变体可且优选地包含具有至少 4 个、或至少 5 个、或至少 6 个、或至少 7 个、或至少 8 个、或至少 9 个、或至少 10 个氨基酸,优选 4-100 个、或 4-90 个、或 4-80 个、或 4-70 个、或 4-60 个、或 4-50 个、或 4-45 个、或 4-40 个、或 4-35 个、或 4-30 个、或 4-25 个、或 4-20 个、或 4-15 个、或 4-10 个氨基酸残基的 C 末端延伸。如本文所定义,V κ 样多肽变体将与天然抗体 κ 或 λ 轻链序列或其片段不同,且优选将保留至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 98% 的与天然序列 V κ 多肽的序列同一性。在另一优选的实施方案中,V κ 样多肽变体在它的氨基酸序列与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列的同一性方面将小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40%。在其它实施方案中,序列同一性介于约 40%与约 95%之间、或介于约 45%与约 90%之间、或介于约 50%与约 85%之间、或介于约 55%与约 80%之间、或介于约 60%与约 75%之间、或介于约 60%与约 80%之间、或介于约 65%与约 85%之间、或介于约 65%与约 90%之间或介于约 65%与约 95%之间。在所有实施方案中,V κ 样多肽优选能够结合靶标。

[0083] 术语“JC κ ”和“JC κ 样”可互换使用,且是指包含与天然序列 κ J 恒定(C)区片段相同的一部分和独特的 N 末端延伸(尾部)的天然序列多肽和其变体。在一个实施方案中,天然序列 JC κ 样多肽的变体包含区分其与抗体 JC 片段的 N 末端延伸(尾部)。在一个特定的实施方案中,天然序列 JC κ 样多肽的变体保留区分 JC κ 样多肽与相应抗体 κ 轻链 JC 片段的独特 N 末端延伸(尾部)的至少一部分且优选全部。在另一实施方案中,变体 JC κ 样多肽的 N 末端尾部是与序列的剩余部分非天然缔合的序列。在后者实施方案中,天然 JC κ 样序列与变体序列中天然存在的 N 末端尾部之间的差异可由一个或多个氨基酸变化(取代、插入、缺失和 / 或添加)引起,或 N 末端尾部可与不同的 JC κ 样蛋白质中本质上存在的尾部相同。天然序列 JC κ 样多肽的变体可在与天然抗体 κ 可变域 JC 序列相同的序列的一部分中含有一个或多个氨基酸变化。在所有情况下,相对于天然抗体 κ 轻链 JC 序列,变体可且优选确实包含具有至少 4 个、或至少 5 个、或至少 6 个、或至少 7 个、或至少 8 个、或至少 9 个、或至少 10 个氨基酸,优选 4-100 个、或 4-90 个、或 4-80 个、或 4-70 个、或 4-60 个、或 4-50 个、或 4-45 个、或 4-40 个、或 4-35 个、或 4-30 个、或 4-25 个、或 4-20 个、或 4-15 个、或 4-10 个氨基酸残基的 N 末端延伸(独特的 N 末端)。如本文所定义,JC κ 样

多肽变体将与天然抗体 κ 或 λ 轻链 JC 序列或其片段不同,且优选将保留与天然序列 JC 多肽至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%或至少约 98%的序列同一性。在另一优选的实施方案中,JC κ 样多肽变体在它的氨基酸序列与天然抗体 λ 或 κ 轻链 JC 序列的同一性方面将小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%或小于 60%。在其它实施方案中,序列同一性介于约 40%与约 95%之间、或介于约 45%与约 90%之间、或介于约 50%与约 85%之间、或介于约 55%与约 80%之间、或介于约 60%与约 75%之间、或介于约 60%与约 80%之间、或介于约 65%与约 85%之间、或介于约 65%与约 90%之间或介于约 65%与约 95%之间。

[0084] 氨基酸序列同一性百分比可使用序列比较程序 NCBI-BLAST2 进行测定 (Altschul 等, *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-3402(1997))。NCBI-BLAST2 序列比较程序可从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载或从 the National Institute of Health, Bethesda, MD 获得。NCBI-BLAST2 使用数个搜索参数,其中这些搜索参数全部设定为默认值,包括例如 unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 和 scoring matrix = BLOSUM62。

[0085] 术语“融合”在本文中用于指不同起源的氨基酸序列通过在框内组合其编码核苷酸序列而组合于一个多肽链中。术语“融合”除融合于它的一个末端以外,还明确地涵盖内部融合,即,将不同起源的序列插入多肽链内。

[0086] 如本文使用的术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”都是指通过共价“肽键”连接的初级氨基酸序列。肽一般由几个氨基酸组成,通常约 2 个至约 50 个氨基酸,且比蛋白质短。术语“多肽”如本文所定义涵盖肽和蛋白质。

[0087] 术语“氨基酸”或“氨基酸残基”通常是指具有它的领域所认可的定义的氨基酸,诸如选自自由以下组成的组的氨基酸:丙氨酸 (Ala);精氨酸 (Arg);天冬酰胺 (Asn);天冬氨酸 (Asp);半胱氨酸 (Cys);谷氨酰胺 (Gln);谷氨酸 (Glu);甘氨酸 (Gly);组氨酸 (His);异亮氨酸 (Ile);亮氨酸 (Leu);赖氨酸 (Lys);蛋氨酸 (Met);苯丙氨酸 (Phe);脯氨酸 (Pro);丝氨酸 (Ser);苏氨酸 (Thr);色氨酸 (Trp);酪氨酸 (Tyr);和缬氨酸 (Val),但需要时,可使用经修饰的、合成的或稀有氨基酸。因此,37CFR1.822(b)(4)中所列的经修饰和非天然氨基酸特别包含在这一定义内且以明确引用的方式并入本文。氨基酸可再分成各种亚组。因此,氨基酸可分成以下组:具有非极性侧链(例如,Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val);具有带负电侧链(例如,Asp、Glu);具有带正电侧链(例如,Arg、His、Lys);或具有不带电极性侧链(例如,Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp 和 Tyr)。氨基酸也可分成以下组:小氨基酸 (Gly、Ala),亲核氨基酸 (Ser、His、Thr、Cys)、疏水性氨基酸 (Val、Leu、Ile、Met、Pro)、芳香族氨基酸 (Phe、Tyr、Trp、Asp、Glu)、酰胺 (Asp、Glu) 和碱性氨基酸 (Lys、Arg)。

[0088] 术语“多核苷酸”是指核酸,诸如 DNA 分子和 RNA 分子以及其类似物(例如,使用核苷酸类似物或使用核酸化学产生的 DNA 或 RNA)。需要时,多核苷酸可例如使用领域内认可的核酸化学合成制备或使用例如聚合酶酶促制备,且需要时,可进行修饰。典型的修饰包括甲基化、生物素化 (biotinylation) 和其它的领域内已知的修饰。另外,核酸分子可为单

链或双链,且需要时,连接于可检测的部分。

[0089] 关于参考多肽而言,术语“变体”是指与天然多肽相比,具有至少一个氨基酸突变或修饰(即,变化)的多肽。可例如通过取代、缺失、插入和/或化学修饰天然氨基酸序列的至少一个氨基酸来制备由“氨基酸修饰”产生的变体。

[0090] “氨基酸修饰”是指预定氨基酸序列的氨基酸序列的变化。示例性的修饰包含氨基酸取代、插入和/或缺失。

[0091] “指定位置的氨基酸修饰”是指指定残基的取代或缺失,或邻近指定残基插入至少一个氨基酸残基。所谓“邻近”指定残基插入意指在其一个至两个残基内插入。插入可为指定残基的N末端或C末端。

[0092] “氨基酸取代”是指用另一不同“置换”氨基酸残基置换预定氨基酸序列中的至少一个现有氨基酸残基。置换残基可为“天然存在的氨基酸残基”(即,由遗传密码编码)且选自自由以下组成的组:丙氨酸(Ala);精氨酸(Arg);天冬酰胺(Asn);天冬氨酸(Asp);半胱氨酸(Cys);谷氨酰胺(Gln);谷氨酸(Glu);甘氨酸(Gly);组氨酸(His);异亮氨酸(Ile);亮氨酸(Leu);赖氨酸(Lys);蛋氨酸(Met);苯丙氨酸(Phe);脯氨酸(Pro);丝氨酸(Ser);苏氨酸(Thr);色氨酸(Trp);酪氨酸(Tyr);和缬氨酸(Val)。用一个或多个非天然存在的氨基酸残基取代也为本文氨基酸取代的定义所涵盖。

[0093] “非天然存在的氨基酸残基”是指除以上列出的那些天然存在的氨基酸残基以外的残基,其能够共价结合邻近的多肽链中的氨基酸残基。非天然存在的氨基酸残基的实例包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其它氨基酸残基类似物,诸如 Ellman 等, *Meth. Enzym.* 202 :301-336(1991) 中所述的氨基酸。为产生所述非天然存在的氨基酸残基,可使用 Noren 等, *Science* 244 :182(1989) 和 Ellman 等(同上)的程序。简言之,这些程序包括用非天然存在的氨基酸残基化学活化抑制基因 tRNA,接着体外转录和翻译 RNA。

[0094] “氨基酸插入”是指在预定氨基酸序列中并入至少一个氨基酸。虽然插入通常将由插入一个或两个氨基酸残基组成,但本申请涵盖较大的“肽插入”,例如插入约3个至约5个或甚至多达约10个氨基酸残基。如以上所公开,插入的残基可以是天然存在的或非天然存在的。

[0095] “氨基酸缺失”是指从预定氨基酸序列中移除至少一个氨基酸残基。

[0096] 除非另有说明,否则术语“诱变”是指改变多核苷酸或多肽序列的任何本领域内认可的技术。优选的诱变类型包括易错 PCR 诱变、饱和诱变或其它定点诱变。

[0097] “定点诱变”是本领域的技术标准,且使用与单链噬菌体 DNA 互补的合成寡核苷酸引物实施,该单链噬菌体 DNA 欲进行除有限错配以外的诱变处理,产生所需突变。简言之,使用合成的寡核苷酸作为引物以指导合成与单链噬菌体 DNA 互补的链,且将所得双链 DNA 转化到噬菌体支撑的宿主细菌中。将所转化细菌的培养物涂铺于顶部琼脂中,使得从含噬菌体的单一细胞形成菌斑。理论上,50%的新菌斑将含有具有突变形式作为单链的噬菌体;50%将具有原始序列。通过在允许确切匹配的杂交但与原始链的错配足以阻止杂交的温度下与激酶化的合成引物杂交来选择目标菌斑。然后选择与探针杂交的菌斑,测序并培养,且回收 DNA。

[0098] 术语“中和分子”在本文中广义地使用且是指抑制病毒重复感染靶细胞的任何分子,而不管实现中和的机理。中和分子优选为如上文所定义的抗体或抗体样分子或结合分

子。中和可例如通过抑制病毒于细胞表面的附着或粘附,例如通过使分子工程化来实现,该分子诸如直接结合负责病毒的附着或粘附的位点的或结合在其附近的抗体或抗体样分子或结合分子。中和也可通过指向病毒粒子表面的分子(诸如抗体或抗体样分子的分子)实现,其中所述分子指向病毒粒子表面导致病毒粒子聚集。中和还可通过继病毒附着于靶细胞之后抑制病毒与细胞膜的融合、通过抑制内吞作用、抑制来自受感染细胞的子代病毒等来发生。本发明的中和分子,诸如抗体或抗体样分子或结合分子,不受实现中和的机理所限制。

[0099] 术语“抗体谱”在本文中广义地使用且是指可用于对特定性质筛选的抗体或抗体片段的集合,所述特定性质诸如结合能力、结合特异性、胃肠运输能力、稳定性、亲和力等。术语特别包括抗体文库,包括所有形式的组合文库,诸如抗体噬菌体展示文库,包括但不限于任何来源的单链 Fv(scFv) 和 Fab 抗体噬菌体展示文库,包括天然、合成和半合成文库。

[0100] 类似地,“抗体样分子谱”(如上文所定义)是指可用于对特定性质筛选的所述分子的集合,所述特定性质诸如结合能力、结合特异性、胃肠运输能力、稳定性、亲和力等。术语特别包括替代抗体文库和 κ 样轻链构建体(如上文所定义)文库,包括所有形式的组合文库,诸如噬菌体展示文库。组合替代抗体文库公开在例如在 Xu 等,(2008),同上。

[0101] 术语“抗体谱”在本文中广义地使用且是指可用于对特定性质筛选的抗体或抗体片段的集合,所述特定性质诸如结合能力、结合特异性、胃肠运输能力、稳定性、亲和力等。术语特别包括抗体文库,包括所有形式的组合文库,诸如抗体噬菌体展示文库,包括但不限于任何来源的单链 Fv(scFv) 和 Fab 抗体噬菌体展示文库,包括天然、合成和半合成文库。

[0102] “噬菌体展示文库”是表达克隆的蛋白质序列的集合作为与噬菌体外壳蛋白的融合物的蛋白质表达文库。因此,用语“噬菌体展示文库”在本文中是指噬菌体(例如,丝状噬菌体)的集合,其中噬菌体表达外部(通常异源)蛋白质。外部蛋白质能够自由地与噬菌体接触的其它部分相互作用(结合)。每一展示外部蛋白质的噬菌体都是噬菌体展示文库的“成员”。

[0103] “抗体噬菌体展示文库”是指展示抗体或抗体片段的噬菌体展示文库。抗体文库包含噬菌体群或编码所述噬菌体群的载体的集合或含有所述噬菌体或载体的集合的细胞。文库可为单价的,平均每个噬菌体粒子展示一个单链抗体或抗体片段,或为多价的,平均每个病毒粒子展示两个或多个抗体或抗体片段。术语“抗体片段”包括但不限于单链 Fv(scFv) 片段和 Fab 片段。优选的抗体文库平均包含 10^6 个以上、或 10^7 个以上、或 10^8 个以上或 10^9 个以上不同的成员。

[0104] 术语“丝状噬菌体”是指能够在其表面上展示异源多肽的病毒粒子,且包括但不限于 f1、fd、Pf1 和 M13。丝状噬菌体可含有选择标记,诸如四环素(例如,“fd-tet”)。本领域技术人员熟知各种丝状噬菌体展示体系(参看例如 Zacher 等, Gene 9 : 127-140(1980); Smith 等, Science 228 : 1315-1317(1985); 和 Parmley 和 Smith, Gene 73 : 305-318(1988))。

[0105] 术语“淘选(panning)”用于指鉴别和分离携带对靶标具有高亲和力和特异性的化合物(诸如抗体)的噬菌体的多轮筛选过程。

[0106] 如本文所用的术语“非人动物”包括但不限于哺乳动物,诸如非人灵长类动物、啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)和非啮齿动物(诸如兔、猪、绵羊、山羊、牛、猪、马和驴)。它还

包括禽类（例如，家鸡、火鸡、鸭、鹅等）。如本文所用的术语“非灵长类动物”是指除灵长类动物以外的哺乳动物，包括但不限于以上特别列出的哺乳动物。

[0107] 词语“功能上不同的抗体”和其语法变体用于指至少一种性质彼此不同的抗体，所述性质包括但不限于结合特异性、结合亲和力和任何免疫或生物功能，诸如中和靶标的能力、生物活性的程度或质量等。

[0108] 词语“保守氨基酸残基”用于指彼此比对的两个或多个氨基酸序列之间相同的氨基酸残基。

[0109] 如本文所用的术语“表位”是指具有至少约 3 至 5 个、优选至少约 5 至 10 个或至少约 5 至 15 个氨基酸且通常不超过约 500 个或约 1,000 个氨基酸的序列，其界定单独或作为较大序列的一部分而结合响应于所述序列所产生的抗体的序列。表位不局限于具有与衍生这一表位的母蛋白质的一部分相同的序列的多肽。实际上，病毒基因组处于恒定变化的状态，且分离株之间表现相对较高程度的可变性。因此，术语“表位”涵盖与天然序列相同的序列，以及天然序列的修饰，诸如缺失、取代和 / 或插入。虽然所述修饰在性质上一般是保守的，但也涵盖非保守的修饰。术语特别包括“模拟表位 (mimotope)”，也就是不鉴别连续的线性天然序列或天然蛋白质中未必存在但功能上模拟天然蛋白质上的表位的序列。术语“表位”特别包括线性和构型表位。

[0110] B. 一般技术

[0111] 进行本发明方法的技术在本领域中众所周知，且描述于标准实验室教科书中，包括例如 Ausubel 等, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons(1997); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 3 版, J. Sambrook 和 D.W. Russell 编著, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*, P.M.O' Brian 和 R. Aitken 编著, Humana Press, *Methods in Molecular Biology*, 第 178 卷; *Phage Display: A Laboratory Manual*, C.F. Barbas III 等编著, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 和 *Antibodies*, G. Subramanian 编著, Kluwer Academic, 2004。诱变可例如使用定点诱变进行 (Kunkel 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492(1985))。

[0112] 在一方面，本发明的病毒抗原中和分子是抗体，其通常使用抗体或多样化多肽文库选择。虽然在以下描述中，本发明参考某些类型的抗体文库说明，但本发明不局限于使用任何特定类型的抗体或多样化多肽文库。重组单克隆抗体文库可基于免疫片段或天然片段。来自免疫抗体文库的抗体通常用 V_H 和 V_L 基因池构建，将所述 V_H 和 V_L 基因池从源 B 细胞克隆到用于表达的适当载体中以产生随机组合文库，这一文库接着可被选择和 / 或筛选。其它类型的文库可包含来自不明确偏好结合抗原的克隆的基因来源的抗体片段。因此，天然抗体文库从天然的未免疫的重排 V 基因衍生。合成抗体文库完全通过体外方法构建，在一个或多个 V 基因的 CDR 中引入具有全简并度或修整简并度的区域。半合成文库组合天然与合成的多样性，且通常建立以增加天然多样性，同时维持所需水平的功能多样性。因此，所述文库可例如通过改组天然 CDR 区 (Soderlind 等, *Nat. Biotechnol.* 18: 852-856(2000))，或通过组合来自人 B 细胞的天然重排的 CDR 序列与合成 cCDR1 与 CDR2 多样性 (Hoet 等, *Nat. Biotechnol.* 23: 455-38(2005)) 来建立。本发明涵盖使用天然、合成和

半合成抗体文库或其任何组合。

[0113] 类似地,本发明的方法不受用于抗体展示的任何特定技术限制。虽然本发明参考噬菌体展示说明,但本发明的抗体还可用其它展示和富集技术鉴别。抗体片段已展示于编码抗体基因的丝状噬菌体的表面上 (Hoogenboom 和 Winter J. Mol. Biol. 222 : 381388(1992) ;McCafferty 等, Nature 348(6301) :552 554(1990) ;Griffiths 等, EMBO J. ,13(14) :3245-3260(1994))。关于选择和筛选抗体文库的技术的综述,参看例如 Hoogenboom, Nature Biotechnol. 23(9) :1105-1116(2005)。另外,本领域中已知多种系统,所述系统展示异源蛋白质和其片段于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表面上 (Agterberg 等, Gene 88 :37-45(1990) ;Charbit 等, Gene 70 :181-189(1988) ;Francisco 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :2713-2717(1992)), 和酵母上,诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Boder 和 Wittrup, Nat. Biotechnol. 15 :553-557(1997) ;Kieke 等, Protein Eng. 10 :1303-1310(1997))。其它已知的展示技术包括核糖体或 mRNA 展示 (Mattheakis 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :9022-9026(1994) ;Hanes 和 Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :4937-4942(1997))、DNA 展示 (Yonezawa 等, Nucl. Acid Res. 31(19) : e118(2003)) ;微生物细胞展示,诸如细菌展示 (Georgiou 等, Nature Biotech. 15 : 29-34(1997)) ;展示于哺乳动物细胞上,孢子展示 (Isticato 等, J. Bacteriol. 183 : 6294-6301(2001) ;Cheng 等, Appl. Environ. Microbiol. 71 :3337-3341(2005) 和 2006 年 11 月 13 日提交的共同代决临时申请第 60/865,574 号) ;病毒展示,诸如逆转录病毒展示 (Urban 等, Nucleic Acids Res. 33 :e35(2005)) ;基于蛋白质-DNA 连接的展示 (Odegrip 等, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101 :2806-2810(2004) ;Reiersen 等, Nucleic Acids Res. 33 : e10(2005)), 和微珠展示 (Sepp 等, FEBS Lett. 532 :455-458(2002))。

[0114] C. 优选实施方案的详细描述

[0115] 在一方面,本发明涉及单克隆抗体和抗体样分子的选择、制备和用途,所述单克隆抗体和抗体样分子中和甲型流感病毒的一个以上亚型和 / 或一个以上分离株,结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,但不抑制血细胞凝集。

[0116] 甲型流感病毒的病毒粒子含有 8 个片段的线性反义单链 RNA。总基因组长度是 13600 个核苷酸,且 8 个片段的长度分别为 2350 个核苷酸、2350 个核苷酸、2250 个核苷酸、1780 个核苷酸、1575 个核苷酸、1420 个核苷酸、1050 个核苷酸和 900 个核苷酸。甲型流感病毒的宿主特异性和减毒已个别地或以病毒基因的组合归因于病毒血凝素 (H, HA)、核蛋白 (NP)、矩阵 (M) 和非结构 (NS) 基因 (参看例如, Rogers 等, Virology 127 :361-373(1983) ; Scholtissek 等, Virology 147 :287-294(1985) ;Snyder 等, J. Clin. Microbiol. 24 : 467-469(1986) ;Tian 等, J. Virol. 53 :771-775(1985) ;Treanor 等, Virology 171 : 1-9(1989))。

