



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118085055 A

(43) 申请公布日 2024.05.28

(21) 申请号 202410217782.8

(22) 申请日 2018.04.19

(30) 优先权数据

62/487,266 2017.04.19 US

(62) 分案原申请数据

201880035012.4 2018.04.19

(71) 申请人 生物医学研究所

地址 瑞士贝林佐纳

申请人 西雅图儿童医院(经营名称:西雅图
儿童研究中心)

瑞士托本公共卫生研究所

(72) 发明人 A·兰扎韦基亚 J·H·Y·谭

C·达本伯格 B·萨克

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 颜芳

(51) Int.Cl.

C07K 14/445 (2006.01)

C07K 5/113 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书93页

序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

作为疫苗及新疟疾疫苗和抗体结合靶标的
疟原虫子孢子NPDP肽

(57) 摘要

本发明涉及作为疫苗及新疟疾疫苗和抗体结合靶标的疟原虫子孢子NPDP肽。本发明提供了例如用于疟疾疫苗的根据SEQ ID NO:1的疟原虫环子孢子蛋白的片段。本发明还提供了编码根据SEQ ID NO:1的疟原虫环子孢子蛋白的片段的核酸、包含根据SEQ ID NO:1的疟原虫环子孢子蛋白的片段的组合物和结合根据SEQ ID NO:1的疟原虫环子孢子蛋白的片段的抗体。根据本发明的抗体特异性结合恶性疟原虫子孢子并且可用于治疗和/或预防疟疾。

1. 肽,其包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NOs:2-5中任一项的氨基酸序列,优选所述肽包含根据SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的肽,其中所述肽包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NOs:6-22中任一项的氨基酸序列。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO.23共有至少72%,优选至少77%,更优选至少83%,甚至更优选至少88%,最优选至少94%的序列同一性的氨基酸序列。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽与疟原虫(Plasmodium)环子孢子蛋白的片段共有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%,甚至更优选至少95%,最优选至少98%的序列同一性,或者其中所述肽由疟原虫环子孢子蛋白的片段组成。
6. 根据权利要求5所述的肽,其中所述疟原虫环子孢子蛋白的片段具有至少8或10个氨基酸,优选至少15个氨基酸,优选至少20个氨基酸,更优选至少25个氨基酸,更优选至少30个氨基酸,更优选至少40个氨基酸,甚至更优选至少50个氨基酸,甚至更优选至少75个氨基酸,甚至更优选至少100个氨基酸,仍更优选至少150个氨基酸,仍更优选至少200个氨基酸,最优选至少300个氨基酸长度。
7. 根据权利要求5或6所述的肽,其中所述疟原虫环子孢子蛋白的片段是SEQ ID NO:24的片段。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽具有不超过380个氨基酸,优选不超过350个氨基酸,优选不超过320个氨基酸,更优选不超过300个氨基酸,更优选不超过275个氨基酸,更优选不超过250个氨基酸,甚至更优选不超过225个氨基酸,甚至更优选不超过200个氨基酸,甚至更优选不超过200个氨基酸,甚至更优选不超过175个氨基酸,仍更优选不超过150个氨基酸,仍更优选不超过125个氨基酸,仍更优选不超过100个氨基酸,特别优选不超过75个氨基酸,并且最优选不超过50个氨基酸长度。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽具有4至380个氨基酸长度,优选地所述肽具有5至350个氨基酸长度,优选地所述肽具有5至300个氨基酸长度,优选地所述肽具有5至250个氨基酸长度,更优选地所述肽具有5至200个氨基酸长度,更优选地所述肽具有5至150个氨基酸长度,更优选地所述肽具有5至100个氨基酸长度,甚至更优选地所述肽具有6至80个氨基酸长度,甚至更优选地所述肽具有7至70个氨基酸长度,甚至更优选地所述肽具有8至60个氨基酸长度,仍更优选地所述肽具有9至50个氨基酸长度,仍更优选地所述肽具有10至40个氨基酸长度,仍更优选地所述肽具有11至30个氨基酸长度,最优选地所述肽具有12至25个氨基酸长度。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽是重组肽。

作为疫苗及新疟疾疫苗和抗体结合靶标的疟原虫子孢子NPD P肽

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请日为2018年4月19日,申请号为201880035012.4,发明名称为“作为疫苗及新疟疾疫苗和抗体结合靶标的疟原虫子孢子NPD P肽”,其整体通过引用在此并入。

技术领域

[0002] 本发明涉及疟疾药物领域,具体涉及疟疾疫苗接种和结合疟原虫子孢子(具体是疟原虫环孢子蛋白)的抗体。

背景技术

[0003] 疟疾是由疟原虫属的寄生性原生动物引起的影响人和其它动物的蚊媒感染性疾病。疟原虫属包括约200个种,其中5个种常规感染人,而其它种感染鸟类、爬行动物、啮齿动物和各种灵长类动物。恶性疟原虫(*P. falciparum*)、间日疟原虫(*P. vivax*)、卵形疟原虫(*P. ovale*)和三日疟原虫(*P. malariae*)几乎一起导致了所有人疟原虫物种的感染,其中恶性疟原虫导致绝大多数的疟疾死亡。疟疾症状典型地包括发烧、感到疲倦、呕吐和头痛。在严重的情况下,其可引起皮肤发黄、癫痫发作、昏迷或死亡。

[0004] 疟疾最通常由感染的雌性按蚊传播。蚊子叮咬将来自蚊子唾液中的寄生虫引入人的血液中。即,在恶性疟原虫感染期间,雌性按蚊将少量的子孢子(~10-100)注入到皮肤中,然后子孢子进入肝脏以侵入肝细胞(Crompton等人(2014) *Annu Rev Immunol* 32,157-187)。在肝细胞中,子孢子无性繁殖(组织裂体增殖),生产数千个裂殖子。这些感染新的红细胞并启动生产8至24个新的感染性裂殖子的一系列无性繁殖周期(血裂体增殖),此时细胞破裂并重新开始感染周期。其它裂殖子发育成未成熟的配子母细胞,所述配子母细胞是雄配子和雌配子的前体。当受精的蚊子叮咬感染的人时,配子母细胞随血液吸收并在蚊子的肠中成熟。雄配子母细胞和雌配子母细胞融合并形成动合子——受精、活动的合子。动合子发育成迁移至昆虫的唾液腺的新子孢子,准备感染新的脊椎动物宿主。

[0005] 虽然子孢子与临床症状无关,但此时宿主内的寄生虫数量低并且其根除可完全消除感人。因此,恶性疟原虫寄生虫的子孢子和肝脏阶段是当前疟疾疫苗候选者的关键靶标,因为成功保护这些阶段的疫苗将能够预防疟疾感染和传播。因此,基于环孢子蛋白(CSP)的亚单位疫苗(如RTS,S)是疟疾疫苗效力的中心。

[0006] 疟原虫环孢子蛋白(CSP)是可利用大肠杆菌(*E. coli*)表达系统容易制备的近似42kD的可溶性蛋白。CSP是疟原虫子孢子阶段的分泌蛋白。CSP在寄生虫表面形成致密的被膜,并且已假设介导子孢子及其两个宿主之间的多种初始相互作用(Ménard R.,2000, *Microbes Infect.*2:633-642;Sinnis P.and Nardin E.,2002, *Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin related anonymous protein*.In *Malaria Immunology*.P.Perlmann and M.Troye-Blomberg,editors.S.Karger AG,Basel,Switzerland.70-96)。CSP的结构和功能在感染

人、非人灵长类动物和啮齿动物的各种疟疾菌株中高度保守。CSP的氨基酸序列包含免疫显性的中央重复区(immunodominant central repeat region),其在疟原虫物种之间是不同的(在恶性疟原虫的情况下为NANP重复区)。重复序列的侧面是N-和C-末端的两个保守基序,即区域I(重复序列的N末端的5-aa序列)和重复序列的C-末端的已知细胞粘附基序(称为I型血小板反应素重复序列(TSR))。这些保守基序在寄生虫从蚊子行进到哺乳动物载体时牵涉在蛋白质加工中。

[0007] 已知CSP在孢子从感染蚊子的中肠壁向蚊子的唾液腺的迁移中起至关重要的作用。另外,CSP参与哺乳动物宿主中肝细胞的结合,其中CSP的N-末端和中央重复区初始地促进寄生虫结合。在肝细胞表面,N-末端的区域1的溶蛋白性切割暴露了C-末端的粘附域(adhesive domain),进而引发寄生虫侵入肝脏(Coppi等人(2005) *J Exp Med* 201,27-33)。

[0008] 目前,领先的疟疾疫苗是RTS,S/AS01(商品名Mosquirix),其是重组蛋白系疟疾疫苗。RTS,S是杂化蛋白颗粒,配制成名为AS01的多组分佐剂。RTS,S疫苗抗原由19个NANP氨基酸重复单元组成,后接完整的C-末端结构域,减去CS抗原的GPI锚,融合成乙型肝炎病毒S蛋白。S蛋白对应于乙型肝炎病毒(HBsAg)的表面抗原。2015年7月获得欧洲监管机构(European regulators)的批准应用,其不仅是世界上第一个获得许可的疟疾疫苗,而且是第一个获得许可用于针对任何种类的寄生性疾病的疫苗。尽管RTS,S引起能够预防肝细胞侵入的抗体的生产,并另外引发使被感染的肝细胞破坏的细胞反应,但RTS,S由于其差的免疫原性而在试验中存在问题。RTS,S试图通过将蛋白质与来自乙型肝炎的表面抗原融合来避免这些,因此创造出更有效和免疫原性的疫苗。此外,RTS,S蛋白必须配制成有效的佐剂AS01——包含免疫刺激剂单磷脂酰脂质A(immunostimulants monophosphoryl lipid A)(MPL,toll样受体4激动剂)和QS-21(Quil A的衍生物)的脂质体系制剂。然而,RTS,S/AS01的疗效水平保持在预期以下。具体地,已知疫苗的保护作用在疫苗接种后迅速下降。加强剂量的效果是积极的,尽管总体疗效似乎随时间而消逝。四年后,接受三剂和加强剂量的儿童中降低36%。缺少加强剂量使针对严重疟疾的疗效降低至可忽略的效果。疫苗显示对婴儿较少有效。三剂疫苗加上加强剂在三年内将临床发作的风险降低26%,但没有提供针对严重疟疾的显著保护。

[0009] 此外,已使这种疫苗的开发复杂化的另一因素是难以鉴定保护的牢固相关性。抗体已在体外功能测试中显示抑制孢子侵入肝细胞,但尚不清楚其在保护接种疟疾疫苗的个体中的作用。

[0010] 因此,仍需要预防疟疾感染和传播的更有效的疟疾疫苗。此外,仍需要特异性抗体,具体是在体内有效抑制孢子侵入和肝脏阶段寄生虫繁殖的抗体。

发明内容

[0011] 鉴于以上,本发明的目的是克服目前的疟疾抗体和以上概述的疫苗的缺点。具体地,本发明的目的是提供疟疾疫苗,其例如由于其效力而优于现有技术的疟疾疫苗。此外,本发明的目的是提供抗体,其例如通过在体内有效抑制孢子侵入和肝脏阶段寄生虫繁殖而优于现有技术的疟疾抗体。

[0012] 此目的借助以下和所附权利要求中陈述的主题来实现。

[0013] 尽管下文详细描述了本发明,但应理解本发明不限于本文所述的具体方法、方案

和试剂,因为这些可以变化。还应理解,本文使用的术语不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外限定,本文使用的所有技术和科学术语均与本领域普通技术人员的通常理解具有相同的含义。

[0014] 在下文中,将描述本发明的要素。这些要素随具体实施方式一起列出,然而,应该理解,其可以任何方式和任何数量组合以生产另外的实施方式。不应将各种描述的实例和优选实施方式解释为将本发明仅限于明确描述的实施方式。这种描述应被理解为支持和包含将明确描述的实施方式与任何数量的公开和/或优选要素组合的实施方式。此外,除非上下文另有说明,本申请中的所有所述要素的任何排列和组合应该被认为已被本申请的描述公开。

[0015] 贯穿说明书和所附权利要求书,除非上下文另有要求,术语“包括”和诸如“含有”和“包含”的变型将被理解为暗示包括所述的成员、整数或步骤,但不排除任何其它未提及的成员、整数或步骤。术语“由……组成”是术语“包括”的特定实施方式,其中排除任何其它未提及的成员、整数或步骤。在本发明的环境中,术语“包括”包括术语“由……组成”。因此,术语“包括”包括“包含”以及“由……组成”,例如,“包括”X的组合物可以仅由X组成,或者可以包括另外的一些,例如X+Y。

[0016] 除非在本文中另有说明或明显与上下文相矛盾,在描述本发明的环境(特别是在权利要求的环境中)中使用的术语“一个”和“一种”和“所述”以及类似的用词应被解释为同时涵盖单数和复数。本文中对数值范围的描述仅旨在充当分别提及落入该范围内的每个单独值的简写法。除非本文另有说明,每个单独的值被并入说明书中,如同其在本文中被单独描述一样。说明书中的任何语言都不应被解释为暗示任何未主张的要素对于本发明的实践必不可少。

[0017] “基本上”一词不排除“完全”,例如,“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,可以从本发明的限定中省略“基本上”一词。

[0018] 与数值x相关的术语“约”表示 $x \pm 10\%$ 。

[0019] 如本文所用,术语“疾病”旨在与术语“紊乱”和“状况”(如在医学状况中)通常是同义词,并且互换使用(因为均反映损害正常功能的人体或动物体或其部分之一的异常状况),典型地由区别的体征和症状表现,并使人或动物的存活时间和/或生活质量降低。

[0020] 如本文所用,提及对象或患者的“治疗”旨在包括预防(prevention)、预防(prophylaxis)、衰减、改善和疗法。术语“对象”或“患者”在本文可互换使用,以表示包括人的所有哺乳动物。对象的实例包括人、牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。优选地,对象或患者是人。

[0021] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用。术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”以及这些术语的变型典型地指代如例如在同配肽的情况下包含通过正常肽键或通过修饰的肽键彼此连接的至少两个氨基酸的分子,具体是肽、寡肽、多肽或蛋白质,如融合蛋白。例如,“经典的”肽、多肽或蛋白质典型地由通过正常肽键连接至彼此的选自自由遗传密码子定义的20种氨基酸的氨基酸构成。肽、多肽或蛋白质可由L-氨基酸和/或D-氨基酸构成。优选地,肽、多肽或蛋白质(完全地)由L-氨基酸构成或(完全地)由D-氨基酸构成。具体地,术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”还包括被定义为含有非肽结构元件的肽类似物的“拟肽”,该肽能够模拟或拮抗天然亲本肽的生物作用(一种或多种)。拟肽缺乏经典的肽特征,如酶促可裂

解的肽键(enzymatically scissile peptide bonds)。具体地,除这些氨基酸外,肽、多肽或蛋白质可包含由遗传密码子定义的20种氨基酸以外的氨基酸,或者其可由遗传密码子定义的20种氨基酸以外的氨基酸构成。具体地,本发明的环境中的肽、多肽或蛋白质可等同地由通过本领域技术人员公知的天然过程(如翻译后成熟过程或通过化学过程)修饰的氨基酸构成。这种修饰在文献中有充分描述。这些修饰可出现在多肽的任何位置:在肽骨架中、在氨基酸链中或甚至在羧基-或氨基-末端。具体地,肽或多肽可在泛素化后分支或在有或无分支的情况下是环状的。这种类型的修饰可以是本领域技术人员公知的天然或合成翻译后过程的结果。本发明的环境中的术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”具体还包括修饰的肽、多肽和蛋白质。例如,肽、多肽或蛋白质修饰可包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核苷酸或核苷酸衍生物的共价固定、脂质或脂质衍生物的共价固定、磷脂酰肌醇的共价固定、共价或非共价交联、环化、二硫键形成、去甲基化、包括聚乙二醇化的糖基化、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰基化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、烯化(seneloylation)、硫酸化、氨基酸加成,如精氨酸或泛素化。这种修饰在文献中有充分描述(Proteins Structure and Molecular Properties(1993) 2nd Ed., T.E.Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins(1983) B.C.Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter等人(1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth.Enzymol.182:626-646和Rattan等人,(1992) Protein Synthesis:Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663:48-62)。因此,术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”优选地包括例如脂肽、脂蛋白、糖肽、糖蛋白等。

[0022] 如本文所用,“(多)肽”包含通过上述肽键连接的氨基酸单体的单链。如本文所用,“蛋白质”包含一种或多种,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种(多)肽,即通过上述肽键连接的氨基酸单体的一条或多条链。优选地,根据本发明的蛋白质包含1、2、3或4种多肽。

[0023] 如本文所用,术语“重组蛋白”指代通过重组手段制备、表达、生产或分离并且特别是天然不存在的任何蛋白质。

[0024] 如本文所用,术语“抗体”包括各种形式的抗体,包括但不限于完整抗体、抗体片段,具体是抗原结合片段、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体或基因工程抗体(变体或突变抗体),只要保留根据本发明的特有性质。优选人抗体和单克隆抗体,并且特别优选的是人单克隆抗体,具体作为重组人单克隆抗体。

