



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118139879 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 04

(21) 申请号 202280060150.4

(22) 申请日 2022.09.06

(30) 优先权数据

PCT/EP2021/074596 2021.09.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/074735 2022.09.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/036774 EN 2023.03.16

(71) 申请人 生物医学研究院

地址 瑞士贝林佐纳

(72) 发明人 安东尼奥·兰扎伟基亚

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 回振海 王春伟

(51) Int.Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书5页 说明书37页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

结合破伤风毒素的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合破伤风毒素的抗体及其抗原结合片段。本发明还涉及编码此类抗体和抗体片段的核酸以及表达此类抗体和抗体片段的细胞。此外,本发明还涉及抗体和抗体片段在诊断、预防和治疗破伤风梭菌或破伤风感染中的用途。

1. 一种结合破伤风毒素的抗体或其抗原结合片段。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%序列同一性

的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)根据SEQ ID NO:1的重链CDR1序列、根据SEQ ID NO:2的重链CDR2序列、根据SEQ ID NO:3的重链CDR3序列、根据SEQ ID NO:4的轻链CDR1序列、根据SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的轻链CDR2序列和根据SEQ ID NO:7的轻链CDR3序列;或(ii)根据SEQ ID NO:12的重链CDR1序列、根据SEQ ID NO:13的重链CDR2序列、根据SEQ ID NO:14的重链CDR3序列、根据SEQ ID NO:15的轻链CDR1序列、根据SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的轻链CDR2序列和根据SEQ ID NO:18的轻链CDR3序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少70%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少70%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少70%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少70%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少75%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少75%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少75%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少75%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少80%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少80%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少80%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少90%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii)包含与SEQ ID NO:19具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结

合片段包含 (i) 包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区和包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;或(ii) 包含根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少70%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少70%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少70%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少70%同一性的氨基酸序列的轻链。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少75%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少75%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少75%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少75%同一性的氨基酸序列的轻链。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少80%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少80%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少80%同一性的氨基酸序列的轻链。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少90%同一性的氨基酸序列的轻链。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含与SEQ ID NO:21具有至少95%同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有至少95%同一性的氨基酸序列的轻链。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含根据SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链和包含根据SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链;或(ii) 包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链和包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段为人源抗体。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段是经纯化的。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体包含Fc部分。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中抗体为IgG型抗体。

25. 根据权利要求24所述的抗体, 其中抗体为IgG1型抗体。

26. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

27. 根据权利要求26所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段为Fab。

28. 根据权利要求1至23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中抗体或其抗原结合片段为单链抗体。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其用作药物。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其用于预防或治疗破伤风梭菌或破伤风感染。

31. 一种核酸分子, 其包含编码根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

32. 根据权利要求31所述的核酸分子, 其中编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸是密码子优化的。

33. 根据权利要求31或32所述的核酸分子, 其包含如SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:48中任一项所示的核酸序列; 或其序列变体, 该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

34. 一种第一核酸分子和第二核酸分子的组合, 其中第一核酸分子包含编码根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸; 并且第二核酸分子包含编码相同抗体或其相同抗原结合片段的相应轻链的多核苷酸。

35. 根据权利要求34所述的核酸分子的组合, 其中编码抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链的多核苷酸之一或两者是密码子优化的。

36. 根据权利要求34或35所述的核酸分子的组合, 其包含如SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:48中任一项所示的核酸序列; 或其序列变体, 该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

37. 一种载体, 其包含根据权利要求31至33中任一项所述的核酸分子或根据权利要求34至36中任一项所述的核酸分子的组合。

38. 一种第一载体和第二载体的组合, 其中第一载体包含如权利要求34至36中任一项所定义的第一核酸分子, 并且第二载体包含如权利要求34至36中任一项所定义的相应第二核酸分子。

39. 一种细胞, 其表达根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段; 或

包含根据权利要求37或38所述的载体。

40. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31至33中任一项所述的核酸、根据权利要求34至36中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求37所述的载体、根据权利要求38所述的载体的组合或根据权利要求39所述的细胞,和任选地,药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

41. 根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31至33中任一项所述的核酸、根据权利要求34至36中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求37所述的载体、根据权利要求38所述的载体的组合、根据权利要求39所述的细胞或根据权利要求40所述的药物组合物,其用作药物;任选地,用于预防或治疗破伤风梭菌或破伤风感染。

42. 根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在(体外)诊断破伤风梭菌或破伤风感染中的用途。

43. 根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段用于通过检查包含在抗破伤风疫苗中的抗原或其表位的构象来监测疫苗的质量的用途。

44. 根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31至33中任一项所述的核酸、根据权利要求34至36中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求37所述的载体、根据权利要求38所述的载体的组合、根据权利要求39所述的细胞或根据权利要求40所述的药物组合物在制备用于预防、治疗或减弱破伤风梭菌或破伤风感染的药物中的用途。

45. 一种减少破伤风梭菌或破伤风感染或降低破伤风梭菌或破伤风感染风险的方法,其包括:向有此需要的对象施用治疗有效量的根据权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求31至33中任一项所述的核酸、根据权利要求34至36中任一项所述的核酸的组合、根据权利要求37所述的载体、根据权利要求38所述的载体的组合、根据权利要求39所述的细胞或根据权利要求40所述的药物组合物。

结合破伤风毒素的抗体及其用途

[0001] 本发明涉及破伤风抗体领域,具体涉及结合破伤风毒素的抗体。本发明还涉及此类抗体的用途,例如在预防和治疗破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) 或破伤风感染的方法中的用途。

[0002] 破伤风是由破伤风梭菌孢子感染所引起的。细菌孢子在环境中无处不在,例如,其可以在土壤、唾液、灰尘和粪便中被发现。它们可以通过影响神经系统的深切口、伤口或烧伤进入人体。大多数病例发生在感染后14天以内。症状包括下巴痉挛或无法张嘴,背部、腹部和四肢的肌肉痉挛,通常由突然的噪音、癫痫发作、头痛、发烧和出汗触发的突然疼痛的肌肉痉挛。虽然破伤风可以通过基于破伤风类毒素的强效疫苗来预防,但在四十岁/五十岁之后,破伤风毒素抗体的滴度会下降。在全球许多地方,破伤风仍然是重要的公共卫生问题,尤其是在免疫覆盖率低和不洁的分娩行为普遍存在的低收入国家或地区。WHO评估2018年有25000名新生儿死于新生儿破伤风。

[0003] 破伤风是由破伤风毒素(也称为“破伤风神经毒素”, TeNT)引起的,破伤风毒素是由破伤风梭菌在厌氧条件下产生的。破伤风毒素是毒性极强的神经毒素,其LD₅₀为约2.5ng/kg至3ng/kg。破伤风毒素在细菌中由tetX基因编码,表达为150-kDa前蛋白,其被细菌或宿主蛋白酶切割成两部分:100kDa重链和50kDa轻链。链由单个二硫键连接。轻链是Zn²⁺金属蛋白酶,而重链包含N-末端易位结构域(HN)和C-末端受体结合结构域(HC)。

[0004] 当患者在医院急诊室出现坏死性伤口时,立即进行治疗——除了积极的伤口护理、控制肌肉痉挛的药物和抗生素外——通常是施用多克隆人源抗体,该抗体是从超免疫人类供体中分离出来的,被称为破伤风免疫球蛋白(TIG)。在低收入国家,通常使用超免疫马血清,这可能会产生危险的超敏反应。

[0005] 然而,多克隆TIG受到各种缺点的影响。它只含有低百分比的专门针对破伤风毒素的抗体,因此通常需要注射大量的蛋白质。这可能导致不良反应,如血管性水肿或过敏反应。此外,尽管抗体的鞘内施用似乎更有效,但这种方法受到可以被注射的蛋白质总量的限制,因此用TIG是不可行的。此外,每批TIG的中和效力不同,并且存在被未知病毒或血液蛋白质污染的风险。此外,TIG含有少量的IgA,其可能会引起IgA缺乏患者的免疫应答。

[0006] 综上,本发明的目的是克服现有技术的缺点。特别地,本发明的目的是提供以高结合亲和力和特异性结合破伤风毒素的抗体。因此,只需注射少量高效抗体。

[0007] 这些目的是通过下文和所附权利要求中提出的主题来实现的。

[0008] 虽然本发明在下面进行了详细描述,但应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为其可能会变化。还应当理解,此处使用的术语并不旨在限制本发明的范围,其将仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0009] 在下文中,将描述本发明的要素。这些要素与特定实施方案一起列出,但应该理解的是,它们可以以任何方式和任何数量组合以创建额外的实施方案。所描述的各种实施例和实施方案不应被解释为将本发明限制为仅明确描述的实施方案。本说明书应被理解为支持并包含将所明确描述的实施方案与任意数量的所公开的要素相结合的实施方案。此外,

除非上下文另有说明,否则本申请中所有所述要素的任何排列和组合均应视为被本申请的说明书公开。

[0010] 在整个说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则术语“包括”以及如“含有”和“包含”的变体将被理解为暗示包括所陈述的成员、整体或步骤,但不排除任何其他未陈述的成员、整体或步骤。术语“由……组成”是术语“包含”的特定实施方案,其中排除了任何其他非声明的成员、整体或步骤。在本发明的上下文中,术语“包括”包含术语“由……组成”。因此,术语“包括”包括“包含”以及“由……组成”例如,“包括”X的组合物可以完全由X组成,或者可以包括附加物,例如X+Y。

[0011] “无量词”、“所述”以及在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)中使用的类似引用应被解释为涵盖单数和复数,除非本文中另有说明或与上下文明确矛盾。本文中对数值范围的引用仅旨在用作单独提到落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文另有说明,将每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独引用一样。说明书中的任何语言都不应解释为表示对于本发明的实践必不可少的任何未要求保护的要素。

[0012] “基本上”一词并不排除“完全”,例如,“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,可以在本发明的定义中省略“基本上”一词。

[0013] 相对于数值x的术语“约”是指 $x \pm 10\%$,例如, $x \pm 5\%$ 、或 $x \pm 7\%$ 、或 $x \pm 10\%$ 、或 $x \pm 6\%$ 、或 $x \pm 12\%$ 、或 $x \pm 8\%$ 、或 $x \pm 15\%$ 、或 $x \pm 20\%$ 。

[0014] 本文所用的术语“疾病”意在通常与术语“病症”和“症状”(如在医学状况中)同义,并可互换使用,因为所有这些都反映了人类或动物身体或其一个部分的损害正常功能的异常状况,并且通常通过有区别的病症和症状来表现,并导致人类或动物具有缩短的持续时间或降低的生活质量。

[0015] 如本文所用,对对象或患者的“治疗”是指包括防治、预防、减毒、改善和治疗。术语“对象”或“患者”在本文可互换使用,以表示包括人类在内的所有哺乳动物。对象的实例包括人类、牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。在一些实施方案中,对象为人类。

[0016] 剂量通常与体重有关。因此,以[g、mg、或其他单位]/kg(或g、mg等)表示的剂量通常是指[g、mg、或其他单位]“每kg(或g、mg等)体重”,即使未明确提及术语“体重”。

[0017] 术语“结合”和类似引用通常意指“特异性结合”,其不涵盖非特异性黏附。

[0018] 如本文所用,术语“抗体”涵盖各种形式的抗体,包括但不限于完整抗体、抗体片段(如抗原结合片段)、人源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体和基因工程化抗体(变体或突变抗体),只要保留根据本发明的特征即可。在一些实施方案中,抗体是人源抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人源单克隆抗体。

[0019] 如上所述,术语“抗体”一般还包括抗体片段。抗体的片段可以保留抗体的抗原结合活性。这类片段被称为“抗原结合片段”。抗原结合片段的实例包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。抗体的片段可通过以下方法从抗体获得:通过包括用酶,例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化的方法,和/或通过由化学还原造成的二硫键裂解。或者,可以通过重组手段,例如通过克隆和表达重链和/或轻链的部分(片段)序列来获得抗体的片段。本发明还涵盖源自本发明抗体的重链和轻链的单链Fv片段(scFv)。例如,本发明包括scFv,其包含来自本发明抗体的CDR。还包括重链或轻链单体和二聚体、单域重链抗体、单域

轻链抗体以及单链抗体,例如,重链和轻链可变结构域通过肽接头连接的单链Fv。本发明的抗体片段可以被包含在本领域技术人员已知的各种结构中。此外,本发明的序列可以是多特异性分子的组分,其中本发明的序列靶向本发明的表位,分子的其他区域结合其他靶点。尽管说明书,包括权利要求书,在某些地方可以明确地指代抗原结合片段、抗体片段、抗体的变体和/或衍生物,但应理解的是,术语“抗体”包括所有类别的抗体,即抗原结合片段、抗体片段、抗体的变体和衍生物。