[0117] 甲型流感病毒和它们的表面蛋白质 (包括血凝素和神经氨酸酶蛋白质) 的核苷酸和氨基酸序列可从 GenBank 和其它序列数据库,诸如洛斯阿拉莫斯国家实验室 (Los Alamos National Laboratory) 的理论生物学和生物物理学组 (Theoretical Biology and Biophysics Group) 维护的流感序列数据库 (Influenza Sequence Database)) 获得。甲型流感病毒血凝素的 15 种已知 H 亚型 (H1-H15) 的氨基酸序列示出在 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205 中,所述申请公开以全文引用的方式并入本文中。

最近从瑞典的黑头鸥中分离出另外的甲型流感病毒血凝素亚型 (H16), 且由 Fouchier 等, J. Virol. 79(5) :2814-22(2005) 报道。还已知各 H 亚型的多种菌株。举例来说, 命名为 H5A/香港 /156/97 的 HA 蛋白质的序列从 1997 年 5 月在香港由人分离的甲型 H5N1 病毒测定, 且在 Suarez 等, J. Virol. 72 :6678-6688(1998) 中与从其它相关 H5N1 分离株获得的数种另外的菌株的序列比较显示。

[0118] 流感病毒神经氨酸酶的催化和抗原位点的结构已由 Colman 等, Nature 303 :41-4(1983) 公开, 且神经氨酸酶序列可从 GenBank 和其它序列数据库获得。

[0119] 已知由受感染个体的免疫反应产生的病毒特异性抗体通常经由与病毒血凝素相互作用来中和病毒 (Ada 等, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 128 :1-54(1986) ;Couch 等, Annu. Rev. Microbiol. 37 :529-549(1983))。流感病毒血凝素的三维结构和流感病毒血凝素与中和抗体之间的复合物的晶体结构也已确定并公开, 参看例如 Wilson 等, Nature 289 :366-73(1981) ;Ruigrok 等, J. Gen. Viro. 169(Pt 11) :2785-95(1988) ;Wrigley 等, Virology 131(2) :308-14(1983) ;Daniels 等, EMBO J. 6 :1459-1465(1987) ;和 Bizebard 等, Nature 376 :92-94(2002)。

[0120] 根据本发明, 具有所需性质的抗体从一个或多个抗体文库中鉴别, 而所述文库可来自多种来源且可具有不同类型。

[0121] 综合人流感抗体文库

[0122] 综合人流感抗体文库可从自患各种先前流感、季节性爆发流行病和大流行的恢复期患者获得的抗体建立, 所述流感包括 1968 年香港流感 (H3N2)、1957 年亚洲流感 (H2N2)、1918 年西班牙流感 (H1N1) 和 2004/2005 年禽流感 (H5N1)。例如参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205, 其以全文引用的方式并入本文中。为制备所述文库, 从已知或怀疑感染流感病毒的个体收集血液或骨髓样本。外周血液样本、尤其是来自偏远地区来源的外周血液样本在运输和使用之前可能需要稳定。用于这一目的的试剂盒众所周知且市面上有售, 诸如 BD Vacutainer® CPT™ 细胞制备试管可用于离心纯化淋巴细胞, 且使用 guanidium、Trizol 或 RNeasy 稳定样本。收到稳定的淋巴细胞或整个骨髓后, 使用本领域已知的免疫球蛋白低聚引物进行 RT-PCR 以获得重链和轻链系。遵循本领域已知的程序, 使 PCR 产物与连接子低聚物组合以产生 scFv 文库, 从而与 m13PIII 蛋白质直接克隆于框内。

[0123] 在典型方案中, 人血清中的抗体可通过熟知的血清学测定检测, 包括例如通过熟知的血凝素抑制 (HAI) 测定 (Kendal, A. P., M. S. Pereira 和 J. J. Skehel. 1982. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia), 或微中和测定 (Harmon 等, J. Clin. Microbiol. 26 :333-337(1988))。如果血清样本已证实含有流感中和抗体, 那么这一检测步骤可能不是必要的。接着利用本领域已知的方法加工来自全血的淋巴细胞或骨髓中存在的淋巴细胞。用 Tri BD 试剂 (Sigma) 从新鲜组织或 RNeasy 稳定的组织中提取全部 RNA。接着, 使用 Oligotex 纯化 (Qiagen) 将分离的供体总 RNA 进一步纯化为 mRNA。接着, 根据 AccuScript 逆转录酶 (Stratagene) 的方案, 通过使用随机九聚物寡核苷酸和或低聚 (dT)₁₈ 引物产生第一链 cDNA 合成。简言之, 在 65℃ 下将 AccuScript RT 缓冲液 (Stratagene) 中的 100ng mRNA、0.5mM dNTP 和 300ng 随

机九聚物和或 500ng 低聚 (dT)₁₈ 引物孵育 5 分钟,接着快速冷却到 4℃。然后,向各反应中添加 100mM DTT、Accuscript RT 和 RNase 阻断剂,并在 42℃下孵育 1 小时,且通过在 70℃下加热 15 分钟使逆转录酶失活。可使用所获得的 cDNA 作为模板来进行抗体重链和轻链 V 基因的 RT-PCR 扩增,然后可克隆到载体中,或如果预期用噬菌体展示文库,那么克隆到噬粒载体中。这一程序产生抗体重链和轻链可变区克隆谱 (V_H 和 V_L 库),其可分开或组合用于筛选。

[0124] 可以与上述方式类似的方式回收、稳定和获取来自早期流行病和大流行(诸如 1918 年西班牙流感)的存活者的外周淋巴细胞的免疫球蛋白谱。对于另外的 H1 和 H3 文库,可从适当计时的接种疫苗的局部源供体回收谱。作为另一方案,可从商业来源购买市面上有售的骨髓总 RNA 或 mRNA 以产生适合 H1 和 H3 的文库,且取决于供体背景,还适合 H2 抗体筛选。

[0125] 合成人样谱

[0126] 在本发明的方法中,合成的人抗体谱可由合成的抗体文库代表,所述文库可利用本领域已知的方法制备或从商业来源获得。因此,完全合成的人谱例如描述于 Horowitz 等,2009 年 3 月 26 日公开的美国专利申请公开 No. 20090082213 中,其全文在此以引用的方式明确地并入本文。简言之,这一专利申请描述免疫球蛋白文库,其中已将预定氨基酸组合引入目标免疫球蛋白的一个或多个互补决定区中。另外,例如通用的免疫球蛋白文库(包括所述库的子集)描述于 2003 年 12 月 11 日公开的美国专利申请公开 No. 20030228302 中,其全文在此以引用的方式明确地并入本文。

[0127] 具有各种突变的抗体重链和轻链的特异性文库可组合以提供本发明抗体的骨架构建体,接着在重链与轻链的 CDR 中引入多样性。这一多样性可利用本领域已知的方法实现,例如通过 Kunkel 诱变,且可重复数次以进一步增加多样性。因此,例如可通过多轮 Kunkel 诱变单独或同时于重链与轻链 CDR1 和 CD2 区中引入多样性。必要时,可根据 CDR 长度分离各种 Kunkel 克隆和/或可移除靶 CDR(例如,CDR1 或 CDR3)中缺乏多样性的克隆,例如通过用模板特异性限制酶消化。这些步骤完成之后,文库尺寸应超过约 10⁹ 个成员,但具有更少成员的文库也适用。

[0128] 在一具体的实施方案中,使用免疫的抗体文库与合成的抗体文库鉴别本发明的中和抗体。这两种类型的文库根本上不同。合成的抗体文库是具有预测的结合抗原的能力的人抗体的合成集合,而免疫谱视情况将含有特别地识别禽类 H5 血凝素和/或 H1、H2 或 H3 血凝素的序列。因此,免疫谱理论上经优化以识别靶流感亚型的关键组件。由于这些差异,这两种方法产生不同的抗体组,且因此提供用于鉴别所需中和抗体的更有效的方法。

[0129] 高免疫的非人灵长类动物抗体文库

[0130] 在这一方法中,从高免疫的非人灵长类动物(诸如猕猴或狒狒)获得抗体文库。具体地说,用甲型流感病毒的各种亚型或用各种血凝素(H)蛋白质使非人灵长类动物免疫。将发展识别甲型流感病毒亚型或血凝素的抗体的效价的动物处死并采集它们的脾脏,其中用甲型流感病毒亚型或血凝素免疫动物。收集免疫动物的血液或骨髓,且如上所述收集所产生的抗体并扩增以获得综合流感抗体文库。

[0131] 分离本发明中和抗体的策略

[0132] 无论所用抗体文库的类型如何,都可发现具有双特异性的抗体,诸如对两种不同

甲型流感亚型和 / 或同一亚型的两个不同菌株 (分离株) 和 / 或人与非人分离株显示反应性的抗体, 且通过控制的交叉反应性选择和 / 或定向组合和 / 或诱变工程化来优化。

[0133] 在图 1 中所说明的典型的富集方案中, 对包含对称为靶标 A 和靶标 B 的两个靶标显示交叉反应性的抗体的文库进行多轮富集 (参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205, 其全文以引用的方式并入本文)。如果富集基于与靶 A 的反应性, 那么每一轮富集都将增加池针对靶标 A 的反应强度。类似地, 如果富集基于对靶标 B 的反应性, 那么每一轮富集都将增加池针对靶标 B 的反应强度。虽然这一方法是指淘选, 即筛选噬菌体展示文库时所用的选择方法 (参看下文), 但是所述方法同样适用于上文讨论的任何类型的文库, 本领域以其它方式已知的其它文库和任何类型的展示技术。靶标 A 与靶标 B 包含抗体结合的任何靶标, 包括但不限于流感病毒的各种分离株、类型和亚型。

[0134] 因为本发明的目标是鉴别具有多种特异性的中和抗体, 所以已开发交叉反应性发现选择方案。为简单起见, 这一方案在示出具有双特异性抗体的选择的图 2 中说明。在这一情况下, 首先就对一个靶标 (例如靶标 A) 的反应性对包含对两个靶标 (靶标 A 与靶标 B) 显示反应性的抗体的抗体文库加以选择, 接着就对另一靶标 (例如靶标 B) 的反应性加以选择。每一轮连续选择都增强所得池针对这两个靶标的反应强度 (也参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205, 其全文以引用的方式并入本文)。因此, 这一方法尤其适用于鉴别具有双特异性的抗体。当然, 通过包括针对其它靶标的另外轮富集, 该方法可扩展到鉴别针对其它靶标显示反应性的抗体。又, 如果筛选的文库是噬菌体展示文库, 那么通过交叉反应性淘选进行选择, 但也可使用其它文库和其它选择方法。

[0135] 以上讨论的两种方法的组合包括分别关于针对靶标 A 与靶标 B 反应性的两轮分开的富集, 重组两个所获得的池, 接着是如上所述的交叉反应性选择轮 (参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205, 其全文以引用的方式并入本文)。这一方法在图 1 中说明。正如在纯交叉反应性选择中, 重组文库的每一轮选择增加所得池针对两个靶标的反应强度。

[0136] 在另一实施例中, 在图 2 中说明, 首先鉴别对靶标 A 显示强反应性且对靶标 B 具有可检测的交叉反应性的克隆。基于这一克隆, 制备诱变文库, 然后在交替轮中分别就对靶标 B 和靶标 A 的反应性加以选择。这一方案将产生对靶标 A 保持强反应性且对靶标 B 具有增加的反应性的抗体 (参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205, 其全文以引用的方式并入本文)。正如先前, 如果筛选的文库是噬菌体展示文库, 那么通过淘选进行选择, 但根据相同策略, 也可使用其它文库、其它展示技术和其它选择法。

[0137] 如上所讨论, 靶标 A 与靶标 B 可例如为甲型流感病毒的两种不同亚型、相同甲型流感病毒的两个不同菌株 (分离株)、两个不同物种的亚型或分离株, 其中一个物种优选为人。因此, 例如靶标 A 可为 H1N1 病毒的新喀里多尼亚分离株的分离株, 且靶标 B 可为 H3N2 病毒的威斯康星州分离株。要强调的是, 这些实施例仅仅是说明性的, 且可以类似的方式鉴别、选择和优化对任何两个靶标或多个靶标具有双特异性和多特异性的抗体。

[0138] 或者, 如果使用允许分离离散骨架和 CDR 长度的抗体文库 (诸如 UAL) 寻找对靶标 A 的抗体, 可筛选抗原 B 且可将该文库限制为相似参数的多样性集合。一旦发现针对抗原 B 的抗体, 那么可使用基于相应 A 和 B 抗体的嵌合或诱变抗体工程化双特异性集合。

[0139] 噬菌体展示

[0140] 在一特定的实施方案中,本发明利用噬菌体展示抗体文库在功能上发现具有多(包括双)特异性的中和单克隆抗体。所述抗体可例如为能够中和一种以上甲型流感病毒亚型的单克隆抗体,所述亚型包括 H1、H3 和 / 或 H9 亚型, H5、H7 和 / 或 H9 亚型,诸如 H1 与 H3 ;H5 与 H1 ;H5 与 H2 ;H5 与 H3 ;H5、H1 和 H2 ;H5、H1 和 H3 ;H5、H2 和 H3 ;H1、H2 和 H3 等亚型,和 / 或同一亚型的一种以上菌株(分离株)。

[0141] 为产生噬菌体抗体文库,将从任何来源获得的 cDNA 文库(包括以上讨论的库)克隆到噬粒载体中。

[0142] 因此,将如上所述利用 RT-PCR 从淋巴细胞或骨髓获得的抗体重链和轻链谱的集合重新装配成融合于 m13pIII 蛋白质的 scFv 库。组合的库将含有约 10^6 以上、或 10^7 以上、或 10^8 以上或 10^9 以上个不同成员,优选为 10^7 以上个不同成员或以上。关于质量控制,对随机克隆进行测序以评估整个谱复杂性。

[0143] 类似地,最初从天然或免疫的人或高免疫的非人灵长类动物抗体文库通过 PCR 获得重链和轻链可变区之后,组合 PCR 产物与连接子低聚物以产生 scFv 文库,以便与 M13pIII 外壳蛋白直接克隆于框中。所述文库将含有约 10^6 以上、或 10^7 以上、或 10^8 以上或 10^9 以上个不同成员,优选为 10^7 以上个不同成员或以上。作为质量控制步骤,对随机克隆进行测序以评估整个谱尺寸和复杂性。

[0144] 抗体噬菌体展示文库可含有各种形式的抗体,诸如呈单链 Fv(scFv) 或 Fab 形式。关于综述,参看例如 Hoogenboom, Methods Mol. Biol. 178 :1-37 (2002)。

[0145] 筛选

[0146] 鉴别具有所需中和性质的抗体的筛选方法在上文已有描述。反应性可基于与所需血凝素蛋白质直接结合来评估。

[0147] 血凝素 (HA) 蛋白质产生

[0148] 血凝素 (HA) 蛋白质可利用 DNA 重组技术产生。在这一方法中,将 HA 基因克隆到适当载体中,优选杆状病毒表达载体以在感染杆状病毒的昆虫细胞中表达,诸如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) 细胞。

[0149] 将编码 HA 蛋白质的核酸插入有或无 C 末端附加表位(诸如 poly-his(六聚组氨酸标记))的杆状病毒表达载体中,诸如 Bac-to-Bac (Invitrogen)。poly-his 标记可通过镍整合色谱法容易地纯化。

[0150] 克隆通常包括通过装配 PCR 从个别合成的低聚物制备参考 cDNA。通过将适当突变低聚物取代为另外的装配 PCR 或通过诱变技术(诸如通过 Kunkel 诱变),制备相应的分离株变体 HA 蛋白质。

[0151] 通过使用脂质体(可商购自 Gibco-BRL)将上述 Bacmid 转染于 Sf9 细胞(ATCC CRL 1711)中产生重组杆状病毒。在 28°C 下孵育 4-5 天后,采集释放的病毒且用于进一步扩增。如 O' Reilley 等, Baculovirus Expression Vectors :A Laboratory Manual (Oxford : Oxford University Press, 1994) 所述进行病毒感染和蛋白质表达。

[0152] 然后可如下通过例如 Ni^{2+} 螯合亲和色谱法纯化所表达的 poly-His 标记的 HA 多肽。如 Rupert 等, Nature 362 :175-179 (1993) 所述从感染重组病毒的 Sf9 细胞收集上清液。用 5mL 床体积制备 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱(可商购自 Qiagen),用 25mL 水洗涤,且用 25mL 上样缓冲液平衡。将过滤的细胞提取物以每分钟 0.5mL 装载于柱上。用上样缓冲液洗涤柱到

基线 A_{280} , 此时开始组分收集。接着, 用二次洗涤缓冲液 (50mM 磷酸盐 ; 300mM NaCl, 10% 甘油, pH 6.0) 洗涤柱, 此洗脱非特异性结合的蛋白质。再次达到 A_{280} 基线之后, 用 0 至 500mM 于二次洗涤缓冲液中的咪唑梯度使柱显色。收集 1mL 组分并利用 SDS-PAGE 分析和用与碱性磷酸酶缀合的 Ni^{2+} -NTA (Qiagen) 进行银染或蛋白质印迹。汇集含有洗脱的 His₁₀ 标记的 HA 多肽的组分并针对上样缓冲液进行透析。

[0153] 或者, IgG 标记 (或 Fc 标记) HA 多肽的纯化可使用已知的色谱技术 (包括例如蛋白质 A 或蛋白质 G 柱色谱) 进行。

[0154] 作为使用 Sf9 细胞的替代, HA 蛋白质还可在其它重组宿主细胞、原核生物、酵母或高等真核生物细胞中产生。合适的原核生物包括但不限于真菌, 诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) (例如大肠杆菌、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)); 沙门菌属 (*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)); 沙雷氏菌属 (*Serratia*) (例如粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*)) 和志贺氏菌属 (*Shigella*) 以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) (诸如枯草杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)) (例如 1989 年 4 月 12 日于 DD 266, 710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P); 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。多种大肠杆菌菌株可公开获得, 诸如大肠杆菌 K12 菌株 MM294 (ATCC 31, 446); 大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537); 大肠杆菌菌株 W3110 (ATCC 27, 325) 和 K5772 (ATCC 53, 635)。

[0155] 除原核生物以外, 真核微生物 (诸如丝状真菌或酵母) 是含有编码 HA 多肽的核酸的载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母是常用的低等真核宿主微生物。然而, 通常可获得许多其它属、种和菌株且适用于本文中, 诸如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach 和 Nurse, *Nature* 290:140 (1981); 1985 年 5 月 2 日公开的 EP139, 383; 克鲁维斯酵母 (*Kluyveromyces*) 宿主 (美国专利 No. 4, 943, 529; Fleer 等, *Bio/Technology* 9:968-975 (1991)), 诸如乳酸克鲁维斯酵母 (*K. lactis*) (MW98-8C、CBS683、CBS4574; Louvencourt 等, *J. Bacteriol* 737 (1983))、脆壁克鲁维斯酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、保加利亚克鲁维斯酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、维克汉姆克鲁维斯酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、克鲁维斯雄酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维斯酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906; Van den Berg 等, *Bio/Technology* 8:135 (1990))、耐热克鲁维斯酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维斯酵母 (*K. marxianus*); 耶氏酵母 (*Yarrowia*) (EP402, 226); 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070; Sreekrishna 等, *J. Basic Microbiol.* 28:265-278 (1988)); 假丝酵母属 (*Candida*); (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234); 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) (Case 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76:5259-5263 (1979)); (*Schwanniomyces*) (诸如 (*Schwanniomyces occidentalis*)) (1990 年 10 月 31 日公开的 EP 394, 538); 和丝状真菌 (诸如脉孢菌 (*Neurospora*)、青霉菌 (*Penicillium*)、弯颈霉菌 (*Tolyposcladium*)) (1991 年 1 月 10 日公开的 W091/00357) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主 (诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*)) (Ballance 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289 (1983); Tilburn 等, *Gene* 26:205-221 (1983); Yelton 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474 (1984)) 和黑曲霉

(*A. niger*) (Kelly 和 Hynes, EMBO J. 4 :475-479(1985))。甲醇酵母适合于本文且包括但不限于能够于甲醇上生长的酵母,选自汉逊酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属、克勒克酵母属 (*Kloeckera*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、植酵母属 (*Saccharomyces*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*) 和红酵母属 (*Rhodotorula*) 组成的属。示例性的这类酵母的具体物种的列表可见于 C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs* 269(1982)。

[0156] 用于表达 HA 蛋白质的适当宿主细胞包括多细胞生物体的细胞。无脊椎动物细胞的实例包括上述昆虫细胞 (诸如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9) 以及植物细胞。适用的哺乳动物宿主细胞细胞系的实例包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 和 COS 细胞。更具体的实例包括被 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系 (亚克隆以在悬浮培养物中生长的 HEK 293 或 HEK 293 细胞) (Graham 等, J. Gen. Virol 36 :59(1977)); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216(1980)); 小鼠足细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 :243-251(1980)); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 和小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)。适当的宿主细胞的选择被认为在本领域的技术范围内。