[0025] 人抗体是本领域公知的(van Dijk, M.A., 和van de Winkel, J.G., Curr.Opin.Chem.Biol.5(2001)368-374)。具体地,人抗体还可在免疫后能够在缺乏内源性免疫球蛋白生产的情况下生产完整指令(repertoire)或选择人抗体的转基因动物(例如,小鼠)中生产。人种系免疫球蛋白基因阵列在此种系突变小鼠中的转移将导致在抗原攻击后生产人抗体(参见,例如, Jakobovits, A., 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993)2551-2555; Jakobovits, A., 等人, Nature 362(1993)255-258; Bruggemann, M., 等人, Year Immunol.7(1993)3340)。人抗体也可在噬菌体显示文库中生产(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)。最优选地, 人单克隆抗体通过使用如 Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal 抗体 from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8):871-5 中描述的改善的 EBV-B 细胞永生生化来制备。如本文所用, 术语“人抗体”还包含例如在可变区中修饰的这种抗体, 以生成如本文所述的根据本发明的性质。如本文所用, 术语“可变区” (轻链的可变区 (V_L)、重链的可变区 (V_H)) 表示直接涉及在将抗体结合至抗原中的每对轻链和重链。

[0026] 本发明的抗体可以是任何同种型 (例如, IgA、IgG、IgM, 即 α 、 γ 或 μ 重链), 但将优选 IgG。在 IgG 同种型中, 抗体可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类, 借此优选 IgG1。本发明的抗体可具有 κ 或 λ 轻链。

[0027] 优选地, 根据本发明的抗体或其抗原结合片段是纯化的抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv。

[0028] 因此, 本发明的抗体可优选为人抗体、单克隆抗体、人单克隆抗体、重组抗体或纯化抗体。本发明还提供了本发明的抗体的片段, 特别是保留抗体的抗原结合活性的片段。这种片段包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv。尽管说明书 (包括权利要求书) 在一些地方可明确地指代抗体的抗原结合片段 (一种或多种)、抗体片段 (一种或多种)、变体 (一种或多种) 和/或衍生物 (一种或多种), 但应理解术语“抗体”包括所有类别的抗体, 即抗体的抗原结合片段 (一种或多种)、抗体片段 (一种或多种)、变体 (一种或多种) 和衍生物 (一种或多种)。

[0029] 如本文所用, 术语“抗原结合片段”、“片段”和“抗体片段”可互换使用, 以指代保留抗体的抗原结合活性的本发明的抗体的任何片段。抗体片段的实例包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv。本发明的抗体的片段可通过包括用酶 (如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶) 消化和/或通过化学还原切割二硫键的方法从抗体获得。可选地, 抗体的片段可通过克隆和表达重链或轻链的序列的部分来获得。抗体“片段”包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段。本发明还包括衍生自本发明的抗体的重链和轻链的单链 Fv 片段 (scFv)。例如, 本发明包括包含来自本发明的抗体的 CDRs 的 scFv。还包括重链或轻链单体和二聚体、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体, 例如单链 Fv, 其中重链和轻链可变结构域通过肽接头连接。

[0030] 本发明的抗体片段可赋予单价或多价相互作用, 并且包含在上述多种结构中。例如, 可合成 scFv 分子以创造三价“三体”或四价“四体”。scFv 分子可包括产生二价微抗体的 Fc 区的结构域。另外, 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并且分子的其它区域结合其它靶标。示例性分子包括但不限于双特异性 Fab2、三特异性 Fab3、双特异性 scFv 和双抗体 (Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9:1126-1136)。

[0031] 根据本发明的抗体可以纯化形式提供。典型地, 抗体将存在于基本不含其它多肽 (例如, 其中小于 90% (按重量计), 通常小于 60% 并且更通常小于 50% 的组合物由其它多肽组成) 的组合物中。根据本发明的抗体可在人和/或非人 (或异源) 宿主例如小鼠中是免疫原性的。例如, 抗体可具有在非人宿主但不在人宿主中是免疫原性的独特型。用于人应用的本

发明的抗体包括不能容易地从宿主(如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等)中分离并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得的抗体。

[0032] 如本文所用,“中和抗体”是可中和即预防、抑制、减少、阻碍或干扰病原体在宿主中引发感染和/或使感染持久的能力的抗体。术语“中和抗体”和“一种中和…的抗体”或“中和…的抗体”在本文可互换使用。这些抗体可根据适当的配方单独或组合用作预防剂或治疗剂,与主动疫苗接种一起作为诊断工具或作为本文所述的生产工具。

[0033] 如本文所用,术语“核酸”、“核酸分子”和“多核苷酸”可互换使用,并且旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0034] 如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这些名称包括后代。因此,词“转化物”和“转化的细胞”包括原代对象细胞和衍生自其的而与转移次数无关的培养物。还应理解,由于有意或无意突变,所有后代的DNA含量可能不精确地相同。包括具有与用于原始转化的细胞中筛选的功能或生物活性相同的变体后代。在旨在明确名称的情况下,则将从环境中清楚看出。

[0035] 剂量通常与体重相关表示。因此,以[g、mg、或其它单位]/kg(或g、mg等)表示的剂量通常指代[g、mg、或其它单位]“每kg(或g、mg等)体重”,即使未明确述及术语“体重”。

[0036] 术语“结合”,并且具体地“特异性结合”和类似参考不包括非特异性粘附(non-specific sticking)。

[0037] 如本文所用,术语“疫苗”典型地理解为是提供至少一种抗原,优选为免疫原的预防或治疗物质。抗原或免疫原可衍生自适于疫苗接种的任何物质。例如,抗原或免疫原可衍生自病原体,如衍生自细菌、病毒颗粒或原生动物、寄生虫等,或衍生自肿瘤或癌性组织。抗原或免疫原可典型地刺激身体的适应性免疫系统以提供适应性免疫应答。具体地,“抗原”或“免疫原”典型地指代可被免疫系统,优选被适应性免疫系统识别并且能够例如通过形成抗体和/或抗原特异性T细胞作为适应性免疫应答的一部分而触发抗原特异性免疫应答的物质。典型地,抗原可以是或可包含可由MHC呈递给T细胞的肽或蛋白质。

[0038] 如本文所用,“序列变体”(也称为“变体”)指代参考序列中的任何改变,借此参考序列是“序列列表和SEQ ID号”(序列列表),即SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:332中列出的任何序列。因此,术语“序列变体”包括核苷酸序列变体和氨基酸序列变体。具体地,在“序列变体”中,保留了(参考序列)的功能,即,序列变体是功能性的(也称为“功能性序列变体”)。序列变体典型地维持例如抗体或抗原/免疫原的生物功能。在本发明的环境中,这种维持的生物功能优选地是抗体与恶性疟原虫子孢子,具体与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)结合,或者肽/蛋白质引起免疫应答,具体是生产抗体的能力。

[0039] 因此,优选的序列变体是与参考序列具有至少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%的序列同一性的功能性序列变体。如本文所用,短语“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%的序列同一性的其功能性序列变体”,意为(i)序列变体如本文所述是功能性的和(ii)%序列同一性越高,序列变体更优选。换言之,短语“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%的序列同一性的其功能性序列变体”具体意为功能性序列变体与相应的参考序

列具有至少70%的序列同一性,优选至少75%的序列同一性,优选至少80%的序列同一性,更优选至少85%的序列同一性,更优选至少88%的序列同一性,甚至更优选至少90%的序列同一性,甚至更优选至少92%的序列同一性,仍更优选至少95%的序列同一性,仍更优选至少96%的序列同一性,特别优选至少97%的序列同一性,特别优选至少98%的序列同一性,并且最优选至少99%的序列同一性。

[0040] 序列同一性通常关于参考序列(即本申请中述及的序列)的全长来计算。如本文所提及,%同一性可例如利用使用由NCBI(the National Center for Biotechnology Information;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62矩阵;空位开放罚分(gap open penalty) = 11和空位延伸罚分(gap extension penalty) = 1]指定的默认参数(default parameters)的BLAST来确定。

[0041] 核苷酸序列的环境中的核苷酸“序列变体”(即,核苷酸序列的“序列变体”)具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个核苷酸被缺失、取代,或者一个或多个核苷酸被插入参考核苷酸序列的序列中。核苷酸在本文中由标准的一个字母名称(A、C、G或T)提及。由于遗传密码子的简并性,核酸(核苷酸)序列的“序列变体”可导致相应参考氨基酸序列的改变,即导致或不导致相应氨基酸序列的“序列变体”。优选的序列变体是这样的核苷酸序列变体,其不导致氨基酸序列变体(沉默突变),但其它非沉默突变也在范围内,具体是导致氨基酸序列(其与参考序列至少70%相同,优选与参考序列至少至少80%相同,更优选与参考序列至少90%相同,甚至更优选至少95%相同,并且特别优选至少99%相同)的突变核苷酸序列。

[0042] 氨基酸环境中的氨基酸“序列变体”(即,氨基酸序列的“序列变体”)具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个氨基酸被缺失或取代,或者一个或多个氨基酸被插入到参考氨基酸序列的序列中。由于改变,氨基酸序列变体具有与参考序列至少70%相同,优选与参考序列至少80%相同,甚至更优选至少90%相同,甚至更优选至少95%相同,并且特别优选与参考序列至少99%相同的氨基酸序列。至少90%相同的变体序列具有不超过10个改变(即缺失、插入或取代的各种组合)/参考序列的100个氨基酸。

[0043] 在肽/蛋白质的环境中,“线性序列”或“序列”是氨基至羧基末端方向上的肽/蛋白质中氨基酸的顺序,其中序列中彼此相邻的残基在肽/蛋白质的一级结构中是连续的。

[0044] 尽管可在“序列变体”中具有非保守氨基酸取代,但在“序列变体”中优选取代是保守氨基酸取代,其中取代的氨基酸与对应被取代的氨基酸(即被取代的原始序列中的氨基酸)具有类似的结构和/或化学性质。举例来说,保守氨基酸取代涉及一种脂族或疏水氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)被另一种脂族或疏水氨基酸的取代;一种含羟基氨基酸(例如丝氨酸和苏氨酸)被另一种含羟基氨基酸的取代;一种酸性残基(例如谷氨酸或天冬氨酸)被另一种酸性残基的取代;含酰胺的残基(例如天冬酰胺和谷氨酰胺)被另一种含酰胺的残基替换;一种芳香族残基(例如苯丙氨酸和酪氨酸)被另一种芳香族残基替换;一种碱性残基(例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)被另一种碱性残基替换;和一种小氨基酸(例如,丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和甘氨酸)被另一种小氨基酸替换。

[0045] 氨基酸序列插入包括从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的长度范围内的氨基和/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-末端与报道分子(reporter molecule)或酶的融合。

[0046] 重要的是,序列变体通常是功能性序列变体,即序列变体中的改变不消除上述相应参考序列的功能性。通过利用本领域公知的计算机程序发现确定可分别被取代、插入或缺失而不消除这种功能性的核苷酸和氨基酸残基的指南。

[0047] 如本文所用,“衍生自”指定核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列指代核酸、肽、多肽或蛋白质的来源。优选地,衍生自特定序列的核酸序列或氨基酸序列具有与其衍生自的序列或其的一部分实质上相同的氨基酸序列,借此“实质上相同”包括以上限定的序列变体。优选地,衍生自特定肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列衍生自特定肽或蛋白质中的对应结构域。借此,“对应的”具体指代相同的功能性。例如,“胞外结构域”对应于(另一种蛋白质)的另一“胞外结构域”,或者“跨膜结构域”对应于(另一种蛋白质)的另一“跨膜结构域”。因此,肽、蛋白质和核酸的“对应”部分对于本领域技术人员是容易鉴别的。同样,“衍生自”其它序列的序列通常容易被本领域普通技术人员鉴别为在序列中具有其来源。

[0048] 优选地,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可与(其衍生自)的起始核酸、肽、多肽或蛋白质相同。然而,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列相对于(其衍生自)的起始核酸、肽、多肽或蛋白质也可具有一个或多个突变,具体地,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可以是(其衍生自)的起始核酸、肽、多肽或蛋白质的上述功能性序列变体。例如,在肽/蛋白质中,一个或多个氨基酸残基可被其它氨基酸残基取代,或者可发生一个或多个氨基酸插入或缺失。

[0049] 如本文所用,术语“突变”涉及与参考序列(例如对应的基因组序列)相比,核酸序列和/或氨基酸序列中的改变。突变,例如与基因组序列相比,可以是例如(天然发生的)体细胞突变、自发突变、例如由酶、化学或照射诱导的诱导突变、或通过定点诱变获得的突变(在核酸序列和/或在氨基酸序列中制造特异性和有意改变的分子生物学方法)。因此,术语“突变”或“突变的”应理解为还包括例如在核酸序列或在氨基酸序列中物理上制造突变。突变包括一个或多个核苷酸或氨基酸的取代、缺失和插入以及若干连续核苷酸或氨基酸的倒位。为实现氨基酸序列的突变,优选可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。突变可例如通过改变(例如,通过定点诱变)编码一种氨基酸的核酸分子的密码子以生产编码不同氨基酸的密码子,或通过合成序列变体(例如,通过了解编码多肽的核酸分子的核苷酸序列和通过设计包含编码多肽的变体的核苷酸序列的核酸分子的合成,而无需使核酸分子的一个或多个核苷酸突变)来实现。

[0050] 本说明书的全文中引用若干文件。无论是上文还是下文,本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指南等)特此以其整体通过引用并入。本文中的任何内容均不得解释为本发明由于在先发明而无权早于此公开。

[0051] 应理解,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为其可以变化。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,而不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求限制。除非另外限定,本文使用的所有技术和科学术语均与本领域普通技术人员的通常理解具有相同的含义。

[0052] 除其它发现外,本发明基于与疟疾环孢子蛋白(CSP)结合的极其有效的抗体的令人惊讶的发现。具体地,令人惊讶地发现那些抗体与疟疾环孢子蛋白上的表位结合,该

表位位于/跨越N-末端和NANP-重复序列之间的连接处,靠近功能上重要的区域I。有趣的是,该区域不包括在目前仅批准的疟疾疫苗RTS,S/AS01中。

[0053] 包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的氨基酸组成的肽

[0054] 第一方面,本发明提供了包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸或由根据SEQ ID NO:1的氨基酸组成的肽:

[0055] NPDP

[0056] [SEQ ID NO:1]

[0057] 可在疟原虫环孢子蛋白区域I的C-末端和NANP重复序列的N-末端发现此基序。令人惊讶地发现结合根据SEQ ID NO:1的基序的抗体极其有效并在体内显著降低(疟原虫孢子)的肝脏寄生虫负担,表明此抗体有效抑制(i)孢子侵入和(ii)体内肝脏阶段寄生虫繁殖的能力。由于根据本发明的肽能够产生这种有效的抗体,因此例如生成针对疟疾的有效疫苗是有用的,该疫苗导致对(i)孢子侵入和(ii)体内肝脏阶段寄生虫的繁殖的抑制。因此,不仅可预防和/或治疗个体中的疾病,还可抑制疾病在人群中的传播。

[0058] 优选地,根据本发明的肽包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NOs:2-5中任一项的氨基酸序列,优选地,肽包含根据SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0059] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成:

[0060] NPDPN

[0061] [SEQ ID NO:2]

[0062] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成:

[0063] NPDPNA

[0064] [SEQ ID NO:3]

[0065] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成:

[0066] NPDPNAN

[0067] [SEQ ID NO:4]

[0068] 更优选地,根据本发明的肽包含根据SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成:

[0069] NPDPNANP

[0070] [SEQ ID NO:5]

[0071] 除根据SEQ ID NO:1的基序外,根据SEQ ID NO:5的这种肽还包括第一“NANP”-序列(即NANP-重复序列的最N-末端部分)。

[0072] 此外,根据本发明的肽可优选包含根据SEQ ID NOs:6-22中任一项的氨基酸序列或由根据SEQ ID NOs:6-22中任一项的氨基酸序列组成。

[0073] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成:

[0074] NPDPNANPN

[0075] [SEQ ID NO:6]

[0076] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成:

[0077] GNPDPNANP

[0078] [SEQ ID NO:7]

[0079] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成:

[0080] GNPDPNANPN

[0081] [SEQ ID NO:8]

[0082] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成:

[0083] DGNPDPNANP

[0084] [SEQ ID NO:9]

[0085] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成:

[0086] NPDNANPNK

[0087] [SEQ ID NO:10]

[0088] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成:

[0089] DGNPDPNANPN

[0090] [SEQ ID NO:11]

[0091] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:12的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成:

[0092] GNPDPNANPNK

[0093] [SEQ ID NO:12]

[0094] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:13的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成:

[0095] DGNPDPNANPNK

[0096] [SEQ ID NO:13]

[0097] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成:

[0098] ADGNPDPNANPN

[0099] [SEQ ID NO:14]

[0100] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成:

[0101] QPADGNPDPNANPNK

[0102] [SEQ ID NO:15]

[0103] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成:

[0104] ADGNPDPNANPNK

[0105] [SEQ ID NO:16]

[0106] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成:

[0107] PADGNPDPNANPNK

[0108] [SEQ ID NO:17]

[0109] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成:

[0110] ADGNPDPNANPNKN

[0111] [SEQ ID NO:18]

[0112] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成:

[0113] PADGNPDPNANPNKN

[0114] [SEQ ID NO:19]

[0115] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成:

[0116] QPADGNPDPNANPNKN

[0117] [SEQ ID NO:20]

[0118] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成:

[0119] PADGNPDPNANPNKNN

[0120] [SEQ ID NO:21]

[0121] 例如,根据本发明的肽优选包含根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成:

[0122] QPADGNPDPNANPNKNN

[0123] [SEQ ID NO:22]

[0124] 更优选地,根据本发明的肽包含根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成,或者与SEQ ID NO.23共有至少72%,优选至少77%,更优选至少83%,甚至更优选至少88%,最优选至少94%的序列同一性。

[0125] KQPADGNPDPNANPNKNN

[0126] [SEQ ID NO:23]

[0127] 总体上,根据本发明的肽优选由疟原虫环孢子蛋白(CSP)的片段,更优选由恶性疟原虫环孢子蛋白的片段组成,或者优选地(在根据本发明的肽的整个长度上)与疟原虫环孢子蛋白的片段,更优选(在根据本发明的肽的整个长度上)与恶性疟原虫环孢子蛋白的片段共有至少70%,优选至少80%,更优选至少90%,甚至更优选至少95%,最优选至少98%的序列同一性。换言之,肽优选由疟原虫环孢子蛋白(CSP)的片段,更优选由恶性疟原虫环孢子蛋白的片段,或者由本文所述的其(功能性)序列变体组成。这意味着特别优选的肽(i)包含上述根据SEQ ID NOs 1-23中任一项的“核心”基序,其中特别优选根据SEQ ID NOs 1或5的核心基序,和(ii)核心基序“外部”,肽仍然是本文所述的CSP的序列变体。为此,与作为参考序列的(对应的)CSP片段相比,在肽的完整长度上计算序列同一性。优

选的CSP参考序列是根据SEQ ID NO:24的氨基酸序列。因此,(以上提及的)疟原虫环子孢子蛋白的片段优选为SEQ ID NO:24的片段。以上提及的疟原虫(恶性疟原虫)环子孢子蛋白(CSP)的片段优选具有至少8个或10个氨基酸,优选至少15个氨基酸,优选至少20个氨基酸,更优选至少25个氨基酸,更优选至少30个氨基酸,更优选至少40个氨基酸,甚至更优选至少50个氨基酸,甚至更优选至少75个氨基酸,甚至更优选至少100个氨基酸,仍更优选至少150个氨基酸,仍更优选至少200个氨基酸,最优选至少300个氨基酸长度。

[0128] 优选地,根据本发明的肽具有不超过380个氨基酸,优选不超过350个氨基酸,优选不超过320个氨基酸,更优选不超过300个氨基酸,更优选不超过275个氨基酸,更优选不超过250个氨基酸,甚至更优选不超过225个氨基酸,甚至更优选不超过200个氨基酸,甚至更优选不超过200个氨基酸,甚至更优选不超过175个氨基酸,仍更优选不超过150个氨基酸,仍更优选不超过125个氨基酸,仍更优选不超过100个氨基酸,特别优选不超过75个氨基酸,并且最优选不超过50个氨基酸长度。

[0129] 更优选地,根据本发明的肽具有4至380个氨基酸长度,优选地肽具有5至350个氨基酸长度,优选地肽具有5至300的氨基酸长度,优选地肽具有5至250个氨基酸长度,更优选地肽具有5至200个氨基酸长度,更优选地肽具有5至150个氨基酸长度,更优选地肽具有5至100个氨基酸长度,甚至更优选地肽具有6至80个氨基酸长度,甚至更优选地肽具有7至70个氨基酸长度,甚至更优选地肽具有8至60个氨基酸长度,仍更优选地肽具有9至50个氨基酸长度,仍更优选地肽具有10至40个氨基酸长度,仍更优选地肽具有11至30个氨基酸长度,最优选地肽具有12至25个氨基酸长度。

[0130] 根据前述权利要求中任一项的肽,其中肽是重组肽。重组肽是天然不存在的肽。例如,可如本文所述对肽进行修饰,使得所得修饰的肽是天然不存在的肽。这可通过非天然(或合成)修饰或通过根据本发明的肽上天然不存在的修饰来实现。可选地或另外地,重组肽的长度也可与天然存在的肽不同。

[0131] 此外,肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比优选地包括一个或多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确一个或(ii)一个或多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确两个或(ii)两个或更多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确三个或(ii)三个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确四个或(ii)四个或更多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确五个或(ii)五个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确六个或(ii)六个或更多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确七个或(ii)七个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确八个或(ii)八个或更多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确九个或(ii)九个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确十个或(ii)十个或更多个突变。优选地,根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白(CSP)的对应参考片段相比包含(i)精确十一个或(ii)十一个或更多个突变。还优选根据本发明的肽

与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十二个或 (ii) 十二个或更多个突变。优选地, 根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十三个或 (ii) 十三个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十四个或 (ii) 十四个或更多个突变。优选地, 根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十五个或 (ii) 十五个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十六个或 (ii) 十六个或更多个突变。优选地, 根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十七个或 (ii) 十七个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十八个或 (ii) 十八个或更多个突变。优选地, 根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确十九个或 (ii) 十九个或更多个突变。还优选根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比包含 (i) 精确二十个或 (ii) 二十个或更多个突变。

[0132] 优选地, 根据本发明的肽与疟原虫环子孢子蛋白 (CSP) 的对应参考片段相比, 更优选与SEQ ID NO:24的对应参考片段相比包含1、2、3、4或5个突变。

[0133] 根据本发明的肽优选用于预防和/或治疗本文所述疟疾。换言之, 优选根据本发明的肽用于制造药物, 优选用于预防和/或治疗本文所述的疟疾。

[0134] 包含根据本发明的肽的蛋白质、病毒样颗粒和蛋白质纳米颗粒

[0135] 在进一步方面, 本发明提供了包含根据本发明的肽的蛋白质。因此, 蛋白质可由根据本发明的肽组成。然而, 优选蛋白质包含 (i) 根据本发明的肽和 (ii) 优选为蛋白质提供协同功能和/或另外功能的另外的氨基酸序列。换言之, 除肽的功能 (作为免疫原/抗原) 之外, 这种另外的氨基酸序列可优选地提供优选与肽的功能 (作为免疫原/抗原) 协同作用的功能。这种功能的非限制性实例包括 (i) 靶向, 例如, 如下文所述, 和 (ii) 免疫原性, 例如, 如下文所述。

[0136] 为此, 根据本发明的蛋白质优选为融合蛋白。融合蛋白典型地包含两种或更多种不同的功能。因此, 融合蛋白典型地包含来自不同来源的“部分”, 例如融合蛋白包含由至少两种不同基因或 (不同) 基因的部分编码的不同蛋白质/肽。因此, 融合蛋白也可称为“嵌合蛋白”。即使融合蛋白总体上可天然存在, 例如, 当复杂突变 (如染色体易位、串联重复或逆转座) 产生包含来自 (例如在癌细胞中) 的两种不同基因的编码序列的部分的新编码序列时, 优选 (天然不存在的) 重组融合蛋白。重组融合蛋白不天然存在于此组合中。

[0137] 例如, 根据本发明的蛋白质可包含——除根据本发明的肽外——HBsAg或HBsAg的片段。HBsAg是乙型肝炎病毒 (HBV) 的表面抗原。

[0138] 乙型肝炎病毒 (HBV) 由 (i) 包含三种相关表面蛋白 (乙型肝炎表面抗原、HBsAg) 和脂质的被膜和 (ii) 包围病毒DNA基因组和DNA聚合酶的二十面体核衣壳组成。HBV衣壳在RNA前基因组复制复合物包装期间在被感染细胞的胞质溶胶中形成, 并通过在颗粒内腔中对前基因组进行逆转录而获得在病毒DNA基因组合成期间发芽的能力。三种HBV被膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg在内质网处形成复杂的跨膜折叠, 并形成二硫键连接的同二聚体和异二聚体。

[0139] HBsAg的“片段”典型地具有至少5, 优选至少10个氨基酸, 优选至少15个氨基酸, 优

选至少20个氨基酸,更优选至少25个氨基酸,更优选至少30个氨基酸,更优选至少40个氨基酸,甚至更优选至少50个氨基酸,甚至更优选至少75个氨基酸,仍更优选至少100个氨基酸,仍更优选至少150个氨基酸,最优选至少200个氨基酸长度。换言之,片段越长,越优选。

[0140] 例如,HBsAg的片段可至少含有HBsAg的抗原性环区(antigenic loop region)。乙型肝炎病毒的被膜含有三个“HBV被膜蛋白”(也称为“HBsAg”、“乙型肝炎表面抗原”):S蛋白(“小”,也成为S-HBsAg)、M蛋白(“中间”,也称为M-HBsAg)和L蛋白(“大”,也称为L-HBsAg)。S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg共有对应于S蛋白(S-HBsAg)并且对病毒组装和感染至关重要的相同的C-末端极端(也称为“S结构域”,226个氨基酸)。S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg在内质网(ER)中合成,组装并通过高尔基体分泌为颗粒。S结构域包含四种预测的跨膜(TM)结构域,借此S结构域的N-末端以及C-末端暴露于内腔。跨膜结构域TM1和TM2均是共翻译蛋白整合到ER膜中所必需的,并且跨膜结构域TM3和TM4位于S结构域的C-末端三分之一处。HBsAg的“抗原性环区”位于HBsAg的S结构域的预测TM3和TM4跨膜结构域之间,借此抗原性环区包含S结构域的第101-172位氨基酸,总共包含226个氨基酸(Salisse J.and Sureau C., 2009, Journal of Virology 83:9321-9328)。重要应注意感染性的决定因素存在于HBV被膜蛋白的抗原性环区中。具体地,HBsAg的第119位和125位之间的残基含有CXXC基序,已证明所述CXXC基序是HBV和HDV的感染性所需的最重要序列(Jaoude GA,Sureau C, Journal of Virology, 2005;79:10460-6)。

[0141] 优选地,根据本发明的蛋白质包含如本文所述的HBsAg或其序列变体的S结构域。

[0142] 更优选地,根据本发明的蛋白质包含如本文所述的SEQ ID NO:319或其序列变体:

[0143] MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNSHPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIIFLLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

[0144] (SEQ ID NO:319)

[0145] SEQ ID NO:319显示了HBsAg的S结构域的示例性氨基酸序列。

[0146] 优选地,根据本发明的蛋白质进一步包含靶向部分,如靶向肽。总体上,靶向肽是指导蛋白质转运至特定位置例如特定的细胞类型、细胞中或细胞中的特定区域(包括细胞核、线粒体、内质网(ER)、叶绿体、质外体、过氧化物酶体和质膜)的肽链。靶向肽在蛋白质被转运至特定位置后例如通过信号肽酶可任选地从蛋白质切割。优选的靶向肽包括抗体及其片段,如scFv。例如,这种抗体或抗体片段可导向至特定的细胞类型的表面分子。

[0147] 例如,靶向肽可具有不超过1000个氨基酸,优选不超过500个氨基酸,更优选不超过200个氨基酸,甚至更优选不超过100个氨基酸,仍更优选不超过80个氨基酸,特别优选不超过70个氨基酸并且最优选不超过50个氨基酸长度。例如,靶向肽可具有3至70个氨基酸长度。

[0148] 优选地,靶向部分,具体是靶向肽,将根据本发明的蛋白质靶向至特定的细胞类型。更优选地,靶向部分,具体是靶向肽,将根据本发明的蛋白质靶向至抗原呈递细胞,如树突细胞。抗原呈递细胞(APC)典型地在其表面上显示与主要组织相容性复合物(MHCs)复合的抗原;过程称为“抗原呈递”。T细胞可利用其T细胞受体(TCRs)识别这些复合物。因此,APCs加工抗原并将其呈递给T细胞。抗原呈递细胞对于有效的适应性免疫应答至关重要,因

为细胞毒性和辅助T细胞的功能均依赖于APCs。抗原呈递允许适应性免疫的特异性,并可有助于抗胞内和胞外病原体的免疫应答。

[0149] 优选地,靶向的APC是专职性APC。专职性抗原呈递细胞专门将抗原呈递给T细胞,并且例如通过吞噬作用(巨噬细胞和树突细胞)或通过受体介导的内吞作用(B细胞)而非常有效地内化抗原,将抗原加工成肽片段,并且然后在其膜上显示与II类MHC分子结合的那些肽。靶向的APCs的优选实例包括巨噬细胞、B细胞和树突细胞。

[0150] 最优选地,靶向的APC是树突细胞(DC)。树突细胞具有最广泛的抗原呈递范围,并且是激活天然T细胞所必需的。DCs将抗原呈递给辅助T细胞和细胞毒性T细胞。它们还可进行交叉呈递——其将MHC I类分子上的外源抗原呈递给细胞毒性T细胞的过程。交叉呈递允许激活这些T细胞。树突细胞可被靶向部分如靶向肽、其特异性受体包括DEC-205、Clec9A和Clec12A识别。

[0151] 优选地,靶向部分,具体是靶向肽,靶向DEC-205。DEC-205是树突细胞(DC)表达的I型细胞表面蛋白。DEC-205的靶向可通过DEC-205抗体或其片段如抗DEC-205scFv来实现,例如,如Birkholz K.等人,2010,Blood 116(13):2277-85中所述(然而,其中根据本发明的肽为抗原/表位)。

[0152] 还优选靶向部分,具体是靶向肽,靶向Clec9A。Clec9A是一组V C型凝集素样受体(CTLR),起激活受体的作用并在髓系细胞(myeloid lineage cells)上表达。在人中,这种受体由已被提出是主要的人交叉呈递mDCs并可代表鼠CD8(+)DCs的人同源物的BDCA3(+)髓样树突细胞(mDCs)选择性表达。Clec9A的靶向可通过Clec9A抗体或其片段来实现,例如,如在Huysamen C.等人,2008,J.Biol.Chem.283(24):16693-16701或在Schreibelt G.等人,2012,Blood 119(10):2284-92中所述。

[0153] 优选地,靶向部分,具体是靶向肽,靶向Clec12A。Clec12A(也称为CD371 DCAL-2、M1CL或CLL-1)是具有胞外C型凝集素结构域的30kD II型跨膜蛋白,其属于C型凝集素家族。Clec12A的靶向可通过Clec12A抗体或其片段来实现,例如,如Hutten T.J.A.等人,2016,J.Immunol.197(7)2715-2725中所述。

[0154] 因此,优选靶向部分,具体是靶向肽,靶向DEC-205、Clec9A和/或Clec12A。由此,蛋白质典型被导向至然后可加工蛋白质并呈递抗原/免疫原的树突细胞,如根据本发明的肽,以触发免疫应答。

[0155] 还优选靶向部分,具体是靶向肽,将蛋白质靶向肝细胞。为此,靶向部分,具体是靶向肽,可包含例如导向针对任何特异性肝细胞表面分子的抗体或其片段。

[0156] 还优选靶向部分,具体是靶向肽,包含疟原虫环孢子蛋白,具体是恶性疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域。在这种环境中,疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域可以是本文所述的CSP的N-末端的任何片段(其中,“CSP的N-末端”延伸直至CSP的中央重复区/NANP重复区;即“CSP的N-末端”指代CSP的中央重复区/NANP重复区的N-末端的所有氨基酸),或其序列变体。CSP的N-末端的片段典型地具有至少3个氨基酸,优选至少5个氨基酸,更优选至少8个氨基酸,甚至更优选至少10个氨基酸,仍更优选至少12个氨基酸,特别优选至少15个氨基酸并且最优选至少20个氨基酸长度。优选的片段及其序列变体为肝细胞提供靶向。“CSP的N-末端”的优选实例显示于SEQ ID NO:320中:

[0157] MMRKLAILSVSFLFVEALFQEYQCYGSSSNTRVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSLKKN

RSLGENDDGNNEDNEKLRKPKHKKLLKQPADGNPDP

[0158] (SEQ ID NO:320)

[0159] 特别优选地,疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含或由CSP区域I组成,具体地,疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域因此包含下列或由下列组成:根据SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0160] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:321或其序列变体的氨基酸序列或由根据本文所述的SEQ ID NO:321或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0161] KKLKQPA

[0162] (SEQ ID NO:321)

[0163] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:322或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:322或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0164] HKKLKQPAD