[0020] 人源抗体在现有技术中是众所周知的(van Dijk,M.A.和van de Winkel,J.G., Curr.Opin.Chem.Biol.5(2001)368-374)。人源抗体也可以在转基因动物(例如小鼠)中产生,所述动物在免疫后能够在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生完整的抗体库或人源抗体选择对象。在这种种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体(参见,例如Jakobovits,A.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)2551-2555;Jakobovits,A.等人,Nature 362(1993)255-258;Bruggemann,M.等人,Year Immunol.7(1993)3340)。人源抗体也可以在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.和Winter,G.,J.Mol.Biol.227(1992)381-388;Marks,J.D.等人,J.Mol.Biol.222(1991)581-597)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985);和Boerner,P.等人,J.Immunol.147(1991)86-95)。在一些实施方案中,如Traggiai E,Becker S,Subbarao K,Kolesnikova L,Uematsu Y,Gismondo MR,Murphy BR,Rappuoli R,Lanzavecchia A.(2004):An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells:potent neutralization of SARS coronavirus.Nat Med.10(8):871-5中所述,通过使用改进的EBV-B细胞永生来制备人单克隆抗体。如本文所用,术语“可变区”(轻链可变区(V_L)、重链可变区(V_H))表示直接参与抗体与抗原结合的轻链和重链中的每一个。

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

[0022] 本发明的抗体可以纯化形式提供。通常,抗体将存在于基本上不含其它多肽的组合物中,例如,其中少于90重量%,通常少于60重量%,更通常少于50重量%的组合物由其它多肽组成。

[0023] 根据本发明的抗体可以在人和/或非人(或异源)宿主例如小鼠中具有免疫原性。例如,抗体可以具有在非人宿主中具有免疫原性但在人宿主中不具有免疫原性的独特位。用于人的本发明抗体包括不能轻易从宿主例如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等中分离的抗体,并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得。

[0024] 如本文所用,“中和抗体”是可以中和,即预防、抑制、减少、阻碍或干扰病原体在宿主中引发和/或持久感染的能力的抗体。术语“中和抗体”和“中和的抗体”在本文可互换使用。这些抗体可以根据适当的配方单独或组合用作预防剂或治疗剂,与主动疫苗接种结合,用作诊断工具或本文所述的生产工具。

[0025] 如本文所用,术语“突变”是指与参考序列例如相应的基因组序列相比,核酸序列和/或氨基酸序列的变化。突变,例如与基因组序列相比,其可以是例如(天然存在的)体细胞突变、自发突变、诱导突变,例如由酶、化学物质或辐射引起的诱导突变,或通过定点诱变

(用于在核酸序列和/或氨基酸序列中进行特异性和有意改变的分子生物学方法)获得的突变。因此,术语“突变”应被理解为还包括用物理的方式进行突变,例如在核酸序列或氨基酸序列中进行突变。突变包括一个或多个核苷酸或氨基酸的取代、删除和插入,以及几个连续核苷酸或氨基酸的倒位。为了实现氨基酸序列的突变,可以将突变引入编码所述氨基酸序列的核苷酸序列中,以表达(重组)突变的多肽。突变可以例如通过例如定点诱变改变编码一个氨基酸的核酸分子的密码子以产生编码不同氨基酸的密码子来实现,或通过合成序列变体来实现,例如通过知晓编码多肽的核酸分子的核苷酸序列,并且通过设计包含编码该多肽的变体的核苷酸序列的核酸分子的合成而无需突变核酸分子的一个或多个核苷酸。

[0026] 在本说明书的全文中引用了若干文献。无论是上文还是下文,本文引用的每个文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书等)均通过引用全文并入本文。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于此类公开内容。

[0027] 应当理解的是,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为它们可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0028] 抗体及其抗原结合片段

[0029] 在第一方面,本发明提供了(经分离的)抗体或其抗原结合片段,其(特异性)结合破伤风毒素。本发明还提供了(经分离的)抗体或其抗原结合片段,其(特异性)结合破伤风类毒素。

[0030] 破伤风毒素(又称为破伤风神经毒素,TeNT)通常被描述为具有三个结构域:轻链(L结构域),以及重链的N-末端(HN结构域)和C-末端(HC结构域)部分。重链的C-末端结构域(HC)负责识别特定的细胞表面受体和突触前结合。重链的C-末端结构域(HC)包含两个亚结构域,N-末端HC-N和C-末端HC-C。C-末端亚结构域HC-C包含多唾液酸神经节苷脂结合位点和巢蛋白结合位点,N-末端亚结构域HC-N与HN结构域连接。重链的N-末端结构域(HN)负责通过膜易位将L结构域递送至胞质中。当破伤风毒素到达胞质时,重链和轻链之间的二硫键被还原,L结构域(轻链)被释放至神经元的胞质中。L结构域是金属蛋白酶,其能阻断脊髓中控制传出运动神经元平衡收缩的抑制性中间神经元的神经递质释放。

[0031] 评估根据本发明的抗体或其抗原结合片段的结合的标准方法是本领域技术人员已知的,并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。因此,抗体结合的相对亲和力可以通过测量饱和时达到50%最大结合所需的抗体浓度(EC_{50})来确定。

[0032] 示例性标准ELISA可以按以下方式进行:ELISA板可以用足量(例如,1 μ g/ml)的待测抗体结合的蛋白/复合体/颗粒(例如,破伤风毒素)包被,以检测抗体与其结合的情况。然后,将板与待测抗体一起孵育。洗涤后,例如使用识别测试抗体的标记抗体如碱性磷酸酶偶联的山羊抗人IgG,可以显示出抗体结合。然后可以洗涤板,可以添加所需的底物(例如,p-NPP),并且可以例如在405nm读取板。可以通过测量在饱和时达到50%最大结合所需的mAb浓度(EC_{50})来确定抗体结合的相对亲和力。 EC_{50} 值可以通过用具有可变斜率的四参数非线性回归拟合的结合曲线的插值来计算。

[0033] 通常,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含在重链上的(至少)三个互补决定区(CDR)和在轻链上的(至少)三个CDR。通常,互补决定区(CDR)是存在于重链可变域和轻链可变域中的高变区。通常,抗体的重链的CDR和所连接的轻链一起形成抗原受体。通常,三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)在可变域中非连续排列。由于抗原受体通常由两个可变域组成(在两条不同的多肽链上,即重链和轻链上:重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)),因此通常每个抗原受体有六个CDR(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。例如,经典的IgG抗体分子通常有两个抗原受体,因此包含12个CDR。重链和/或轻链上的CDR可以通过框架区分开,其中框架区(FR)是可变域中比CDR“可变性”小的区域。例如,可变区(或每个可变区分别)由三个CDR隔开的四个框架区域组成。

[0034] 确定了本发明示例性抗体的重链和轻链的序列,其在重链上包含三个不同的CDR,并且在轻链上包含三个不同的CDR。CDR氨基酸的位置根据IMGT编号系统确定(IMGT:<http://www.imgt.org/>;cf.Lefranc,M.-P.等人(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)。

[0035] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段,包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0036] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段,包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0037] 如本说明书通篇所用,“序列同一性”通常根据参考序列(即本申请中所述的序列)的全长来计算的。如本文所指,百分比同一性可以例如通过本领域已知的方法来确定,如使

用由NCBI (国家生物技术信息中心;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 指定的默认参数的BLAST来确定[Blosum 62矩阵;空位开放罚分为11,空位延伸罚分为1]。

[0038] 如本说明书通篇所用,“序列变体”具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个氨基酸或核苷酸被删除或取代,和/或一个或多个氨基酸或核苷酸被插入参考序列中。由于这些改变,序列变体通常具有与参考序列具有至少70%同一性的序列。相对于参考序列的每100个氨基酸或核苷酸,具有至少70%同一性的变体序列具有不超过30个改变,即删除、插入或取代的任意组合。序列变体可以与参考序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性(其中,通常,序列变体与参考序列的%同一性越高,序列变体越优选)。在“序列变体”中,参考序列的功能性(例如,在本例中与破伤风毒素结合)可以保持。

[0039] 通常,尽管可以具有非保守的氨基酸取代,但取代通常是保守的氨基酸取代,即被取代的氨基酸与参考序列中相应的氨基酸具有相似的结构或化学性质。举例来说,保守的氨基酸取代包括一个脂肪族或疏水性氨基酸,例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,被另一个脂肪族或疏水性氨基酸取代;一个含羟基的氨基酸,如丝氨酸和苏氨酸,被另一个含羟基的氨基酸取代;一个酸性残基,例如谷氨酸或天冬氨酸,被另一个酸性残基取代;一个含酰胺的残基,如天冬酰胺和谷氨酰胺,被另一个含酰胺的残基取代;一个芳香残基,如苯丙氨酸和酪氨酸,被另一个芳香残基取代;一个碱性残基,如赖氨酸、精氨酸和组氨酸,被另一个碱性残基取代;以及一个小氨基酸,如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸和甘氨酸,被另一个小氨基酸取代。

[0040] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基到含有一百个或多于一百个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括氨基酸序列的N-或C-末端与报告分子或酶的融合。

[0041] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含(i)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(ii)分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iv)分别与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸

序列具有至少90%序列同一性(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0042] 因此,抗体或其抗原结合片段优选包含:

[0043] -根据SEQ ID NO:1的重链CDR1序列;

[0044] -根据SEQ ID NO:2的重链CDR2序列;

[0045] -根据SEQ ID NO:3的重链CDR3序列;

[0046] -根据SEQ ID NO:4的轻链CDR1序列;

[0047] -根据SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的轻链CDR2序列;和

[0048] -根据SEQ ID NO:7的轻链CDR3序列。

[0049] 或者,抗体或其抗原结合片段优选包含:

[0050] -根据SEQ ID NO:12的重链CDR1序列;

[0051] -根据SEQ ID NO:13的重链CDR2序列;

[0052] -根据SEQ ID NO:14的重链CDR3序列;

[0053] -根据SEQ ID NO:15的轻链CDR1序列;

[0054] -根据SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的轻链CDR2序列;和

[0055] -根据SEQ ID NO:18的轻链CDR3序列。

[0056] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和包含与SEQ ID NO:9具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0057] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:19具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0058] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有75%或大于75%(例如,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于

99%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有75%或大于75% (例如, 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此, 如上定义的CDR序列 (分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列) 可以被保留。

[0059] 在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:19具有75%或大于75% (例如, 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有75%或大于75% (例如, 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此, 如上定义的CDR序列 (分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列) 可以被保留。

[0060] 在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:8具有80%或大于80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有80%或大于80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此, 如上定义的CDR序列 (分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列) 可以被保留。

[0061] 在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:19具有80%或大于80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有80%或大于80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此, 如上定义的CDR序列 (分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列) 可以被保留。

[0062] 在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含 (i) 包含与SEQ ID NO:8具有85%或大于85% (例如, 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有85%或大于85% (例如, 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此, 如上定义的CDR序列 (分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列; 和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链

CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0063] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:19具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0064] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0065] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:19具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0066] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:8具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:9具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0067] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:19具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:20具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0068] 更具体地,抗体或其抗原结合片段优选包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含或组成为如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含或组成为如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[0069] 或者,抗体或其抗原结合片段优选包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含或组成为如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含或组成为如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0070] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0071] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有70%或大于70%(例如,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0072] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有75%或大于75%(例如,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有75%或大于75%(例如,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0073] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有75%或大于75%(例如,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有75%或大于75%(例如,76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的

重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有80%或大于80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有80%或大于80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0075] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有80%或大于80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有80%或大于80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0076] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0077] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有85%或大于85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0078] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重

链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0079] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有90%或大于90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0080] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:10具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:11具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:21具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:22具有95%或大于95%(例如,96%、97%、98%、99%或大于99%)同一性的氨基酸序列的轻链。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0082] 更具体地,抗体或其抗原结合片段优选包含重链和轻链,所述重链包含或组成为如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列并且所述轻链包含或组成为如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

[0083] 或者,抗体或其抗原结合片段优选包含重链和轻链,所述重链包含或组成为如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列并且所述轻链包含或组成为如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。

[0084] 本发明的示例性抗体,即抗体TT104和TT110的CDR和VH/VL序列以及Fab序列如下表1所示。

[0085]

抗体名称	重链					轻链				
	CDR1	CDR2	CDR3	VH	Fab	CDR1	CDR2	CDR3	VL	Fab
TT104	1	2	3	8	10	4	5/6	7	9	11
TT110	12	13	14	19	21	15	16/17	18	20	22

[0086] 表1:本发明的示例性抗体的CDR、VH/VL和Fab序列(SEQ ID NO)。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的抗体是人源抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体。例如,本发明的抗体是人源单克隆抗体。

[0088] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含Fc部分。Fc部分可以源自人源,例如源自人IgG1、人IgG2、人IgG3和/或人IgG4,如人IgG1。