[0157] 血凝素 (HA) 蛋白质淘选

[0158] 将 HA 蛋白质固定于微量测试孔或磁性微珠的表面上以淘选上述文库。在一特定实施方案中,使各文库在 4°C 结合一种或多种 H 蛋白质 2 小时,然后用冷 PBS 彻底洗涤,之后用 0.2M 甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH2.5) 洗脱 HA 特异性结合克隆。回收的噬菌体是 pH 被中和的且通过感染易感宿主大肠杆菌而扩增。接着,可诱导噬粒制备以重复阳性克隆的富集,接着分离克隆得到筛出物。充分富集之后,通过将整个池感染到非琥珀抑制基因大肠杆菌菌株 (诸如 HB2151) 中以表达可溶的 scFv 蛋白质使之转移。或者,可将池亚克隆到单体 scFv 表达载体 (诸如 pBAD) 中,且表达重组的可溶 scFv 蛋白质以用于如下所述的体外分析和表征。

[0159] 表征

[0160] 如上所述测试克隆对一种或多种 H 蛋白质的结合亲和力。举例来说,测试对 H1 蛋白质 (Refseq ABQ10137, 分离株新喀里多尼亚 /20/99 (H1N1) 和 / 或 Refseq ABU99069, 分离株索罗门群岛 /3/06 (H1N1)) 的结合,且并行测试对 H3 蛋白质的结合 (Refseq ACC67032, 分离株威斯康星州 /67/05 (H3N2) 和 / 或 Refseq CAA24269、香港 /68 (H3N2)) 的结合,但也可仅使用其它分离株或其任何组合。可测试基于所证明的结合而获得的阳性克隆的中和能力。关于中和的典型功能测试涉及使用与红细胞结合的整个病毒的血细胞凝集抑制测定。或者,利用重组血凝素蛋白质和红细胞的血细胞凝集测定也是可能的。为消除对全血的需要,可在气道上皮细胞上进行血凝素结合抑制测定。结合测定可以任何配置进行,包括但不限于基于任何流式细胞术或细胞 ELISA (cELISA) 的测定。使用 cELISA 的优点在于,它不使用昂贵的流式细胞术设备且可提供更自动的克隆评估和更强大的数据收集。另一方面,流式细胞术可提供更高的灵敏度、一致性和速度。

[0161] 在一方面,本发明抗体对含有 H1HA 的流感病毒和 / 或含有 H3HA 的流感病毒具有结合亲和力。本发明抗体的结合亲和力可利用本领域技术人员已知的方法测定,例如利用 Munson 等, Anal. Biochem. , 107 :220(1980) 的 Scatchard 分析。在一个实施方案中,结合亲和力 < 100pM。在其它实施方案中,抗体的结合亲和力为从约 1×10^{-7} 到约 1×10^{-13} M, 从

约 1×10^{-8} 到约 1×10^{-12} M 或从约 1×10^{-9} 到约 1×10^{-11} M。在其它实施方案中,抗体的结合亲和力和为约 1×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M、约 1×10^{-10} M、约 1×10^{-11} M、约 1×10^{-12} M 或约 1×10^{-13} M。

[0162] 优化:诱变文库

[0163] 对于流感流行病和大流行(包括与由非人动物病毒引起的人感染相关的潜在大流行)的有效管理,需要有效中和 H 蛋白质的当前分离株以及未来突变的抗体。为实现这一目标,需要鉴别结合靶血凝素亚型的所有已知分离株的各种 H(例如, H1、H3、H5 等)中和克隆。

[0164] 在一些情况下,交叉反应性抗体通过针对单一抗原的定向筛选而显现。为增加分离交叉反应性克隆的可能性,应通过针对多种抗原渐进筛选应用多种选择压力。在任一情况下,交叉反应性都可利用本领域已知的抗体优化方法进一步改进。举例来说,可对本文所述的免疫球蛋白链的可变区的某些区进行一种或多种优化策略,包括轻链改组、目的性诱变、CDR 合并和所选 CDR 和 / 或骨架区的定向诱变。

[0165] 一种设计为以有意引入具有一种以上甲型流感亚型和 / 或同一亚型的一种以上分离株的本文抗体的交叉反应性的诱变方法在本文中称为“目的性”诱变。目的性诱变可用于基于一种或多种优选具有不同反应性的抗体克隆而合理地使抗体集合工程化。在本发明的情况下,目的性诱变用于编码由类同序列(诸如抗体的个别 CDR)上的类似位置界定的单个或多个残基。在此情况下,这些集合使用低聚简并度产生以捕获可比较位置可见的残基范围。预期,在这一集合内,亲本克隆之间或甚至之外,将存在特异性连续性。目的性诱变的目标在于在两个或多个离散的实体或集合之间产生不同的多功能抗体集合或库。在流感的情况下,可利用这一方法使用识别两个不同表位、分离株或亚型的两种抗体和将这两种功能质量融于单个抗体。举例来说,第一甲型流感抗体可对 H1 亚型的分离株具有特异性且第二抗体对甲型流感病毒的 H3 亚型的分离株具有特异性。为建立目标诱变文库,首先获得这两个抗体的 CDR 序列并比对。接着用单个密码子将保守身份的所有位置固定到匹配的残基。在非保守位置处,合并简并密码子以编码这两个残基。在一些情况下,简并密码子应仅编码这一位置处的这两个亲本残基。然而,在一些情况下产生另外的副产物。取决于尺寸限制或目标,可拨入副产物产生的水平以迫使副产物产生或消除这一产生。

[0166] 因此,举例来说,如果两个抗体的第一位分别是苏氨酸和丙氨酸,那么头两个位置为 A/G-C 的简并密码子应仅编码苏氨酸或丙氨酸,而不管第三个位置的碱基如何。如果例如下一个位置的残基是赖氨酸和精氨酸,那么简并密码子 A-A/G-A/G 将仅编码赖氨酸或精氨酸。然而,如果使用简并密码子 MC-A/G-A/G/C/T,那么还将产生天冬酰胺、组氨酸、谷氨酰胺和丝氨酸副产物。

[0167] 为方便起见,更简单地使用仅具有匹配 CDR 长度的抗体。一种促使达成此的方法是基于 CDR 长度和起初发现的抗体赋予的可能甚至骨架限制而针对第二抗原筛选尺寸限制的文库。然而,应注意,使用等长度的 CDR 仅是方便,而不是要求。显而易见,虽然这一方法将适用于建立甲型流感病毒中和抗体的大型功能多样的文库,但它的适用性宽广得多。这一诱变技术可用于产生任何抗体的功能多样的文库或集合(参看 2008 年 1 月 17 日公开的美国申请公开 No. 20080014205,且其全文以引用的方式并入本文)。因此,本文包括图 3 以说明目的性诱变方法的用途,其使用 TNF- α 抗体和 CD11a 抗体的 CDR 作为诱变的亲本序

列。

[0168] 因为通常不能容易地选择交叉反应性,所以执行典型的诱变策略可能不能够产生有效的交叉反应性。设计目的性诱变作为定向方法以产生具有交叉反应潜能的抗体范围。或者,CDR 合并可提供建立和 / 或优化交叉反应性抗体的另一快速且有效的策略。已十分明确,抗原结合和特异性严重受选自任一链或两个链的 CDR 的不同组合的影响。因为先前存在的抗体中所含的 CDR 可能已经针对靶标预先优化,所以可建立单一抗体或包含来自多个抗体的 CDR 混合物的抗体集合,如图 6 中所描绘,其可证明有效针对不均一的靶。

[0169] 在图 6 中,虽然将 CDR 合并抗体描绘为 CDR 基于单个骨架的组合叠加,但其可基于多个相关和无关骨架或甚至其嵌合骨架叠加,从而增加所得合并抗体的整体多样性和生产力。混合库具有平衡现有抗体中可见的生产多样性与鉴别每合并集合的众多新抗体的能力的益处。另外的重链骨架的这一拓宽的应用允许获取使得在可衍生更高交叉反应性和效能的常规 B 细胞成熟中不可得到组合的 CDR 和骨架变体情况下的结合样本。因为 CDR 充当相互作用的环而啮合靶,所以可通过按相应原始安排或不管原始安排混合重链与轻链之间的 CDR 建立更广泛的组合。

[0170] 如果更常规的优化足以增加效能或活性范围,那么可利用靶向随机诱变、饱和诱变或甚至易于出错的 PCR。

[0171] 使用不明确合成的寡核苷酸的靶向随机诱变 (Matteuchi 和 Heyneker, *Nucleic Acids Research* 11:3113-3121(1983)) 是以特定比率相对彼此在指定位置处产生预期密码子以及所有可能的密码子的技术。不明确合成的寡核苷酸通过在指定位置特定添加非“野生型”碱基或通过特定添加密码子导致核苷酸添加的准确性降低。此通常通过在寡核苷酸合成仪中固定野生型与非野生型碱基的比率且在合成时指定两种试剂的混合来进行。

[0172] 饱和诱变 (Hayashi 等, *Biotechniques* 17:310-315(1994)) 是所有 20 种氨基酸在蛋白质的特定位置取代的技术,且测定对应于各变体的克隆的特定表型。(还参看美国专利 No. 6, 171, 820、No. 6, 358, 709 和 No. 6, 361, 974。)

[0173] 易于出错的 PCR (Leung 等, *Technique* 1:11-15(1989); Cadwell 和 Joyce, *PCR Method Applic.* 2:28-33(1992)) 是在克隆的基因中引入随机点突变的修改的聚合酶链反应 (PCR) 技术。可克隆所得 PCR 产物以产生随机突变体文库,或如果在适当 PCR 引物内并入 T7 启动子,那么直接转录。

[0174] 也熟知其它诱变技术且描述于例如 *In Vitro Mutagenesis Protocols*, J. Brame 编著, Humana Press, 2001。

[0175] 优化:诱变文库筛选的选择考虑因素

[0176] 在此情况下,主要目标之一是使抗体工程化和从集合中分离抗体以有效处理当前 H1 和 / 或 H3 (或 H5 或 H9) 分离株以及未来突变。为使具有能够识别新分离株 H1/H3 中的突变的耐性的抗体工程化,需要鉴别结合多种 H1/H3 分离株的中和克隆。预期,如果在第一 H1/H3 分离株上选择克隆,那么它应以较小的程度结合 / 中和第二 H1/H3 分离株。在此情况下,目标在于在改进 (或至少维持) 第一 H1/H3 分离株结合的范围,显著改进对第二 H1/H3 分离株的识别。因此,首先选择第二 H1/H3 参考蛋白质的改进,接着选择第一 H1/H3 蛋白质。如此可有关新菌株提供更高的选择压力,同时维持第二参数的压力。

[0177] 其它 H 中和抗体可以类似方式优化。在此情况下,可使用来自其它分离株 (例如,

H5、H9 等)的任何参考蛋白质序列且当前用作起点或终点来选择和优化。

[0178] 另外,用中和抗体克隆测试中间类型(intertype)识别。中间类型识别的实例是结合非 H1 来源或优化的克隆的相符或工程 H1。

[0179] 总之,多个诱变集合和筛选可基于 C5 和 A11 抗体、C5 样和 A11 样抗体、C5 和 A11 样分子、C5 和 C5 样替代抗体和 A11 和 A11 样替代抗体。借此,可对各上述分子进行任何和全部上述选择以分离具有宽范围反应性和高效力的适当反应性的分子。

[0180] 中和抗体的表位定位

[0181] 一旦已鉴别出具有所需性质的中和抗体,即可希望鉴别由大多数所述抗体识别的显性表位。表位定位的方法在本领域中众所周知且公开于例如 Morris, Glenn E., Epitope Mapping Protocols, Totowa, N. J. 编, Humana Press, 1996 ;和 Epitope Mapping: A Practical Approach, Westwood 和 Hay 编, Oxford University Press, 2001。

[0182] 表位定位涉及抗体结合的表位的鉴别。存在许多本领域技术人员已知测定蛋白质上表位位置的方法,包括抗体-抗原复合物的结晶学分析、竞争测定、基因片段表达测定和基于合成肽的测定(参看例如 Harlow 和 Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1999 的第 11 章;美国专利 No. 7, 332, 579, 各文献的全文以引用的方式并入本文)。当两种抗体识别相同或空间上重叠的表位时,抗体结合与参考抗体“本质上相同的表位”。确定两种抗体是否结合相同或空间上重叠的表位的常用方法是竞争测定,所述测定可使用标记的抗原或标记的抗体以所有不同格式配置。通常,抗原固定于 96 孔板上,且使用放射性或酶标记测量未标记抗体阻断标记抗体的结合的能力。

[0183] 中和抗体的制备

[0184] 一旦鉴别出具有所需中和性质的抗体,即可利用本领域中熟知的方法(包括例如杂交瘤技术或 DNA 重组技术)制备所述抗体,包括抗体片段。

[0185] 在杂交瘤方法中,使小鼠或其它适当的宿主动物(诸如仓鼠)免疫以得到产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者,可在体外使淋巴细胞免疫。然后,使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 页(Academic Press, 1986))。

[0186] 接种所制备的杂交瘤细胞,并使之在优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的物质的合适的培养基中生长。举例来说,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT 或 HPRT),那么用于杂交瘤的培养基通常应包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT 培养基),所述物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞生长。

[0187] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合,支持通过所选择的抗体产生细胞的稳定高水平抗体产生,且对培养基(诸如 HAT 培养基)敏感的骨髓瘤细胞。在这些细胞系中,优选的骨髓瘤细胞细胞系是鼠类骨髓瘤细胞系,诸如源自可以从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的细胞系和可以从 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也已描述人骨髓瘤和小鼠人杂骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol. 133 :3001(1984);和 Brodeur 等, Monoclonal Antibody

Production Techniques and Applications,第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0188] 测定融合瘤细胞生长所在的培养基的针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,由免疫沉淀法或体外结合测定(诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0189] 可例如通过分离编码所需抗体链的DNA和利用熟知的重组表达载体使用用于共表达的编码序列共转染重组宿主细胞来产生重组单克隆抗体。重组宿主细胞可为原核和真核细胞,诸如上述细胞。

[0190] 用于制备人源化抗体的人可变域轻链与重链的选择对降低抗原性来说是非常重要的。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人可变域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。然后接受与啮齿动物的序列最接近的人序列作为人源化抗体的人骨架区(FR)(Sims等, J. Immunol. 151:2296(1993); Chothia等, J. Mol. Biol. 196:901(1987))。重要的是,抗体保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物性质而被人源化。为实现这一目标,根据优选的方法,利用亲本序列和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上人源化的产物的分析方法制备人源化抗体。

[0191] 另外,可根据本领域已知的方法产生人抗体。举例来说,可产生在无内源性免疫球蛋白产生的情况下在免疫之后能够产生人抗体的全谱的转基因动物(例如,小鼠)。参看例如 Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551(1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258(1993); Bruggermann等, Year in Immuno. 7:33(1993); 和美国专利 No. 5,591,669、No. 5,589,369 和 No. 5,545,807。

[0192] 中和抗体

[0193] 已通过使用本文所述的技术已鉴别许多中和抗体,包括下文实施例中描述的技术。在一方面,本发明提供结合血凝素蛋白质表位的中和抗体。在一个实施方案中,中和抗体结合血凝素蛋白质 HA1 亚单位上的至少一个表位。在另一实施方案中,中和抗体结合血凝素蛋白质 HA1 亚单位上的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个表位。

[0194] 在一些实施方案中,本发明抗体中和含有 H3 和 / 或 H1 的病毒。在其它实施方案中,抗体中和 H3 与 H1。在一个实施方案中,本发明的抗体防止血细胞凝集。在其它实施方案中,抗体阻止甲型流感病毒结合欲感染的靶细胞。在另一实施方案中,抗血凝素抗体阻止甲型流感病毒的 HA 的球状头部区上的受体结合位点附着于靶细胞,从而具有 HA 的血凝素活性。

[0195] 基于下文实施例中所述的实验,鉴别了许多抗血凝素抗体重链 / 轻链配对。在另一实施方案中,本发明抗体可与两种或两种以上甲型流感病毒亚型交叉反应。在一个实施方案中,抗体含有包含如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的重链多肽和包含如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的轻链多肽。在一个优选实施方案中,本发明的中和抗体结合与针对如下的表位基本上相同的表位 (i) 包含如 SEQ ID NO:2 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID NO:6 所示的轻链氨基酸序列的抗体(下文实施例中的克隆 1286-A11 且如表 1 中所示);(ii) 包含如 SEQ ID NO:1 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID NO:3 所示的轻链氨基酸序列的抗体(下文实施例中的克隆 1286-C5 且如表 1 中所示);(iii) 包含如 SEQ ID NO:1 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID

NO:4 所示的轻链氨基酸序列的抗体（下文实施例中的克隆 1286-C5 且如表 1 中所示）；或（iv）包括如 SEQ ID NO:1 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID NO:5 所示的轻链氨基酸序列的抗体（下文实施例中的克隆 1286-C5 且如表 1 中所示）。

[0196] 表 1

重链序列	SEQ ID NO	轻链序列	SEQ ID NO
QVQLQESGGGLVQPGESL RLSCVGSFSGESTLSYY AVSWVRQAPGKLEWLSI INAGGGDIDYADSVEGRF TISRDNKETLYLQMTNL RVEDTGVYYCAKHMSMQ QVVSAGWERADLVGDAF DVWGQGTMTVTVSS	1	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC TGSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNNRPSGV PDR FSGSKSGASASLAITGLQAEDE AHYYCQSYDNSLSGSVFGGGT QLTVLS	3
		DIQLTQSPSSLSASVGDRVTLT CQASQDIRKFLNWKYQKPGK GPKLLIYDASNLQRGVPSRFSG GGSGTDFTLHSSLQPEDVGT YCYQYDGLPFTFGGGTKLEIK	4
		DIQLTQSPSSLSASIGDRVTITC QASQDIRNSLNWYEHKPGKAP KLLIHDASNLETQVPSRFSGGG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANSFPLTFGGGTKVEIK	5
QVQLQQSGPRLVKPSQTL SLTCAISGDSVSGDSGTW NWIRQSPSRGLEWLGRTY YRSKWYNDYAESVKSRIV IKADTSKNEFSLQLNSVTP EDTAIYYCARAGVKIFGLI VGALDNWGRGTLTVTVSS	2	EIVMTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQKPG QAPRLLIYGASTRATGV PDRF HGGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQYDTSSGLTFGGGTK VEIK	6

[0198] 已报道比典型重链环长的抗体显示某些性质。举例来说，比典型重链 CDR3 环长的环已与多反应性有关（Schettino 等 J. Immunol. 1997 ;158 ;2477-2489），且最近，其与多种抗 HIV 抗体（Saphire 等，Science 2001 ;293 ;1151-1159 ;Kunert 等，AIDS Res. Hum. Retroviruses ;1998 ;14(13) ;1115-1128 ;Barbas 等，J Mol Biol 1993 ;230(3) :812-823）和抗肺炎抗体（Baxendale 等，2008 ;Clin. Exper. Immunol. 2007 ;151 ;51-60）相关。延长的环可有助于更深的探测和与病原抗原相互作用。在 HIV 抗体的情况下，其含有长度为 19 个氨基酸的重链 CDR3，通过形成接触 gp120 上敏感的凹穴区的指状凸出非常特异性地与靶标啮合。如实施例 7 中所述，C05 抗体重链序列具有显著非典型长度的含 11 个氨基酸的重链 CDR1 环和含 25 个氨基酸的 CDR3 环。

[0199] 在一方面，本发明涉及一种具有长度经修饰的重链 CDR 环的流感中和抗体或结合分子。通常，接触抗原的人重链 CDR1 环的长度通常为约 6 或 8 个氨基酸，且接触抗原的人重链 CDR3 环的典型长度通常为约 13 个氨基酸（Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD 编著，第 5 版，

(1991);MacCallum 等,1996, J. Mol. Biol. 262,732-745)。在一个实施方案中,长度经修饰的重链是“延长”的重链 CDR 环,其是指比抗体的典型重链 CDR 环长的 CDR 环。