[0165] (SEQ ID NO:322)

[0166] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:323或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:323或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0167] KHKKLKQPADG

[0168] (SEQ ID NO:323)

[0169] 此外,疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域优选包含根据本文所述的SEQ ID NO:324或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:324或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0170] KHKKLKQP

[0171] (SEQ ID NO:324)

[0172] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:325或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:325或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0173] RPKHKKLLKQP

[0174] (SEQ ID NO:325)

[0175] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:326或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:326或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0176] PKHKLLKQPADGN

[0177] (SEQ ID NO:326)

[0178] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:327或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:327或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0179] KPKHKLLKQPADGNP

[0180] (SEQ ID NO:327)

[0181] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:328或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:328或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0182] RKPCHKKLPADGNPD

[0183] (SEQ ID NO:328)

[0184] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:329或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:329或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0185] NEKLRKPKCHKKLP

[0186] (SEQ ID NO:329)

[0187] 还优选疟原虫环孢子蛋白的N-末端区域包含根据本文所述的SEQ ID NO:330或其序列变体的氨基酸序列,或由根据本文所述的SEQ ID NO:330或其序列变体的氨基酸序列组成:

[0188] NEKLRKPKCHKKLPADG

[0189] (SEQ ID NO:330)

[0190] 优选地,根据本发明蛋白质的蛋白质进一步包含免疫原性肽。总体上,免疫原性肽增加了根据本发明的肽的免疫原性。为此,免疫原性肽本身是免疫原性的,即能够引发免疫应答。例如,免疫原性肽可包含不同于根据本发明的肽的抗原/免疫原,如上述HBsAg。多种免疫原性肽是本领域已知的。此外,本领域技术人员公知可如何设计免疫原性肽,例如,如 Flower D.R.,2013,Nature Chemical Biology 9(12):749-753:Designing immunogenic peptides中所述。

[0191] 根据本发明的蛋白质可进一步包括本领域已知的接头序列,例如“GS-接头”。

[0192] 根据本发明的蛋白质优选具有至少20个氨基酸,优选至少50个氨基酸,优选至少60个氨基酸,更优选至少70个氨基酸,更优选至少80个氨基酸,更优选至少90个氨基酸,甚至更优选至少100个氨基酸,甚至更优选至少150个氨基酸,甚至更优选至少200个氨基酸,仍更优选至少250个氨基酸,仍更优选至少300个氨基酸,最优选至少350或至少400个氨基酸长度。

[0193] 在进一步方面,本发明还提供了病毒样颗粒,其包含本文所述的根据本发明的肽或本文所述的根据本发明的蛋白质。

[0194] 如本文所用,“病毒样颗粒”(也“VLP”)具体指代衍生自若干病毒中的任一种的非复制性的病毒壳。VLPs通常由一种或多种病毒蛋白如但不限于被称为衣壳蛋白、包被蛋白、壳蛋白、表面蛋白和/或被膜蛋白、或衍生自这些蛋白质的形成颗粒的多肽构成。在适当的表达系统中重组表达蛋白质后,VLPs可自发形成。生产特定VLPs的方法是本领域已知的。重组表达病毒蛋白后VLPs的存在可利用本领域已知的常规技术(如通过电子显微镜、生物物理表征等)来检测。进一步,VLPs可通过已知的技术例如密度梯度离心法分离,并通过特征性密度谱带鉴定。参见,例如,Baker等人(1991)Biophys.J.60:1445-1456;和Hagensee等人(1994)J.Viral.68:4503-4505;Vincente,J Invertebr Pathol.,2011;Schneider-Ohrum and Ross,Curr.Top.Microbial.Immunol.,354:53073,2012)。

[0195] 例如,如果HBsAg或另一种病毒蛋白以足够的浓度存在,则病毒样颗粒在无DNA的情况下自发组装,导致非感染性免疫原性构建体。共同给予使得免疫系统激活并增加抗体对根据本发明的肽的应答。

[0196] 因此,包含本文所述的根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的病毒样颗粒具体是包括根据本发明的肽或蛋白质的病毒样颗粒(VLP),其包含SEQ ID NO:1。包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的VLP的优选实施方式对应于根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的优选实施方式。

[0197] 总体上,VLPs缺乏病毒复制所需的病毒组分,并且因此代表病毒的高度减毒形式。VLP可显示当给予对象时能够引发对疟原虫的免疫应答的多肽(例如,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质)。病毒样颗粒及其生产方法对本领域普通技术人员是已知和熟悉的,并且已知来自若干病毒的病毒蛋白形成VLPs,包括人乳头瘤病毒、HIV(Kang等人,Biol.Chem.380:353-64(1999))、塞姆利基森林病毒(Notka等人,Biol.Chem.380:341-52(1999))、人多瘤病毒(human polyomavirus)(Goldmann等人,J.Virol.73:4465-9(1999))、轮状病毒(Jiang等人,Vaccine 17:1005-13(1999))、微小病毒(Casal,Biotechnology and Applied Biochemistry,Vol 29,Part 2,pp 141-150(1999))、犬微小病毒(Hurtado等人,J.Viral.70:5422-9(1996))、戊型肝炎病毒(Li等人,J.Viral.71:35 7207-13(1997))和新城鸡瘟病毒。例如,包含根据本发明的肽的嵌合VLP可以是HBsAg系VLP。这种VLPs的形成可通过任何合适的技术来检测。用于检测培养基中VLPs的本领域已知的合适技术的实例包括,例如,电子显微镜技术、动态光散射(DLS)、选择性色谱分离(例如,离子交换、疏水相互作用和/或VLPs的尺寸排阻色谱分离(size exclusion chromatographic separation))和密度梯度离心。

[0198] 在进一步方面,本发明还提供了包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒。如本文所用,“蛋白质纳米颗粒”具体指代多亚单位蛋白质系的多面体形状结构。亚单位各自由蛋白质或多肽(例如糖基化的多肽)构成,并且任选地由以下单个或多个特征构成:核酸、辅基、有机和无机化合物。蛋白质纳米颗粒的非限制性实例包括铁蛋白纳米颗粒(参见,例如,Zhang,Y.Int.J.Mol.Sci.,12:5406-5421,2011,通过引用并入本文)、包裹蛋白纳米颗粒(encapsulin nanoparticles)(参见,例如,Sutter等人,Nature Struct.and Mol.Biol.,15:939-947,2008,通过引用并入本文)、硫氧化还原酶(Sulfur Oxygenase Reductase)(SOR)纳米颗粒(参见,例如,Urich等人,Science,311:996-1000,2006,通过引用并入本文)、2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒(lumazine synthase nanoparticles)(参见,例如,Zhang等人,J.Mol.Biol.,306:1099-1114,2001)或丙酮酸脱氢酶纳米颗粒(参见,例如,Izard等人,PNAS 96:1240-1245,1999,通过引用并入本文)。铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶和丙酮酸脱氢酶是单体蛋白,其自组装成在一些情况下分别由24、60、24、60和60个蛋白质亚单位组成的球状蛋白复合物。优选地,铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶单体连接至根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质,并且自组装成在其表面上呈递本公开的抗原/表位的蛋白质纳米颗粒,所述蛋白质纳米颗粒可被给予对象以刺激对根据本发明的肽或对根据本发明的蛋白质的免疫应答。

[0199] 因此,包含本文所述的根据本发明的免疫原的蛋白质纳米颗粒颗粒具体是包括根

据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒。包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒的优选实施方式对应于根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的优选实施方式。

[0200] 例如,蛋白质纳米颗粒可包括任一种本公开的肽中的一种或多种,其中蛋白质纳米颗粒优选特异性结合如本文所述的根据本发明的抗体。

[0201] 纳米颗粒的非限制性实例包括分别由包括铁蛋白、包裹蛋白和SOR蛋白的单体亚单位组装体组成的铁蛋白纳米颗粒、包裹蛋白纳米颗粒和硫氧化还原酶(SOR)纳米颗粒。为构建包括根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质通常连接至蛋白质纳米颗粒的亚单位(如铁蛋白、包裹蛋白或SOR蛋白)。融合蛋白在适当的条件下自组装成纳米颗粒。

[0202] 优选地,蛋白质纳米颗粒因此为铁蛋白纳米颗粒、包裹蛋白纳米颗粒、硫氧化还原酶(SOR)纳米颗粒、2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒或丙酮酸脱氢酶纳米颗粒。更优选地,蛋白质纳米颗粒为铁蛋白纳米颗粒。

[0203] 铁蛋白纳米颗粒及其免疫目的(例如,针对流感抗原的免疫)的应用已在本领域中公开(参见,例如,Kanekiyo等人,Nature,499:102-106,2013,其整体通过引用并入本文)。因此,优选的蛋白质纳米颗粒是铁蛋白纳米颗粒。例如,本公开的免疫原(具体为根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质)中的任一种可连接至铁蛋白多肽或不同铁蛋白多肽的杂合体,以构建铁蛋白纳米颗粒。因此,包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒优选为铁蛋白纳米颗粒。

[0204] 铁蛋白是球形蛋白,存在于所有动物、细菌和植物中,并且其主要作用是通过水合铁离子和质子往返于矿化核的运送来控制多核 $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ 形成的速率和位置。球状形式的铁蛋白由单体亚单位组成,所述单体亚单位是分子量为近似17-20kDa的多肽。一种这样的单体亚单位的序列的实例由SEQ ID NO:331表示:

[0205] 铁蛋白多肽:

[0206] MLSKDI IKLLNEQVNKEMSSNLYMSSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVVPVQ
LTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHA IKGKD HATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGN
ENHGLYLADQYVVKGI AKSRKS

[0207] (SEQ ID NO:331)

[0208] 球状形式的铁蛋白包含24个单体亚单位蛋白,并且具有带有432个对称的衣壳样结构。构建铁蛋白纳米颗粒的方法是本领域普通技术人员已知的,并在本文中进一步描述(参见,例如,Zhang,Int.J.Mol.Sci.,12:5406-5421,2011,其整体通过引用并入本文)。

[0209] 例如,铁蛋白多肽可以是大肠杆菌铁蛋白、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)铁蛋白、人轻链铁蛋白、牛蛙铁蛋白或其杂合体,如大肠杆菌-人杂合铁蛋白、大肠杆菌-牛蛙杂合铁蛋白或人-牛蛙杂合铁蛋白。与根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质组合的铁蛋白多肽的示例性氨基酸序列和编码铁蛋白多肽的核酸序列可发现于GENBANK®,例如登录号ZP 03085328、ZP 06990637、EJB64322.1、AAA35832、NP 000137AAA49532、AAA49525、AAA49524和AAA49523,具体地以2017年4月29日可获得的其整体通过引用并入本文。优选地,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质连接至包括与SEQ ID NO:331所示的氨基酸序列至少80%(如至少85%、至少90%、至少95%或至少97%)相同的氨基酸序列的铁蛋白。

[0210] 优选地,铁蛋白多肽是幽门螺杆菌铁蛋白(如SEQ ID NO:331所示的铁蛋白多肽)。更优选地,铁蛋白多肽包括位置31处的半胱氨酸残基的取代,如C31S、C31A或C31V取代。根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可连接至优选进一步包括铁蛋白多肽的位置31处的半胱氨酸残基取代(如C31S、C31A或C31V取代)的幽门螺杆菌铁蛋白(如SEQ ID NO:331所示的铁蛋白多肽)。

[0211] 优选地,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可连接至包裹蛋白多肽以构建包裹蛋白纳米颗粒。因此,包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒优选为包裹蛋白纳米颗粒。包裹蛋白是细菌蛋白的保守家族,也称为亚麻蛋白样蛋白(linocin-like proteins),其形成起包装酶的最小区室作用的大蛋白质组装体。包裹蛋白组装体由单体亚单位组成,所述单体亚单位是分子量为近似30kDa的多肽。一种这样的单体亚单位的序列的实例被提供为SEQ ID NO:332:

[0212] 包裹蛋白多肽:

[0213] MEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLYGRKFVDVEGPYGYEAAHPLGEVEVLSDENEVVKWGL
RKSLPLIELRATFTLDLWELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIFRGCEKSGVKLLSFEERKIECGSTPK
DLLEAIVRALSIFSKDGIIEGYPYTLVINTDRWINFLKEEAGHYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALVVSERGGDFK
LILGQDLSIGYEDREKDAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF

[0214] (SEQ ID NO:332)

[0215] 生产后,单体亚单位自组装成包括60个单体亚单位的球状包裹蛋白组装体。构建包裹蛋白纳米颗粒的方法是本领域普通技术人员已知的,并在本文中进一步描述(参见,例如,Sutter等人,Nature Struct.and Mol.Biol.,15:939-947,2008,其整体通过引用并入本文)。在特定的实例中,包裹蛋白多肽是细菌包裹蛋白,如大肠杆菌或海栖热袍菌(*Thermotoga maritime*)包裹蛋白。

[0216] 与根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质组合的示例性包裹蛋白序列如SEQ ID NO:332所示。

[0217] 优选地,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可连接至硫氧化还原酶(SOR)多肽,以构建SOR纳米颗粒。因此,包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒优选为SOR纳米颗粒。SOR蛋白是(例如来自嗜热古细菌*Acidianus ambivalens*)的微生物蛋白,其形成24个亚单位蛋白质组装体。构建SOR纳米颗粒的方法是本领域普通技术人员已知的(参见,例如,Urich等人,Science,311:996-1000,2006,其整体通过引用并入本文)。

[0218] 此外,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质还可连接至2,4-二氧四氢蝶啶合酶多肽,以构建2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒。因此,包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒优选为2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒。

[0219] 此外,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质还可连接至丙酮酸脱氢酶多肽,以构建丙酮酸脱氢酶纳米颗粒。因此,包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的蛋白质纳米颗粒优选为丙酮酸脱氢酶纳米颗粒。

[0220] 蛋白质纳米颗粒的进一步优选实例及其获得方法公开于Warangkana Lohcharoenkal,Liying Wang,Yi Charlie Chen,and Yon Rojanasakul,“Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy,”BioMed Research International,vol.2014,Article ID 180549,12pages,2014.doi:10.1155/2014/

180549,其通过引用并入本文。

[0221] 优选地,根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质例如通过接头(如本领域已知的GS-接头)连接至纳米颗粒蛋白如铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白的N-或C-末端。优选在HEK 293细胞中制造构建体,具体因为融合蛋白可从那些细胞分泌并且自组装成纳米颗粒。可利用已知技术,例如通过一些不同的色谱程序例如Mono Q(阴离子交换)然后进行尺寸排阻(SUPEROSE®6)色谱纯化纳米颗粒。

[0222] 本发明还提供了融合蛋白,其包含(i)根据本发明的肽和(ii)能够指导单体亚单位自组装成球状形式的蛋白质的纳米颗粒蛋白如铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白,或其任何部分的单体亚单位。来自任何已知纳米颗粒蛋白如铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白的氨基酸序列可用于生产具有根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的融合蛋白,具体只要单体亚单位能够自组装成在其表面上显示根据本发明的肽的纳米颗粒。

[0223] 融合蛋白无需包含纳米颗粒蛋白如铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白的单体亚单位多肽的全长序列。可利用单体亚单位多肽的部分或区域,只要该部分包含指导单体亚单位自组装成球状形式的蛋白质的氨基酸序列。

[0224] 在一些实施方式中,将突变工程化为单体铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶亚单位的氨基酸序列可以是有用的。例如,改变位点如酶识别位点或糖基化位点以赋予融合蛋白有益的性质(例如,半衰期)可以是有用的。

[0225] 本领域技术人员将理解,应完成将根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质融合成铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白,使得包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的融合蛋白的部分不干扰单体铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶亚单位自组装成球状蛋白,并且融合蛋白的铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白部分不干扰根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质引起免疫应答的能力。

[0226] 总体上,纳米颗粒蛋白和根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可直接连接在一起,而不影响任一部分的活性。可选地,利用接头(也称为间隔子)序列连接纳米颗粒蛋白和根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质。例如,铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白和根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可直接连接在一起,而不影响任一部分的活性。可选地,利用接头(也称为间隔子)序列连接铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白和根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质。

[0227] 可设计接头序列以将融合蛋白的铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶部分和包含根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的融合蛋白的部分关于彼此定位,使得融合蛋白保持组装成纳米颗粒的能力,并且还引起对疟原虫的免疫应答。

[0228] 优选地,接头序列包含氨基酸。优选使用的氨基酸是具有小侧链的氨基酸和/或不带电荷的氨基酸。这种氨基酸较不可能干扰融合蛋白的正确折叠和活性。因此,单独或组合用于接头序列的优选的氨基酸是丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸。这种接头序列的一个实例是SGG。可根据需要添加或减去氨基酸。本领域技术人员能够确定用于构建蛋白质纳米颗粒的适当的接头序列。