[0089] 如本文所用,术语“Fc部分”指源自免疫球蛋白重链部分的序列,该序列始于木瓜蛋白酶切割位点正上游的铰链区(例如,天然IgG中的残基216,重链恒定区的第一个残基为114),终止于免疫球蛋白重链的C-末端。因此,Fc部分可以是完整的Fc部分或其一部分(例如结构域)。完整的Fc部分至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域(例如,EU氨基酸第216至446位)。附加的赖氨酸残基(K)有时会出现现在Fc部分的极端C-末端,但通常会从成熟抗体上被切割下来。

[0090] 本文Fc部分内的每个氨基酸位置已经根据本领域公认的Kabat EU编号系统进行编号,参见例如Kabat等人的“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S.Dept.Health and Human Services,1983和1987.EU指数或Kabat中的EU指数或EU编号是指EU抗体的编号(Edelman GM,Cunningham BA,Gall WE,Gottlieb PD,Rutishauser U,Waxdal MJ.The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule.Proc Natl Acad Sci U S A.1969;63(1):78-85;Kabat E.A.,National Institutes of Health(U.S.)Office of the Director,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,5th edition,Bethesda,MD:U.S.Dept.of Health and Human Services,Public Health Service,National Institutes of Health,1991,在此通过引用完全并入本文)。

[0091] 在一些实施方案中,在本发明的上下文中,Fc部分包含以下至少一种:铰链(例如,上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、或其变体、部分、或片段。Fc部分可以至少包含铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域。Fc部分可以是完整的Fc部分。相对于天然存在的Fc部分,Fc部分还可包含一个或多于一个氨基酸插入、删除或取代。例如,可以删除铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域(或其部分)中的至少一个。例如,Fc部分可包含或由以下组成:(i)与CH2结构域(或其部分)融合的铰链域(或其部分)、(ii)与CH3结构域(或其部分)融合的铰链域(或其部分)、(iii)与CH3结构域(或其部分)融合的CH2结构域(或其部分)、(iv)铰链结构域(或其部分)、(v)CH2结构域(或其部分)或(vi)CH3结构域或其部分。

[0092] 本领域普通技术人员将理解,可以修饰Fc部分,使得其氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子的完整Fc部分不同,同时保留天然存在的Fc部分赋予的至少一种所需功能。这样的功能包括Fc受体(FcR)结合、抗体半衰期调节、ADCC功能、蛋白A结合、蛋白G结合和补体结合。对这种功能负责和/或必需的天然存在的Fc部分的部分是本领域技术人员众所周知的。在一些实施例中,根据本发明的抗体包含(完整的)Fc部分/Fc区,其中与FcR的相互作用/结合没有受到损害。

[0093] 通常,可以通过技术人员已知的各种方法例如ELISA(Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthall DN, Parren PW, 等人:Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV.Nature 2007,449:101-104;Grevys A, Bern M, Foss S, Bratlie DB, Moen A, Gunnarsen KS, Aase A, Michaelsen TE, Sandlie I, Andersen JT: Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions.2015,194:5497-5508)或流式细胞仪(Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC:Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1:a specific role for

antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. *J Virol* 2009,83:7397-7410; Piccoli L, Campo I, Fregni CS, Rodriguez BMF, Minola A, Sallusto F, Luisetti M, Corti D, Lanzavecchia A: Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Commun* 2015,6:1-9) 来评估抗体与Fc受体的结合。

[0094] 例如, FcR结合可以通过(抗体的)Fc部分与Fc受体(FcR)的相互作用来介导, 所述Fc受体是造血细胞上的特化细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族, 并被证明通过免疫复合物的吞噬作用介导抗体包被的病原体的去除, 以及通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性来介导由相应抗体包被的红细胞和各种其他细胞靶标(例如肿瘤细胞)的裂解(ADCC; Van de Winkel, J.G. 和 Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49(1991) 511-524)。FcR通过其对免疫球蛋白类别的特异性来定义; IgG抗体的Fc受体被称为Fc γ R、IgE的Fc受体被称为Fc ϵ R、IgA的Fc受体被称为Fc α R, 依此类推, 新生Fc受体被称为FcRn。Fc受体结合描述于例如 Ravetch, J.V. 和 Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9(1991) 457-492; Capel, P.J. 等人, *Immunomethods* 4(1994) 25-34; de Haas, M. 等人, *J Lab. Clin. Med.* 126(1995) 330-341; 和 Gessner, J.E. 等人, *Ann. Hematol.* 76(1998) 231-248。

[0095] 天然IgG抗体(Fc γ R)的Fc结构域与受体交联可触发多种效应功能, 包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性、炎症介质的释放以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。因此, Fc部分可以提供交联受体(Fc γ R)。在人类中, 已鉴定出三类Fc γ R, 它们是: (i) Fc γ RI (CD64), 其以高亲和力结合单体IgG, 并在巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达; (ii) Fc γ RII (CD32), 其以中等至低亲和力结合复合IgG, 并且广泛表达, 特别是在白细胞上表达, 并且已知是抗体介导的免疫中的核心角色, 其可分为Fc γ RIIA, Fc γ RIIB和Fc γ RIIC并在免疫系统中发挥不同的功能, 但与IgG-Fc的结合具有相似的低亲和力, 这些受体的胞外域高度同源; (iii) Fc γ RIII (CD16), 其以中等至低亲和力结合IgG, 并分为两种类型: Fc γ RIIIA, 其存在于NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及一些单核细胞和T细胞上, 并介导ADCC; 以及Fc γ RIIIB, 其在嗜中性粒细胞上高度表达。Fc γ RIIA存在于许多参与杀伤的细胞(如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞)上, 并且似乎能够激活杀伤过程。Fc γ RIIIB似乎在抑制过程中起作用, 并存在于B细胞、巨噬细胞以及肥大细胞和嗜酸性粒细胞中。重要的是, 75%的Fc γ RIIIB存在于肝脏中(Ganesan, L.P. 等人, 2012: Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189:4981-4988)。Fc γ RIIIB在称为LSEC的肝窦内皮细胞上大量表达, 在肝脏的库普弗(Kupffer)细胞和LSEC中是小免疫复合物清除的主要位点(Ganesan, L.P. 等人, 2012: Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189:4981-4988)。

[0096] 因此, 本发明的抗体及其抗原结合片段可以能够结合Fc γ RIIb, 例如包含用于结合Fc γ RIIb的Fc部分, 特别是Fc区的抗体, 例如IgG型抗体。此外, 可以通过引入突变S267E和L328F来工程改造Fc部分以增强Fc γ RIIb结合, 如Chu, S.Y. 等人, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933所述的。从而可以增强免疫复合物的清除(Chu, S. 等人, 2014: Accelerated

Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor Fc γ RIIb. *Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts*). 因此, 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含具有突变S267E和L328F的工程改造的Fc部分, 特别是如S.Y.等人, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933中所述的。

[0097] 在B细胞上, 其作用似乎是抑制其他免疫球蛋白产生和同种型转换, 例如IgE类。在巨噬细胞上, Fc γ RIIB作用为抑制通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞中, b型可通过IgE与其独立受体的结合来帮助抑制这些细胞的活化。

[0098] 关于Fc γ RI结合, E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329中的至少一种天然IgG中的修饰降低了与Fc γ RI的结合。位于第233至236位的IgG2残基被取代为IgG1和IgG4, 其与Fc γ RI的结合降低了 10^3 倍, 并消除了人单核细胞对抗体致敏的红细胞的反应 (Armour, K.L.等人 *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624)。关于Fc γ RII结合, 发现例如E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414中的至少一种IgG突变减少了对Fc γ RIIA的结合。关于Fc γ RIII结合, 发现例如E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376中的至少一种突变减少了对Fc γ RIIIA的结合。对人IgG1上与Fc受体的结合位点的图、上述突变位点和测量与Fc γ RI和Fc γ RIIA结合的方法在Shields, R.L.等人, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604中有所描述。例如, 单突变 (S239D或I332E)、双突变 (S239D/I332E) 和三突变 (S239D/I332E/A330L) 提高针对人Fc γ RIIIA的亲和力。此外, 将突变G236A增加到S239D/I332E不仅提高Fc γ RIIa: Fc γ RIIb的比例, 还增强与Fc γ RIIa的结合。因此, 描述突变G236A/S239D/A330L/I332E以增强Fc γ RIIa和Fc γ RIIIA的结合。

[0099] 关于与关键Fc γ RII的结合, 天然IgG Fc的两个区域似乎对Fc γ RII和IgG的相互作用至关重要, 即 (i) IgG Fc的下部铰链位点, 特别是氨基酸残基L、L、G、G (234-237, EU编号), 和 (ii) IgG Fc的CH2结构域的相邻区域, 特别是上部CH2结构域中与下部铰链区相邻的环和链, 例如在P331区域 (Wines, B.D等人, *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318)。此外, Fc γ RI看与IgG Fc上的相同位点结合, 然而FcRn和蛋白A与IgG Fc上的不同位点结合, 所述位点似乎位于CH2至CH3界面处 (Wines, B.D等人, *J. Immunol.* 2000; 164: 5313-5318)。

[0100] 例如, Fc部分可以至少包含或由Fc部分的部分组成, 该Fc部分的部分是本领域已知的FcRn结合或延长半衰期所需的部分。可选地或附加地, 本发明抗体的Fc部分至少包含本领域已知的蛋白质A结合所需的部分和/或本发明抗体的Fc部分至少包含本领域已知的蛋白质G结合所需的Fc分子的部分。Fc部分可以至少包含本领域已知的Fc γ R结合所需的部分。如上所述, Fc部分可因此至少包含 (i) 天然IgG Fc的下铰链位点, 尤其是氨基酸残基L、L、G、G (234-237, EU编号), 和 (ii) 天然IgG Fc的CH2结构域的邻近区域, 特别是上部CH2结构域中与下部铰链区相邻的环和链, 例如在P331的区域中, 例如在P331周围的天然IgG Fc的上部CH2结构域中的至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的区域, 例如在天然IgG Fc的氨基酸第320和340位之间 (EU编号)。

[0101] 此外, 与未经修饰的抗体相比, 可以通过将 (随机) 氨基酸突变引入重链的CH2结构

域或CH3结构域的特定区域来修饰根据本发明的抗体,以改变它们与FcR的结合亲和力和/或其血清半衰期。此类修饰的实例包括但不限于选自氨基酸残基第250、314和428位的重链恒定区的至少一个氨基酸的取代。这种Fc修饰的其他实例描述于Saxena A, Wu D. *Advances in Therapeutic Fc Engineering-Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life*. *Front Immunol*. 2016;7:580中,通过引用并入本文。在一些实施方案中,抗体可包含“YTE”突变(M252Y/S254T/T256E;EU编号)。在一些实施方案中,抗体可包含重链恒定区中的突变M428L和/或N434S(EU编号)。

[0102] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含Fc区。如本文所用,术语“Fc区”是指由抗体重链的两个或多于两个Fc部分形成的免疫球蛋白的部分。例如,Fc区可以是单体或“单链”Fc区(即,scFc区)。单链Fc区由在单个多肽链内连接的Fc部分组成(例如,在单个连续核酸序列中编码)。WO 2008/143954 A2中公开了示例性的scFc区。Fc区可以为二聚体。“二聚体Fc区”或“dcFc”是指由两个分开的免疫球蛋白重链的Fc部分形成的二聚体。二聚体Fc区可以是两个相同的Fc部分的同二聚体(例如,天然存在的免疫球蛋白的Fc区)或两个不同的Fc部分的异二聚体。

[0103] Fc区的Fc部分可以是相同或不同的类和/或亚类。例如,Fc部分可以衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的免疫球蛋白(例如人免疫球蛋白)。Fc区的Fc部分可以是相同的类和亚类。然而,Fc区(或Fc区的一个或多于一个Fc部分)也可以是嵌合的,由此嵌合Fc区可以包含衍生自不同免疫球蛋白类和/或亚类的Fc部分。例如,二聚或单链Fc区的至少两个Fc部分可以来自不同的免疫球蛋白类和/或亚类。另外地或可替代地,嵌合Fc区可包含一个或多于一个嵌合Fc部分。例如,嵌合Fc区或部分可包含衍生自第一亚类(例如IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的一个或多于一个部分,而Fc区或部分的其余部分属于不同的亚类。例如,Fc多肽的Fc区或部分可以包含衍生自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG4亚类)的CH2结构域和/或CH3结构域和衍生自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG3亚类)的铰链区。例如,Fc区或部分可以包含衍生自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG4亚类)的铰链和/或CH2结构域和衍生自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的CH3结构域。例如,嵌合Fc区可以包含来自第一亚类免疫球蛋白(例如,IgG4亚类)的Fc部分(例如,完整Fc部分)和来自第二亚类免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的Fc部分。例如,Fc区或部分可包含来自IgG4免疫球蛋白的CH2结构域和来自IgG1免疫球蛋白的CH3结构域。例如,Fc区或部分可包含来自IgG4分子的CH1结构域和CH2结构域以及来自IgG1分子的CH3结构域。例如,Fc区或部分可包含来自抗体的特定亚类的CH2结构域的一部分,例如CH2结构域的EU第292至340位。例如,Fc区或Fc片段可包含氨基酸,其中CH2的第292至340位衍生自IgG4部分,而CH2的其余部分衍生自IgG1部分(替代地,CH2的第292至340位可衍生自IgG1部分,并且CH2的其余部分衍生自IgG4部分)。