[0200] 在一个实施方案中,抗体或结合分子具有延长的重链 CDR3 环和 / 或延长的重链 CDR1 环。在一个实施方案中,延长的重链 CDR3 环比典型的重链 CDR3 环长约 1 个氨基酸、约 2 个氨基酸、约 3 个氨基酸、约 4 个氨基酸、约 5 个氨基酸、约 6 个氨基酸、约 7 个氨基酸、约 8 个氨基酸、约 9 个氨基酸、约 10 个氨基酸、约 11 个氨基酸、约 12 个氨基酸、约 13 个氨基酸、约 14 个氨基酸、约 15 个氨基酸、约 16 个氨基酸、约 17 个氨基酸、约 18 个氨基酸、约 19 个氨基酸或约 20 个氨基酸。在另一实施方案中,延长的重链 CDR3 环比典型的重链 CDR3 环长约 1 至约 20 个氨基酸、约 1 至约 19 个氨基酸、约 1 至约 18 个氨基酸、约 1 至约 17 个氨基酸、约 1 至约 16 个氨基酸、约 1 至约 15 个氨基酸、约 1 至约 14 个氨基酸、约 1 至约 13 个氨基酸、约 1 至约 12 个氨基酸、约 1 至约 11 个氨基酸、约 1 至约 10 个氨基酸、约 1 至约 9 个氨基酸、约 1 至约 8 个氨基酸、约 1 至约 7 个氨基酸、约 1 至约 6 个氨基酸、约 1 至约 5 个氨基酸、约 1 至约 4 个氨基酸、约 1 至约 3 个氨基酸或约 1 至约 2 个氨基酸。在另一实施方案中,延长的重链 CDR3 环长为约 14 个、约 15 个、约 16 个、约 17 个、约 18 个、约 19 个、约 20 个、约 21 个、约 22 个、约 23 个、约 24 个、约 25 个、约 26 个、约 27 个、约 28 个、约 29 个、约 30 个、约 31 个、约 32 个、约 33 个、约 34 或约 35 个氨基酸。

[0201] 在一个优选实施方案中,延长的重链 CDR3 环长为约 25 个氨基酸。在另一优选实施方案中,延长的重链 CDR3 环包含氨基酸序列 AKHMSMQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO : 9)。因为所述抗体能够抑制血细胞凝集,所以这个长重链 CDR3 环可能也形成深度探测球状头部的凸出。球状头部的所述深部探针可提供干扰血凝素球状头部域凹穴中唾液酸配位的新型方法。此可有助于对于如本文所述的具有延长 CDR3 环的抗体所观察到的显著的活性宽度。

[0202] 在一个实施方案中,抗体或结合分子具有延长的重链 CDR1 环。在一个实施方案中,延长的重链 CDR1 环比典型的重链 CDR1 环长约 1 个氨基酸、约 2 个氨基酸、约 3 个氨基酸、约 4 个氨基酸、约 5 个氨基酸、约 6 个氨基酸、约 7 个氨基酸、约 8 个氨基酸、约 9 个氨基酸、约 10 个氨基酸、约 11 个氨基酸、约 12 个氨基酸、约 13 个氨基酸、约 14 个氨基酸或约 15 个氨基酸。在另一实施方案中,延长的重链 CDR1 环比典型的重链 CDR1 环长约 1 至约 15 个氨基酸、约 1 至约 14 个氨基酸、约 1 至约 13 个氨基酸、约 1 至约 12 个氨基酸、约 1 至约 11 个氨基酸、约 1 至约 10 个氨基酸、约 1 至约 9 个氨基酸、约 1 至约 8 个氨基酸、约 1 至约 7 个氨基酸、约 1 至约 6 个氨基酸、约 1 至约 5 个氨基酸、约 1 至约 4 个氨基酸、约 1 至约 3 个氨基酸或约 1 至约 2 个氨基酸。在另一实施方案中,延长的重链 CDR3 环长为约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 7 个、约 8 个、约 9 个、约 10 个、约 11 个、约 12 个、约 13 个、约 14 个或约 15 个氨基酸。

[0203] 在一个优选实施方案中,延长的重链 CDR1 环长为约 11 个氨基酸。在另一优选实施方案中,延长的重链 CDR1 环包含氨基酸序列 GESTLSYYAVS (SEQ ID NO : 7)。因为重链 CDR1 区通常最接近 CDR3 且朝向结合面的边缘,另外的长度 (例如,3-5 个氨基酸) 可能可提供另外的物理停泊表面积使抗体对血凝素的稳定性更高。奇怪的是,VH 基因的分析并未揭示 CDR1 的所述延长的长度的用途。类似地,BLAST 搜索未成功鉴别任何具有所述 CDR1 长度的任何先前报道的抗体。考虑阳性选择在加强所述新型 CDR1 长度和组成中起作用。

[0204] 在一个其它方面,长度经修饰的重链环是缩短的重链环。缩短的重链环可包含缺失。在一个实施方案中,CDR1 环和 / 或 CDR3 环包含缺失。在另一实施方案中,SEQ ID NO : 7 和 / 或 SEQ ID NO :9 包含缺失。在一个实施方案中,重链 CDR1 或 CDR3 环内的缺失为约 1 个氨基酸、约 2 个氨基酸、约 3 个氨基酸、约 4 个氨基酸、约 5 个氨基酸、约 6 个氨基酸、约 7 个氨基酸、约 8 个氨基酸、约 9 个氨基酸、约 10 个氨基酸、约 11 个氨基酸、约 12 个氨基酸、约 13 个氨基酸、约 14 个氨基酸、或约 15 个氨基酸、或约 16 个氨基酸、或约 16 个氨基酸、或约 17 个氨基酸、或约 18 个氨基酸、或约 19 个氨基酸、或约 20 个氨基酸、或约 21 个氨基酸、或约 22 个氨基酸、或约 23 个氨基酸或约 24 个氨基酸。

[0205] 在一方面,本发明涉及具有降低的氧化电位或降低的氧化异质性电位的流感中和抗体或结合分子。在多肽水制剂中由过氧化物氧化蛋氨酸被认为对基于蛋白质的治疗的发展有害。利害关系至少是两倍。首先,如果蛋氨酸是必需的,那么必须控制氧化以使抗体可维持活性。然而,如果其对活性不是必需的,那么优选不可氧化的取代以产生具有降低的异质性的抗体或结合分子。在一个实施方案中,具有降低的氧化电位的抗体或结合分子具有变体重链氨基酸序列。在另一实施方案中,变体氨基酸序列位于 CDR3 环中。在一个实施方案中,变体氨基酸序列包含至少一个对应于根据 Kabat 编号规定位置 96 和 / 或 98 处的氨基酸的取代。在一个优选的实施方案中,位置 96 和 / 或 98 处的蛋氨酸是取代的氨基酸。在又一实施方案中,变体重链氨基酸序列含有至少一个蛋氨酸残基取代。在一个实施方案中,变体重链氨基酸序列含有至少两个蛋氨酸残基取代。在一个优选的实施方案中,变体序列含有至少一个蛋氨酸到亮氨酸的取代,更优选至少两个蛋氨酸到亮氨酸的取代。在另一实施方案中,变体序列包括以下的一者:

[0206] AKHMSLQQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO :25) ;

[0207] AKHLMSQQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO :26) ;

[0208] AKHASLQQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO :27) ;和

[0209] AKHSSLQQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO :28), 优选为

[0210] AKHL SLQQVVSAGWERADLVGDAFD (SEQ ID NO :29)。

[0211] 在一个实施方案中,具有降低的氧化异质性电位的抗体或结合分子保留一个或多个以下特征:(i) 中和甲型流感病毒的一种以上亚型和 / 或一种以上分离株,(ii) 结合所述病毒的血凝素 (HA) 抗原,(iii) 抑制血细胞凝集,或其任何组合。

[0212] 在一方面,本发明涉及具有多肽的中和抗体或结合分子,所述多肽包含包括、实质上由或由一个或多个如 SEQ ID NO :1-29 所示的氨基酸序列组成。

[0213] 在另一方面,本发明涉及具有本文所述的重链或轻链氨基酸序列的组分的中和抗体或结合分子。举例来说,已表征 1286-C05 和 1286-A11 抗体的重链和轻链氨基酸序列 (实施例 2),且本发明涵盖它们各种重链与轻链之间、其 CDR 区和 / 或其功能活性片段的组合。本文所述的抗体或结合分子可由任何组合的重链与轻链和 / 或重链与轻链高变 CDR 区 (SEQ ID NO :1-29) 组成。在一个实施方案中,抗体或结合分子包含重链 SEQ ID NO :1 或 2 与轻链 SEQ ID NO :6 ;或重链 SEQ ID NO :1 或 2 与一个或多个轻链 SEQ ID NO :3、4 或 5。在另一实施方案中,抗体或结合分子包含 (i) 重链 SEQ ID NO :1 与重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :10-12 中的一个或多个 ;(ii) 重链 SEQ ID NO :2 与重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :7-9 中的一个或多个 ;(iii) 轻链 SEQ ID NO :13-21 中的一个与重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :10-12 中的

一个或多个 ;和 (iv) 轻链 SEQ ID NO :22-24 中的一个和重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :7-9 中的一个或多个。在其它实施方案中,抗体或结合分子包含 (i) 重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :7、8 或 9 中的一个或多个与重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :10、11 或 12 中的一个或多个 ;(ii) 重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :7、8 或 9 中的一个或多个与轻链高变 CDR 区 SEQ ID NO :22、23 或 24 中的一个或多个 ;和 (iii) 重链高变 CDR 区 SEQ ID NO :10、11 或 12 中的一个或多个与轻链高变 CDR 区 SEQ ID NO :13-21 中的一个或多个。本领域的技术人员应了解 SEQ ID NO :1-29 的其它组合或其功能活性片段。

[0214] 中和抗体的用途

[0215] 本发明的流感中和抗体可用于预防和 / 或治疗甲型流感感染和开发提供适当的交叉中和表位的疫苗。关于治疗性应用,通过使用抗体或基于抗体的转运序列促进其递送的抗体或其它分子通常以药物组合物形式使用。技术和制剂通常可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co. (Easton, Pa. 1990)。还参看 Wang 和 Hanson " Parenteral Formulations of Proteins and Peptides :Stability and Stabilizers, " Journal of Parenteral Science and Technology. Technical Report No. 10, 增刊 42-2S(1988)。

[0216] 在一方面,本发明涉及一种治疗或预防有需要的受试者的流感的方法。在一个实施方案中,方法包括对有需要的受试者施用本文所述的流感中和抗体的步骤。抗体可为 C05 抗体。如实施例 6 中所述,C05 抗体可提供针对流感感染 (例如 H3N2 感染) 的治疗或预防作用。

[0217] 抗体通常调配成冻干制剂或水溶液形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者来说是无毒的,且包含缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸 ;抗氧化剂,包含抗坏血酸和蛋氨酸 ;防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵 ;氯化六烃季铵 ;氯化苄甲胺 ;苄索氯铵 ;酚、丁醇或苄醇 ;对羟基苯甲酸烷酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯 ;儿茶酚 ;间苯二酚 ;环己醇 ;3- 戊醇 ;和间甲酚) ;低分子量 (小于约 10 个残基) 多肽 ;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白 ;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮 ;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸 ;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精 ;螯合剂,诸如 EDTA ;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇 ;成盐抗衡离子,诸如钠 ;金属络合物 (例如,锌 - 蛋白质络合物) ;和 / 或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0218] 抗体还可被俘获在例如通过凝聚技术或通过界面聚合 (分别为例如羟甲基纤维素或明胶 - 微胶囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊) 制备的微胶囊中,胶态药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒子和纳米胶囊) 中,或粗乳液中。所述技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。

[0219] 本文公开的中和抗体也可配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体由本领域已知的方法制备,诸如以下中所述的方法 :Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3688(1985) ;Hwang 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77 :4030(1980) ;美国专利 No. 4, 485, 045 和 No. 4, 544, 545 ;和 1997 年 10 月 23 日公开的 W097/38731。循环时间增加的脂质体在美国专利 No. 5, 013, 556 中有公开。

[0220] 特别适用的脂质体可通过使用包含卵磷脂、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺

(PEG-PE) 的脂质组合物的反相蒸发法产生。脂质体经由具有确定孔径尺寸的过滤器挤出, 产生具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) 中所述经由二硫化物交换反应与脂质体缀合。脂质体内任选地含有化学治疗剂。参看 Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)。

[0221] 对于疾病的预防或治疗, 抗体的适当剂量将取决于待治疗的感染类型和疾病的严重性和过程, 以及抗体施用用于预防目的还是治疗目的。抗体适合一次或经由一系列治疗对患者施用。取决于疾病的类型和严重性, 对患者施用的典型最初候选剂量为约 $1 \mu\text{g/kg}$ 至约 $15 \mu\text{g/kg}$, 例如通过一次或多次单独的施用或通过连续输注。

[0222] 本发明的中和抗体可另外用作甲型流感病毒的抗原决定簇的表位定位的工具且用于疫苗开发。实际上, 如下文实施例所示, 本文发明者已鉴别出可用作疫苗设计引导的数种宽反应性中和抗体。

[0223] 因此, 本发明的中和抗体可用于选择功能上模拟抗体结合的中和表位的肽或多肽, 而这些肽或多肽又可发展为针对甲型流感病毒感染的疫苗。在一个实施方案中, 本发明提供一种有效针对甲型流感病毒的疫苗, 其包含功能上模拟由本文所述的抗体结合的中和表位的肽或多肽。在一个实施方案中, 疫苗包含功能上模拟由结合血凝素 (HA) 抗原的抗体结合的中和表位的肽或多肽。在另一实施方案中, 疫苗可为合成的。在其它实施方案中, 疫苗可包含 (i) 减毒的甲型流感病毒或其一部分; 或 (ii) 灭活的甲型流感病毒或其一部分。在一个其它实施方案中, 疫苗包含功能上模拟由结合血凝素 (HA) 抗原的抗体结合的中和表位的肽或多肽。HA 抗原可为 H3 亚型或 H1 亚型。在另一实施方案中, HA 抗原展示于甲型流感病毒的表面上。

[0224] 在另一实施方案中, 疫苗的肽或多肽含有募集交叉反应性甲型流感病毒中和抗体的抗原决定簇。

[0225] 在一方面, 本发明提供本文所述的抗体的用途, 其用于制备适用于或预防或治疗有需要的受试者的疾病的药剂或药物组合物。在另一实施方案中, 本发明提供治疗或预防有需要的受试者的疾病的药物组合物, 所述组合物包含本文所述的流感中和抗体。

[0226] 具有中和性质和非抗体分子

[0227] 虽然在先前描述中, 本发明参考抗体文库说明, 但其它非抗体分子 (诸如替代抗体) 的文库可以类似方式制备、使用和优化。因此, 基于前 B 细胞受体 (pre-BCR) 的独特的组合蛋白质文库 (“替代抗体文库”) 的构建描述于 Xu 等, 2008, 同上。如之前所讨论, pre-BCR 是抗体谱正常发育期间所产生的蛋白质。不同于典型的抗体, pre-BCR 亚单位是包含抗体重链与两个替代轻链 (SLC) 组分配对的三聚物。在哺乳动物、大肠杆菌和噬粒系统中表达基于这些不同的重链与固定的 SLC 配对的 pre-BCR 蛋白质的组合文库。这些文库包含对靶抗原具有纳摩尔亲和力的成员。有关文库构建、选择性富集和库成员的生物物理表征的描述详述于 Xu 等, (2008), (同上) 的材料和方法章节中。任何本文所述的抗体序列都可用于构建所述结合或非抗体分子, 诸如替代抗体。

[0228] 本发明的更多详情由以下非限定性实施例说明。

[0229] 实施例 1- 来自流感供体的抗体文库

[0230] 被选择包含到综合流感文库的供体被确认先前被流感感染, 在 1957H2N2 或 1968H3N2 流感大流行时约 5 岁, 且目前身体健康。进行关于一组 H1N1A/

NewCaledonia/20/99、H3N2A/Panama/2007/99 和 H5N1A/ 越南 /1203/2004 病毒或血凝素蛋白质的血清学以证实血凝素蛋白质抗体的存在。

[0231] 首先从符合选择标准的各供体收集 5-20ml 骨髓并根据制造商的说明书与 RNAlater (Applied Biosystems) 混合以保持细胞 RNA 的完整性。使用 TRI-BD 试剂方案 (Sigma-Aldrich) 分离 RNA。

[0232] 通过 RT-PCR, 使用随机引发的 cDNA 模板 (重链)、低聚 dT 引发的 cDNA 模板 (轻链) 和基因特异性可变域引物, 从源自各供体的 RNA 回收重链和轻链谱。

[0233] 接着, 用 NotI 和 BamHI 消化每个供体 1ug 各汇集的 κ 轻链和汇集的 λ 轻链, 且使用 Qiagen Gel Extraction 试剂盒凝胶纯化。关于 κ 和 λ 轻链克隆, 用 NotI 和 BamHI 消化 5ug 各载体, 且使用 Qiagen Gel Extraction 试剂盒凝胶纯化。用 200ng 凝胶纯化的 κ 或 λ 插入物和 1ug 凝胶纯化的载体进行轻链文库连接。在 14°C 下孵育过夜。为测定克隆效率, 建立等于一次电穿孔量 (200-300ng 载体 DNA) 的对照连接反应而不添加轻链插入物。在转化之前, 使用 Edge BioSystem Perfroma 离心柱将连接脱盐。使用 80 μ l Dh5 α 电组分细胞等分试样在 3-5 次电穿孔中转化各文库, 各回收到 1ml SOC 中, 汇集并在 37°C 下长出 1 小时。将各文库的样本涂铺于选择培养基上, 并用于测定克隆效率和转化株的总数。将剩余物转移到 200ml 2YT+100ug/ml 氨苄西林 (Ampicillin)+2% 葡萄糖中, 且在 37°C 下生长过夜。成功的文库具有低于 10% 的背景, 且总转化株超过 1×10^6 个成员。第二天, 使用 Qiagen High Speed Maxiprep 试剂盒分离轻链文库质粒。

[0234] 为克隆重链集合, 用 40 单位过量 /ug DNA 用 SfiI 和 XhoI 消化 1.5-2ug 每一个这 5 个供体特异性重链可变基因 (VH1/7、VH 2,5,6、VH 3 和 VH4), 且使用 Qiagen Gel Extraction 试剂盒凝胶纯化。为制备接受者质粒, 用 40 单位过量 /ug DNA 用 SfiI 和 XhoI 消化 15ug 各轻链文库载体, 并使用 Qiagen Gel Extraction 试剂盒凝胶纯化。通过每供体池组合 1.2ug SfiI/XhoI 消化的凝胶纯化的重链 DNA 以含有 300ng 5 个重链可变基因家族中的一个和 5ug 各轻链文库分别为 κ 和 λ 实现库连接。建立等于一次电穿孔量 (300-600ng 载体 DNA) 的对照连接反应而不添加重链插入物。在 14°C 下孵育连接过夜, 并且然后用 Edge BioSystem Pefroma 离心柱脱盐。将连接每库转化于 8-12 电穿孔, 使用 80ul TG-1 细胞实现, 各回收到 1ml SOC 中, 汇集并在 37°C 下生长 1 小时。使用各自的样本测定克隆效率和转化株的总数。转化株 / 库的目标数应为至少 1×10^7 , 背景小于 10%。将剩余物转移到 300ml 2YT+100ug/ml 氨苄西林 +2% 葡萄糖中, 且生长到 OD600 为约 0.3。接着, 以 5 : 1 的感染倍率 (MOI) 的添加 m13K07 辅助噬菌体且在 37°C 下在不震荡的情况下孵育 1 小时。辅助感染后, 通过离心采集细胞, 并再悬浮于 300ml 2YT+100ug/ml 氨苄西林 +2% 葡萄糖 +70ug/ml 卡那霉素 (Kanamycin) 中, 且在 37°C 下在震荡下继续生长过夜以产生储备噬菌体。

[0235] 通过在 4°C 下在 6000RPM 下离心 10 分钟收集含有所得噬菌体的培养上清液。接着, 通过向各上清液中添加 0.2 体积的 20% PEG/2.5MNaCl 溶液使噬菌体沉淀, 并在冰上孵育 1 小时。然后通过 4°C 下以 7900RPM 离心 15 分钟收集噬菌体。移除上清液, 且将噬菌体离心块再悬浮于 30ml 无菌 1×PBS 中。对于在 -20°C 下长期储存, 给 PBS 补充 50% 甘油。

[0236] 实施例 2- 中和抗体的制备

[0237] 如先前所述, 将源自人骨髓噬菌体展示抗体文库的抗体 (参看实施例 1) 转化为哺乳动物表达的免疫球蛋白并测试 (还参看 Kashyap AK 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008

年 4 月 22 日 ;105(16):5986-91)。重链分成两个序列类别：

[0238] QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCVGS^{SS}FGESTLSYYAVSWVRQAPGKGLEWLSIINAGGGDIDYADSV
EGRFTISRDN^{SKET}LYLQMTNLRVEDTG^{VYYCAKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFDVWGQGTMTVSS}(SEQ ID
NO:1)

[0239] QVQLQQSGPRLVKPSQTL^{SLTCAISGDSVSGDSGTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK}WYNDYAESVKS
RIVIKADTSKNEFSLQLNSVTPEDTAIYYCARAGVKIFGLIVGALDNWGRGTLTVSS(SEQ ID NO:2)

[0240] 重链的加下划线的高变 CDR 区显示如下。

[0241] GESTLSYYAVS(SEQ ID NO:7)

[0242] WLSIINAGGGDID(SEQ ID NO:8)

[0243] A|KHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFD(SEQ ID NO:9)

[0244] SGDSGTWN(SEQ ID NO:10)

[0245] WLGRTYYRSKWYND(SEQ ID NO:11)

[0246] ARAGVKIFGLIVGALD(SEQ ID NO:12)

[0247] 发现由 SEQ ID NO:1 所述的重链与由克隆 1286-C5 例示的一个 λ 轻链 (SEQ ID
NO:3) 和两个 κ 轻链 (SEQ ID NO:4-5) 配对。