[0229] 优选地,蛋白质纳米颗粒的分子量为100至5000kDa,如近似500至4600kDa。更优选地,当蛋白质纳米颗粒包括根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质时,铁蛋白纳米颗粒的近似分子量为约650kDa,包裹蛋白纳米颗粒的近似分子量为约2100kDa,SOR纳米颗粒的近似分子量为约1000kDa,2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒的近似分子量为约4000kDa,以及丙酮酸脱氢酶纳米颗粒的近似分子量为约4600kDa。

[0230] 连接至铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶蛋白的根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质可自组装成多亚单位蛋白质纳米颗粒,典型地分别称为铁蛋白纳米颗粒、包裹蛋白纳米颗粒、SOR纳米颗粒、2,4-二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒和丙酮酸脱氢酶纳米颗粒。包括根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的纳米颗粒与不包括根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质的天然铁蛋白、包裹蛋白、SOR、2,4-二氧四氢蝶啶合酶或丙酮酸脱氢酶纳米颗粒具有基本相同的结构特征。即,其(分别)包含24、60、24、60或60个亚单位并具有类似的对应对称性。

[0231] 还优选根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒或根据本发明的蛋白质纳米颗粒优选以 $1\mu\text{M}$ 或更小的 K_d 特异性结合下述根据本发明的抗体。

[0232] 如本文所用,“ K_d ”指代给定相互作用如多肽-配体相互作用或抗体-抗原相互作用的解离常数。例如,对于抗体(如下文所述的根据本发明的抗体)和抗原(如根据本发明的肽或根据本发明的蛋白质)的双分子相互作用,其是双分子相互作用的各组分的浓度除以复合物的浓度。确定抗体:抗原相互作用的 K_d 的方法是本领域普通技术人员熟悉的。

[0233] 根据本发明的抗体

[0234] 结合根据本发明的肽的抗体

[0235] 在进一步方面,本发明提供了(特异性)结合根据本发明的肽的抗体或其抗原结合片段。换言之,根据本发明的抗体或其抗原结合片段能够识别对应于根据本发明的肽的表位,具体是CSP表位。因此,根据本发明的抗体结合CSP表位,所述CSP表位位于CSP的N-末端和NANP-重复区之间的连接处,靠近CSP的功能重要区域I。

[0236] 令人惊讶地发现结合此表位并且因此结合根据本发明的肽的抗体在体内大大降低了肝脏寄生虫的负担,表面这种抗体能够有效抑制(i)孢子侵入和(ii)体内肝脏阶段寄生虫繁殖。由此,不仅可预防和/或治疗个体中的疾病,还可抑制疾病在人群中的传播。

[0237] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是人抗体。还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体,优选人单克隆抗体。此外,还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段是重组抗体。

[0238] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含Fc部分。更优选地,Fc部分衍生自人来源,例如,来自人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4,借此人IgG1是特别优选的。

[0239] 如本文所用,术语“Fc部分”指代衍生自起始于木瓜蛋白酶切割位点(例如,天然IgG中的残基216,取重链恒定区的第一个残基为114)上游的铰链区并终止于免疫球蛋白重链的C-末端的免疫球蛋白重链的部分。因此,Fc部分可以是完整的Fc部分或其的一部分(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氨基酸位置216-446)。另外的赖氨酸残基(K)有时出现在Fc部分的极端C-末端,但通常从成熟抗体切割。Fc部分内的每个氨基酸位置已根据Kabat的本领域公认的EU编号系统(参见,例如,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Dept.Health

and Human Services, 1983 and 1987中) 进行编号。

[0240] 优选地, 在本发明的环境中, Fc部分包含下列至少一者: 铰链(例如, 上、中和/或下铰链区) 结构域、CH2结构域、CH3结构域、或其变体、部分、或片段。在优选的实施方式中, Fc部分至少包含铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域。更优选地, Fc部分是完整的Fc部分。Fc部分相对于天然存在的Fc部分还可包含一个或多个氨基酸插入、缺失或取代。例如, 可缺失铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域(或其部分) 中的至少一个。例如, Fc部分可包含下列或由下列组成: (i) 与CH2结构域(或其部分) 融合的铰链结构域(或其部分), (ii) 与CH3结构域(或其部分) 融合的铰链结构域(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。

[0241] 本领域普通技术人员将理解, 可修饰Fc部分使得其氨基酸序列不同于天然存在的免疫球蛋白分子的完整Fc部分, 同时保留天然存在的Fc部分赋予的至少一种期望的功能。这种功能包括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公知的。

[0242] 例如, 为激活补体, 级联C1q结合至与抗原性靶标相连的至少两个IgG1分子或一个IgM分子(Ward, E. S., 和Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94)。Burton, D. R., 描述(*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) 包含第318至337位的氨基酸残基的重链区参与补体固定。Duncan, A. R. 和Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740) 利用位点定向诱变, 报道Glu318、Lys320和Lys322形成与C1q的结合位点。Glu318、Lys320和Lys 322残基在结合C1q中的作用通过包含这些残基的短合成肽抑制补体介导的裂解能力得到证实。

[0243] 例如, FcR结合可通过(抗体)的Fc部分与造血细胞上的特异性细胞表面受体Fc受体(FcRs) 的相互作用来介导。Fc受体属于免疫球蛋白超家族, 并显示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(ADCC; Van de Winkel, J. G., and Anderson, C. L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524) 裂解被对应抗体包被的红细胞和各种其它细胞靶标(例如肿瘤细胞)。FcRs通过其对免疫球蛋白类的特异性来限定; IgG抗体的Fc受体称为Fc γ R, IgE的Fc受体称为Fc ϵ R, IgA的Fc受体称为Fc α R等, 并且新生儿Fc受体称为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中。

[0244] 受体通过天然IgG抗体(Fc γ R)的Fc结构域的交联触发多种效应子功能, 包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性和炎性介质的释放以及免疫复合物清除和抗体生产的调节。因此, 优选提供受体(Fc γ R)的交联的Fc部分。在人中, 已经表征了三类Fc γ R, 其为: (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 R II (CD32), 其以中等至低亲和力结合复合IgG, 具体在白细胞上广泛表达, 已知是抗体介导的免疫的核心参与者(central player), 并且可分为在免疫系统中执行不同功能的Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIC, 但以类似低亲和力结合IgG-Fc, 并且这些受体的胞外结构域高度同源; 和(iii) Fc γ R III (CD16), 其以中度至低亲和力结合IgG并以两种类型存在: 在NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和一些单核细胞和T细胞和介导ADCC上

发现的Fc γ RIIIA,和在嗜中性粒细胞上高度表达的Fc γ RIIIB。Fc γ RIIA发现于与杀伤有关的多种细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞)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,并发现于B细胞、巨噬细胞和肥大细胞和嗜酸性粒细胞上。重要的是,在肝脏中发现了所有Fc γ RIIIB的75% (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在肝窦内皮(称为LSEC)上大量表达,并且肝脏中的枯否细胞和LSEC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)。

[0245] 因此,在本发明中,优选这种抗体及其抗原结合片段,其能够结合Fc γ RIIb,例如,包含用于结合Fc γ RIIb的Fc部分具体为Fc区域的抗体,如例如IgG型抗体。此外,可通过引入突变S267E和L328F来工程化Fc部分以增强Fc γ RIIIB结合,如由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中所描述。由此,可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,在本发明的环境中,优选这种抗体或其抗原结合片段,其包含具有突变S267E和L328F的工程化Fc部分,具体如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中所描述。

[0246] 在B细胞上,其似乎起抑制进一步免疫球蛋白生产和同种型转化(例如说IgE类)的作用。在巨噬细胞上,Fc γ RIIIB充当抑制通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞上,b形式可通过IgE与其独立受体的结合来帮助抑制这些细胞的激活。

[0247] 关于Fc γ RI结合,E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329中的至少一种在天然IgG中的修饰降低了与Fc γ RI的结合。被取代成IgG1和IgG4的第233-236位的IgG2残基将与Fc γ RI的结合降低 10^3 倍并消除人单核细胞对抗体致敏的红细胞的应答(Armour, K.L. 等人, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624)。关于Fc γ RII结合,例如对于E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414中的至少一种的IgG突变,发现对Fc γ RIIA的结合降低。关于Fc γ RIII结合,例如对于E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376中的至少一种的突变,发现对Fc γ RIIIA的结合降低。人IgG1上对Fc受体的结合位点的图谱、前述突变位点和测量结合Fc γ RI和Fc γ RIIA的方法描述于Shields, R.L. 等人, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604中。

[0248] 关于与关键Fc γ RII的结合,天然IgG Fc的两个区域似乎对于Fc γ RII和IgGs,即(i) IgG Fc的下铰链位点,具体为氨基酸残基L、L、G、G (234-237, EU编号)和(ii) IgG Fc的CH2结构域的相邻区域,具体为与下铰链区域(例如在P331的区域中)相邻的上CH2结构域中

的环和链(Wines,B.D.等人,J.Immunol.2000;164:5313-5318)的相互作用至关重要。此外,Fc γ RI似乎结合至IgG Fc上的相同位点,然而FcRn和蛋白A结合似乎位于CH2-CH3交界处的IgG Fc上的不同位点(Wines,B.D.等人,J.Immunol.2000;164:5313-5318)。

[0249] 例如,Fc部分可包含下列或由下列组成:本领域已知FcRn结合或延长的半衰期所需的Fc部分的至少一部分。可选地或另外地,本发明的抗体的Fc部分包含蛋白A结合所需的至少本领域已知的部分和/或本发明的抗体的Fc部分包含蛋白G结合所需的本领域已知的Fc分子的至少一部分。优选的Fc部分包含Fc γ R结合所需的至少本领域已知的部分。如上所述,因此,优选的Fc部分可至少包含(i)天然IgG Fc的下铰链位点,具体为氨基酸残基L、L、G、G(234-237,EU编号)和(ii)天然IgG Fc的CH2结构域的相邻区域,具体为与下铰链区(例如P331的区域中)相邻的上CH2结构域,例如在P331附近(例如在天然IgG Fc的氨基酸320和340(EU编号)之间)的天然IgG Fc的上CH2结构域中的至少3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的区域中的环和链。

[0250] 优选地,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”指代由抗体重链的两个或更多个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(例如,在单个连续核酸序列中编码)的单个多肽链内连接的Fc部分组成。WO 2008/143954 A2中公开了示例性scFc区。优选地,Fc区是二聚体Fc区。“二聚体Fc区”或“dcFc”指代由两个单独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(例如,天然存在的免疫球蛋白的Fc区)的同二聚体或两个不同Fc部分的异二聚体。

[0251] Fc区的Fc部分可以是相同或不同的类和/或亚类。例如,Fc部分可衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的免疫球蛋白(例如,人免疫球蛋白)。优选地,Fc区的Fc部分具有相同的类和亚类。然而,Fc区(或Fc区的一个或多个Fc部分)还可以是嵌合的,借此嵌合Fc区可包含衍生自不同免疫球蛋白类和/或亚类的Fc部分。例如,嵌合或单链Fc区的Fc部分中的至少两个可来自不同的免疫球蛋白类和/或亚类。另外地或可选地,嵌合Fc区可包含一个或多个嵌合的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个部分,而Fc区或部分的其余部分具有不同的亚类。例如,Fc多肽的Fc区或部分可包含衍生自第一亚类(例如,IgG1、IgG2或IgG4亚类)的免疫球蛋白的CH2和/或CH3结构域和来自第二亚类(例如,IgG3亚类)的免疫球蛋白的铰链区。例如,Fc区或部分可包含衍生自第一亚类(例如,IgG4亚类)的免疫球蛋白的铰链和/或CH2结构域和来自第二亚类(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的CH3结构域。例如,嵌合Fc区可包含来自第一亚类(例如,IgG4亚类)的免疫球蛋白的Fc部分(例如,完整的Fc部分)的和来自第二亚类(例如,IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的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结构域和来自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结构域的部分,例如CH2结构域的EU位置292-340。例如,Fc区或部分可包含衍生自IgG4部分的CH2的第292-340位的氨基酸和衍生自IgG1部分的CH2的其余部分(可选地,CH2的292-340可衍生自IgG1部分,并且CH2的其余部分衍生自IgG4部分)。

[0252] 此外,Fc区或部分可(另外地或可选地)例如包含嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可例

如部分衍生自IgG1、IgG2或IgG4分子(例如,上和下中铰链序列),和部分衍生自IgG3分子(例如,中铰链序列)。在另一实例中,Fc区或部分可包含部分衍生自IgG1分子和部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。在另一实例中,嵌合铰链可包含来自IgG4分子的上和下铰链结构域和来自IgG1分子的中铰链结构域。这种嵌合铰链可例如通过在IgG4铰链区的中铰链结构域中的EU位置228处引入脯氨酸取代(Ser228Pro)来制备。在另一实施方式中,嵌合铰链可包含来自IgG2抗体和/或Ser228Pro突变体的EU位置233-236处的氨基酸,其中铰链的其余氨基酸来自IgG4抗体(例如,序列ESKYGPPCPPCPAPPVAGP的嵌合铰链)。可用于根据本发明的抗体的Fc部分的进一步的嵌合铰链描述于US2005/0163783 A1中。

[0253] 在本发明中,优选Fc部分或Fc区包含下列或由下列组成:衍生自人免疫球蛋白序列(例如,来自人IgG分子的Fc区或Fc部分)的氨基酸序列。然而,多肽可包含来自另一哺乳动物物种的一个或多个氨基酸。例如,灵长类动物Fc部分或灵长类动物结合位点可包括在本主题的多肽中。可选地,一个或多个鼠氨基酸可存在于Fc部分或Fc区中。

[0254] 优选地,根据本发明的抗体包含——具体除上述Fc部分之外——衍生自恒定区,具体为IgG的恒定区,优选IgG1的恒定区,更优选人IgG1的恒定区的其它部分。更优选地,根据本发明的抗体包含——具体除上述Fc部分之外——恒定区的所有其它部分,具体为IgG的恒定区的所有其它部分,优选IgG1的恒定区的所有其它部分,更优选人IgG1恒定区的所有其它部分。

[0255] 恒定区的特别优选的序列为根据SEQ ID NOs:313-315的氨基酸序列(根据SEQ ID NOs:316-318的核酸序列)。优选地,如本文所述,IgG1 CH1-CH2-CH3的氨基酸序列是根据SEQ ID NO:313或其功能性序列变体。

[0256] 如上所述,根据本发明的特别优选的抗体包含衍生自人IgG1的(完整)Fc区。更优选地,根据本发明的抗体还包含——具体除衍生自人IgG1的(完整)Fc区之外——IgG的恒定区的所有其它部分,优选IgG1的恒定区的所有其它部分,更优选人IgG1的恒定区的所有其它部分。

[0257] 优选地,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/结合未受损。总体上,抗体与Fc受体的结合可通过技术人员已知的各种方法如ELISA(Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthal DN, Parren PWI, 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)或流式细胞术(Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC:Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: aspecific 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)来评价。

[0258] 总体上,根据本发明的抗体可被糖基化。连接到重链的CH2结构域的N-连接的聚糖例如可影响C1q和FcR与对这些受体具有低亲和力的糖基化抗体的结合。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个突变,其中糖基化残基被非糖基化残基取代。聚糖结构也可影响活性,例如根据聚糖双天线链末端的半乳糖的数量(0、1或2)可以看到补体介导的细胞凋亡的差异。优选地,施用后抗体的聚糖不导致人免疫原性应答。

[0259] 此外,可通过将随机氨基酸突变引入重链的CH2或CH3结构域的特定区域来修饰根据本发明的抗体,以改变其对FcR的结合亲和力和/或其与未修饰抗体相比的血清半衰期。这种修饰的实例包括但不限于来自选自氨基酸残基250、314和428的重链恒定区的至少一种氨基酸的取代。

[0260] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含由包含VH3基因家族的基因(片段)优选基因(片段)VH3-30的核酸编码的抗体或其抗原结合片段的重链的可变区(VH)。

[0261] 总体上,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选地包含重链上的(至少)三个互补决定区(CDRs)和轻链上的(至少)三个CDRs。总体上,互补决定区(CDRs)是存在于重链可变结构域和轻链可变结构域中的高度可变区。典型地,抗体的重链和连接的轻链的CDRs一起形成抗原受体。通常,三个CDRs(CDR1、CDR2和CDR3)非连续地排列在可变结构域中。由于抗原受体典型地由(两个不同多肽链,即重链和轻链)上的两个可变结构域构成,因此每个抗原受体有六个CDRs(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。单个抗体分子通常具有两个抗原受体,因此包含十二个CDRs。重链和/或轻链上的CDRs可被框架区分开,借此框架区(FR)是比CDR较小“可变的”的可变结构域中的区域。例如,链(或分别每条链)可由被三个CDRs分开的四个框架区构成。

[0262] 确定了包含重链上的三个不同CDRs和轻链上的三个不同CDRs的本发明示例性抗体的重链和轻链的序列。根据IMGT编号系统(IMGT:<http://www.imgt.org/>;cf.Lefranc, M.-P.etal.(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)限定CDR氨基酸的位置。