[0104] 而且,Fc区或部分可(另外或替代地)例如包含嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以例如部分衍生自IgG1、IgG2或IgG4分子(例如,上部和下部、中部铰链序列),并且部分衍生自IgG3分子(例如,中部铰链序列)。在另一个实例中,Fc区或部分可包含部分衍生自IgG1分子且部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。在另一个实例中,嵌合铰链可包含来自IgG4分子的上部和下部铰链结构域和来自IgG1分子的中部铰链结构域。可以例如通过在IgG4铰链区的中间铰链结构域的EU第228位引入脯氨酸取代(Ser228Pro)来制备这种嵌合铰链。在其他实施

方案中,嵌合铰链可包含位于EU第233至236位的氨基酸,其来自IgG2抗体和/或Ser228Pro突变,其中铰链的剩余氨基酸来自IgG4抗体。可以在根据本发明的抗体的Fc部分中使用的其他嵌合铰链描述于US2005/0163783 A1中。

[0105] 在一些实施方案中,Fc部分或Fc区包含或由衍生自人免疫球蛋白序列的氨基酸序列(例如,衍生自人IgG分子的Fc区或Fc部分)组成。然而,Fc部分或Fc区可包含来自另一哺乳动物物种的一个或多于一个氨基酸。例如,灵长类动物Fc部分或灵长类动物结合位点可包括在抗体或其抗原结合片段中。或者,在Fc部分或Fc区中可存在一种或多于一种鼠类氨基酸。

[0106] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段,特别是除了如上所述的Fc部分之外,包含源自恒定区,特别是源自IgG的恒定区,如源自(人)IgG1的恒定区的其他部分。根据本发明的抗体,特别是除了如上所述的Fc部分之外,可以包含恒定区的所有其他部分,特别是IgG(如(人)IgG1)的恒定区的所有其他部分。换言之,抗体或其抗原结合片段可以包含源自人IgG1的(完整)Fc区。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段,特别是除了源自人IgG1的(完整)Fc区之外,还包含IgG恒定区的所有其他部分,如(人)IgG1恒定区的所有其他部分。

[0107] 然而,通常,本发明的抗体可以是任何同种型抗体(例如,IgA、IgG、IgM,即 α 、 γ 或 μ 重链)。例如,抗体可以是IgG型抗体。在IgG同种型中,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类,例如IgG1。本发明的抗体可以具有 κ 或 λ 轻链。在一些实施方案中,抗体是IgG1型抗体并且具有 λ 或 κ 轻链。

[0108] 在一些实施方案中,抗体是人IgG1抗体。抗体可以是任何同种异型抗体。术语“同种异型”是指在IgG亚类中发现的等位基因变异。例如,抗体可以是G1m1(或G1m(a))同种异型、G1m2(或G1m(x))同种异型、G1m3(或G1m(f))同种异型和/或G1m17(或Gm(z))同种异型。G1m3和G1m17同种异型位于CH1结构域中的相同位置(根据EU编号的位置214)。G1m3对应于R214(EU),而G1m17对应于K214(EU)。G1m1同种异型位于CH3结构域(在位置356和358(EU))并且是指替换E356D和M358L。G1m2同种异型是指用甘氨酸替换位置431(EU)的丙氨酸。G1m1同种异型可以与例如G1m3或G1m17同种异型组合。在一些实施方案中,抗体属于同种异型G1m3,不含G1m1(G1m3,-1)。在一些实施方案中,抗体是G1m17,1同种异型。在一些实施方案中,抗体是G1m3,1同种异型。在一些实施方案中,抗体属于同种异型G1m17,不含G1m1(G1m17,-1)。任选地,这些同种异型可以与G1m2、G1m27或G1m28同种异型组合(或不组合)。例如,抗体可以是G1m17,1,2同种异型。

[0109] 通常,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以被糖基化。例如,附着在重链CH2结构域上的N-连接聚糖可以影响C1q和FcR的结合,且糖基化抗体对这些受体的亲和力较低。因此,根据本发明的抗体的Fc部分的CH2结构域可包含一个或多于一个突变,其中糖基化残基被非糖基化残基取代。例如,抗体的聚糖在施用后不导致人免疫原应答。

[0110] 恒定区的示例序列是根据SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:26的氨基酸序列。例如,IgG1CH1-CH2-CH3的氨基酸序列是根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性。轻链恒定区可以包含根据SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25的氨基酸序列;或其序列变体(包括,例

如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。

[0111] 如上所述,本发明包含抗原结合片段。抗原结合片段可以包含或不包含Fc部分,特别是完整Fc部分的一部分。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。例如,F(ab')₂(其可通过胃蛋白酶裂解或重组表达获得)以及Fab'(其可由F(ab')₂或通过重组表达获得)通常包括铰链区。

[0112] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以为单链抗体(或片段)。单链抗体(或片段)可以编码完整的六个CDR集,即包括三个重链CDR以及三个轻链CDR。更具体地,单链抗体(或片段)可以包括重链可变区(VH)以及轻链可变区(VL),例如包括如上所述的VH和VL。

[0113] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不包含Fc区。换言之,抗体或其抗原结合片段可以不包含铰链区、CH2区和CH3区中的任何。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段为Fab。除了重链和轻链可变域之外,Fab通常还包括重链(例如,CH1)和轻链(例如,CL)的单一恒定区。Fab可以通过以下方式获得:例如通过木瓜蛋白酶裂解,或通过使用例如在编码重链VH和CH1区(特别是直接在CH1编码序列之后)的核酸序列之后引入的终止密码子重组表达。例如,Fab(CH1区)的重链恒定区的氨基酸序列可以为根据SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。Fab的轻链恒定区通常对应于“完整”免疫球蛋白的轻链恒定区,因此可以为根据SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25的氨基酸序列;或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。

[0114] 在一些实施方案中,Fab包含或组成为根据SEQ ID NO:10的重链序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性;和根据SEQ ID NO:11的轻链序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0115] 在其他实施方案中,Fab包含或组成为根据SEQ ID NO:21的重链序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性;和根据SEQ ID NO:22的轻链序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和

CDR3序列)可以被保留。

[0116] 本发明的抗体还包括杂合抗体分子,其包含来自如上定义的本发明抗体的六个CDR和来自针对抗原的另一抗体的一个或多个一个CDR。例如,抗体可以是双特异性的。

[0117] 变体抗体也包括在本发明的范围内。因此,本申请中所述序列的变体也包括在本发明的范围内。这种变体包括体内在免疫应答过程中通过体细胞突变产生的天然变体或体外培养永生B细胞克隆时产生的天然变体。或者,变异可由于遗传密码的简并性而产生,或可由于转录或翻译错误而产生。

[0118] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以以纯化形式提供。通常,抗体或其抗原结合片段将存在于基本上不含其它多肽的组合物中,例如,其中少于90重量%,通常少于60重量%,更通常少于50重量%的组合物由其它多肽组成。

[0119] 本发明的抗体可以在非人类(或异源)宿主例如小鼠中具有免疫原性。特别地,抗体可以具有在非人类宿主中而不是人类宿主中具有免疫原性的独特位。特别地,用于人的本发明抗体包括不能轻易从宿主例如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等中分离的抗体,并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得。

[0120] 核酸

[0121] 在另一方面,本发明还提供了核酸分子,其包含编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸,如上所述。

[0122] 在一些实施方案中,核酸分子包括一种或多种编码本发明的示例性抗体(例如,如上表1所述)或如本文所述的其序列变体(具有如上所述的至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多于99%的序列同一性)的多核苷酸。

[0123] 核酸分子和/或多核苷酸的实例包括例如重组多核苷酸、载体、寡核苷酸、RNA分子例如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA,或DNA分子例如cDNA。核酸可编码抗体的轻链和/或重链。换言之,抗体的轻链和重链可由相同的核酸分子编码(例如,以双顺反子方式)。或者,抗体的轻链和重链可由不同核酸分子编码。

[0124] 由于遗传密码的冗余性,本发明还包括编码相同的氨基酸序列的核酸序列的序列变体。编码抗体的多核苷酸(或完整核酸分子)可以针对抗体的表达进行优化。例如,核苷酸序列的密码子优化可用于提高用于产生抗体的表达系统中的翻译效率。此外,核酸分子可包含异源元件(即,自然界中不出现在与编码抗体(重链或轻链)的序列相同的核酸分子上的元件)。例如,核酸分子可以包括异源启动子、异源增强子、异源UTR(例如,用于最佳翻译/表达)、异源Poly-A-尾等。

[0125] 核酸分子是包含核酸组分的分子。术语核酸分子通常是指DNA分子或RNA分子。它可与术语“多核苷酸”同义使用,即核酸分子可由编码抗体的多核苷酸组成。或者,除了编码抗体的多核苷酸之外,核酸分子还可包含其他元件。通常,核酸分子是包含核苷酸单体或由核苷酸单体组成的聚合物,所述核苷酸单体通过糖/磷酸骨架的磷酸二酯键彼此共价连接。术语“核酸分子”还涵盖经修饰的核酸分子,例如碱基修饰、糖修饰或骨架修饰等的DNA或RNA分子。

[0126] 通常,可以操纵核酸分子以插入、删除或改变某些核酸序列。这种操作的变化包括

但不限于引入限制位点、修改密码子使用、添加或优化转录和/或翻译调节序列等变化。也可以改变核酸以改变编码的氨基酸。例如,在抗体的氨基酸序列中引入一个或多个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等)氨基酸取代、缺失和/或插入可能是有用的。这样的点突变可以修饰效应子功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可以引入氨基酸以连接共价基团(例如标记),或可以引入标签(例如出于纯化目的)。或者,核酸序列中的突变可以是“沉默的”,即由于遗传密码的冗余而不反映在氨基酸序列中。通常,突变可以被引入特定位点或可以被随机引入,然后进行选择(例如分子进化)。例如,可以将编码(示例性)抗体的轻链或重链的任何一个或多个的核酸随机或定向突变以在编码的氨基酸中引入不同的性质。此类变化可能是迭代过程的结果,其中保留了初始变化,并在其他核苷酸位置引入了新变化。此外,在独立的步骤中实现的变化可以合并。

[0127] 在一些实施方案中,编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸(或(完整)核酸分子)可以是密码子优化的。本领域技术人员知道用于密码子优化的各种工具,例如描述于如下中的那些:Ju Xin Chin,Bevan Kai-Sheng Chung,Dong-Yup Lee,Codon Optimization OnLine(COOL):a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design,Bioinformatics,Volume 30,Issue 15,1August 2014,Pages 2210-2212;或:Grote A,Hiller K,Scheer M,Munch R,Nortemann B,Hempel DC,Jahn D,JCcat:a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host.Nucleic Acids Res.2005Jul 1;33(Web Server issue):W526-31;或例如,Genscript's OptimumGene™ algorithm(如US2011/0081708 A1中所述)。

[0128] 例如,本发明的核酸分子可以包含SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:48中任一项的核酸序列,或其序列变体,该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0129] 编码本发明的示例性抗体的CDR、VH/VL或Fab序列的示例性核酸序列如下表2所示。

[0130] 表2:本发明的示例性抗体的示例性核酸CDR、VH/VL和Fab序列(SEQ ID NO)。

抗体名称	重链					轻链				
	CDR1	CDR2	CDR3	VH	Fab	CDR1	CDR2	CDR3	VL	Fab
TT104	27	28	29	34	36	30	31/32	33	35	37
TT110	38	39	40	45	47	41	42/43	44	46	48

[0132] 因此,核酸分子可以包含:

[0133] (i) 根据SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:38的多核苷酸(或其序列变体);根据SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:39的多核苷酸(或其序列变体);根据SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:40的多核苷酸(或其序列变体);根据SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:41的多核苷酸(或其序列变体);根据(a) SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32的多核苷酸(或其序列变体)或根据(b) SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43的多核苷酸(或其序列变体);和根据SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:44的多核苷酸(或其序列变体);

[0134] (ii) 根据SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:45的多核苷酸(或其序列变体);和根据SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:46的多核苷酸(或其序列变体);或

[0135] (iii) 根据SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:47的多核苷酸(或其序列变体);和根据SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:48的多核苷酸(或其序列变体)。