[0248] QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKS
GASASLAITGLQAEDEAHYYCQSYD^{NSLSGS}VF^{GGGTQ}LT^{VLS}(SEQ IDNO:3)

[0249] DIQLTQSPSSLSASVGD^{RVTLTCQASQDIRKFLNWYQQKPGKGP}KLLIYDASNLQ^{RGVPSRFSGGGSGT}
DFTLI^{ISSLPEDVGTYYCQQYDGLPFTFGGGTKLEIK}(SEQ ID NO:4)DIQLTQSPSSLSASIGDRVTITCQAS
QDIRNSLNWYEHKPGKAPKLLIH^{DASNLETGVPSRFSGGGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQANSFPLTFGGG}TK
VEIK(SEQ ID NO:5)

[0250] 轻链的加下划线的高变 CDR 区显示如下。

[0251] IGAGYDVHWY(SEQ ID NO:13)

[0252] LLIYDNNRNP(SEQ ID NO:14)

[0253] QSYD^{NSLSGS}(SEQ ID NO:15)

[0254] IRKFLNWY(SEQ ID NO:16)

[0255] LLIYDASNLQ(SEQ ID NO:17)

[0256] QQYDGLPF(SEQ ID NO:18)

[0257] IRNSLNWY(SEQ ID NO:19)

[0258] LLIHDASNLE(SEQ ID NO:20)

[0259] QQANSFPL(SEQ ID NO:21)

[0260] 由 SEQ ID NO:2 所述且由克隆 1286-A11 例示的重链与单个 κ 轻链 (SEQ ED NO:
6) 配对。

[0261] EIVMTQSPGTL^{SLSPGERATLS}CRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGVPDRFHGGGSG
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDTSSGLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:6)

[0262] 轻链的加下划线的高变 CDR 区显示如下。

[0263] SSYLAWY(SEQ ID NO:22)

[0264] LLIYGASTRA(SEQ ID NO:23)

[0265] QQYDTSSGL(SEQ ID NO:24)

[0266] 图 4-5 显示克隆 1286-C5 抗体和克隆 1286-A11 的结合能力。为表征这些抗体的功能,如先前所述测试相应 IgG 结合一组不同抗原的能力(图 4 和 5)(还参看 Kashyap AK 等,2008 同上)。克隆 1286-A11 和克隆 1286-C5 抗体的结合能力。1286-A11 与 1286-C5 能够结合 H1N1、H3N2 和 H9N2 血凝素。另外,1286-A11 能够结合 H5N1 血凝素。也如先前所述进行各种流感亚型病毒的微中和(还参看同前)。

[0267] 如下表 2 中所示,各抗体能够体外在 MDCK 细胞中中和 H1 病毒复制。

[0268] 表 2

[0269]	1286-C5	亚型	菌株	结合	中和 MIC(ug/mL)
	禽流感	H5N1	越南/1203/04	否	333 时无活性
		H9N2	香港 1073/99	是	100
	季节性流感	H1N1	新喀里多尼亚 /20/99	是	0.5
			索罗门群岛/3/06	是	0.65
		H3N2	威斯康星州/67/05	是	0.13
			香港/68	是	0.13
	“亚洲”流感	H2N2	Adachi/1/1957	是	21
	1286-A11	亚型	菌株	结合	中和 MIC(ug/mL)
	禽流感	H5N1	越南/1203/04	是	333 时的部分 活性
	季节性流感	H1N1	新喀里多尼亚 /20/99	是	83
			索罗门群岛/3/06	是	未测试
		H3N2	威斯康星州/67/05	是	333 时无活性

[0270] 1286-C5 还显示显著的中和 H3 病毒复制的能力。虽然 1286-A11 不显著中和 H3 亚型病毒,但确实显示 H5 亚型中和。1286-C5 抗体的作用机理是通过血细胞凝集抑制,而 1286-A11 的作用机理尚未确定。

[0271] 每种这些抗体都将分别通过标准的直接和随机化的抗体优化技术(诸如饱和诱变和易于出错的 PCR)优化以增加效能和活性范围。推测这些抗体如果转化成各种片段以及单特异性和多特异性替代抗体,那么将适用。

[0272] 实施例 3- 产生通用的流感疫苗

[0273] 针对异质病原体的疫苗设计的目标在于鉴别和设计有效且广泛保护性的抗原。在流感的情况下,历史上已对保守线性序列和区的经验测试进行诸多努力,但几乎都没成功。这些失败的似乎有理的原因在于缺乏知识:针对抗原测试物的聚焦应答是在实际感染环境中供病原体上的抗原中和用的真正产生位点。关于流感,将预期在流感感染存活者的谱内发现这些真正的溶液。在我们的案例中,我们已证明,大抗体集合中某些抗体能够中和多个流感亚型。这些抗体中的一些通过典型抑制血细胞凝集和流感。总起来说,我们预期,利用源自真正存活者的所述交叉中和抗体的疫苗设计和评估将有助于交叉反应或“通用”流感疫苗的设计和有效性。

[0274] 交叉中和单克隆抗体特别可用于设计和验证在现在和未来制造的疫苗中维持或

增强交叉中和表位的质量和抗原性的疫苗制备过程。假如结合疫苗的抗体反映出结构完整性和抗原潜能,那么将评估交叉中和抗体与所述疫苗工艺衍生物的结合以定量评估它们的交叉中和潜能。

[0275] 为使对这些通用表位的应答最大化,将通过佐剂(如孢子外膜或孢子外壁)建立增加对这些通用表位的免疫原性的衍生物。或者,可通过预测模型和支持性测试使这些交叉中和表位工程化和优化以增加它们的免疫原性。在任何情况下,所得抗原应再次测试以确保,不仅结合靶标的效率得以维持,而且实现定向免疫原性。此将包括测定来自免疫个体或测试动物的血清中所含的特异性通用中和效价,可能通过竞争性 ELISA 测定。作为体外替代方案,将组合所述抗原-抗体结合数据与免疫原性的体外或计算模拟预测模型的抗原-抗体结合数据。为进一步引导针对通用表位的应答,可将已知的非中和和非交叉反应血凝素表位去免疫。

[0276] 宜将这一抗体延伸到工程化的重组血凝素嵌合体、片段和构形模拟物的设计和验证中。举例来说,已十分明确流感含有许多产生非中和应答的免疫显性表位。利用交叉保护的抗体,可能评估对这些免疫显性非中和表位部分或全部去免疫的疫苗的抗原变体是否维持或建立对通用保护性表位的增强识别。

[0277] 同样由于这些疫苗设计,因此可将抗原表位降至最小且甚至将它们从血凝素环境中去除以建立构象交叉的特异性抗原。

[0278] 所述策略概述上述详细方法以将应答引导到最小化的中和表位或元件。从对所述很可能在构象上依赖且存在于不连续序列空间内的最小化元件的认识,将可能如先前所述以组合方式将构象中和表位重新建立在更小多肽中(参看 Horowitz 等, Combinatorial Libraries of Conformationally Constrained Polypeptide Sequences, PCT 公开第 WO/2008/089073 号),其中仅最接近放置不连续表位或在所设计的结构支持的情况下可重建构象表位的必要性质。

[0279] 在所述设计中,我们将获取构象表位且将它们表达于血凝素相关和无关的结构支架上,或甚至作为构象表位的集合表达于可由构象依赖性抗体选择的库内。

[0280] 将不连续表位的减少为构象表位将产生甚至比传统蛋白质工程可能的肽免疫原尺寸更小的肽免疫原。此外,这些结构表位可进一步增强,尺寸进一步减小,或通过使用非肽模拟物取代。在任何情况下,任何这些构象衍生物或模拟物都将由 SEQ ID NO:1-6 中的一个或多个、包含 SEQ ID NO:1-6 中至少一个的相关抗体或所选流感病毒的相应抗体验证。

[0281] 方法和材料。交叉反应性流感 HAI 表位孢子疫苗靶标。

[0282] 1. 靶标由哺乳动物表达为分泌的蛋白质或表达于哺乳动物细胞上。

[0283] a. 来自单个分离株的球状 HAI 变体

[0284] b. 来自相关分离株的球状 HAI 嵌合体

[0285] c. 来自无关分离株的球状 HAI 嵌合体

[0286] d. 来自相关和无关分离株的球状 HAI 嵌合体

[0287] 2. 用 SEQ ID NO:1-6 抗体或分泌蛋白质或哺乳动物细胞上的相关抗体检测构象表位

[0288] 3. 将成功的构象抗原转移到孢子表达

[0289] 4. 测试与 SEQ ID NO:1-6 抗体或相关抗体结合的孢子

[0290] 5. 评估体内交叉反应免疫原性

[0291] 实施例 4- 增加交叉亚型中和抗体的效能和范围

[0292] 基于实施例 1 中所述的抗体的重链和轻链的序列信息,使用诱变方法建立改进的突变体以供在文库中个别地或于集合中进行测试。常用于引入有利的突变的方法可为在负责遍及已知负责结合的区的结合或易于出错的 PCR 诱变位点的饱和诱变。

[0293] 如果由于常规抗体优化策略的固有限制而交叉反应性和效能不足,那么可考虑目的性诱变、合并抗体文库或这两种方法相互组合或与先前提及的常规优化策略的组合。

[0294] 实施例 5- 共施用疫苗和抗体以增加保护效能和范围

[0295] 已知抗体与抗原的复合物有效诱导针对大量微生物蛋白质和其它动物蛋白质的应答。一种可能的解释是通过抗原递呈细胞上的 Fc 受体发生疫苗抗体复合物的强迫摄取。交叉反应性抗体与季节性疫苗的复合物将允许每年增加效能,且因为交叉反应性抗体识别大量血凝素抗原,所以当为每一季节流感疫苗选择新病毒分离株时,此不需要重新建立新抗体。此外,因为这些抗体是针对保守中和区,实际上其在与抗原复合时可引导对这些极其保守的易感区更有效的保护应答。如先前所述,疫苗可为传统的活的或灭活的病毒、重组蛋白质或蛋白质片段、或甚至与抗体、抗体片段或衍生物或替代抗体复合的最小化的肽或非肽构象表位。

[0296] 实施例 6- 针对流感激发的保护性作用

[0297] 将 6-8 周大的雌性 DBA/2(Charles River) 小鼠圈养在 ABSL3+ 容器中,每笼 5-6 只。任意提供食物和水。通过腹膜内 (IP) 注射使小鼠 (每组 5-6 只) 于约 200-300 μ L 无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中接受每公斤体重 1、2.5、10 或 25mg 抗体 C05(C05-1286)。经由 IP 注射给对照组注射含 25mg 非免疫性人 IgG 的 200-300 μ L PBS 或仅 PBS。用 X-31(H3N2) 或 A/孟菲斯/3/2008(H1N1) 病毒的病毒激发之前 24 小时,施用抗体和对照剂。关于致命性病毒激发,通过鼻内施用含 33MLD₅₀ (50% 小鼠致死剂量) 流感病毒的 30-50 μ L PBS 给小鼠接种。H3N2 与 H1N1 病毒在 DBA/2 小鼠中具有高病原性。死亡前的症状是重量损失 > 30% 且一般不活动。每日监测体重、发病率和死亡率,持续 14 天。

[0298] 图 7A-B 说明 C05 抗体针对高效价致命性 H3N2 病毒激发的预防作用。关于高效价激发 (33MLD₅₀),获得以下结果。PBS 处理 :0% 存活。2.5mg/kg 处理 :80% 存活。10mg/kg 处理 :100% 存活。25mg/kg 处理 :100% 存活。25mg/kg IgG 亚型 :0% 存活。图 7E 说明 C05 抗体针对 H1N1 孟菲斯 /3/2008 病毒激发的预防作用。

[0299] 图 7C-D 显示 C05 抗体针对致命性 H3N2 病毒激发的治疗作用。首先通过鼻内施用含 33MLD₅₀ (50% 小鼠致死量) X-31(H3N2) 流感病毒的 30-50 μ L PBS 对 DBA/2 小鼠接种。通过腹膜内 (IP) 注射使小鼠 (每组 5-6 只) 接受约 200-300 μ L 无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的每公斤体重 15mg 抗体 C05(C05-1286)。经由 IP 注射给对照组注射含 25mg 非免疫性人 IgG 的 200-300 μ L PBS 或仅 PBS。C05 抗体在感染之后 24、48、72 或 96 小时施用。对照在感染之后 24 小时施用。每日监测体重、发病率和死亡率,持续 14 天。

[0300] 实施例 7- 产生重链环具有不同长度的变体

[0301] 如下所示,C05 抗体重链序列 (SEQ ID NO :1) 具有含 11 个氨基酸的显著非典型长度的重链 CDR1 (SEQ ID NO :7) 环。与 VH3-23 生殖系相比,C05 在 CDR1 处具有多于 5 个氨基酸。

[0302]

	CDR1	CDR2
VH3 3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-----SSYAMSWVRQAPGKGLIEWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	
C05	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCVCGSGSSFGESTLSYYAVSWVRQAPGKGLIEWLSIINAGGDDIDYADSVKGRFTISRDNKETLYLQMTNLRVEDTGYYCAK	
	<u>CDR1 插入</u>	
	CDR 侧接	
	基于C05	
	GESTLSYYAVS	
	(X) _m GESTLSYYAVS	
	GESTLSYYAVS(Y) _n	
	(X) _m GESTLSYYAVS(Y) _n	
	基于生殖系	
	SSYAMS	
	(X) _m SSYAMS	
	SSYAMS(Y) _n	
	(X) _m SSYAMS(Y) _n	

	<u>CDR1 缺失</u>	
	连续	
	-----SSYAMS 3-23 生殖系	
	GESTLSYYAVS C05	
	-ESTLSYYAVS	
	--STLSYYAVS	
	---TLSYYAVS	
	----LSYYAVS	
	-----SYAVS	

[0303] 因为重链 CDR1 区通常最接近 CDR3 且朝向结合面边缘放置,另外的长度 3-5 个氨

基酸可能可提供另外的物理停泊表面积,从而使抗体对血凝素的稳定性更高。VH 基因谱的分析并未揭示 CDR1 的所述延长的长度的用途。此外, BLAST 搜索并未鉴别任何具有所述 CDR1 长度的抗体。因此,考虑阳性选择可在所述新型 CDR1 长度和它的组成的存在和增强中起作用。因为重链以 CDR1 与 CDR3 中所述独特的环长度为标志,所以将考虑不仅通过改变这些环的组成而且通过改变这些环的长度来增加效能和活性宽度。就实现改进来说,如上所示(左下图),可首先通过缺失亲本 CDR1 环的氨基酸延伸且甚至用相应较短的生殖系 CDR1 肽序列置换和 / 或通过产生中间长度环或其多样化集合开始。仍然,如果延长的环是有利的但不是完全最佳的,那么将考虑通过在 CDR1 内、CDR1 的 FR1 接合处和 / 或 FR2 接合处以逐步和组合方式插入 (1-20) 随机或选择的氨基酸来延长环。通过建立所述具有延长环长度的抗体的组合库,可针对易感与非易感流感分离株、菌株和类型有差别地筛选出更佳且更宽的结合物。

[0304] 另外,C05 抗体以比典型重链 CDR3 (SEQ ID NO :9) 环长 25 个氨基酸为标志。类似于上述实施例的 CDR1 插入和缺失,可对 CDR3 区进行类似修饰。如下所示(右下图),CDR3 序列可在环内或在 CDR3 的 FR3 和 FR4 接合处以逐步组合方式类似地收缩或扩展 1-20 个氨基酸(显示 C05 的基因组序列)。

[0305]

	CDR2	CDR3
VH3 3-23	<u>EWVSAISGGSTYYVADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKHMSMQQW</u> <u>SAGWERADLVGDAFDVWGQGTMTVTVSS</u>	
C05	<u>EWLSIINAGGDDIDYADSV</u> <u>EGRFTISRDN</u> <u>SKETLYLQMTN</u> <u>LRVEDTGVYYCAK</u> <u>-----AFDIWGQGTMTVTVSS</u>	JH3

CDR3 插入

基于C05

	AKHMSMQQVV	SAGWERADLVGDAFD
(X) _m	AKHMSMQQVV	SAGWERADLVGDAFD
	AKHMSMQQVV	SAGWERADLVGDAFD (Y) _n
(X) _m	AKHMSMQQVV	SAGWERADLVGDAFD (Y) _n

[0306] 照此类推到其它互利诱变,可将环长度改变的 CDR1 和 CDR3 文库可针对目前易感和不易感的流感分离株、菌株和类型组合以审查新型且更广泛有效的抗流感抗体。重要的

是,这些策略不仅还可应用到亲本 C05CDR 中,而且可应用到交叉于目标抗体的 Vh3-23 生殖系 CDR1 环。

[0307] 实施例 8- 具有降低的氧化异质性电位的变体

[0308] 抗体 1286-C05 在重链 CDR3 环内的 Kabat 残基 96 和 98 处含有两个蛋氨酸。根据定义,这个环是表面暴露的且因此易被氧化。我们通过产生双点突变测试任一个或两个蛋氨酸是否是必需的,所述双点突变为用丙氨酸、亮氨酸或丝氨酸取代 Kabat 残基 96 处的蛋氨酸,和用亮氨酸取代 Kabat 残基 98 处的蛋氨酸。如先前所述 (Kashyap AK 等,同上 2008) 在瞬时哺乳动物系统中产生相应的蛋白质并纯化。测试所得蛋白质与 H1 (新喀里多尼亚 /20/99) 血凝素的结合且发现在亲本蛋白质的折叠内结合。接着,测试这些蛋白质结合 H3 (威斯康星州 /67/2005) 血凝素的能力,显示亮氨酸 96/ 亮氨酸 98 变体结合基本上优于丙氨酸 96/ 亮氨酸 98 和丝氨酸 96/ 亮氨酸 98 变体。图 8 说明 C05 不可氧化的“LL”变体维持对 H1 和 H3HA 蛋白质的识别。

[0309] 图 9 显示与非变体 C05 与 H1 和 H3 的结合相比,亮氨酸 96/ 亮氨酸 98C05 变体与 H1 (新喀里多尼亚 /20/99) 和 H3 (威斯康星州 /67/2005) 血凝素的结合。所述 C05 不可氧化的“LL”变体维持对 H1 和 H3HA 蛋白质的识别。

[0310] 表 3 说明,如由血细胞凝集抑制 (HAI) 测定所测试,C05-LL 变体显示类似的效能和活性宽度,其中血细胞凝集和血细胞凝集抑制测定大体上如 Edwards 和 Dimmock (Journal of Virology, 第 75 卷,第 10208-18, 2001 页) 所述,且其中重组病毒如 Kashyap 等, (2008) (同上) 所述产生。所述值表示抗体抑制血细胞凝集的最低浓度 0.5% cRBC。

[0311] 表 3

[0312]

亚型	菌株	1286 C05 的活性	1286 C5 LL 变体的活性
大流行 H1N1	(SOIV) A/Cal/04/09 (6:2)	无活性(>100ug/ml)	无活性(>100ug/ml)
季节性 H1N1	A/New Cal/99	<0.1 ug/ml	0.39ug/ml
	A/Texas/91	无活性(>100ug/ml)	无活性(>100ug/ml)
	A/Bris/59/07	1.56 ug/ml	3.12 ug/ml
	A/Sol Is/06	1.56 ug/ml	3.12 ug/ml
	A/Virginia/87	无活性(>100ug/ml)	无活性(>100ug/ml)
季节性 H3N2	A/Wisc/05	<0.1 ug/ml	<0.1 ug/ml
	A/HK/68	<0.1 ug/ml	0.39ug/ml
	A/Bris/10/07	12.5 ug/ml	12.5 ug/ml
	A/Pan/99	0.39ug/ml	0.19ug/ml

[0313] 实施例 8- 产生具有增加亲和力和活性幅度的变体

[0314] 使用各种诱变方法建立改进的突变体以供在文库中个别地或于集合中进行测试。用于在负责结合的位点 (诸如 CDR 或那些接触通过直接结构分析特别发现的残基的位点) 引入有利突变的常见方法为但不限于饱和诱变、精确诱变或简约诱变。

[0315] 作为定向步骤,应建立基于通过上述方法的 CDR3 诱变的变体集合。使用其它人抗体的先前研究工作已通过对轻链、其它重链 CDR 或甚至一次同时数个或所有这些区域探测

和产生点变体以产生协同改进而显示巨大益处。通常可通过维持 CDR 的亲本骨架和长度而仅改变 CDR 的组成来实现。相反地,可遍及相似区以及重链可变域의 其它区域使用易于出错的 PCR 诱变和其它随机过程来产生变体的集合。在任何情况下,所得集合或克隆都可就亲和力和增加、中和和 / 或活性幅度加以选择。

[0316] 如上所述,虽然我们将产生所述优化集合,但因为重链以 CDR1 与 CDR3 中所述独特的环长度为标志,所以甚至更重要的是不仅通过改变这些环的组成而且通过改变这些环的长度来测试效能和活性幅度。举例来说,我们将通过用相应较短的生殖系 CDR1 肽序列置换和 / 或突变的集合而测试延长的 CDR1 环的作用。另外,可进行在 CDR1 内或在 CDR1 的 FR1 与 FR2 接合处以逐步文库方式插入随机氨基酸直到环匹配且甚至超过现有延长的环长度,并有差别地筛选出更佳且更宽的结合物。类似地,CDR3 序列可在环内或在 CDR3 的 FR3 与 FR4 接合处以逐步库方式收缩或扩展。照此类推到其它互利诱变,环长度改变的 CDR1 和 CDR3 文库可组合以审查新型且更广泛有效的抗流感抗体。