[0263] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NOs:66、84、138、156、208、226、260、278和296中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0264] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中至少一个CDR,优选地至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NOs:66、84、138、208、226和278中任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:66或根据SEQ ID NO:226;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:208或根据SEQ ID NO:278;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中至少一个CDR,优选至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:84或根据SEQ ID NO:138;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0265] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0266] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:64、82、136、154、206、224、258、276和294中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0267] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:65、83、137、155、207、225、259、277和295中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0268] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:66、84、138、156、208、226、260、278和296中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的其功能性序列变体。

[0269] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0270] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:64、82、136、206、224和276中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0271] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:65、83、137、207、225和277中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0272] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:66、84、138、208、226和278中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0273] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0274] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:64或根据SEQ ID NO:224;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0275] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:65或根据SEQ ID NO:225;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0276] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:66或根据SEQ ID NO:226;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0277] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0278] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:206或根据SEQ ID NO:276;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0279] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:207或根据SEQ ID NO:277;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0280] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:208或根据SEQ ID NO:278;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0281] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0282] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:82或根据SEQ ID NO:136;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0283] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:83或根据SEQ ID NO:137;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

和/或

[0284] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:84或根据SEQ ID NO:138;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0285] 还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0286] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:67、85、139、157、209、227、261、279和297中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0287] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:68、69、86、87、140、141、158、159、210、211、228、229、262、263、280、281、298和299中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0288] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:70、88、142、160、212、230、264、282和300中的任一项或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0289] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0290] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:67、85、139、209、227和279中的任一项;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0291] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:68、69、86、87、140、141、210、211、228、229、280和281;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0292] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NOs:70、88、142、212、230和282中的任一项;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0293] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0294] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:67;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；

[0295] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:68或69;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0296] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:70;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0297] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0298] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:209;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0299] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:210或211;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0300] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0301] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0302] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:227;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0303] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:228或229;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0304] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0305] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0306] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:279;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0307] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:280或281;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；和/或

[0308] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含下列氨基酸：根据SEQ ID NO:282；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0309] 特别优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链，其中

[0310] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:139；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；

[0311] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:140或141；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；和/或

[0312] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:142；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0313] 最优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链，其中

[0314] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:85；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；

[0315] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:86或87；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；和/或

[0316] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列：SEQ ID NO:88；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0317] 优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列：(i) SEQ ID NOs:64-66；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ii) SEQ ID NOs:82-84；或其具有至少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%的序列同一性的功能性序列变体；(iii) SEQ ID NOs:136-138；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(iv) SEQ ID NOs:154-156；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(v) SEQ ID NOs:206-208；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vi) SEQ ID NOs:224-226；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vii) SEQ ID NOs:258-260；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(viii) SEQ ID NOs:276-278；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ix) SEQ ID NOs:294-296；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0318] 还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列：(i) SEQ ID NOs:64-68和70；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ii) SEQ ID NOs:64-67和69-70；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(iii) SEQ ID NOs:82-86和88；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(iv) SEQ ID NOs:82-85和87-88；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(v) SEQ ID NOs:136-140和142；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vi) SEQ ID NOs:136-139和141-142；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vii) SEQ ID NOs:154-158和160；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(viii) SEQ ID NOs:154-157和159-160；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ix) SEQ ID NOs:206-210和212；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；或(x) SEQ ID NOs:206-209和211-212；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；或(xi) SEQ ID NOs:224-228和230；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；或(xii) SEQ ID NOs:224-227和229-230；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；或(xiii) SEQ ID

N0s: 258-262和264;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xiv) SEQ ID N0s: 258-261和263-264;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xv) SEQ ID N0s: 276-280和282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xvi) SEQ ID N0s: 276-279和281-282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xvii) SEQ ID N0s: 294-298和300;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xviii) SEQ ID N0s: 294-297和299-300;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0319] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) 分别SEQ ID N0s: 64-68和70;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID N0s: 64-67和69-70;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0320] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID N0s: 224-228和230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID N0s: 224-227和229-230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0321] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID N0s: 276-280和282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID N0s: 276-279和281-282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0322] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID N0s: 206-210和212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ

ID NOs:206-209和211-212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0323] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:136-140和142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(ii) SEQ ID NOs:136-139和141-142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0324] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:82-86和88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(ii) SEQ ID NOs:82-85和87-88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0325] 另外,还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和任选地轻链可变区(VL),其中重链可变区(VH)包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NOs:71、89、143、161、213、231、265、283和301中的任一项;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0326] 此外,还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据下列的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:71或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区(VL)氨基酸序列:SEQ ID NO:72或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(ii)根据下列的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:89或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区(VL)氨基酸序列:SEQ ID NO:90或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(iii)根据下列的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:143或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区(VL)氨基酸序列:SEQ ID NO:144或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(iv)根据下列的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:161或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:162或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(v)根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:213或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:214或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (vi) 根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:231或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:232或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (vii) 根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:265或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:266或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (viii) 根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:283或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:284或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ix)根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:301或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:302或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0327] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:71或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:72或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0328] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:231或其具有至少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%序列同一性的功

能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:232或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0329] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:283或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:284或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0330] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:213或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:214或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0331] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:143或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:144或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0332] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:89或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:90或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0333] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段为gMGG3、gMGG4、gMGH2、gMGH3、gMGU5、gMGU8、gMGU11、gMGU12或gMGV3,优选地抗体或其抗原结合片段为gMGG3、gMGG4、gMGH2、gMGU5、gMGU8或gMGU12,更优选地抗体或其抗原结合片段为gMGG4或gMGH2。

[0334] 本发明人已分离出根据本发明的单克隆抗体 (mAb),其在本文称为MGG3、MGG4、MGH2、MGH3、MGU5、MGU8、MGU11、MGU12和MGV3(cf.表1和2、实施例1)。基于那些抗体,具体基于那些抗体的VH和VL基因,术语“gMGG3”、“gMGG4”、“gMGH2”、“gMGH3”、“gMGU5”、“gMGU8”、“gMGU11”、“gMGU12”和“gMGV3”,如本文所用,指代相应的“通用的”抗体或其抗原结合片段。

[0335] 即,“gMGG3”指代具有根据SEQ ID NO:64的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:65的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:66的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:67的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:68或69的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:70的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0336] “gMGG4”指代具有根据SEQ ID NO:82的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:83的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:84的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:85的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:86或87的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:88的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0337] “gMGH2”指代具有根据SEQ ID NO:136的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:137的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:138的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:139的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:140或141的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:142的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:143的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0338] “gMGH3”指代具有根据SEQ ID NO:154的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:155的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:156的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:157的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:158或159的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:160的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:161的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:162的氨基酸序列。

[0339] “gMGU5”指代具有根据SEQ ID NO:206的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:207的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:208的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:209的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:210或211的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:212的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:213的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:214的氨基酸序列。

[0340] “gMGU8”指代具有根据SEQ ID NO:224的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:225的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:226的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:227的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:228或229的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:230的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:231的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:232的氨基酸序列。

[0341] “gMGU11”指代具有根据SEQ ID NO:258的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:259的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:260的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:261的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:262或263的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:264的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:265的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:266的氨基酸序列。

[0342] “gMGU12”指代具有根据SEQ ID NO:276的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:277的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:278的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:279的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:280或281的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:282的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:283的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:284的氨基酸序列。

[0343] “gMGV3”指代具有根据SEQ ID NO:294的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:295的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:296的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:297的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:298或299的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:300的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:301的氨基

酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:302的氨基酸序列。

[0344] 与恶性疟原虫子孢子结合的抗体

[0345] 在进一步方面,本发明提供了(特异性)结合恶性疟原虫子孢子的抗体或其抗原结合片段。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段(特异性)结合疟原虫环孢子蛋白,最优选地(特异性)结合根据SEQ ID NO:24的疟原虫环孢子蛋白。换言之,根据本发明的抗体或其抗原结合片段能够识别表位,具体为CSP表位。

[0346] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段为人抗体。还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体,优选为人单克隆抗体。此外,还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段为重组抗体。

[0347] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含上述Fc部分。应理解与根据本发明的肽结合的根据本发明的抗体的Fc部分的优选实施方式对应于与恶性疟原虫子孢子结合的根据本发明的抗体的Fc部分的优选实施方式。例如,Fc部分优选衍生自人来源,例如人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4,借此特别优选人IgG1。

[0348] 对于根据本发明的所有抗体,即结合根据本发明的肽的抗体和结合恶性疟原虫子孢子的抗体,还优选抗体或其抗原结合片段不包含Fc部分。具体优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段为纯化抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

[0349] 如上所述,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选地包含重链上的(至少)三个互补决定区(CDRs)和轻链上的(至少)三个CDRs。总体上,互补决定区(CDRs)为存在于重链可变结构域和轻链可变结构域中的高度可变区。典型地,抗体的重链和连接的轻链的CDRs一起形成抗原受体。通常,三个CDRs(CDR1、CDR2和CDR3)非连续地排列在可变结构域中。由于抗原受体典型地由(两个不同多肽链,即重链和轻链上)的两个可变结构域构成,因此每个抗原受体有六个CDRs(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。单个抗体分子通常具有两个抗原受体并且因此含有十二个CDRs。重链和/或轻链的CDRs可由框架区分开,借此框架区(FR)是比CDR较小“可变”的可变结构域中的区域。例如,链(或分别每条链)可由被三个CDRs分开的四个框架区构成。

[0350] 确定了包含重链上的三个不同CDRs和轻链上的三个不同CDRs的本发明的示例性抗体的重链和轻链的序列。根据IMGT编号系统(IMGT:<http://www.imgt.org/>;cf.Lefranc, M.-P.et al.(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)限定CDR氨基酸的位置。

[0351] 下表1显示了根据本发明的示例性抗体的重链CDRs(CDRH1、CDRH2和CDRH3)和重链可变区(称为“VH”)的氨基酸序列的SEQ ID NOs:

[0352]

抗体名称	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
MGG1	28	29	30	35
MGG2	46	47	48	53
MGG3	64	65	66	71
MGG4	82	83	84	89
MGG8	100	101	102	107
MGH1	118	119	120	125
MGH2	136	137	138	143
MGH3	154	155	156	161

MGU1	172	173	174	178
MGU3	188	189	190	195
MGU5	206	207	208	213
MGU8	224	225	226	231
MGU10	242	243	244	248
MGU11	258	259	260	265
MGU12	276	277	278	283
MGV3	294	295	296	301

[0353] 表1。

[0354] 下表2显示了根据本发明的示例性抗体的轻链CDRs (CDRL1、CDRL2和CDRL3) 和轻链可变区(称为“VL”)的氨基酸序列的SEQ ID NOs:

抗体名称	CDRL1	CDRL2	CDRL2长	CDRL3	VL
MGG1	31	32	33	34	36
MGG2	49	50	51	52	54
MGG3	67	68	69	70	72
MGG4	85	86	87	88	90

[0355]

MGG8	103	104	105	106	108
MGH1	121	122	123	124	126
MGH2	139	140	141	142	144
MGH3	157	158	159	160	162
MGU1	175	176	—	177	179
MGU3	191	192	193	194	196
MGU5	209	210	211	212	214
MGU8	227	228	229	230	232
MGU10	245	246	—	247	249
MGU11	261	262	263	264	266
MGU12	279	280	281	282	284
MGV3	297	298	299	300	302

[0356]

[0357] 表2。

[0358] 因此, 优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含与表1和/或表2中所示的CDR序列、VH序列和/或VL序列中的至少一个具有至少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%同一性的氨基酸序列。

[0359] 优选地, 根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链, 其中至少一个CDR, 优选至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列或由根据下

列的氨基酸序列组成:SEQ ID N0s:30、48、66、84、102、120、138、156、174、190、208、226、260、244、278和296中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体

[0360] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0361] (i) 至少一个重链CDRH1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:28、46、64、82、100、118、136、154、172、188、206、224、242、258、276和294中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0362] (ii) 至少一个CDRH2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:29、47、65、83、101、119、137、155、173、189、207、225、243、259、277和295中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0363] (iii) 至少一个重链CDRH3包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:30、48、66、84、102、120、138、156、174、190、208、226、260、244、278和296中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0364] 还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括包含至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3的重链和包含至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3的轻链,其中

[0365] (i) 至少一个CDRL1包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:31、49、67、85、103、121、139、157、175、191、209、227、245、261、279和297中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;

[0366] (ii) 至少一个CDRL2包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:32、33、50、51、68、69、86、87、104、105、122、123、140、141、158、159、176、192、193、210、211、228、229、246、262、263、280、281、298和299中的任一项,或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;和/或

[0367] (iii) 至少一个CDRL3氨基包含根据下列的氨基酸序列:SEQ ID N0s:34、52、70、88、106、124、142、160、177、194、212、230、247、264、282和300中的任一项或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0368] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列:(i) SEQ ID N0:64-66s;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;(ii) SEQ ID N0s:82-84;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(iii) SEQ ID NOs:136-138；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(iv) SEQ ID NOs:154-156；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(v) SEQ ID NOs:206-208；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vi) SEQ ID NOs:224-226；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(vii) SEQ ID NOs:258-260；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(viii) SEQ ID NOs:276-278；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ix) SEQ ID NOs:294-296；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(x) SEQ ID NOs:28-30；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(xi) SEQ ID NOs:46-48；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(xii) SEQ ID NOs:100-102；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(xiii) SEQ ID NOs:118-120；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(xiv) SEQ ID NOs:172-174；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(xv) SEQ ID NOs:188-190；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；或(xvi) SEQ ID NOs:242-244；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0369] 优选地，根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列：(i) SEQ ID NOs:64-68和70的；或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体；(ii) SEQ ID NOs:64-67和69-70；或其具有至少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%序列同一性的功能性

序列变体; (iii) SEQ ID NOs:82-86和88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (iv) SEQ ID NOs:82-85和87-88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (v) SEQ ID NOs:136-140和142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (vi) SEQ ID NOs:136-139和141-142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (vii) SEQ ID NOs:154-158和160;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (viii) SEQ ID NOs:154-157和159-160;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体; (ix) SEQ ID NOs:206-210和212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (x) SEQ ID NOs:206-209和211-212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xi) SEQ ID NOs:224-228和230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xii) SEQ ID NOs:224-227和229-230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xiii) SEQ ID NOs:258-262和264;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xiv) SEQ ID NOs:258-261和263-264;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xv) SEQ ID NOs:276-280和282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xvi) SEQ ID NOs:276-279和281-282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xvii) SEQ ID NOs:294-298和300;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xviii) SEQ ID NOs:294-297和299-300;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或 (xix) SEQ ID NOs:28-32和34;或其具有至少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%序列同一性的功能

性序列变体;或(xx)SEQ ID NOs:28-31和33-34;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxi)SEQ ID NOs:46-50和52;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxii)SEQ ID NOs:46-49和51-52;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxiii)SEQ ID NOs:100-104和106;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxiv)SEQ ID NOs:100-103和105-106;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxv)SEQ ID NOs:118-122和124;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxvi)SEQ ID NOs:118-121和123-124;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxvii)SEQ ID NOs:172-176和178;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxviii)SEQ ID NOs:172-177;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxix)SEQ ID NOs:188-192和194;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxx)SEQ ID NOs:188-191和193-194;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(xxxi)SEQ ID NOs:242-247;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0370] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i)分别SEQ ID NOs:64-68和70;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii)SEQ ID NOs:64-67和69-70;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0371] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i)SEQ ID NOs:224-228和230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii)SEQ ID

NOs:224-227和229-230;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0372] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:276-280和282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID NOs:276-279和281-282;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0373] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:206-210和212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID NOs:206-209和211-212;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0374] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:136-140和142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID NOs:136-139和141-142;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0375] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) SEQ ID NOs:82-86和88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体;或(ii) SEQ ID NOs:82-85和87-88;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0376] 另外,还优选根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和任选地轻链可变区(VL),其中重链可变区(VH)包含根据下列的氨基酸序列或由根据下列的氨基酸序列组成:SEQ ID NOs:35、53、71、89、107、125、143、161、178、195、213、231、248、265、283和301中的任一项;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0377] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含(i)根据下列的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:71或其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少

或至少99%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列: SEQ ID NO:249或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0378] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:71或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:72或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0379] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:231或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:232或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0380] 甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:283或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:284或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0381] 仍更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:213或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:214或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0382] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:143或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:144或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0383] 最优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据下列的重链可变区 (VH) 氨基酸序列:SEQ ID NO:89或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体和/或根据下列的轻链可变区 (VL) 氨基酸序列:SEQ ID NO:90或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0384] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段为gMGG1、gMGG2、gMGG3、gMGG4、gMGG8、gMGH1、gMGH2、gMGH3、gMGU1、gMGU3、gMGU5、gMGU8、gMGU10、gMGU11、gMGU12或gMGV3,优选地抗体或其抗原结合片段为gMGG3、gMGG4、gMGH2、gMGU5、gMGU8或gMGU12,更优选地抗体或其抗原结合片段为gMGG4或gMGH2。