[0136] 本发明还提供了第一核酸分子和第二核酸分子的组合,其中第一核酸分子包含编码本发明抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸;并且第二核酸分子包含编码相同抗体或其相同抗原结合片段的相应轻链的多核苷酸。上述关于本发明核酸分子的(一般)特征的描述相应地适用于组合的第一核酸分子和第二核酸分子。因此,编码抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链的多核苷酸之一或两者是密码子优化的。例如,组合可以包含如SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:48中任一项所示的核酸序列,或其序列变体,该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在一些实施方案中,如下所述的第一核酸分子和第二核酸分子的组合,其中第一核酸分子包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸;和第二核酸分子包含编码相同抗体或其相同的抗原结合片段的相应轻链的多核苷酸。

[0137] 本发明还提供了第一核酸分子和第二核酸分子的组合,其中

[0138] -第一核酸分子包含编码抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸,所述多核苷酸包含:(a) 根据SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29的核苷酸序列(或其序列变体);或(b) 根据SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核苷酸序列(或其序列变体);和

[0139] -第二核酸分子包含编码抗体或其抗原结合片段的轻链的多核苷酸,所述多核苷酸包含:(c) 根据SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31(或SEQ ID NO:32)和SEQ ID NO:33的核苷酸序列(或其序列变体);或(d) 根据SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42(或SEQ ID NO:43)和SEQ ID NO:44的核苷酸序列(或其序列变体)。

[0140] 这种组合通常编码如上所述的本发明的抗体或其抗原结合片段。再次,上述关于本发明核酸分子的(一般)特征的描述相应地适用于组合的第一核酸分子和第二核酸分子。

[0141] 在一些实施方案中,

[0142] -第一核酸分子包含多核苷酸,所述多核苷酸包含:(a) 根据SEQ ID NO:34的核苷酸序列(或其序列变体);或(b) 根据SEQ ID NO:45的核苷酸序列(或其序列变体);和

[0143] -第二核酸分子包含多核苷酸,所述多核苷酸包含:(c) 根据SEQ ID NO:35的核苷酸序列(或其序列变体);或(d) 根据SEQ ID NO:46的核苷酸序列(或其序列变体)。

[0144] 在一些实施方案中,

[0145] -第一核酸分子包含多核苷酸,所述多核苷酸包含:(a) 根据SEQ ID NO:36的核苷酸序列(或其序列变体);或(b) 根据SEQ ID NO:47的核苷酸序列(或其序列变体);和

[0146] -第二核酸分子包含多核苷酸,所述多核苷酸包含:(c) 根据SEQ ID NO:37的核苷酸序列(或其序列变体);或(d) 根据SEQ ID NO:48的核苷酸序列(或其序列变体)。

[0147] 应当理解,对于本文所述的示例性序列,如上表2所示的对应于抗体TT104或抗体TT110的SEQ ID NO的这种组合是优选的。

[0148] 载体

[0149] 还包括在本发明范围内的是包含根据本发明的核酸分子的载体,例如表达载体。通常,载体包含如上所述的核酸分子。

[0150] 本发明还提供第一载体和第二载体的组合,其中第一载体包含如上所述的第一核酸分子(对于核酸分子的组合),并且第二载体包含如上所述的第二核酸分子(对于核酸分子的组合)。

[0151] 载体通常是重组核酸分子,即自然界中不存在的核酸分子。因此,载体可包含异源元件(即,自然界中不同来源的序列元件)。例如,载体可包含多克隆位点、异源启动子、异源增强子、异源选择标记(以与不包含所述载体的细胞相比,识别包含所述载体的细胞)等。在本发明的上下文中,载体适合于纳入或包藏所需的核酸序列。这样的载体可以是存储载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。存储载体是允许方便地存储核酸分子的载体。因此,载体可以包含对应于例如根据本发明所期抗体(的重链和/或轻链)的序列。表达载体可用于产生表达产物,例如RNA,如mRNA或肽、多肽或蛋白质。例如,表达载体可以包含转录载体的序列段所需的序列,例如(异源)启动子序列。克隆载体通常是包含克隆位点的载体,该位点可用于将核酸序列纳入到载体中。克隆载体可以是例如质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适于将核酸分子转移到细胞或生物中的载体,例如病毒载体。在本发明的上下文中,载体可以是例如RNA载体或DNA载体。例如,在本申请意义上的载体包括克隆位点、选择标记例如抗生素抗性因子、和适合于载体复制的序列例如复制起点。在本申请的上下文中,载体可以是质粒载体。

[0152] 细胞

[0153] 在另一方面,本发明还提供了表达本发明的抗体或其抗原结合片段;和/或包含根据本发明的载体(或载体的组合)的细胞。

[0154] 这种细胞的实例包括但不限于真核细胞例如酵母细胞、动物细胞或植物细胞。这种细胞的其他实例包括但不限于原核细胞,例如大肠杆菌。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞,如哺乳动物细胞系。实例包括人细胞、CHO细胞、HEK293T细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、人肝细胞、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0155] 可以用根据本发明的载体,例如用表达载体来转染细胞。术语“转染”是指将核酸分子,例如DNA或RNA(例如mRNA)分子引入细胞,例如引入真核细胞或原核细胞。在本发明的上下文中,术语“转染”涵盖技术人员已知的用于将核酸分子引入细胞如哺乳动物细胞的任何方法。这样的方法包括例如电穿孔,脂质转染如基于阳离子脂质和/或脂质体、磷酸钙沉淀、基于纳米颗粒的转染、基于病毒的转染或基于阳离子聚合物如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺的转染等。在一些实施方案中,引入是非病毒的。

[0156] 此外,本发明的细胞可以用根据本发明的载体稳定或瞬时转染,其中载体例如用于表达根据本发明的抗体。在一些实施方案中,用编码根据本发明的抗体的根据本发明的载体稳定转染细胞。在其他实施方案中,用编码根据本发明的抗体的根据本发明的载体瞬时转染细胞。

[0157] 因此,本发明还提供了异源表达本发明的抗体或其抗原结合片段的重组宿主细胞。例如,细胞可以是与抗体不同的物种(例如,表达人抗体的CHO细胞)。在一些实施方案中,细胞的细胞类型在自然界中不表达(这种)抗体。此外,宿主细胞可以对不以其天然状态存在的抗体赋予翻译后修饰(PTM;例如,糖基化)。这种PTM可导致功能差异(例如,降低的免疫原性)。因此,本发明的抗体或其抗原结合片段可具有翻译后修饰,其不同于天然产生的抗体(例如人类免疫应答的抗体)。

[0158] 抗体制备

[0159] 可以通过本领域已知的任何方法来制备根据本发明的抗体。例如,使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的一般方法是众所周知的(Kohler,G.and Milstein,C,.1975;Kozbar等人,1983)。在一些实施方案中,使用W02004/076677中所述的替代EBV永生化方法。

[0160] 在一些实施方案中,使用W0 2004/076677中所述的方法,该文献通过引用并入本文。在该方法中,用EBV和多克隆B细胞激活剂转化产生本发明抗体的B细胞。可以在转化步骤中任选地添加细胞生长和分化的其他刺激物,以进一步提高效率。这些刺激物可以是细胞因子,例如IL-2和IL-15。一方面,在永生化步骤中加入IL-2以进一步提高永生化效率,但是其使用不是必需的。然后可以使用本领域已知的方法培养使用这些方法产生的永生化B细胞,并从中分离出抗体。

[0161] W0 2010/046775中描述了另一种示例性方法。在这种方法中,将浆细胞进行有限数量的培养,或者在微孔培养板中作为单个浆细胞进行培养。可以从浆细胞培养物中分离出抗体。此外,可以使用本领域已知的方法从浆细胞培养物中提取RNA并进行PCR。可以通过RT-PCR(逆转录酶PCR)扩增抗体的VH和VL区、对其进行测序并克隆到表达载体中,然后将其转染到HEK293T细胞或其他宿主细胞中。表达载体中的核酸的克隆、宿主细胞的转染、转染的宿主细胞的培养以及所制备的抗体的分离可以使用本领域技术人员已知的任何方法进行。

[0162] 如果需要,可以使用过滤、离心和各种色谱方法例如HPLC或亲和色谱法进一步纯化抗体。包括产生药物级抗体的技术在内的纯化抗体例如单克隆抗体的技术在本领域中是众所周知的。

[0163] 分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明的抗体的DNA序列。所需的DNA序列可以使用寡核苷酸合成技术完全或部分合成。可以适当使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0164] 任何合适的宿主细胞/载体系统均可用于表达编码本发明抗体分子的DNA序列。真核生物例如哺乳动物宿主细胞表达系统可以用于制备抗体分子,如完整的抗体分子。合适的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。此外,原核生物例如细菌宿主细胞表达系统可用于产生抗体分子,例如完整的抗体分子。合适的细菌宿主细胞包括但不限于大肠杆菌细胞。

[0165] 本发明还提供用于产生根据本发明的抗体分子的方法,其包括在适合从编码本发明抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下,培养包含编码本发明核酸的载体的(异源)宿主细胞,和分离抗体分子。

[0166] 为了产生包含重链和轻链两者的抗体,可用两种载体转染细胞系,第一载体编码轻链多肽,第二载体编码重链多肽。或者,可使用单个载体,所述载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0167] 根据本发明的抗体可通过如下方法产生:(i)在宿主细胞中例如通过使用根据本发明的载体表达根据本发明的核酸序列,和(ii)分离表达的抗体产物。此外,方法可包括(iii)纯化经分离的抗体。可筛选转化的B细胞和培养的浆细胞以获得产生所需特异性或功能抗体的细胞。

[0168] 筛选步骤可通过任何免疫测定法例如ELISA,通过组织或细胞染色(包括转染细

胞),通过中和测定法或通过本领域已知用于鉴定所需特异性或功能的许多其他方法之一进行。测定可基于对一种或多种抗原的简单识别进行选择,或者可基于所需功能进行选择,例如选择中和抗体而不仅仅是抗原结合抗体,选择可改变靶细胞的特征的抗体,所述特征例如它们的信号级联、它们的形状、它们的生长速率、它们影响其他细胞的能力、它们对其他细胞或其他试剂或条件变化的影响的反应、它们的分化状态等。

[0169] 然后可从阳性转化的B细胞培养物中产生单个转化的B细胞克隆。用于从阳性细胞混合物中分离单个克隆的克隆步骤可使用有限稀释、显微操纵、通过细胞分选的单细胞沉积或本领域已知的另一种方法进行。

[0170] 可使用本领域已知的方法在HEK293T细胞或其他已知宿主细胞中分离、克隆和表达来自培养的浆细胞的核酸。

[0171] 本发明的永生化B细胞克隆或转染的宿主细胞可以多种方式使用,例如,作为单克隆抗体的来源,作为编码感兴趣的单克隆抗体的核酸(DNA或mRNA)的来源,用于研究等。

[0172] 本发明还提供了包含产生根据本发明的抗体的永生化记忆B细胞或转染宿主细胞的组合物。

[0173] 本发明的永生化B细胞克隆或培养的浆细胞也可用于随后重组表达的克隆抗体基因的核酸来源。出于药学目的,例如由于稳定性、可重复性、培养容易性等原因,重组来源的表达可比B细胞或杂交瘤的表达更常见。

[0174] 因此,本发明还提供制备重组细胞的方法,其包括以下步骤:(i)从编码感兴趣抗体的B细胞克隆或培养的浆细胞中获得一种或多种核酸(例如,重链和/或轻链mRNA);(ii)将核酸插入表达载体;和(iii)将载体转染到(异源)宿主细胞中以便允许感兴趣的抗体在此宿主细胞中表达。

[0175] 类似地,本发明还提供制备重组细胞的方法,其包括以下步骤:(i)对来自编码感兴趣抗体的B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸进行测序;和(ii)使用来自步骤(i)的序列信息来制备用于插入宿主细胞的核酸,以便允许感兴趣的抗体在此宿主细胞中表达。核酸可以,但不必需在步骤(i)和(ii)之间进行操纵以引入限制性位点、改变密码子使用和/或优化转录和/或翻译调控序列。

[0176] 此外,本发明还提供转染的宿主细胞的制备方法,其包括以下步骤:用一种或多种编码感兴趣抗体的核酸转染宿主细胞,其中核酸是源自本发明的永生化抗体B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸。因此,首先制备核酸然后使用其转染宿主细胞的步骤可由不同地方(例如,不同国家)的不同人在不同时间进行。

[0177] 然后可将本发明的这些重组细胞用于表达和培养目的。它们特别适用于大规模药物生产的抗体表达。它们也可用作药物组合物的活性成分。可使用任何合适的培养技术,包括但不限于静态培养、滚瓶培养、腹水液、中空纤维型生物反应器柱、模块化微型发酵罐、搅拌罐、微载体培养、陶瓷型芯灌注等。