[0317] 虽然在上文描述中本发明参考某些实施方案说明,但不受其限制。实际上,除本文所示出或描述的修改以外,本发明的各种修改由上述描述将变得对本领域的技术人员显而易见且属于随附权利要求的范畴。

[0318] 因此,整个说明书中所引用的所有参考文献的全文以引用的方式并入本文。

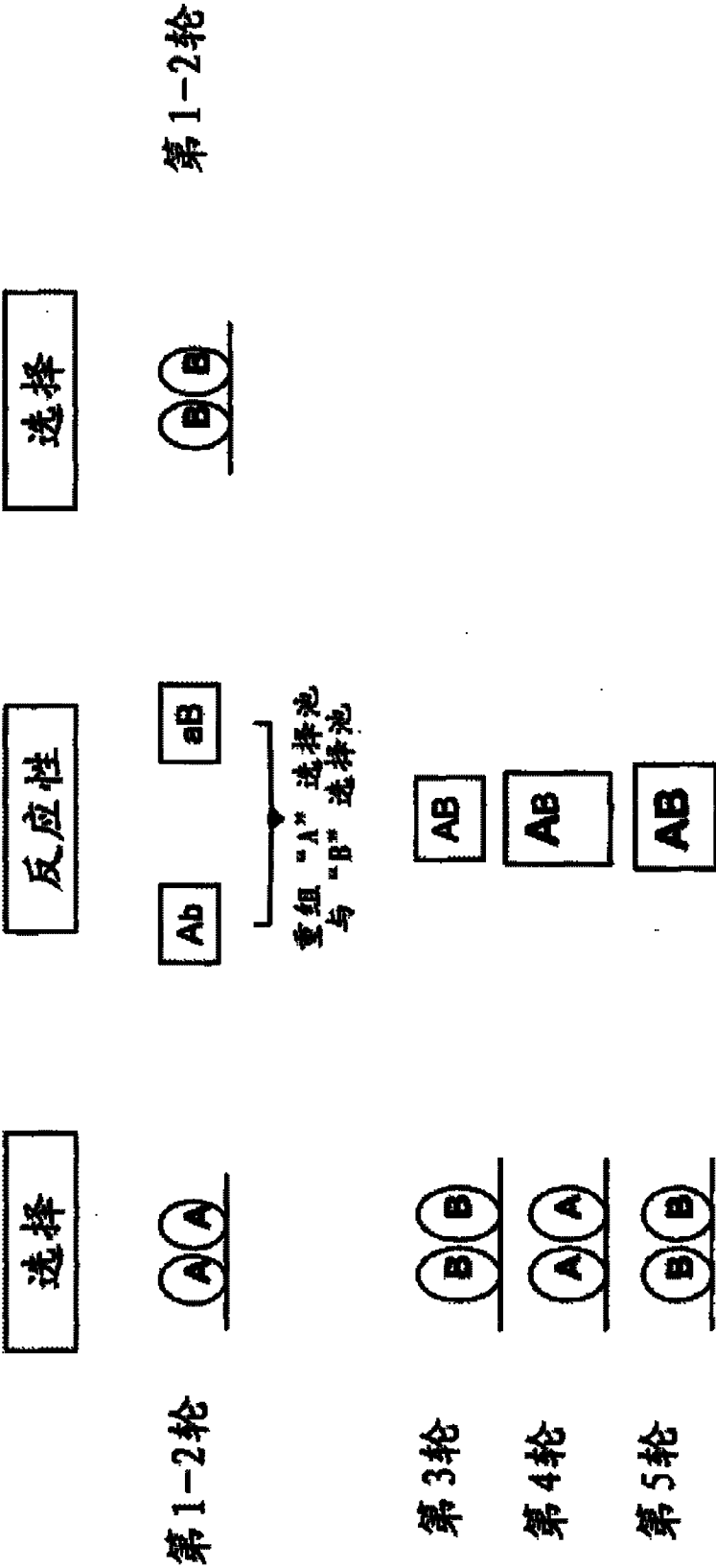


图 1

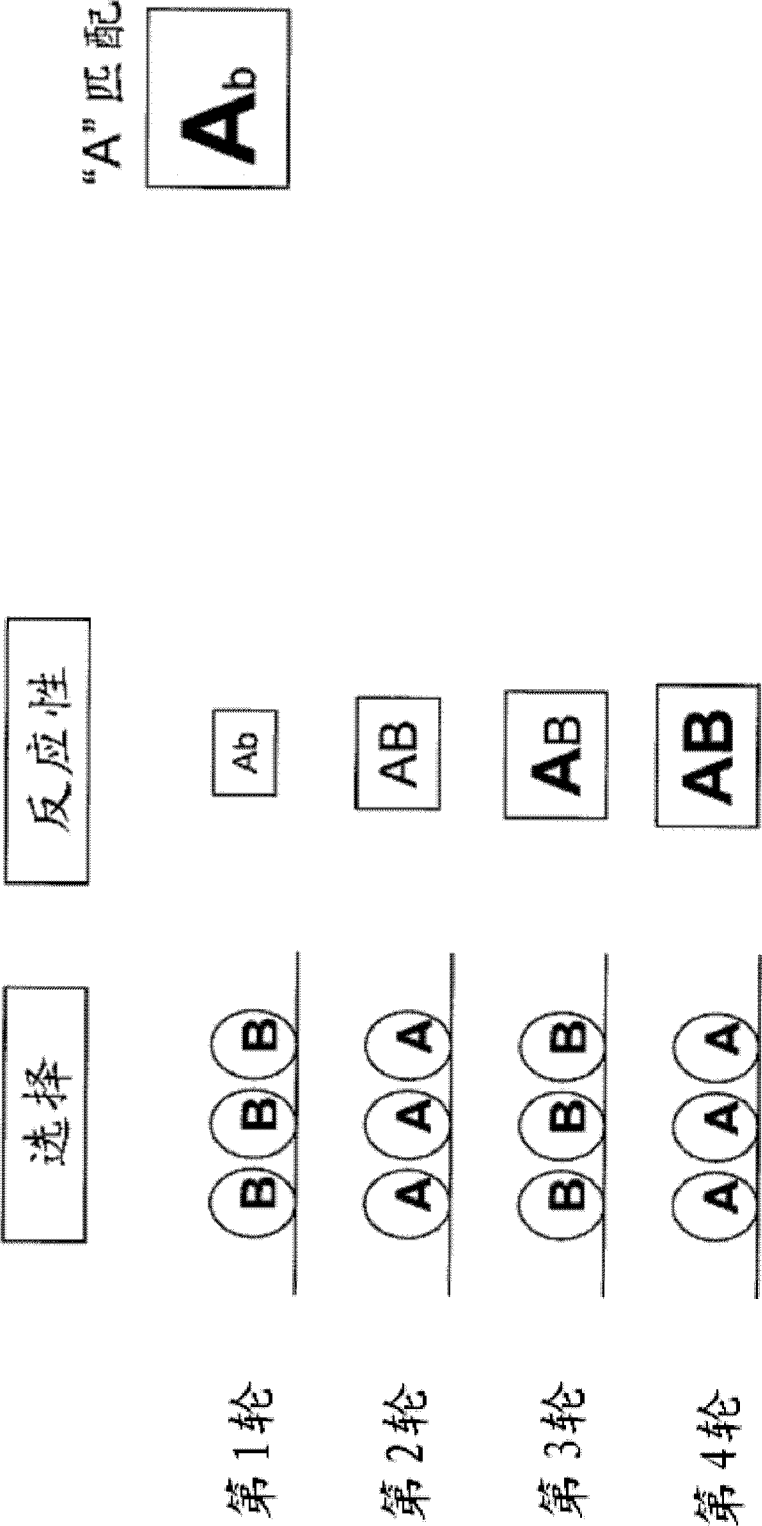


图 2

H3目标实例											
CDR H3											
2SD4 CODONS 简并寡聚核苷酸 密码子 Raptiva	T	K	A	S	Y	L	S	T	S	S	D
	A C N	A A R G C N	T C N	T C N	T A Y	C T N	A G Y A C N	A G Y A C N	A G Y A C N	A G Y A C N	G A Y
	R	M R N	S	W Y N		Y	W R	R S	S	W R	Y
	G C N	C G N G G N	A T H	T A Y	T A Y	T T Y	T A Y G G N	A C N A C N	T A Y	T T Y	G A Y
	A	R	G	I	Y	F	Y	G	T	Y	F
目标副产物		A A Y		A C N		T T R A A Y	A A Y A G Y	A G R A G R	A A Y	T T R	
		N		T		L	N	S	R	N	L
		C A Y		T T Y			T G Y A G R			T G Y	
		H		F			C	R		C	
		C A R		T T R			G C N				
		Q		L			A				
		A G Y		A T G							
可能的残基		S		M							
	2	6	2	6	1	2	4	5	3	3	1