[0385] 本发明人已经分离出根据本发明的单克隆抗体(mAb),其在本文称为MGG1、MGG2、MGG3、MGG4、MGG8、MGH1、MGH2、MGH3、MGU1、MGU3、MGU5、MGU8、MGU10、MGU11、MGU12和MGV3(cf.表1和2、实施例1)。基于那些抗体,具体基于那些抗体的VH和VL基因,术语“gMGG1”、“gMGG2”、“gMGG3”、“gMGG4”、“gMGG8”、“gMGH1”、“gMGH2”、“gMGH3”、“gMGU1”、“gMGU3”、“gMGU5”、“gMGU8”、“gMGU10”、“gMGU11”、“gMGU12”和“gMGV3”,如本文所用,指代相应的“通用的”抗体或其抗原结合片段。

[0386] 即,“gMGG1”指代具有根据SEQ ID NO:28的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:29的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:30的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:31的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:32或33的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:34的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:35的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0387] “gMGG2”指代具有根据SEQ ID NO:46的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:47的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:48的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:49的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:50或51的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:52的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:53的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0388] “gMGG3”指代具有根据SEQ ID NO:64的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:65的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:66的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:67的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:68或69的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:70的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:71的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0389] “gMGG4”指代具有根据SEQ ID NO:82的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:83的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:84的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:85的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:86或87的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:88的CDRL3氨基酸序列的点抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选地具有根据SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0390] “gMGG8”指代具有根据SEQ ID NO:100的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:101的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:102的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:103的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:104或105的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:106的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区(V_H)优选具有根据SEQ ID NO:107的氨基酸序列并且轻链可变区(V_L)优选具有根据SEQ ID NO:108的氨基酸序列。

[0391] “gMGH1”指代具有根据SEQ ID NO:118的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:119的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:120的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:121的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:122或123的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:124的CDRL3氨

氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:125的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:126的氨基酸序列。

[0392] “gMGH2”指代具有根据SEQ ID NO:136的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:137的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:138的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:139的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:140或141的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:142的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:143的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选地具有根据SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0393] “gMGH3”指代具有根据SEQ ID NO:154的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:155的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:156的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:157的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:158或159的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:160的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:161的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:162的氨基酸序列。

[0394] “gMGU1”指代具有根据SEQ ID NO:172的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:173的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:174的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:175的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:176的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:177的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:178的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:179的氨基酸序列。

[0395] “gMGU3”指代具有根据SEQ ID NO:188的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:189的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:190的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:191的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:192或193的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:194的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:195的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:196的氨基酸序列。

[0396] “gMGU5”指代具有根据SEQ ID NO:206的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:207的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:208的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:209的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:210或211的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:212的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:213的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:214的氨基酸序列。

[0397] “gMGU8”指代具有根据SEQ ID NO:224的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:225的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:226的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:227的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:228或229的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:230的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:231的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:232的氨基酸序列。

[0398] “gMGU10”指代具有根据SEQ ID NO:242的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:243的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:244的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:245的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:246的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:247的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:248的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:249的氨基酸序列。

[0399] “gMGU11”指代具有根据SEQ ID NO:258的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:259的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:260的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:261的CDRL1

氨基酸序列、根据SEQ ID NO:262或263的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:264的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:265的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:266的氨基酸序列。

[0400] “gMGU12”指代具有根据SEQ ID NO:276的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:277的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:278的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:279的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:280或281的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:282的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:283的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:284的氨基酸序列。

[0401] “gMGV3”指代具有根据SEQ ID NO:294的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:295的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:296的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:297的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:298或299的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:300的CDRL3氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。重链可变区 (V_H) 优选具有根据SEQ ID NO:301的氨基酸序列并且轻链可变区 (V_L) 优选具有根据SEQ ID NO:302的氨基酸序列。

[0402] 抗体的任选另外的特征

[0403] 本发明的抗体(即结合恶性疟原虫子孢子的抗体和结合本发明的肽的抗体)及其抗原结合片段可偶联至例如用于递送至治疗位点的药物或偶联至可检测的标记物,以促进包含目的细胞的位点成像。将抗体偶联至药物和可检测标记的方法以及使用可检测标记成像是本领域公知的。标记的抗体可用于采用多种标记物的多种检测中。通过将可检测物质连接至抗体可促进例如在本发明的抗体与目的表位之间或在根据本发明的肽或蛋白质与抗体之间检测抗体-抗原复合物的形成。合适的检测手段包括使用标记物,如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、发色团、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基复合物、自由基、颗粒、染料等。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例为鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;并且合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、或 ^3H 。这样的标记试剂可用于多种公知的测定,如放射免疫测定、酶免疫测定例如ELISA、荧光免疫测定等。因此,根据本发明的标记抗体可用于例如US 3,766,162;US 3,791,932;US 3,817,837;和US 4,233,402中描述的这种测定中。

[0404] 根据本发明的抗体可缀合至治疗部分,如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子或放射性同位素。放射性同位素的实例包括但不限于I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、Bi-213、Pd-109、Tc-99、In-111等。这种抗体缀合物可用于修饰给定的生物应答;药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有期望的生物学活性的蛋白质或多肽。这种蛋白质可包括例如毒素,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素。

[0405] 将这种治疗部分与抗体缀合的技术是公知的。参见,例如,Arnon等人(1985)“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,ed.Reisfeld等人(Alan R.Liss,Inc.), pp.243-256;ed.Hellstrom等人(1987)“Antibodies for Drug Delivery,”in Controlled

Drug Delivery, ed. Robinson 等人 (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera 等人 pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin 等人 (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; and Thorpe 等人 (1982) Immunol. Rev. 62: 119-158.

[0406] 可选地, 抗体或其抗体片段可与第二抗体或其抗体片段缀合, 以形成如US 4, 676, 980中所述的抗体异源缀合物。另外, 可在标记物和本发明的抗体之间使用接头, 例如, 如US 4, 831, 175中所述。抗体或其抗原结合片段可用放射性碘、铟、钷或本领域已知的其它放射性颗粒直接标记, 例如, 如US 5, 595, 721中所述。治疗可由同时或随后给予的缀合或非缀合抗体的治疗的组合组成, 例如, 如W000/52031; W000/52473中所述。

[0407] 本发明的抗体还可连接至固体支持物上。另外, 本发明的抗体或其功能性抗体片段可通过与聚合物共价缀合而被化学修饰, 以例如增加其循环半衰期。聚合物的实例和将其连接至肽的方法显示于US 4, 766, 106; US 4, 179, 337; US 4, 495, 285和US 4, 609, 546中。在一些实施方式中, 聚合物可选自聚氧乙基化多元醇和聚乙二醇 (PEG)。PEG在室温下可溶于水并具有通式: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$, 其中R可以是氢或保护基团, 如烷基或烷醇基。优选地, 保护基团可具有1至8个碳。例如, 保护基团是甲基。符号n是正整数。在一个实施方式中, n在1和1, 000之间。在另一实施方式中, n在2和500之间。优选地, PEG的平均分子量在1, 000和40, 000之间, 更优选地PEG的分子量在2, 000和20, 000之间, 甚至更优选地PEG的分子量在3, 000和12, 000之间。此外, PEG可具有至少一个羟基, 例如, PEG可具有末端羟基。例如, 末端羟基被激活以与抑制剂上的游离氨基反应。然而, 将理解, 可改变反应性基团的类型和量以实现本发明的共价缀合的PEG/抗体。

[0408] 水溶性聚氧乙基化多元醇也可用于本发明。其包括聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油 (POG) 等。在一个实施方式中, 使用POG。不受任何理论的束缚, 因为聚氧乙基化甘油的甘油骨架是天然存在于例如动物和人中的甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯中的相同骨架, 所以此分支将不一定被视为身体的外来剂。POG的分子量可与PEG在相同范围内。可用于增加循环半衰期的另一药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法是本领域技术人员已知的。其它药物递送系统是本领域已知的并且描述于例如Poznansky MJ和Juliano RL, 1984, Pharmacol. Rev. 36(4): 277-336中。

[0409] 本发明的抗体可以纯化形式提供。典型地, 抗体将存在于基本不含其它多肽 (例如, 其中小于90% (按重量计)、通常小于60%并且更通常小于50%的组合物由其它多肽组成) 的组合物中。

[0410] 本发明的抗体在非人 (或异源) 宿主例如小鼠中可以是免疫原性的。具体地, 抗体可具有在非人宿主但在人宿主中具有免疫原性的独特型。具体地, 用于人应用的本发明的抗体包括不能容易地从诸如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等宿主分离并且通常不能通过人源化或从异种小鼠中获得的抗体。

[0411] 抗体的生产

[0412] 可通过本领域已知的任何方法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公知的(Kohler,G.和Milstein,C,.1975;Kozbar等人1983)。

[0413] 优选地,使用W02004/076677中描述的EBV永生化方法。在此方法中,用EBV和多克隆B细胞激活剂转化生产本发明的抗体的B细胞。可在转化步骤中任选地添加细胞生长和分化的另外的刺激物,以进一步提高效率。这些刺激物可以是细胞因子,如IL-2和IL-15。在一个方面,在永生化步骤中添加IL-2以进一步改善永生化效率,但其使用不是必需的。然后可利用本领域已知的方法培养利用这些方法生产的永生化B细胞,并从中分离出抗体。

[0414] 另一优选的方法描述于W0 2010/046775中。在此方法中,将浆细胞进行有限数量的培养,或在微孔培养板中培养为单个浆细胞。可从浆细胞培养物分离抗体。进一步,可从浆细胞培养物中提取RNA并且可利用本领域已知的方法进行PCR。抗体的VH和VL区可通过RT-PCR(逆转录酶PCR)扩增,测序并克隆成然后将转染到HEK293T细胞或其它宿主细胞中的表达载体。表达载体中核酸的克隆、宿主细胞的转染、转染的宿主细胞的培养和生产的抗体的分离可利用本领域技术人员已知的任何方法来进行。

[0415] 如果需要,可利用过滤、离心和各种色谱法如HPLC和亲和色谱法进一步纯化抗体。纯化抗体例如单克隆抗体的技术,包括用于生产药物级抗体的技术是本领域公知的。

[0416] 可通过包括用酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化和/或通过化学还原切割二硫键的方法从抗体获得本发明的抗体的片段。可选地,可通过克隆和表达重链或轻链的部分序列来获得抗体的片段。抗体“片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明还包括衍生自本发明的抗体的重链和轻链的单链Fv片段(scFv)。例如,本发明包括包含来自本发明的抗体的CDRs的scFv。还包括重链或轻链单体和二聚体、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体,例如其中重链和轻链可变结构域通过肽接头连接的单链Fv。

[0417] 本发明的抗体片段可赋予单价或多价相互作用,并且包含在上述多种结构中。例如,可合成scFv分子以产生三价“三体”或四价“四体”。scFv分子可包括产生二价小抗体的Fc区的结构域。另外,本发明的序列可以是特异性分子的组分,其中本发明的序列靶向本发明的表位并且该分子的其它区域结合其它靶标。示例性分子包括但不限于双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、双特异性scFv和双抗体(Holliger和Hudson,2005,Nature Biotechnology 9:1126-1136)。

[0418] 分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明的抗体或抗体片段的DNA序列。可利用寡核苷酸合成技术直接或部分合成期望的DNA序列。可适当使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0419] 任何合适的宿主细胞/载体系统可用于表达编码本发明的抗体分子或其片段的DNA序列。细菌例如大肠杆菌和其它微生物系统可部分用于表达抗体片段,如Fab和F(ab')₂片段,尤其是Fv片段和单链抗体片段例如单链Fvs。真核生物例如哺乳动物宿主细胞表达系统可用于生产较大的抗体分子,包括完整的抗体分子。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。

[0420] 本发明还提供了用于生产根据本发明的抗体分子的方法,包括在适于从编码本发明的抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养包含编码本发明的核酸的载体的宿主细胞,和分离抗体分子。

[0421] 抗体分子可仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下,仅需使用编码序列的重链轻

链多肽以转染宿主细胞。为生产包含重链和轻链的产物,可用两种载体转染细胞系,编码轻链多肽的第一载体和编码重链多肽的第二载体。可选地,可使用单个载体,该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。可选地,根据本发明的抗体可通过(i)例如通过用根据本发明的载体在宿主细胞中表达根据本发明的核酸序列,和(ii)分离表达的抗体产物来生产。另外,该方法可包括(iii)纯化分离的抗体。可筛选转化的B细胞和培养的浆细胞用于生产期望的特异性或功能的抗体的那些。

[0422] 可通过任何免疫测定例如ELISA,通过组织或细胞(包括转染的细胞)的染色,通过中和测定或通过本领域已知的用于鉴定期望特异性或功能的其它方法中的一种来进行筛选步骤。测定可基于一种或多种抗原的简单识别来选择,或者可另外基于期望功能来选择,例如,以选择中和抗体而非仅结合抗原的抗体,以选择可通过其它细胞或通过其它试剂或通过条件的改变、其分化状态等来改变靶向的细胞的特征如其信号传导级联、其形状、其生长速率、其感染其它细胞的能力、其对感染的应答的抗体。

[0423] 然后可从阳性转化的B细胞培养物生产单个转化的B细胞克隆。可利用有限的稀释、显微操作、通过细胞分选的单细胞沉积或本领域已知的另一方法进行从阳性细胞的混合物中分离单个克隆的克隆步骤。

[0424] 可利用本领域已知的方法在HEK293T细胞或其它已知的宿主细胞中分离、克隆和表达来自培养的浆细胞的核酸。

[0425] 本发明的永生化B细胞克隆或转染的宿主细胞可以各种方式使用,例如,作为单克隆抗体来源、作为编码目的单克隆抗体的核酸(DNA或mRNA)来源、用于研究等等。

[0426] 本发明还提供了包含生产根据本发明的抗体的永生化B细胞或转染的宿主细胞的组合物。

[0427] 本发明的永生化B细胞克隆或培养的浆细胞也可用作核酸来源,用于克隆后续重组表达的抗体基因。例如,因为稳定性、可重复性、易于培养等,从重组来源表达在药学的目的上比从B细胞或杂交瘤表达更为常见。

[0428] 因此,本发明还提供了制备重组细胞的方法,包括以下步骤:(i)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得获得编码目的抗体的一种或多种核酸(例如,重链和/或轻链mRNAs);(ii)将核酸插入表达载体中和(iii)将载体转染到宿主细胞中以允许目的抗体在此宿主细胞中表达。

[0429] 类似地,本发明提供了制备重组细胞的方法,包括以下步骤:(i)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码目的抗体的核酸(一种或多种)进行测序;和(ii)利用来自步骤(i)的序列信息以制备用于插入宿主细胞的核酸(一种或多种),以允许目的抗体在此宿主细胞中表达。可以但不需要在步骤(i)和(ii)之间操作核酸以引入限制位点,以改变密码子使用和/或优选转录和/或翻译调节序列。

[0430] 此外,本发明还提供了制备转染的宿主细胞的方法,包括用一种或多种编码目的抗体的核酸转染宿主细胞的步骤,其中核酸是衍生自本发明的永生化B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸。因此,可由不同地方(例如,不同国家)的不同人员在不同的时间执行首先制备核酸(一种或多种),然后将其用于转染宿主细胞的程序。

[0431] 然后可将本发明的这些重组抗体用于表达和培养目的。其对于用于大规模药物生产的抗体的表达特别有用。其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(ascites fluid)、中空纤维型生物反应器筒(hollow-fiber type bioreactor cartridge)、模块化微型发酵罐(modular minifermenter)、搅拌釜、微载体培养、陶瓷芯灌注(ceramic core perfusion)等。

[0432] 从B细胞或浆细胞获得免疫球蛋白基因并对其进行测序的方法是本领域公知的(例如,参见Kuby Immunology,第4版,2000年,第4章)。

[0433] 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、骨髓瘤细胞或人肝脏细胞),以及植物细胞,借此优选哺乳动物细胞。优选的表达宿主可糖基化本发明的抗体,特别具有自身在人中不具有免疫原性的碳水化合物结构。在一个实施方式中,转染的宿主细胞可能能够在无血清培养基中生长。在进一步的实施方式中,转染的宿主细胞可能能够在不存在动物衍生的产物的情况下在培养基中生长。也可培养转染的宿主细胞以产生细胞系。

[0434] 本发明还提供用于制备编码目的抗体的一种或多种核酸分子(例如,重链和轻链基因)的方法,包括以下步骤:(i)制备永生B细胞克隆或培养根据本发明的浆细胞;(ii)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得编码目的抗体的核酸。进一步,本发明提供用于获得编码目的抗体的核酸序列的方法,包括以下步骤:(i)制备永生B细胞克隆或培养根据本发明的浆细胞;(ii)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码目的抗体的核酸进行测序。