[0178] 从B细胞或浆细胞获得和测序免疫球蛋白基因的方法是本领域众所周知的(例如,参见Chapter 4 of Kuby Immunology, 4th edition, 2000)。

[0179] 转染的宿主细胞可以是真核细胞,包括酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(例如,CHO细胞、NS0细胞、人细胞如PER.C6或HKB-11细胞、骨髓瘤细胞或人肝细胞),以及植物细胞。在一些实施方案中,转染的宿主细胞是哺乳动物细胞,例如人类细胞。在一些实施方

案中,表达宿主可对本发明的抗体进行糖基化,特别是对自身不具有人类免疫原性的碳水化合物结构。在一些实施方案中,转染的宿主细胞可以能够在无血清培养基中生长。在进一步的实施方案中,转染的宿主细胞可以能够在不存在动物衍生产物的条件下在培养物中生长。也可以培养转染的宿主细胞以产生细胞系。

[0180] 本发明还提供制备一个或多个于一个编码感兴趣抗体的核酸分子(例如重链和轻链基因)的方法,其包括以下步骤:(i)根据本发明制备永生化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得编码目标抗体的核酸。此外,本发明提供获得编码感兴趣抗体的核酸序列的方法,其包括以下步骤:(i)根据本发明制备永生化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)对来自编码感兴趣抗体的B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸进行测序。

[0181] 本发明还提供了制备编码感兴趣抗体的核酸分子的方法,包括获得从本发明的转化的B细胞克隆或培养的浆细胞获得的核酸的步骤。因此,首先获得B细胞克隆或培养的浆细胞,然后从B细胞克隆或培养的浆细胞中获得核酸的步骤可由不同地方(例如,不同国家)的不同人进行。

[0182] 本发明还包括制备根据本发明的抗体(例如,用于药物用途)的方法,其包括以下步骤:(i)获得和/或测序来自表达感兴趣抗体的选定的B细胞克隆或培养的浆细胞的一个或多个于一个核酸(例如重链和轻链基因);(ii)将核酸插入表达载体或使用核酸序列制备表达载体;(iii)转染能够表达感兴趣抗体的宿主细胞;(iv)在表达感兴趣抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞;并且,任选地,(v)纯化感兴趣的抗体。

[0183] 本发明还提供制备感兴趣抗体的方法,其包括以下步骤:在表达感兴趣抗体的条件下,培养或传代培养转染的宿主细胞群,例如稳定转染的宿主细胞群,并且任选地纯化感兴趣的抗体,其中所述转染的宿主细胞群通过如下方法制备:(i)提供编码选定的感兴趣的抗体的核酸,其由如上所述制备的B细胞克隆或培养的浆细胞产生,(ii)将核酸插入表达载体,(iii)在可表达感兴趣抗体的宿主细胞中转染载体,和(iv)培养或传代培养包含插入的核酸的转染宿主细胞以产生感兴趣的抗体。因此,首先制备重组宿主细胞然后培养它以表达抗体的步骤可由不同地方(例如不同国家)的不同人在明显不同的时间进行。

[0184] 药物组合物

[0185] 本发明还提供了包含以下一种或多于一种的药物组合物:

[0186] (i) 本发明的抗体或其抗原结合片段;

[0187] (ii) 本发明的核酸或核酸的组合;

[0188] (iii) 本发明的载体或载体的组合;和/或

[0189] (iv) 表达根据本发明的抗体或包含根据本发明的载体的细胞,

[0190] 和任选的药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0191] 换言之,本发明还提供了包含根据本发明的抗体、根据本发明的核酸、根据本发明的载体和/或根据本发明的细胞的药物组合物。

[0192] 药物组合物可任选地还包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。尽管载体或赋形剂可以促进施用,但其本身不应诱导产生对接收组合物的个体有害的抗体。它也不应是有毒的。合适的载体可以是大的缓慢代谢的高分子,例如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性的病毒颗粒。在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂不是关于破伤风梭

菌和/或破伤风感染的活性成分。

[0193] 可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0194] 药物组合物中的药学上可接受的载体可以另外包含液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这种组合物中可以存在辅助物质,例如湿润剂或乳化剂或pH缓冲物质。这样的载体使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆液剂和混悬剂,以供对象摄取。

[0195] 本发明的药物组合物可以以各种形式制备。例如,可以将组合物制备成可注射剂、或液体溶液剂或混悬剂。也可以制备为适合于在注射之前在液体载体中溶解或悬浮的固体形式(例如,类似于Synagis™和Herceptin®的冻干组合物,用于使用含有防腐剂的无菌水复溶)。组合物可制备为用于局部施用,例如作为软膏剂、霜剂或散剂。组合物可制备为用于口服施用,例如作为片剂或胶囊剂、作为气雾剂、或作为糖浆剂(任选调味)。可以使用细粉或喷雾剂将组合物制备为用于肺部施用,例如作为吸入剂。组合物可制备为栓剂或阴道栓剂。可以将组合物制备为用于鼻部、耳部或眼部的施用,例如以滴剂的形式。组合物可以呈试剂盒形式,设计成使得组合的组合物在即将施用于对象之前被复溶。例如,冻干抗体可以以试剂盒形式与无菌水或无菌缓冲液一起提供。

[0196] 在一些实施方案中,组合物中的(唯一)活性成分是根据本发明的抗体。这样,它可能易于在胃肠道中降解。因此,如果要通过胃肠道的途径施用组合物,则该组合物可以包含保护抗体免于降解但当抗体已从胃肠道吸收后便释放的试剂。

[0197] 药学上可接受的载体的详细讨论可得自:Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472。

[0198] 本发明的药物组合物的pH通常为5.5至8.5,在一些实施方案中,其可以为6至8,例如约为7。可以通过使用缓冲液来维持pH。组合物可以是无菌的和/或无热原的。组合物可以是对人等渗的。在一些实施方案中,本发明的药物组合物在密封容器中供应。

[0199] 在本发明范围内的是以多种施用形式存在的组合物;形式包括但不限于适合于肠胃外施用的那些形式,例如通过注射或输注,例如通过推注或连续输注。当产品用于注射或输注时,它可以呈现为油性或水性介质中的混悬剂、溶液剂或乳剂形式,并且可以包含配制剂,例如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可以是干燥形式,以便在与适当的无菌液体一起使用之前进行复溶。

[0200] 通常将载体理解为适合于存储、运输和/或施用化合物的材料,例如药物活性化合物,特别是根据本发明的抗体的材料。例如,载体可以是生理上可接受的液体,其适合于存储、运输和/或施用药物活性化合物,特别是根据本发明的抗体。一旦配制完成,就可以将本发明的组合物直接施用于对象。在一些实施方案中,该组合物适合于施用于哺乳动物例如人类对象。

[0201] 本发明的药物组合物可以通过任何数量的途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。在一些实施方案中,药物组合物可以施用于中枢神经系统。因此,例如其可以通过鞘内、脑室、脑内、硬脑膜外、经鼻、鼻内或脊柱周围施用途施用。无痛皮下喷射器也可用于施用本发明的药物组合物。任选地,可以将药物组合物制备为用于口服施用例如作

为片剂、胶囊剂等,制备为用于局部施用,或作为注射剂例如作为液体溶液剂或混悬剂。在一些实施方案中,药物组合物是可注射的。还包括适合于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介物中的固体形式,例如药物组合物可以为冻干形式。

[0202] 对于注射例如静脉内、皮肤或皮下注射、或在患病部位注射,活性成分可以为肠胃外可接受的水溶液形式,其不含热原且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗载体例如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸林格注射液来制备合适的溶液。如果需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。无论是抗体、肽、核酸分子或要给予个体的根据本发明的另一种药学上有用的化合物,施用通常以“有效量”施用,例如以“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定)施用,这足以使个人受益。实际施用的量、施用的速率和时间进程将取决于所治疗药物的性质和严重程度。对于注射,可以例如在预填充的注射器中提供根据本发明的药物组合物。

[0203] 如上定义的本发明药物组合物也可以以任何口服可接受的剂型口服施用,包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液剂。对于口服片剂,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要口服水性混悬剂时,将活性成分,即如上定义的本发明的转运货物缀合分子,与乳化剂和助悬剂混合。如果需要,还可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0204] 本发明的药物组合物也可以局部施用,特别是当治疗目标包括通过局部施用容易接近的区域或器官,例如包括可接近的上皮组织。针对这些区域或器官中的每一个容易制备合适的局部制剂。对于局部施用,可以将本发明的药物组合物配制成合适的软膏剂,该软膏剂包含本发明的药物组合物,特别地,其如上定义的组分悬浮或溶解在一种或多种载体中。局部施用的载体包括但不限于矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。替代地,可以将本发明的药物组合物配制成合适的洗剂或霜剂。在本发明的上下文中,合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、合成鲸蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二醇、苧醇和水。

[0205] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。特别地,药物组合物可以以单剂量产品的形式提供。在一些实施方案中,药物组合物中的抗体的量(特别是如果以单剂量产品形式提供)不超过200mg,例如不超过100mg或50mg。

[0206] 对于单剂量,例如每日、每周或每月剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量不可超过1g或500mg。在一些实施方案中,对于单剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量不可超过200mg或100mg。例如,对于单剂量,根据本发明的药物组合物中抗体的量不可超过50mg。

[0207] 药物组合物通常包含“有效”量的本发明的一种或多种抗体,即足以治疗、改善、减弱、减轻或预防所需疾病或病症或表现出可检测的治疗作用的量。治疗效果还包括减少或减轻致病效力或身体症状。对于任何特定对象的确切有效量将取决于他们的大小、体重和健康状况、疾病的性质和程度以及选择施用的治疗方法或治疗方法的组合。对于给定情况的有效量通过常规实验确定,并且在临床医生的判断之内。出于本发明的目的,有效剂量通常可为约0.005mg/kg至约100mg/kg,例如约0.0075mg/kg至约50mg/kg或约0.01mg/kg至约10mg/kg。在一些实施方案中,本发明的抗体的有效剂量(例如,药物组合物中抗体的量)将为约0.02mg/kg至约5mg/kg,相对于待给药个体的体重(例如,按kg计)。

[0208] 此外,根据本发明的药物组合物还可以包含附加活性成分,其可以是其他抗体或不是抗体的成分。因此,根据本发明的药物组合物可以包含一种或多种附加活性成分。在一些实施方案中,药物组合物包含两个不同的抗体或抗原结合片段,特别是两个与破伤风毒素(特异性)结合的不同的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,两个不同的抗体或其抗原结合片段中的每个是根据如上所述的本发明的抗体。

[0209] 根据本发明的抗体可以存在于与附加活性成分(例如,如上所述的第二抗体)相同的药物组合物中,或者,根据本发明的抗体包含在第一药物组合物中并且附加活性成分包含在不同于第一药物组合物的第二药物组合物中。因此,如果设想了多于一种附加活性成分,则根据本发明的每种附加活性成分(例如,上述的第二抗体)和抗体可以包含于不同的药物组合物。可以将这些不同的药物组合物组合/同时地或在分开的时间或在分开的位置(例如身体的分开的部分)施用。

[0210] 因此,本发明还提供了两个不同的抗体或其抗原结合片段的组合,其中两个不同的抗体或其抗原结合片段中的每个都是根据如上所述的本发明的抗体,优选地,用于如下文更详细描述的药物中。

[0211] 此外,本发明还提供了包含两种不同抗体或其抗原结合片段的多部分试剂盒,其中两种不同抗体或其抗原结合片段中的每种都是如上所述的本发明的抗体。在多部分试剂盒中,两种不同的抗体可以在不同的容器中提供(例如,在不同的药物组合物中)。

[0212] 特别地,对于上述药物组合物、组合和多部分试剂盒,本发明的两种不同的抗体或其抗原结合片段中的第一抗体或其抗原结合片段可以包含根据SEQ ID NO:1的重链CDR1序列、根据SEQ ID NO:2的重链CDR2序列、根据SEQ ID NO:3的重链CDR3序列、根据SEQ ID NO:4的轻链CDR1序列、根据SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的轻链CDR2序列和根据SEQ ID NO:7的轻链CDR3序列;并且第二抗体或其抗原结合片段可以包含根据SEQ ID NO:12的重链CDR1序列、根据SEQ ID NO:13的重链CDR2序列、根据SEQ ID NO:14的重链CDR3序列、根据SEQ ID NO:15的轻链CDR1序列、根据SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的轻链CDR2序列和根据SEQ ID NO:18的轻链CDR3序列。

[0213] 在一些实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段可以包含根据SEQ ID NO:8的VH序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性;和根据SEQ ID NO:10的VL序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。因此,如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。第二抗体或其抗原结合片段然后可以包含根据SEQ ID NO:19的VH序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性;和根据SEQ ID NO:20的VL序列,或其序列变体(包括,例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多于10个突变),该序列变体具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。因此,