图 3

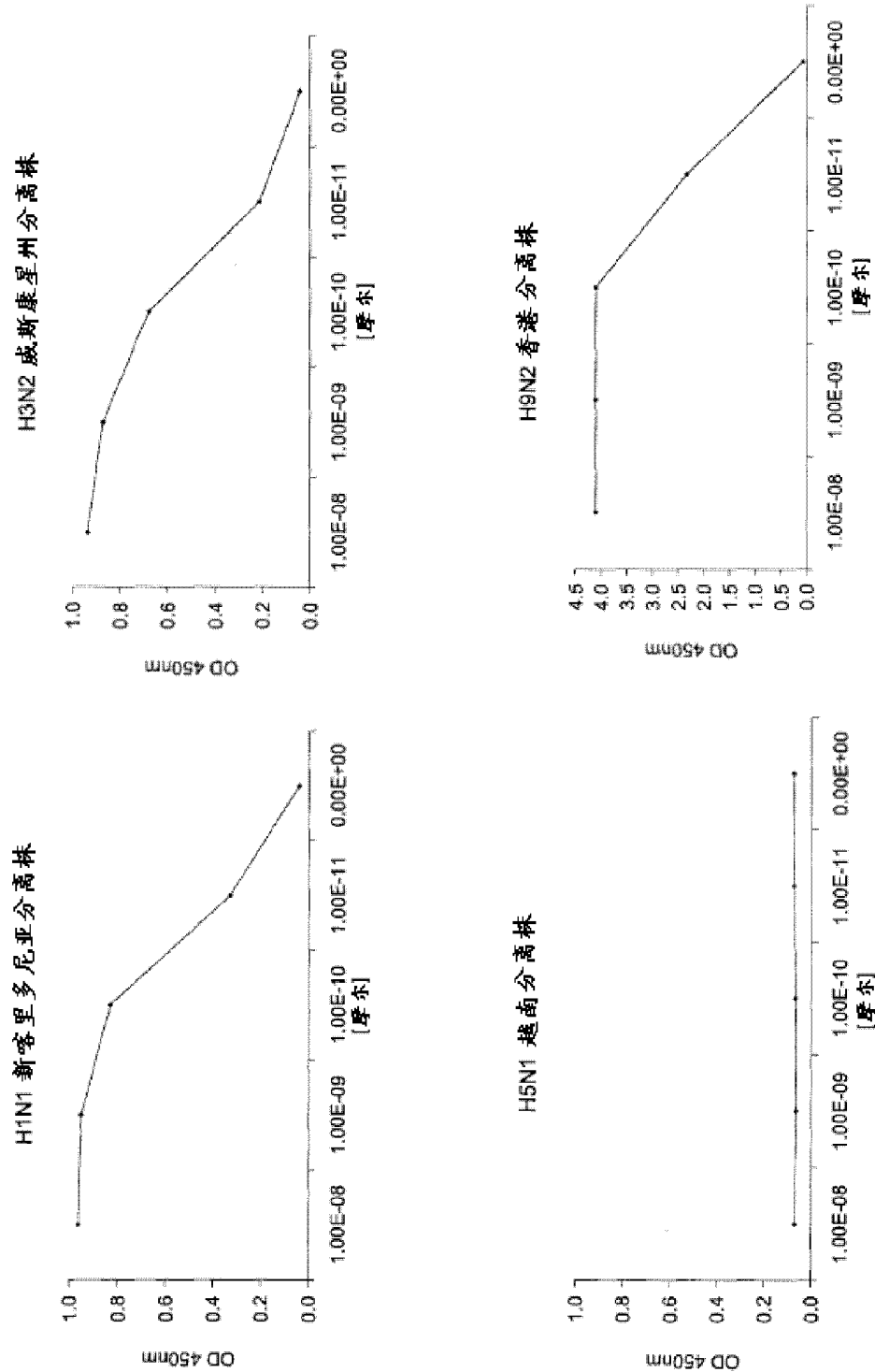


图 4

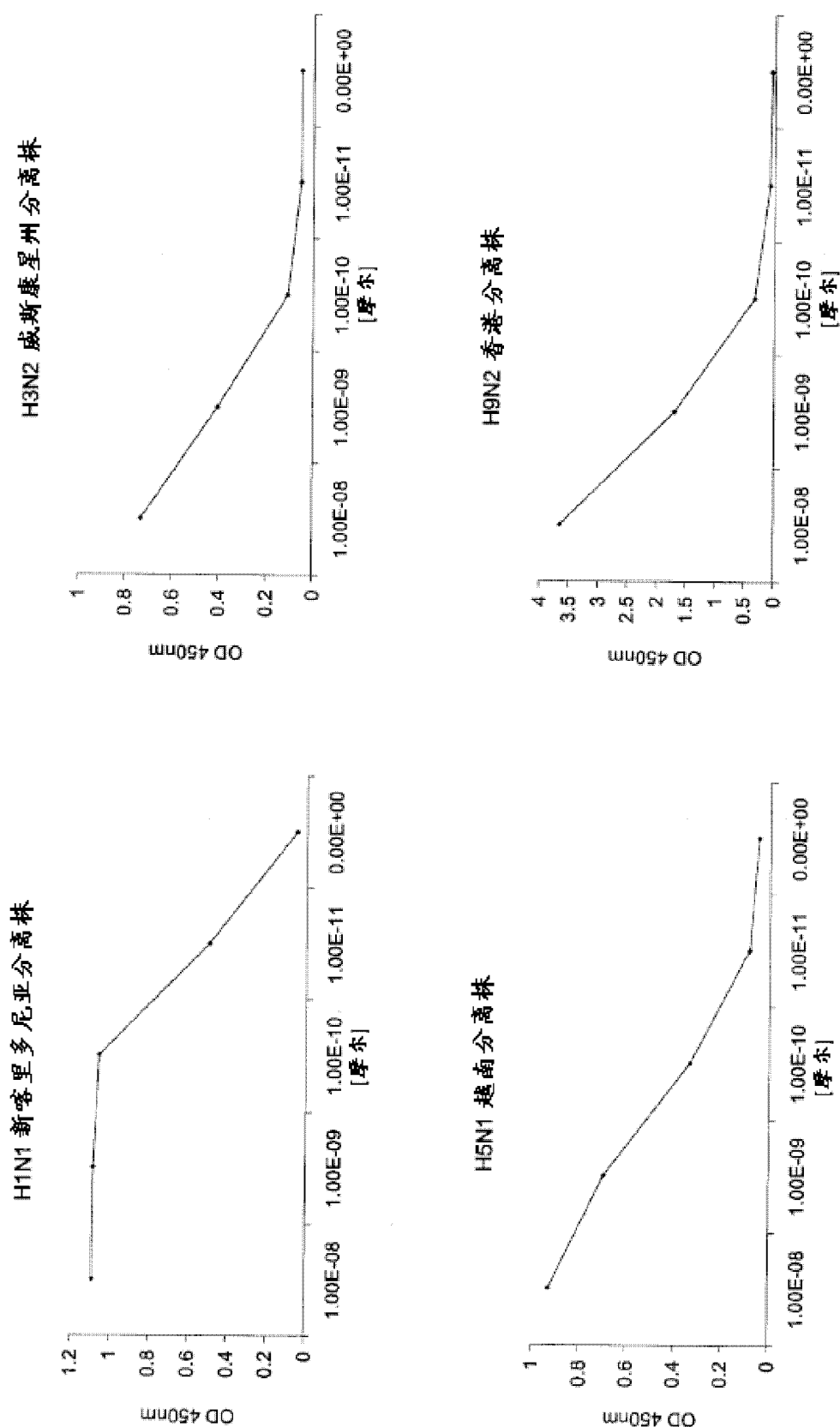


图 5

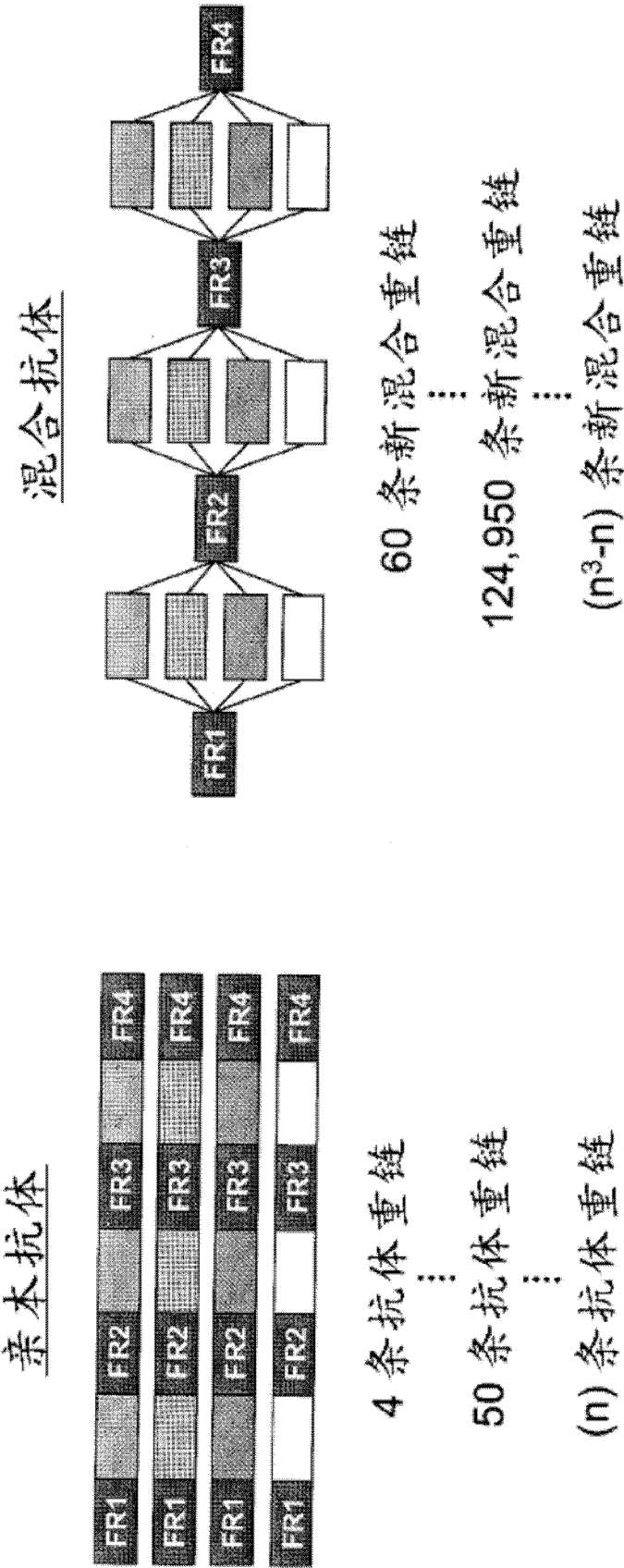


图 6

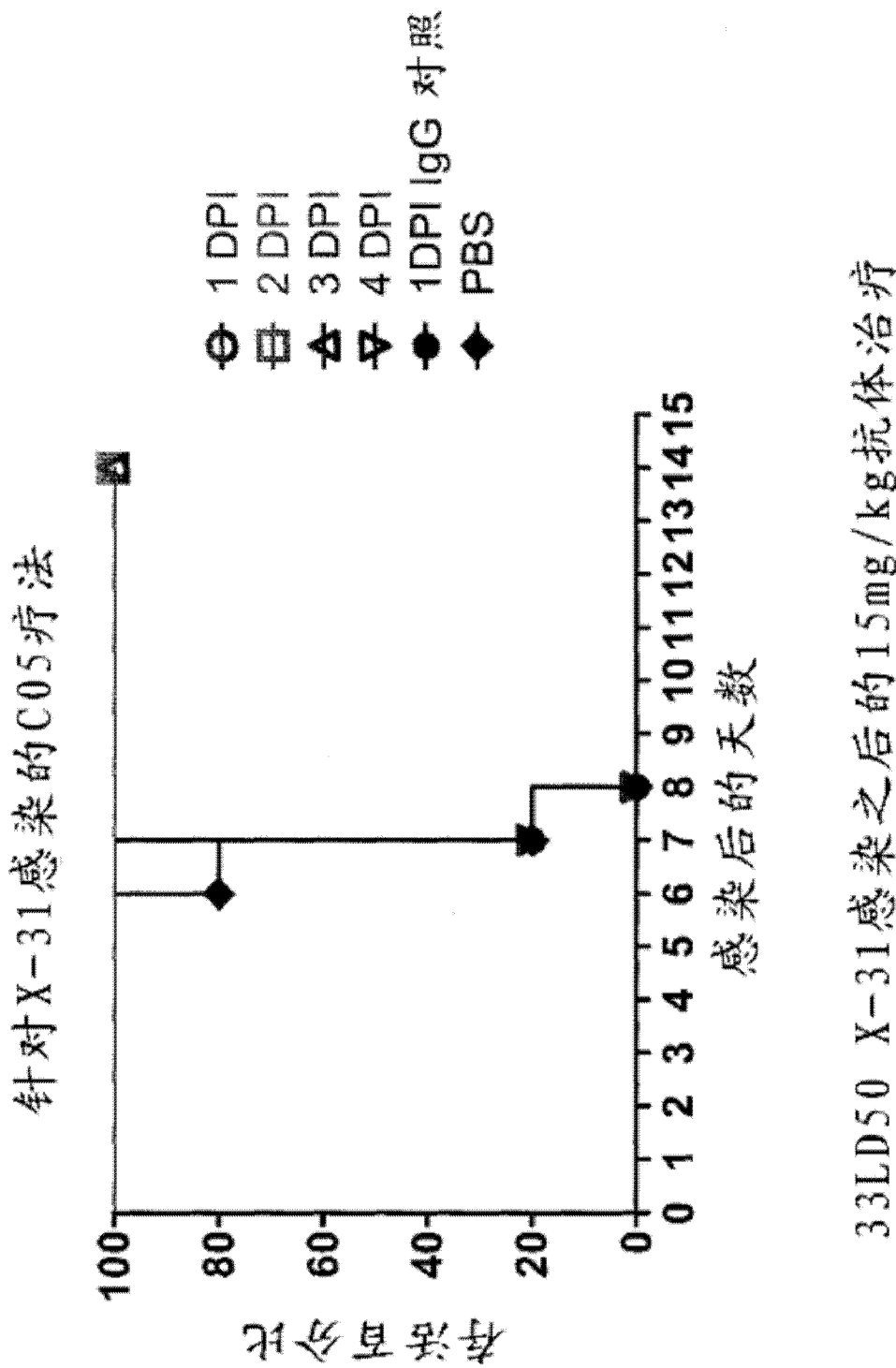


图 7A

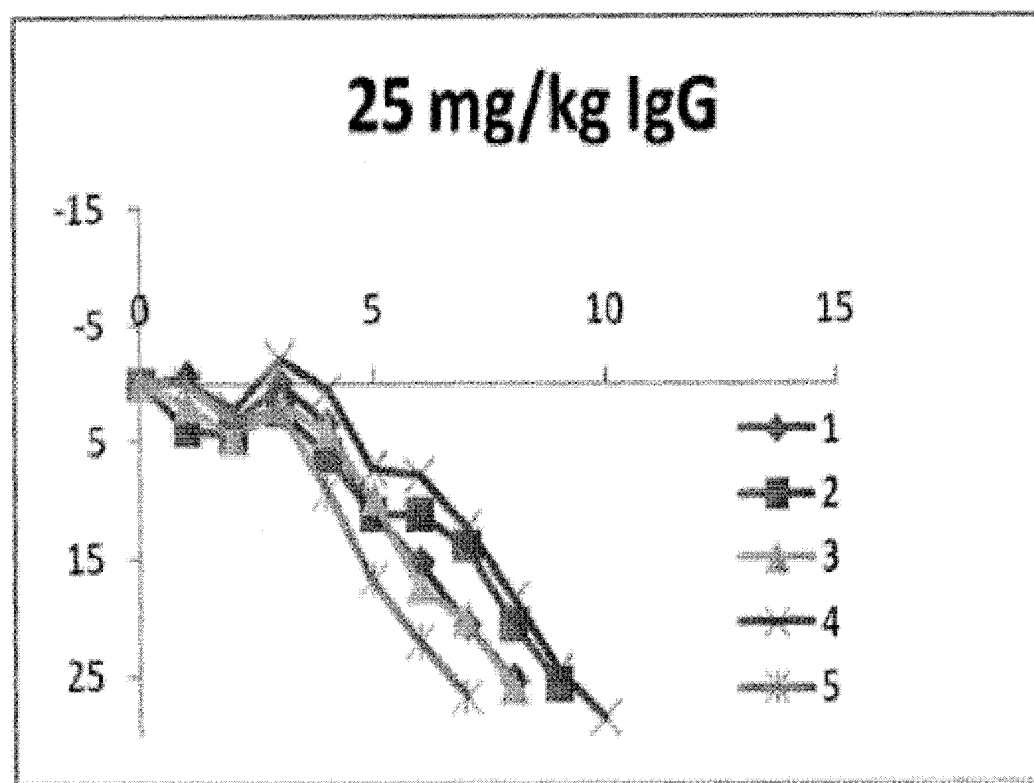
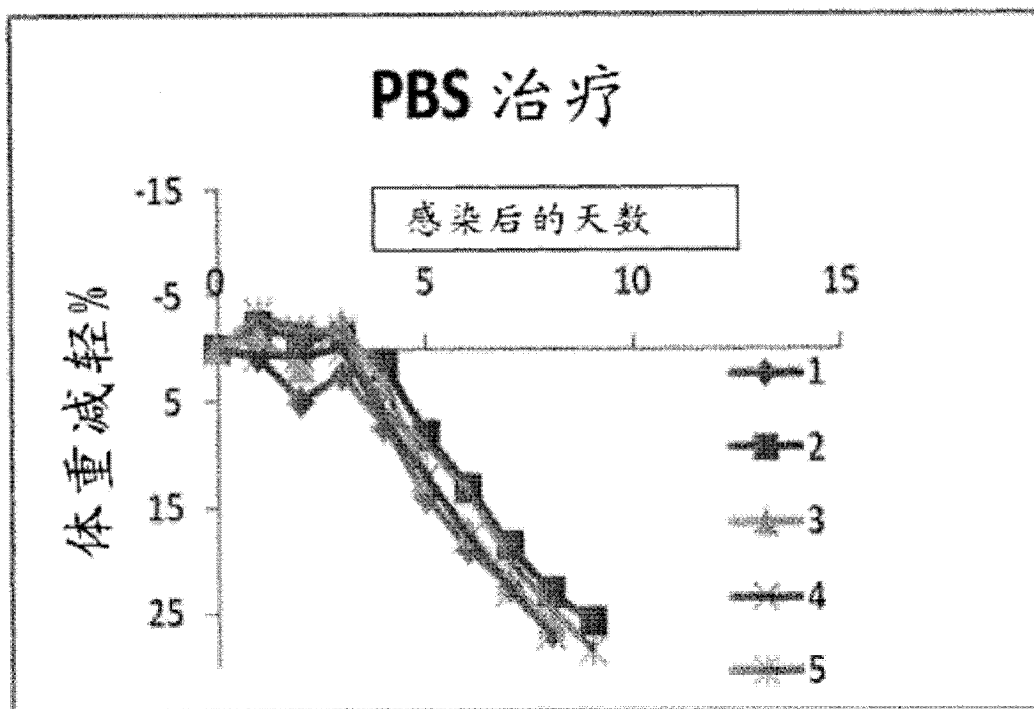


图 7B

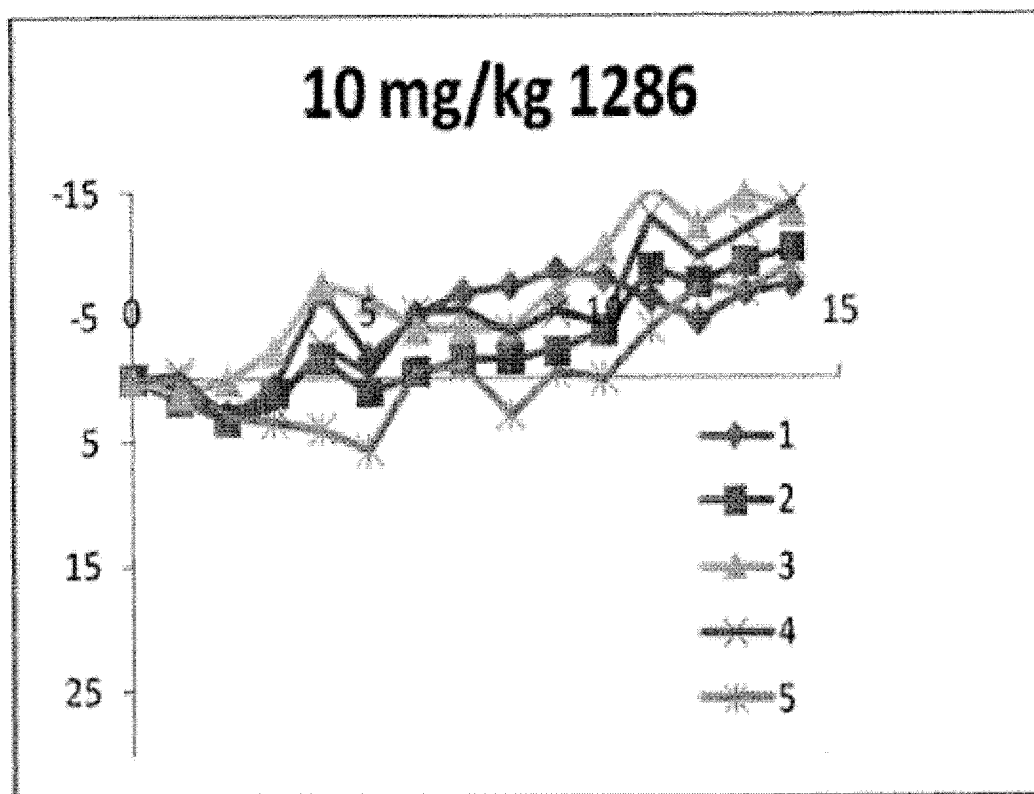
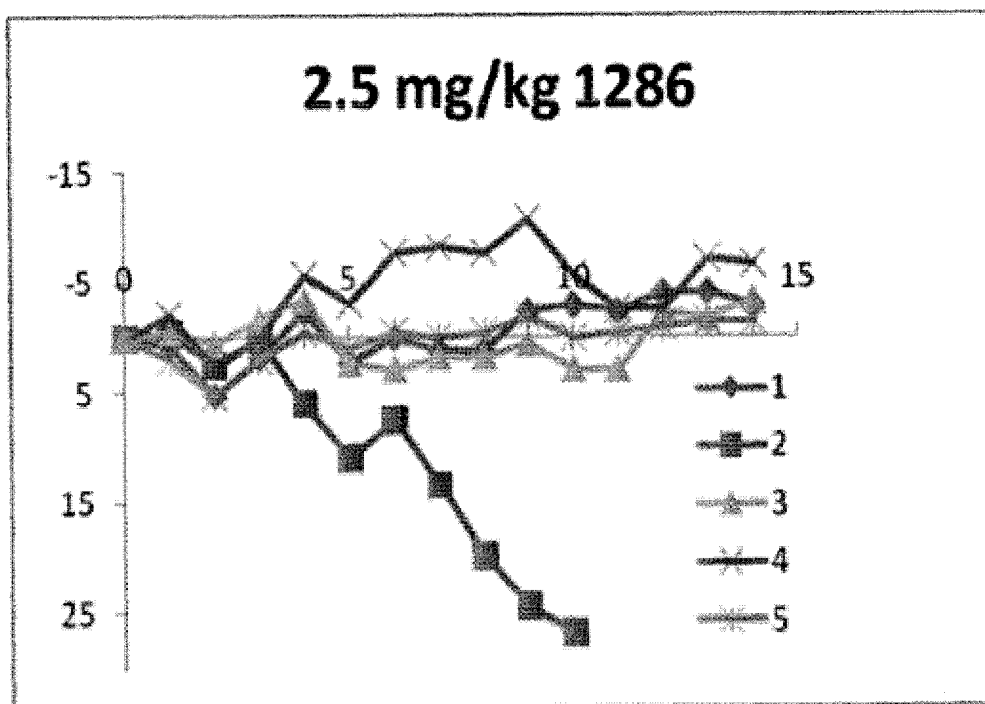


图 7B(续)

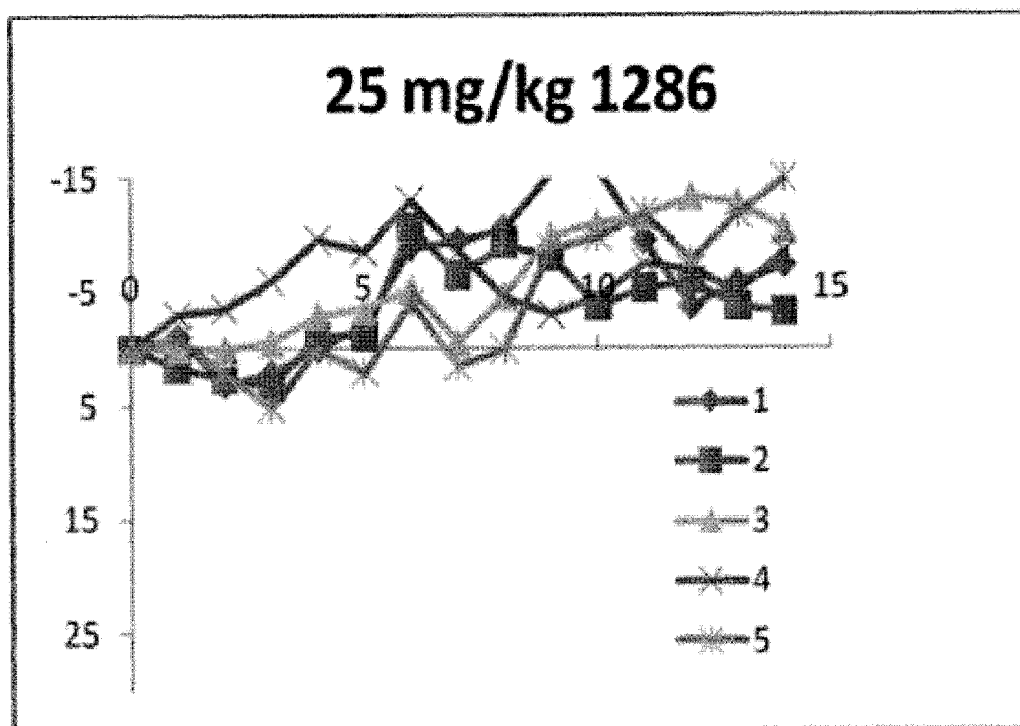


图 7B(续)

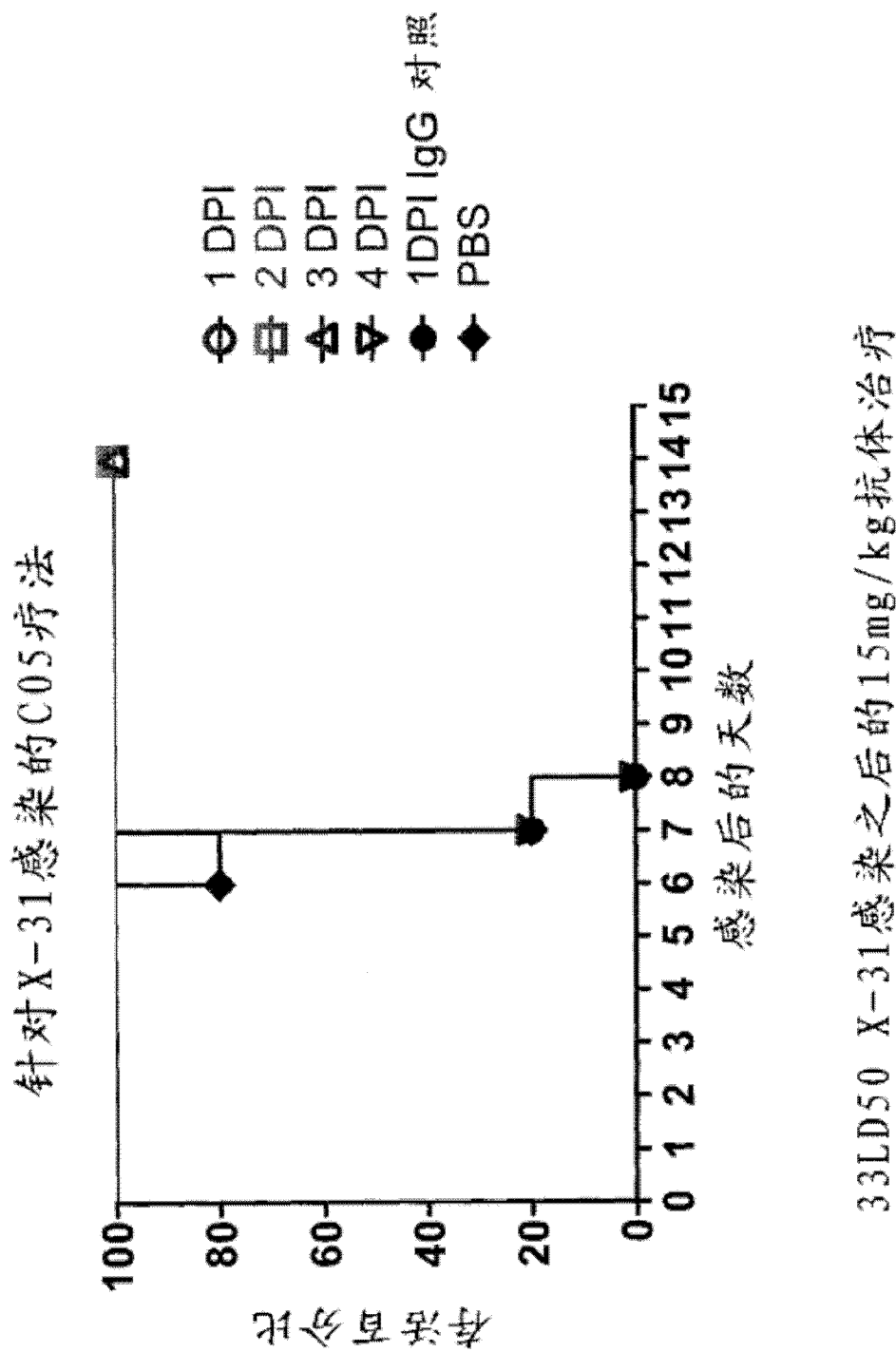


图 7C

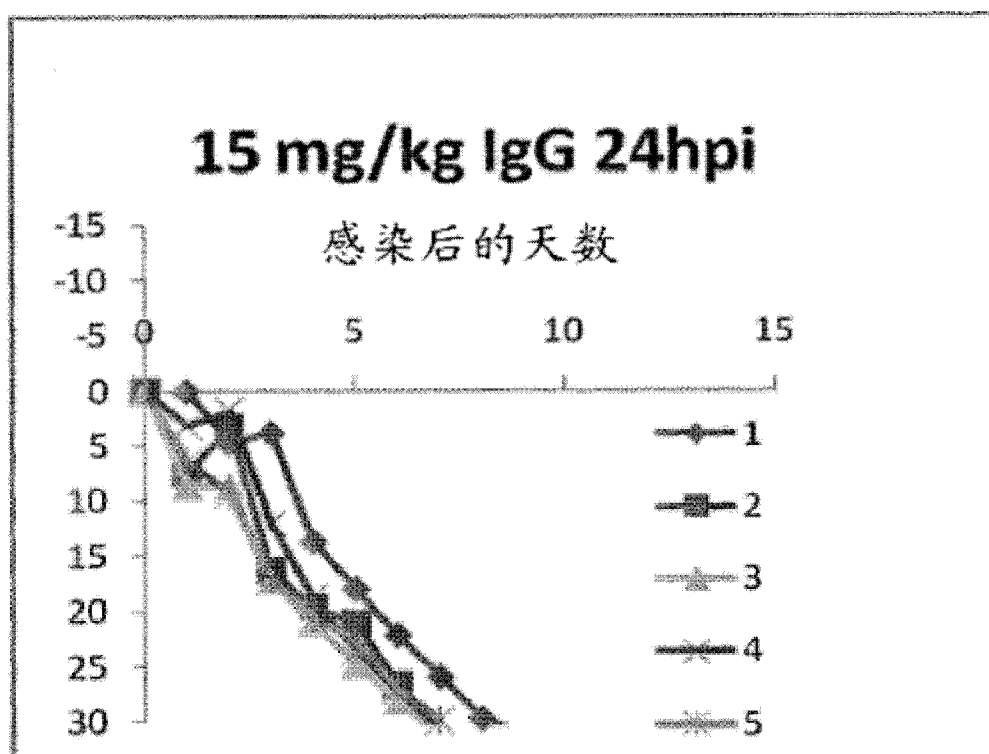
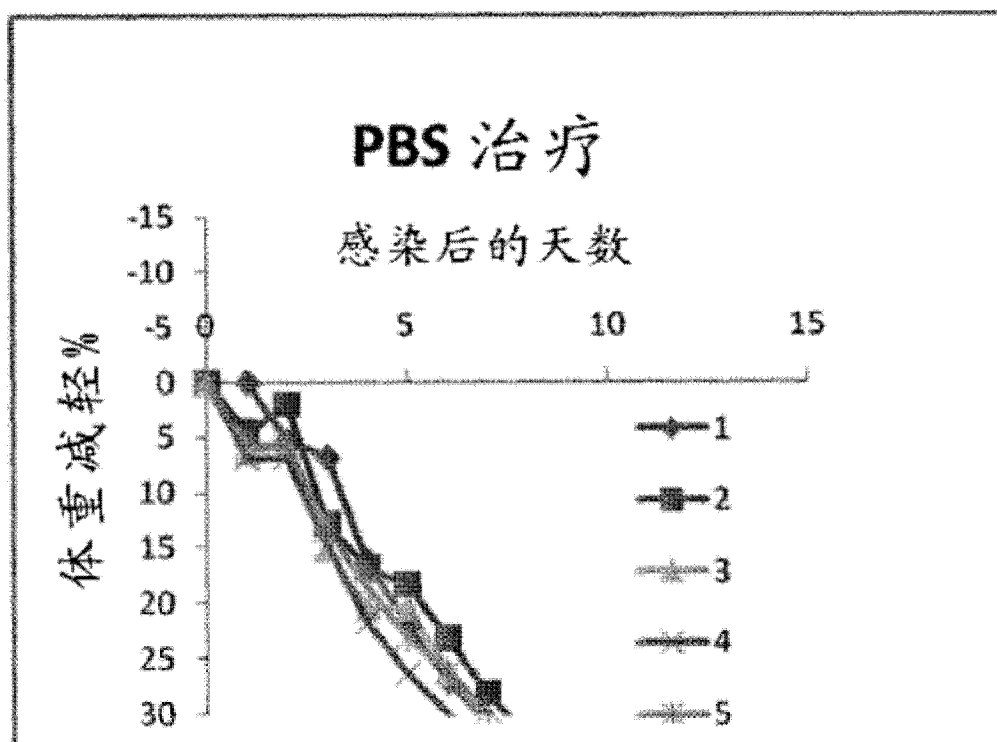