如上定义的CDR序列(分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列)可以被保留。

[0214] 根据本发明的抗体和附加活性成分(例如,上述的第二抗体)可以提供附加治疗效果,如协同治疗效果。术语“协同”用于描述两种或多于两种活性剂的联合效果,其大于每种相应活性剂的各个效果之和。因此,在两种或多于两种试剂的联合效果导致对活性或过程的“协同抑制”的情况下,该活性或过程的抑制大于每种各自活性剂的抑制效果的总和。术语“协同治疗效果”是指用两种或多于两种治疗方法的组合观察到的治疗效果,其中治疗效果(如许多参数中的任何一个所测量的)大于用相应的单独治疗方法观察到的单独治疗效果的总和。

[0215] 在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物可以不包含附加活性成分(除了如上所述的本发明的抗体或相应的核酸、载体或细胞之外)。

[0216] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以包含本发明的抗体,其中所述抗体可以占组合物中总蛋白的至少50重量%(例如60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%或高于99重量%)。在这样的组合物中,抗体优选为纯化形式。

[0217] 本发明还提供了制备药物组合物的方法,该方法包括以下步骤:(i)制备本发明的抗体;和(ii)将纯化的抗体与一种或多于一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体混合。

[0218] 在其他实施方案中,制备药物组合物的方法包括以下步骤:将抗体与一种或多于一种药学上可接受的载体混合,其中该抗体是获自本发明的转化的B细胞或培养的浆细胞的单克隆抗体。

[0219] 作为用于治疗目的递送抗体或B细胞的替代,可以将编码衍生自B细胞或培养的浆细胞的目的单克隆抗体的核酸(通常为DNA)递送给对象从而使核酸可以在对象中原位表达以提供所需的治疗效果。合适的基因疗法和核酸递送载体是本领域已知的。

[0220] 药物组合物可以包含抗微生物剂,特别是以多剂量形式包装时。它们可以包含洗涤剂,例如Tween(聚山梨醇酯),例如Tween 80。表面活性剂通常以低水平存在,例如小于0.01%。组合物还可包含钠盐(例如氯化钠)以产生张力。例如,典型的NaCl浓度为 $10 \pm 2\text{mg/ml}$ 。

[0221] 此外,药物组合物可以包含例如约 15mg/ml 至 30mg/ml (例如 25mg/ml)的糖醇(例如甘露醇)或二糖(例如蔗糖或海藻糖),特别是药物组合物要经冻干或者药物组合物包括从冻干材料复溶的材料时。冻干前,可将用于冻干的组合物的pH调节至5至8、或5.5至7、或约6.1。

[0222] 本发明的组合物还可包含一种或多于一种免疫调节剂。在一些实施方案中,一种或多于一种免疫调节剂包括佐剂。

[0223] 医学治疗和其他用途

[0224] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子(或核酸分子的组合)、根据本发明的载体(或载体的组合)、根据本发明的细胞、根据本发明的药物组合物、根据本发明的组合或根据本发明的多部分试剂盒作为药物的用途。特别地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子(或核酸分子的

组合)、根据本发明的载体(或载体的组合)、根据本发明的细胞、根据本发明的药物组合物、根据本发明的组合或根据本发明的多部分试剂盒可用于预防和/或治疗破伤风梭菌或破伤风感染。

[0225] 因此,本发明还提供了改善或减轻破伤风梭菌或破伤风感染或降低破伤风梭菌或破伤风感染风险的方法,包括:向有此需要的对象施用治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子(或核酸分子的组合)、根据本发明的载体(或载体的组合)、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物。此外,本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸分子(或核酸分子的组合)、根据本发明的载体(或载体的组合)、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在制备用于预防、治疗或减轻破伤风梭菌或破伤风感染的药物中的用途。

[0226] 破伤风梭菌或破伤风感染的预防特别指受试者未被诊断为破伤风梭菌或破伤风感染(未进行诊断或诊断结果为阴性)和/或受试者未表现出破伤风梭菌或破伤风感染的症状的预防性设置。相反,在治疗环境中,对象通常被诊断为破伤风梭菌或破伤风感染和/或显示出破伤风梭菌或破伤风感染的症状。值得注意的是,术语破伤风梭菌或破伤风感染的“处理”和“疗法”/“治疗”包括(完全)治愈以及减缓/减轻破伤风梭菌或破伤风感染和/或相关症状。

[0227] 在一些实施方案中对象为人类。检查治疗效果的一种方式包括监测施用本发明的组合物后的疾病症状。治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。在一个实施方案中,根据本发明的抗体、抗体片段、核酸、载体、细胞或组合物被施用于需要这种治疗的对象。这类对象包括但不限于特别地处于感染破伤风梭菌或破伤风的风险或易感的对象,包括例如免疫功能低下的对象。

[0228] 本发明所述的抗体及其片段还可用于诊断破伤风梭菌或破伤风感染。诊断方法可以包括使抗体与样品接触。这种样品可以从对象中分离,例如从鼻腔、窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液如血浆或血清中提取的分离组织样品。例如,抗体或其抗原结合片段可以与(经分离的)血液样品(例如,全血、血浆或血清)接触。诊断方法还可以包括检测抗原/抗体复合物,特别是在抗体与样品接触之后。这种检测步骤通常在工作台上进行,即不与人体或动物体产生任何接触。检测方法的实例是本领域技术人员众所周知的,并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。因此,诊断可以在体外进行,例如通过使用如上所述的经分离的样品(以及抗原/抗体复合物的体外检测步骤)。因此,抗体或其抗原结合片段可用于(体外)诊断破伤风梭菌或破伤风感染。

[0229] 因此,本发明的抗体或其抗原结合片段可以用于检测抗原,即破伤风毒素的(体外)方法中。同样,本发明的抗体或其抗原结合片段可以用于结合破伤风毒素靶蛋白/抗原的(体外)方法中。为了检测破伤风毒素(抗原),可以使抗体与(经分离的)样品(即待测试抗原是否存在的样品)接触。通过抗体与其抗原(破伤风毒素)的特异性结合,形成抗体/抗原复合物,该复合物可以通过本领域已知的方法容易地检测。

[0230] 这种检测方法可用于(体外)诊断(使用从人体或动物体分离的样品),但也可用于测试其他(例如,生产/制造)样品,例如疫苗样品。因此,如本发明所述的抗体、抗体片段或其变体也可以用于非治疗/非诊断背景,例如用于疫苗开发或制造。因此,本发明还提供了

本发明的抗体或其抗原结合片段的用途,用于测试疫苗,特别是抗原(即,包含在疫苗中的所期抗原,如破伤风毒素)是否被正确地生成和/或折叠(和/或处于正确的构象)。因此,抗体可用于监测具有所期免疫原性的疫苗制造。为此,可以使抗体与疫苗接触,例如如上所述。此外,本发明还包括本发明的抗体或其抗原结合片段,通过检查疫苗是否含有所期抗原,例如破伤风毒素或其片段或变体,来监控抗破伤风疫苗的质量的用途。更具体地,该抗体可用于检查疫苗中抗原或其表位的构象。抗原(破伤风毒素)的修饰形式,如可用于疫苗中的破伤风毒素的片段和变体,也可以用本发明的抗体进行测试。

附图说明

[0231] 下面将给出附图的简要说明。这些图旨在更详细地说明本发明。然而,它们不打算以任何方式限制本发明的主题。

[0232] 图1显示了实施例1中从接种破伤风类毒素(TT)的供体分离的单克隆抗体与TT的结合特性。

实施例

[0233] 在下文中,呈现了说明本发明的各种实施方案和各方面的特定实施例。然而,本发明的范围不应受这里描述的特定实施方案的限制。为了使本领域的技术人员更清楚地理解 and 实践本发明,给出了以下准备工作和实施例。然而,本发明的范围不受示例性实施方式的限制,这些示例性实施方式仅意图作为本发明的单个方面的说明,并且功能上等效的方法也在本发明的范围内。实际上,除了这里描述的那些之外,本领域技术人员从前述说明、附图和下面的实施例中可以很容易地看出本发明的各种修改。所有这些修改都落入所附权利要求的范围内。

[0234] 实施例1:人源单克隆抗体TT104和TT110的鉴定与表征

[0235] 外周血样本是从接受过破伤风类毒素(TT)常规疫苗接种的供体中采集的。通过使用抗CD19-PECy7抗体和小鼠抗PE微珠的磁性细胞分选,然后使用Alexa Fluor 647缀合的山羊抗人IgG、Alexa Fluor 647缀合的山羊抗人IgM和PE标记的抗人IgD进行FACS分选,来分离记忆B细胞。分选的IgG记忆B细胞用Epstein-Barr病毒(EBV)永生,并在存在CpG-DNA和经辐射的PBMC饲养细胞的情况下接种于单细胞培养物中(如Traggiai E.等人,2004,Nat Med 10(8):871-5和WO2004/076677所述)。

[0236] 永生化后两周,通过ELISA检测培养物上清液与TT的结合。简言之,用1 μ g/ml重组TT包被ELISA板。用1% BSA封闭板,用滴定的抗体孵育,然后用1/500碱性磷酸酶(AP)缀合的山羊抗人IgG孵育。然后清洗板,加入底物(对硝基苯磷酸酯(p-NPP),Sigma),在405nm处读板。

[0237] 结果如图1和表3所示。这些数据表明,鉴定了几种产生TT特异性单克隆抗体的永生B细胞克隆;对10个TT特异性单克隆抗体的抗体V基因进行了测序,并使用IMGT数据库进行了分析(IMGT:<http://www.imgt.org/>;cf.Lefranc,M.-P.等人(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)。

[0238] 表3.从TT疫苗接种供体分离的TT特异性单克隆抗体的EC50值(稀释因子,DF)和VDJ基因(重链)和VJ基因(轻链)的使用。

[0239]

mAbs (组1)	EC50 (DF)	重链VDJ基因			轻链VJ基因	
TT101	1.03E+00	NA			NA	
TT102	6.40E+01	VH3-48*02	JH4*02	D5-18*01	VK1-33*01	JK2*01
TT103	1.06E+00	VH3-23*04	JH3*01	D3-10*01	VK3-20*01	JK1*01
TT107	7.86E+15	VH3-11*06	JH4*02	D2-15*01	VK3-20*01	JK1*01
TT108	3.11E-01	NA			NA	
TT109	6.80E+02	VH3-30*03	JH5*01	D5-18*01	VK2-30*01	JK1*01
TT110	8.41E+19	VH1-46*02	JH4*02	D5-18*01	VK3-15*01	JK1*01
TT111	6.66E+03	NA			NA	
TT114	4.11E+17	VH4-34*01	JH5*02	D3-10*01	VK1-27*01	JK4*01
TT115	7.20E-01	NA			NA	

[0240]

mAbs (组2)	EC50 (DF)					
TT2	3.06E+01	NA			NA	
TT4	2.37E-01	NA			NA	
TT9	1.79E+01	NA			NA	
TT13	1.06E+00	VH3-30-3*01	JH2*01	D2-15*01	VL9-49*03	JL3*02
TT16	2.34E-01	NA			NA	
TT33	5.43E-01	VH3-15*01	JH4*02	D1-26*01	VL2-23*01	JL1*01
TT39	7.25E+14	VH2-5*02	JH4*02	D6-19*01	VL2-14*01	JL2*01
TT104	7.72E+10	VH4-39*03	JH5*02	D1-1*01	VK3-15*01	JK2*01

[0241] NA,无法获得

[0242] 在结合亲和力最高的抗体中,选择了TT110和TT104,并制备了这些抗体的FAB。

[0243] 序列和序列号表(序列列表):

[0244]

SEQ ID NO	序列	备注
氨基酸序列		
TT104		
SEQ ID NO: 1	DDSMGSSTYY	CDRH1
SEQ ID NO: 2	VYYNGVT	CDRH2
SEQ ID NO: 3	ARQADNWFD	CDRH3
SEQ ID NO: 4	QSVGSD	CDRL1
SEQ ID NO: 5	GAS	CDRL2
SEQ ID NO: 6	LIYGASYRA	CDRL2 长
SEQ ID NO: 7	QQYYNWPPYT	CDRL3
SEQ ID NO: 8	QLQLQESGPGGLVRPSETLSLTCSVSDDSMGSSTY YAWIRQPPGKGLEWIGNVYNGVTYYNSSLE SRLTSLIDPSKNQFSLILSSVTAADTAVYYCARQA DNWFDPWGQGTLTVSS	VH
SEQ ID NO: 9	EIMMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSDLA WYQQKPGQAPRLLIYGASYRATGIPARFSGGGS GTEFTLTISSMQSEDAVYYCQQYYNWPPYTFG QGTKVEIK	VL
SEQ ID NO: 10	QLQLQESGPGGLVRPSETLSLTCSVSDDSMGSSTY YAWIRQPPGKGLEWIGNVYNGVTYYNSSLE SRLTSLIDPSKNQFSLILSSVTAADTAVYYCARQA DNWFDPWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSC	Fab 重链
SEQ ID NO: 11	EIMMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSDLA WYQQKPGQAPRLLIYGASYRATGIPARFSGGGS GTEFTLTISSMQSEDAVYYCQQYYNWPPYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Fab 轻链
TT110		
SEQ ID NO: 12	GFTLNYY	CDRH1
SEQ ID NO: 13	FNPSSGTR	CDRH2
SEQ ID NO: 14	ARIGGSTYGRMTYYFDH	CDRH3
SEQ ID NO: 15	RSISTT	CDRL1
SEQ ID NO: 16	GAS	CDRL2
SEQ ID NO: 17	LIYGASTRA	CDRL2 长
SEQ ID NO: 18	QQYNDWPVT	CDRL3