图 7D

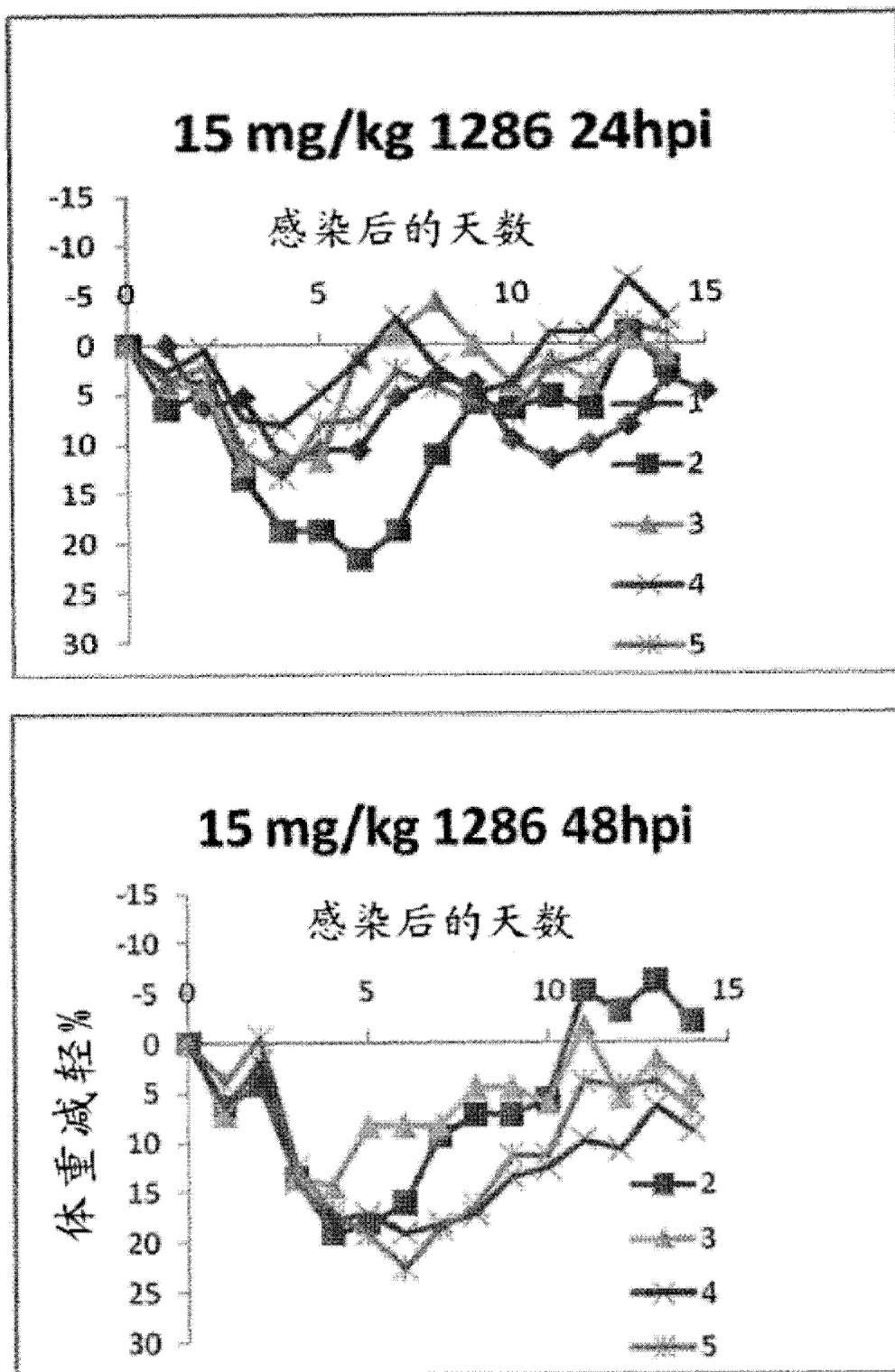


图 7D(续)

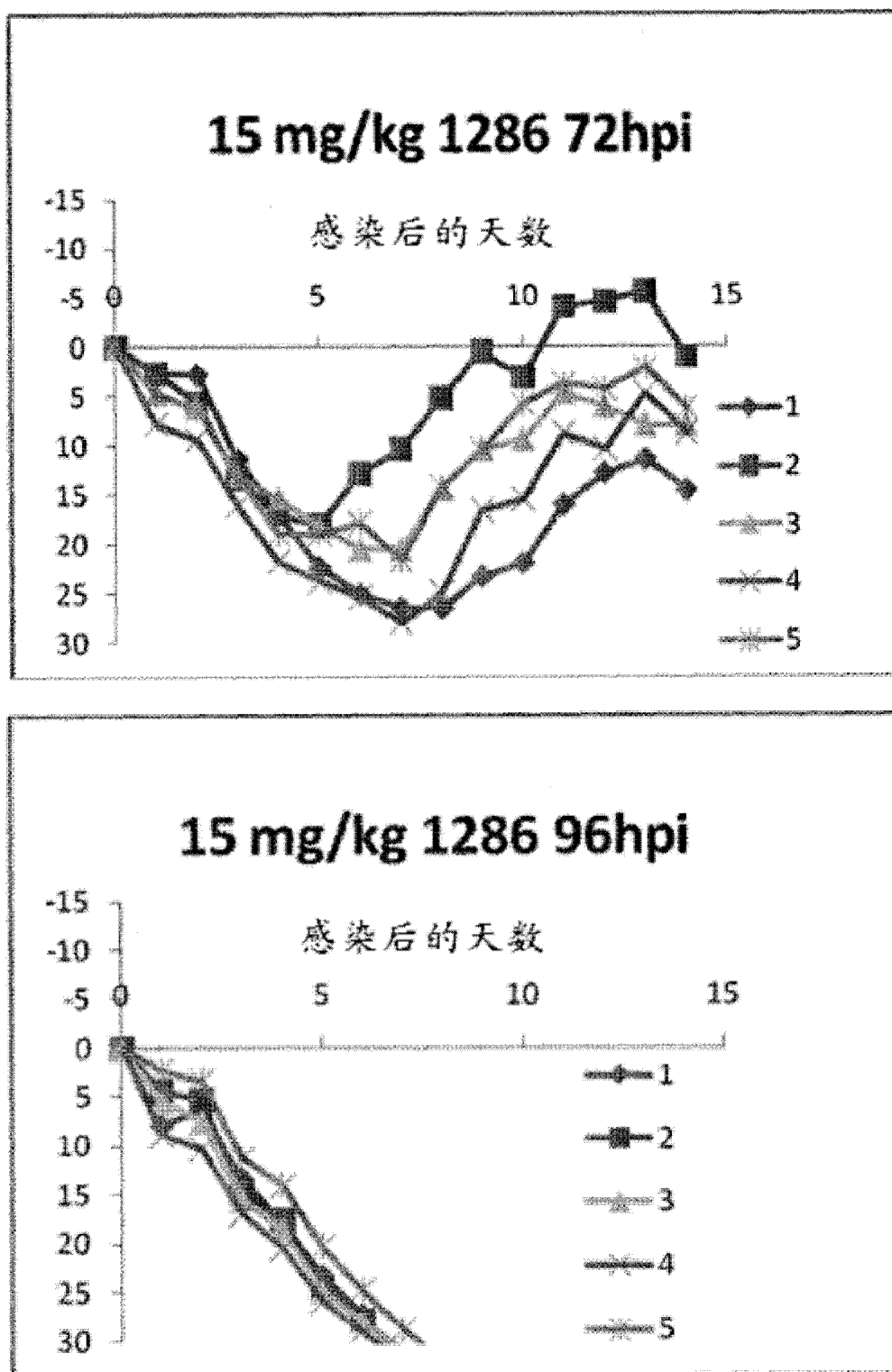
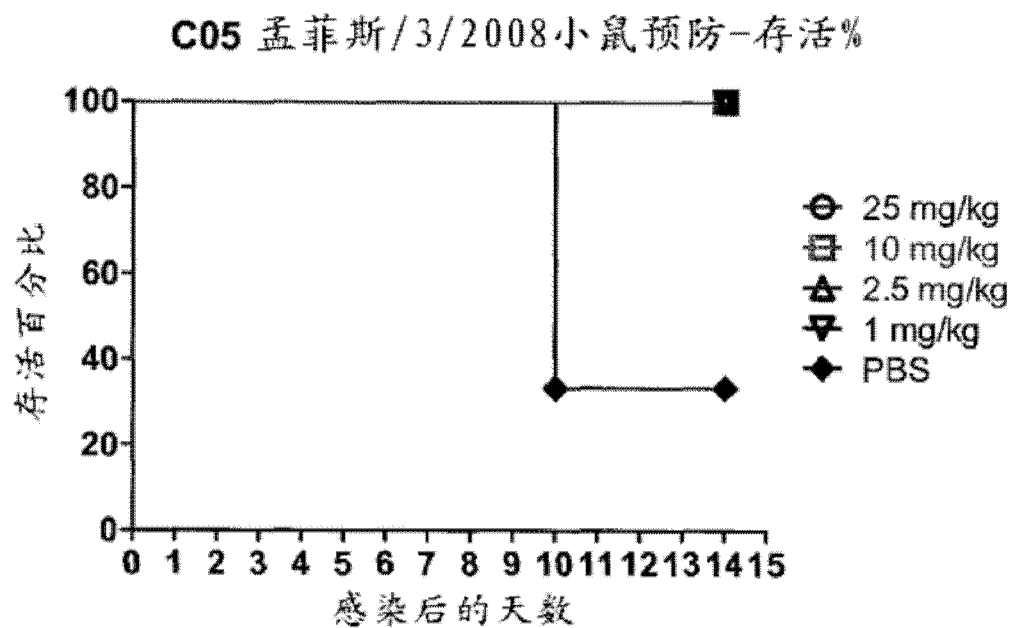


图 7D(续)



C05 A/孟菲斯/3/2008 H1N1预防-体重减轻%

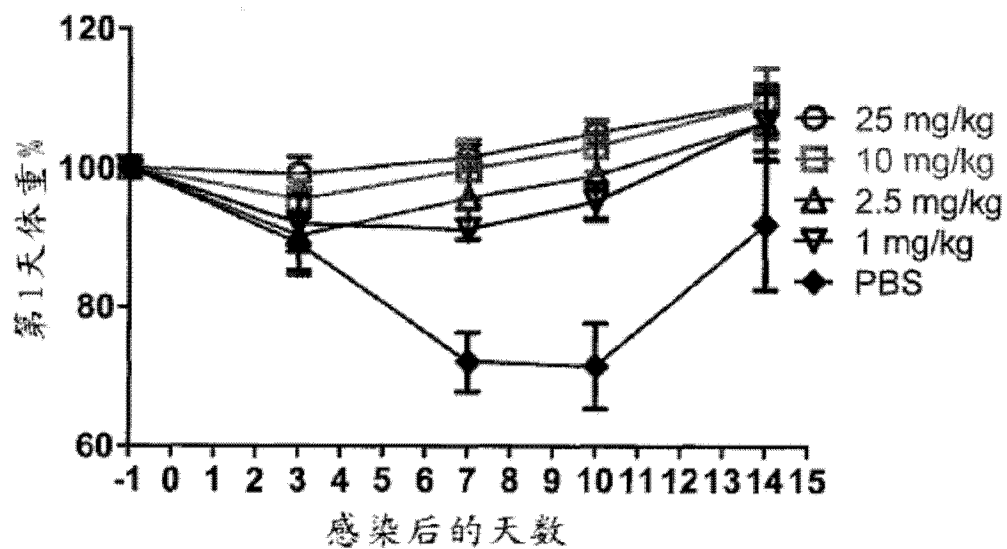


图 7E

AL LL SL 未经修饰的C5对H1和H3

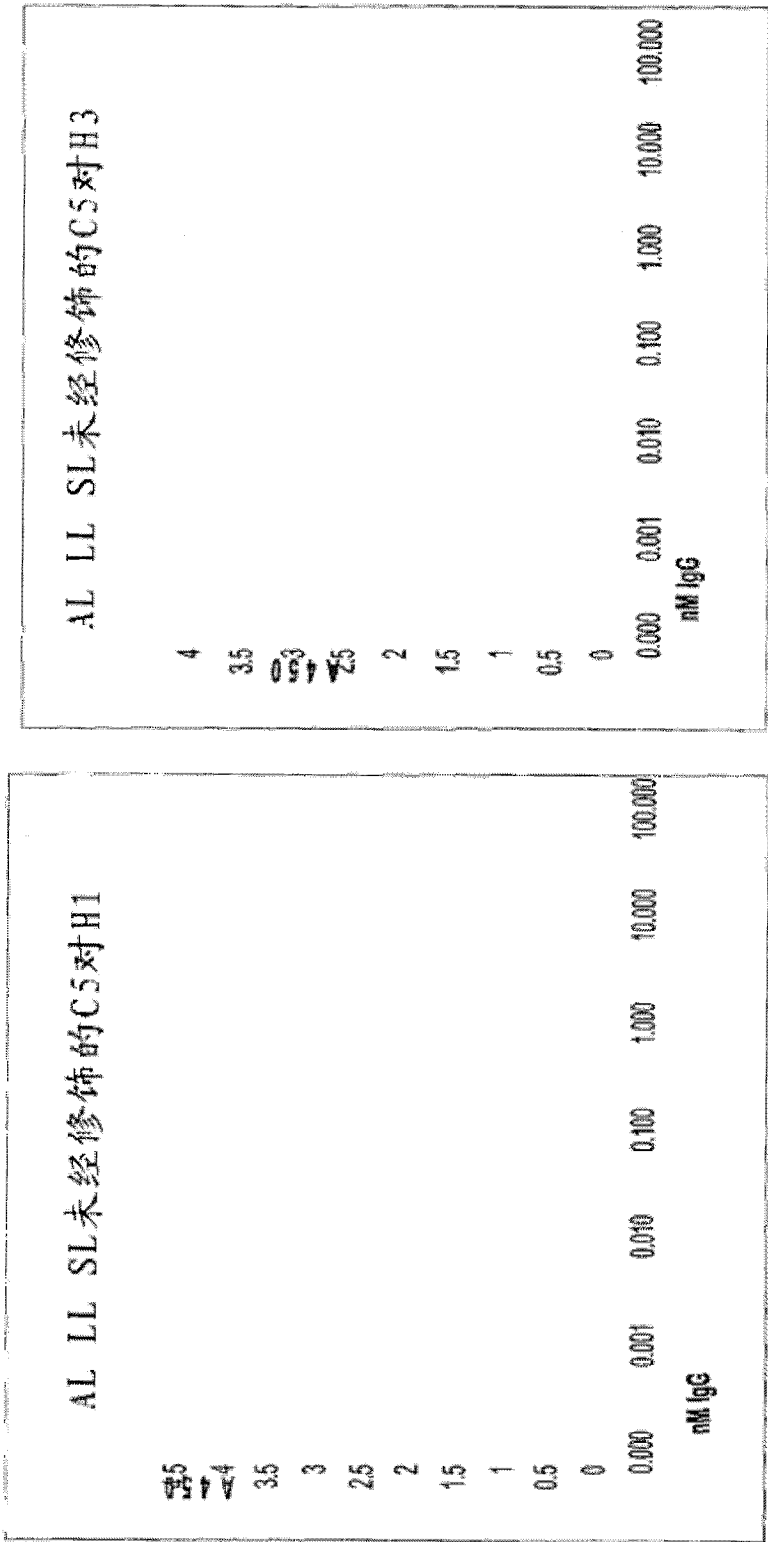


图 8

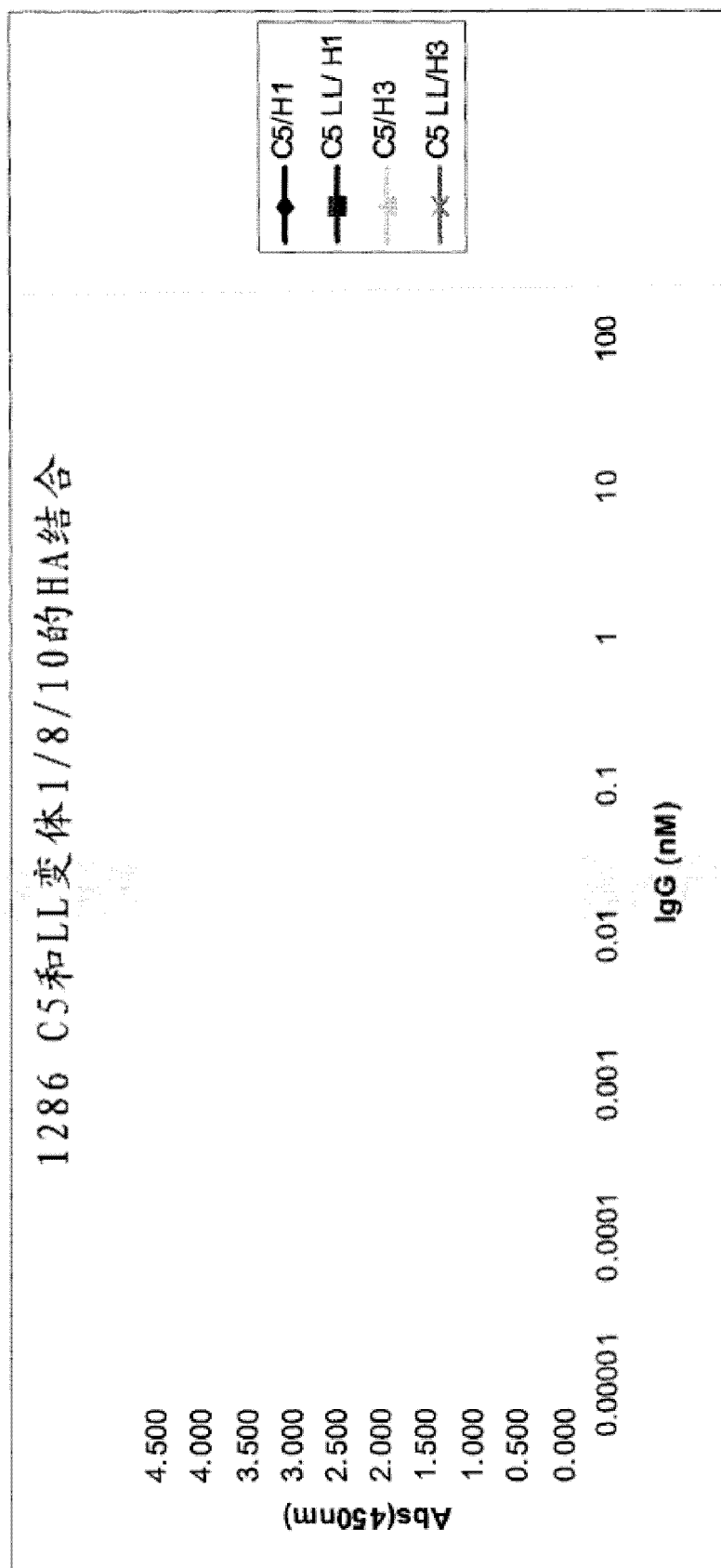


图 9