[0245]

SEQ ID NO: 19	QVQLMQSGAEVQKPGASVKVSCQASGFTLNN YYIHWLRQAPGQGFEWMGIFNPSSGTRTYAQK FQGRISMTADASTTLYMELSGLTSEDAGVYFCA RIGGSTYGRMLTYFDHWGQGTVVAVSS	VH
SEQ ID NO: 20	EVVLTQSPVTLSPGGRGTLSCRASRSISTTLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFTGSGSGT EFTLTISLQSEDAVYYCQQYNDWPVTFGQGT QVEVK	VL
SEQ ID NO: 21	QVQLMQSGAEVQKPGASVKVSCQASGFTLNN YYIHWLRQAPGQGFEWMGIFNPSSGTRTYAQK FQGRISMTADASTTLYMELSGLTSEDAGVYFCA RIGGSTYGRMLTYFDHWGQGTVVAVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	Fab 重链
SEQ ID NO: 22	EVVLTQSPVTLSPGGRGTLSCRASRSISTTLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFTGSGSGT EFTLTISLQSEDAVYYCQQYNDWPVTFGQGT QVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	Fab 轻链
恒定区		
SEQ ID NO: 23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSPGK	IgG 重链
SEQ ID NO: 24	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRYSYCQVTHEGSTVEKTV PTECS	IgG λ轻链
SEQ ID NO: 25	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	IgG κ轻链
SEQ ID NO: 26	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC	Fab 重链

[0246]

核酸序列		
TT104		
SEQ ID NO: 27	gatgactccatgggcagcagtactactac	CDRH1
SEQ ID NO: 28	gtctattataatggagtcacc	CDRH2
SEQ ID NO: 29	gcgagacaagcagacaactggttcgacccc	CDRH3
SEQ ID NO: 30	cagagtgttggcagcgac	CDRL1
SEQ ID NO: 31	ggagcatcc	CDRL2
SEQ ID NO: 32	ctcatctatggagcatcctacagggcc	CDRL2 长
SEQ ID NO: 33	cagcagtattacaactggccccgtacact	CDRL3
SEQ ID NO: 34	cagctgcagctgcaggagtcgggccaggactggtgaggccctcg gagaccctgtcctcacctgcagtgtctctgatgactccatgggcag cagtacttactactgggcctggatccgccagccccagggaaggg actggagtggattgggaatgtctattataatggagtcacctactaca ctcgtccctcgagagtcgactcacctatccatcgaccgtctaaga accagtttccctgatcttgagttctgtgaccgccgagacacggcc gtatattactgtgcgagacaagcagacaactggttcgaccctggg gccagggaaccctggtcaccgtctcgtca	VH
SEQ ID NO: 35	gaaataatgatgacgcagctctccagccaccctgtctgtctccagg ggaaagagccaccctctctgcaggccagtcagagtgttggcag cgacttggcttggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggct cctcatctatggagcatcctacagggccactggtatccagccagg ttcagtggcgggtgggtctgggacagagttcactctaccatcagcag tatgcagctgaagatttgcagtttattactgtcagcagattacaact ggccccgtacacttttggccaggggaccaaggtggagatcaaa	VL
SEQ ID NO: 36	cagctgcagctgcaggagctggaccaggactggtgcggccctcc gagaccctgtctctgacatgctctgtgagcgacgattctatgggcag ctccacctactattgggcctggatcagacagccccctggcaaggg actggagtggatcggaacgtgtactataatggcgtgacctactata actctagcctggagtctaggctgacactgagcatcgacccttcaa gaatcagttcagcctgatcctgtcctctgtgaccgccgatacag ccgtgtactattgtgccggcaggccgacaactggttgatccttggg gacagggcaccttgggtgacagtgaagtcgcgtcgaccaagggc ccatcggttctcccctggcacctctccaagagcaccttggggg gcacagcggccctgggctgctggtcaaggactacttcccgaac ctgtgacggctctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgc acaccttcccggctgtcctacagtctcaggacttactccctcagc agcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac atctgaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaa gagagttgagccaaatctgttag	Fab 重链

[0247]

SEQ ID NO: 37	gaaataatgatgacgcagctctccagccaccctgtctgtgtctccagg ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtggcag cgacttggcttggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggct cctcatctatggagcatcctacagggccactggtatcccagccagg ttcagtgccggtgggtctgggacagagttcactctcaccatcagcag tatgcagctgaagatttgcagtttattactgtcagcagattacaact ggccccgtacacttttggccaggggaccaaggtggagatcaaac gtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagc agttgaaatctggaaactgcctctgtgtgtgctgtgtaataacttctat cccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctcca atcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaagg acagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagca gactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcag ggcctgagctcgcctgcacaaagagctcaacaggggagagtgt tag	Fab 轻链
IT110		
SEQ ID NO: 38	ggattcacctcaacaattactat	CDRH1
SEQ ID NO: 39	ttcaaccctagtagtgggaccaga	CDRH2
SEQ ID NO: 40	gcgagaattggaggctccacttatggccgactaatgacctactactt gatcat	CDRH3
SEQ ID NO: 41	cggagtattagcaccacc	CDRL1
SEQ ID NO: 42	ggtgcttc	CDRL2
SEQ ID NO: 43	ctcatttatggtgcttcaccagggcc	CDRL2 长
SEQ ID NO: 44	cagcagtataatgactggcccgtagc	CDRL3
SEQ ID NO: 45	cagggtcagctaatgcagctctgggctgaggtgcagaagcctggg cctcagtgaaagtgtcctgccaggcatctggattcacctcaacaat tactatattcactggctacgacaggccctggacaagggtttgagt gatgggaattttcaaccctagtagtgggaccagaacttacgcgcag aagttccagggcagaatcagtatgaccgccgacgcgtcaacgacg acactctacatggagctgagcggcctgacttcggaagacgcgggc gtatattctgtgcgagaattggaggctccacttatggccgactaatg acctactactttgatcattggggccagggaacgggtggtcgcgtctc ctca	VH
SEQ ID NO: 46	gaggtagtgttacacagctctccggtcaccctgtctgtgtctccagg gggagaggcaccctctcctgcagggccagtcggagtattagcacc accttagcctggtagcagcagaacctggccaggctcccaggctc ctcatttatggtgcttcaccagggccactggtatcccagccaggttc actggcagtggtctgggacagagttcacgctcaccatcagcagc ctacagctgaagatttcgagtttattattgtcagcagtataatgactg gcccgtgacgttcggccaggggaccagggtggaagtcaag	VL

[0248]

SEQ ID NO: 47	cagggtcagctaatacagctctggggctgaggtgcagaagcctgggg cctcagtgaagtgctcctgccaggcatctggattcaccctcaacaat tactatattcactggctacgacaggcccctggacaagggtttgagtg gatgggaatttcaaccctagtagtgggaccagaacttacgcgcag aagttccagggcagaatcagatgaccgccgacgcgtcaacgacg acactctacatggagctgagcggcctgacttcggaagacgcgggc gtatattctgtgcgagaattggaggctccacttatggccgactaatg acctactactttgatcattggggccagggaacgggtggtcgcgtctc ctcagcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctc ctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggt caaggactactccccgaacctgtgacgggtctcgtggaaactaggc gccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagtcct caggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagca gcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccca gcaacaccaagggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtag	Fab 重链
SEQ ID NO: 48	gaggtagtggtgacacagctctccggtcacctgtctgtctccaggg gggagaggcaccctctcctgcagggccagtcggagtattagcacc accttagcctggtagcagcagaaacctggccaggctcccaggctc ctcatttatgggtcttccaccagggccactggatcccagccagggtc actggcagtggtctgggacagagttcacgctcaccatcagcagc ctacagtctgaagatttcgagttattattgtcagcagtataatgactg gcccgtgacgttcggccaggggaccagggtggaagtcaagcgtac gggtggctgcacatctgtcttcatcttccgccatctgatgagcagtt gaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatccc agagaggccaaagtacagtgggaagggtgataacgccctccaatcg ggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacag cacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagact acgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggggc ctgagctcggccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag	Fab 轻链

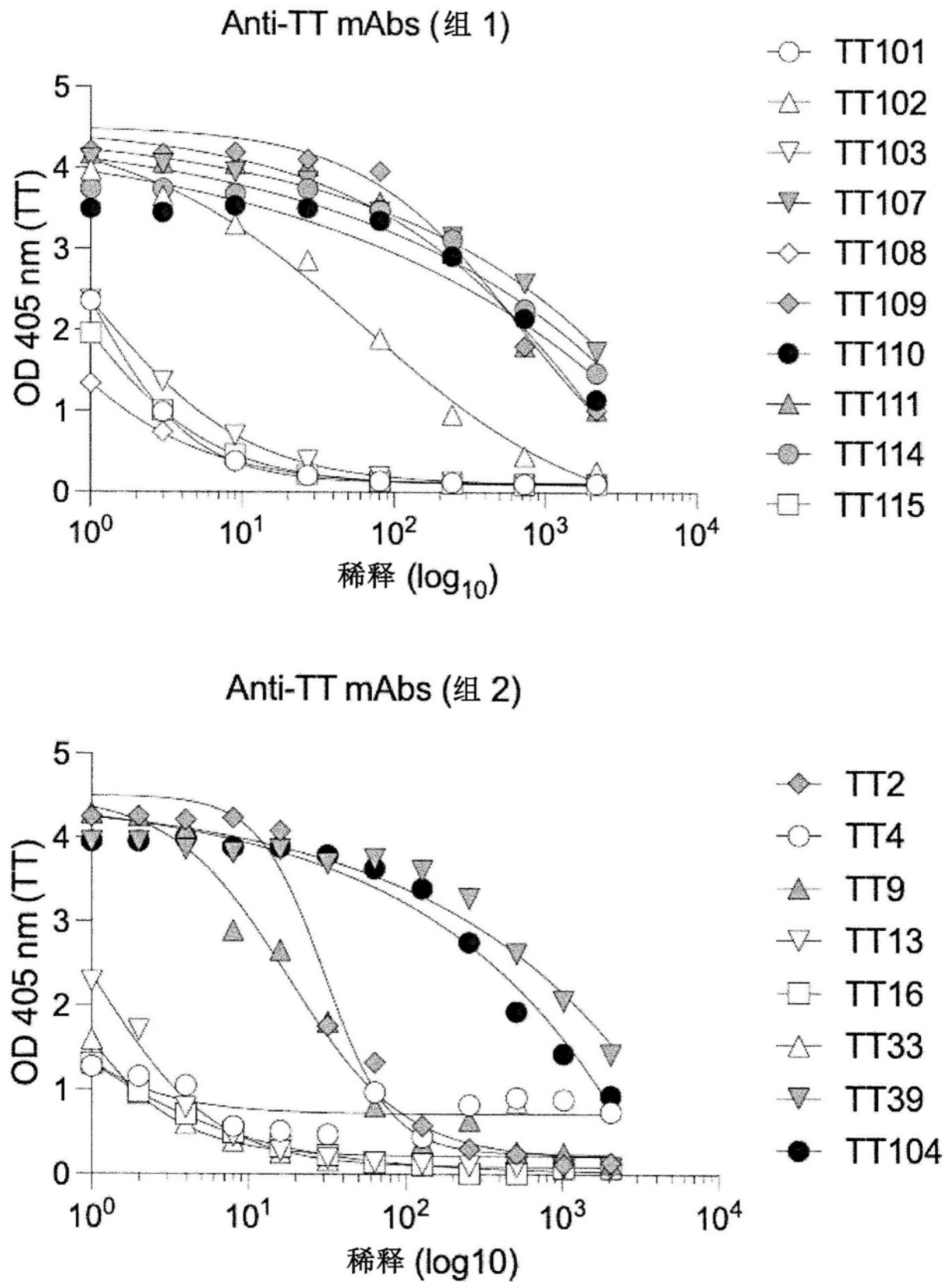


图1