[0435] 本发明进一步提供了制备编码目的抗体的核酸分子(一种或多种)的方法,其包括获得从本发明的转化的B细胞克隆或培养的浆细胞获得的核酸的步骤。因此,可在不同的地方(例如,在不同国家)由不同的人在不同时间执行首先获得B细胞克隆或培养的浆细胞,和然后从B细胞克隆或培养的浆细胞获得核酸(一种或多种)的程序。

[0436] 本发明还包括制备根据本发明的(例如,用于药物应用)的抗体的方法,其包括以下步骤:(i)获得和/或测序来自选择的B细胞克隆或培养的浆细胞的表达目的抗体的一种或多种核酸(例如,重链和轻链基因);(ii)插入核酸(一种或多种)或使用核酸(一种或多种)序列(一种或多种)以制备表达载体;(iii)转染可表达目的抗体的宿主细胞;(iv)在表达目的抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞;(v)纯化目的抗体。

[0437] 本发明还提供了制备抗体的方法,其包括以下步骤:在表达目的抗体的条件下培养或传代培养转化的宿主细胞群,例如稳定转染的宿主细胞群,和任选地纯化目的抗体,其中所述转染的宿主细胞群已经通过下列制备:(i)提供由上述制备的B细胞克隆或培养的浆细胞生产的编码选择的目的抗体的核酸(一种或多种),(ii)将核酸(一种或多种)插入表达载体中,(iii)在可表达目的抗体的宿主细胞中转染载体,和(iv)培养或传代培养包含插入的核酸的转染的宿主细胞,以生产目的抗体。因此,可在不同地方(例如,在不同国家)由不同的人在不同时间执行首先制备重组宿主细胞,和然后将其培养以表达抗体的程序。

[0438] 核酸分子、载体和细胞

[0439] 在另一方面,本发明还提供了包含编码上述根据本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的核酸分子。在另一方面,本发明还提供了包含编码上述根据本发明的肽或上述根据本发明的蛋白质的多核苷酸的核酸分子。

[0440] 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、诸如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA的RNA分子或诸如cDNA的DNA分子。核酸分子也可以是下述

载体。

[0441] 核酸分子是包含核酸组分,优选地由核酸组分组成的分子。术语核酸分子优选指代DNA或RNA分子。具体地,其与术语“多核苷酸”同义使用。优选地,核酸分子是包含下列或由下列组成的聚合物:通过糖/磷酸盐骨架的磷酸二酯键彼此共价连接的核苷酸单体。术语“核酸分子”还包括修饰的核酸分子,如碱基修饰、糖修饰或骨架修饰等的DNA或RNA分子。

[0442] 关于包含编码根据本发明的抗体的多核苷酸的核酸分子(如核酸序列),优选编码本发明的抗体的轻链和重链的部分或全部和CDRs的这种核酸序列。因此,本文优选提供编码轻链和重链的部分或全部,具体是本发明的示例性抗体的VH和VL序列和CDRs的核酸序列。表1和2提供了根据本发明的示例性抗体的CDRs和VH和VL的氨基酸序列的SEQ ID号。

[0443] 下表3和4提供了编码根据本发明的示例性抗体的CDRs和VH和VL的示例性核酸序列的SEQ ID号。由于遗传密码子的冗余,本发明还包含这些核酸序列的序列变体,具体是编码相同氨基酸序列的这种序列变体。

[0444] 下表3显示了根据本发明的示例性抗体的重链CDR (CDRH1、CDRH2和CDRH3)和重链可变区(称为“VH”)的核酸序列的SEQ ID NOs:

抗体名	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
MGG1	37	38	39	44
MGG2	55	56	57	62
MGG3	73	74	75	80
MGG4	91	92	93	98

抗体名	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
MGG8	109	110	111	116
MGH1	127	128	129	134
MGH2	145	146	147	152
MGH3	163	164	165	170
MGU1	180	181	182	186
MGU3	197	198	199	204
MGU5	215	216	217	222
MGU8	233	234	235	240
MGU10	250	251	252	256
MGU11	267	268	269	274
MGU12	285	286	287	292
MGV3	303	304	305	310

[0447] 表3。

[0448] 下表4显示了根据本发明的示例性抗体的轻链CDR (CDRL1、CDRL2和CDRL3)和轻链可变区(称为“VL”)的核酸序列的SEQ ID NOs:

	抗体名	CDRL1	CDRL2	CDRL2 长	CDRL3	VL
	MGG1	40	41	42	43	45
	MGG2	58	59	60	61	63
	MGG3	76	77	78	79	81
	MGG4	94	95	96	97	99
	MGG8	112	113	114	115	117
[0449]	MGH1	130	131	132	133	135
	MGH2	148	149	150	151	153
	MGH3	166	167	168	169	171
	MGU1	183	184	—	185	187
	MGU3	200	201	202	203	205
	MGU5	218	219	220	221	223
	MGU8	236	237	238	239	241
	MGU10	253	254	—	255	257
	MGU11	270	271	272	273	275
[0450]	MGU12	288	289	290	291	293
	MGV3	306	307	308	309	311

[0451] 表4。

[0452] 优选地,根据本发明的核酸分子的序列包含根据下列的多核苷酸序列或由根据下列的多核苷酸序列组成:SEQ ID NOs:37-45、55-63、73-81、91-99、109-117、127-135、145-153、163-171、180-187、197-205、215-223、233-241、250-257、267-275、285-293、303-311中的任一项;或其功能性序列变体。换言之,优选根据本发明的核酸分子包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含根据下列的核酸序列或由根据下列的核酸序列组成:SEQ ID NO:37-45、55-63、73-81、91-99、109-117、127-135、145-153、163-171、180-187、197-205、215-223、233-241、250-257、267-275、285-293、303-311中的任一项;或其具有至少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%序列同一性的功能性序列变体。

[0453] 还优选根据本发明的核酸序列包括与根据本发明的(示例性)抗体中使用的编码CDR、VH序列和/或VL序列(例如与表3和4所示的序列)的核酸具有至少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%同一性的核酸序列。

[0454] 还优选根据本发明的核酸序列包括与编码根据本发明的肽的核酸(例如根据SEQ ID NOs:1-24中任一项的序列)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%同一性的核酸序列。更优选地,根据本发明的核酸分子包含编码根据SEQ ID NOs:1-24中的任一项的氨基酸序列中的任一个的多核苷酸。

[0455] 总体上,可操作核酸分子以插入、缺失或改变某些核酸序列。这种操作的改变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/或翻译调节序列等的改变。还可改变核酸以改变编码的氨基酸。例如,将一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等)氨基酸取代、缺失和/或插入引入到抗体的氨基酸序列中可以是有益的。这样的点突变可修饰效应子功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可引入氨基酸用于连接共价基团(例如,标记)或可(例如出于纯化目的)引入标签。突变可被引入特定位点或可随机引入,然后进行选择(例如,分子演化)。例如,编码本发明的(示例性)抗体的CDR区、VH序列和/或VL序列中的任一个的一种或多种核酸可随机或定向突变以在编码的氨基酸中引入不同的性质。这种改变可以是迭代过程的结果,其中保留了初始改变,并引入其它核苷酸位置的新改变。进一步,可组合在独立步骤中实现的改变。引入编码的氨基酸中的不同性质可包括但不限于增强的亲和力。

[0456] 在另一方面,本发明还提供了载体,例如表达载体,其包含根据本发明的核酸分子。优选地,载体包含上述核酸分子。

[0457] 术语“载体”指代核酸分子,优选指代重组核酸分子,即天然不存在的核酸分子。本发明的环境中的载体适于并入或包含期望的核酸序列。这种载体可以是存储载体(storage vectors)、表达载体、克隆载体、转移载体等。存储载体是允许方便存储核酸分子的载体。因此,载体可包含对应于例如根据本发明的期望抗体或其抗体片段或对应于根据本发明的期望的肽或蛋白质的序列。表达载体可用于生产表达产物,如RNA(例如mRNA)或肽、多肽或蛋白质。例如,表达载体可包含转录载体的序列延伸所述的序列,如启动子序列。克隆载体典型为可用于将核酸序列并入载体的含有克隆位点的载体。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有机体中的载体,例如,病毒载体。本发明的环境中的载体可以是例如RNA载体或DNA载体。优选地,载体是DNA分子。例如,本申请意义上的载体包含克隆位点、选择标记如抗生素抗性因子和适于载体复制的序列如复制起点。优选地,本申请环境中的载体为质粒载体。

[0458] 在进一步方面,本发明还提供了表达(i)根据本发明的抗体或其抗原结合片段或(ii)根据本发明的肽或蛋白质的细胞(a);和/或包含根据本发明的载体的细胞(b)。

[0459] 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。优选地,细胞是哺乳动物细胞,更优选为哺乳动物细胞系。优选的实例包括人细胞、CHO细胞、HEK293T细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、人肝脏细胞、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0460] 具体地,可用根据本发明的载体,优选表达载体转染细胞。术语“转染”指代将核酸分子如DNA或RNA(例如mRNA)分子引入细胞,优选引入真核细胞中。在本发明的环境中,术语“转染”包括技术人员已知的用语将核酸分子引入细胞,优选引入真核细胞如哺乳动物细胞中的任何方法。这种方法包括,例如,电穿孔、例如基于阳离子脂质和/或脂质体的脂转染、磷酸钙沉淀、纳米颗粒系转染、病毒系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。优选地,引入是非病毒的。

[0461] 此外,可用例如用于表达根据本发明的抗体或其抗原结合片段或用于表达根据本发明的肽或蛋白质的根据本发明的载体稳定或瞬时转染本发明的细胞。优选地,细胞用例如编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段或编码根据本发明的肽或蛋白质的根据本发明的载体稳定转染。可选地,还优选例如编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段或编

码根据本发明的肽或蛋白质的根据本发明的载体瞬时转染细胞。

[0462] 药物组合物

[0463] 在进一步方面,本发明提供了药物组合物,其包含下列中的一种或多种:

[0464] (i) 根据本发明的肽;

[0465] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0466] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0467] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0468] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0469] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0470] (vii) 编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0471] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;和/或

[0472] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞。

[0473] 换言之,本发明还提供了药物组合物,其包含根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体和/或根据本发明的细胞。

[0474] 优选地,药物组合物包含根据本发明的肽和/或根据本发明的蛋白质。

[0475] 还优选药物组合物包含根据本发明的病毒样颗粒和/或根据本发明的蛋白质纳米颗粒。

[0476] 在这种环境中,即如果药物组合物包含根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒和/或根据本发明的蛋白质纳米颗粒,则药物组合物优选为疫苗。“疫苗”典型地理解为提供至少一种抗原,优选至少一种免疫原(如根据本发明的肽)的预防或治疗物质。“免疫原”典型地能够引发免疫应答。如本文所用,“免疫原”具体为能在哺乳动物(如人和牛,优选牛),如被感染有或有感染病原体(如疟原虫)风险的哺乳动物中诱导免疫应答的蛋白质或其部分。免疫原的给予可例如导致针对目的病原体的保护性免疫和/或主动免疫。因此,抗原或免疫原典型地可刺激身体的适应性免疫系统以提供适应性免疫应答。具体地,“抗原”或“免疫原”典型地指代可被免疫系统,优选被适应性免疫系统识别,并且例如通过形成抗体和/或抗原特异性T细胞作为适应性免疫应答的一部分能够触发抗原特异性免疫应答的物质。典型地,抗原可以是或可包含可由MHC呈递给T细胞的肽或蛋白质。

[0477] 优选地,药物组合物包含根据本发明的抗体或其抗体片段。

[0478] 还优选组合物包含根据本发明的核酸。

[0479] 优选地,药物组合物包含根据本发明的载体和/或根据本发明的细胞。

[0480] 药物组合物可优选还包含药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂。尽管载剂或赋形剂可促进给药,但其不应优选自身诱导生产对接受该组合物的个体有害的抗体。其也不应是有毒的。合适的载剂可以是大的、缓慢代谢的大分子,如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性的病毒颗粒。总体上,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载剂可以是活性组分或非活性组分。优选地,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的载剂不是关于疟疾的活性组分。

[0481] 可使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸盐,如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0482] 药物组合物中的药学上可接受的载剂可另外包含液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这种组合物中可存在辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质。这种载剂使得药物组合物被配制成为对象消化的片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液和悬浮液。

[0483] 本发明的药物组合物可制备成各种形式。例如,可将组合物制备成可注射剂,液体溶液或悬浮液。也可制备适于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介中的固体形式(例如,用于含有防腐剂的无菌水重构的类似于Synagis™和Herceptin™的冻干组合物)。组合物可制备为例如软膏剂、乳膏剂或粉末用于局部给药。组合物可制备为例如片剂或胶囊、喷雾或糖浆(任选地调味)用于口服给药。组合物可制备为例如使用细粉或喷雾的吸入剂用于肺部给药。组合物可制备为栓剂或阴道栓剂。组合物可制备成例如滴剂用于鼻、耳或眼部给药。组合物可以是设计成使得组合的组合物在给予对象之前被重构的试剂盒形式。例如,冻干抗体可以具有无菌水或无菌缓冲液的试剂盒形式提供。

[0484] 优选组合物中的活性成分为根据本发明的抗体或其抗体片段。还优选组合物中的活性成分为根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的蛋白质纳米颗粒和/或根据本发明的病毒样颗粒。这样,其(抗体、肽、蛋白质等)可在胃肠道中易于降解。因此,如果组合物是通过胃肠道途径给予的,则该组合物可含有保护抗体、肽、蛋白质、蛋白质纳米颗粒或病毒样颗粒免于降解但其一旦已从胃肠道吸收组合物后就将其释放的试剂。

[0485] 在Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,ISBN:0683306472中可找到对药学上可接受的载剂的详尽讨论。

[0486] 本发明的药物组合物的pH通常在5.5和8.5之间,在一些实施方式中,这可在6和8之间,并且在其它实施方式中为约7。可通过使用缓冲剂来维持pH。组合物可以是无菌和/或无热源的。组合物相对于人可以是等渗的。在一个实施方式中,本发明的药物组合物提供在气密密封的容器中。

[0487] 本发明范围内的是以若干给药形式存在的组合物;形式包括但不限于适于肠胃外给药的那些形式,例如通过注射或输注,例如通过弹丸注射或连续输注。在产品用于注射或输注的情况下,其可呈在油性或水性媒介中的悬浮液、溶液或乳液形式,并且其可含有配制剂,如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。可选地,抗体或肽/蛋白质可以是干燥形式,用于在与适当的无菌液体一起使用之前进行重构。媒介典型地理解为适于存储、运输和/或给予化合物如药物活性化合物,具体为根据本发明的抗体或肽/蛋白质的物质。例如,媒介可以是生理上可接受的液体,所述液体适于存储、运输和/或给予药物活性化合物,具体为根据本发明的抗体或肽/蛋白质。配制后,可将本发明的组合物直接给予对象。在一个实施方式中,组合物适合于给予哺乳动物,例如,人类对象。

[0488] 本发明的药物组合物可以任何数量的途径,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、经皮、经皮肤、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径给予。无痛皮下注射器(Hyposprays)也可用于给予本发明的药物组合物。优选地,药物组合物可制备为例如片剂、胶囊等用于口服给药,用于局部给药、或作为注射剂,例如作为液体溶液或悬浮液,借此特别优选药物组合物为可注射的。也可优选适于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介中的固体形式,例如冻干形式的药物组合物。

[0489] 对于注射,例如静脉内、皮肤或经皮肤注射、或在患病位点注射,活性成分将优选为不含热源并且具有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水溶液形式。本领域相

关技术人员很能够使用例如等渗媒介如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。根据需要,可包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。无论是多肽、肽或核酸分子,还是待给予个体的根据本发明的其它药学上有用的化合物,给药优选为“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定),这足以显示个体收益。实际给予的量和给药速率和时间过程将取决于所治疗的本质和严重性。对于注射,可例如在预填充的注射器中提供根据本发明的药物组合物。

[0490] 上述本发明的药物组合物也可以任何口服可接受的剂型包括但不限于胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液口服给予。在用于口服使用的片剂的情况下,常用的载剂包括乳糖和玉米淀粉。典型地还添加润滑剂,如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服给药,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服使用需要水性悬浮液时,活性成分,即上述本发明的转运货物缀合物分子(transporter cargo conjugate molecule),与乳化剂和悬浮剂混合。如果期望,还可添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0491] 本发明的药物组合物也可局部给予,尤其是当治疗靶标包括局部应用容易达到的区域或器官时,例如,包括皮肤或任何其它可及的上皮组织的疾病。对于这些区域或器官中的每一个容易制备合适的局部制剂。对于局部应用,本发明的药物组合物可配制成合适的软膏剂,其含有本发明的药物组合物,特别是上述其悬浮或溶解于一种或多种载剂中的组分。局部给药的载剂包括但不限于矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可选地,本发明的药物组合物可配制成合适的洗剂或乳膏剂。在本发明的环境中,合适的载剂包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨酸酯60、十六烷基酯蜡、十六硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苜醇和水。

[0492] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。具体地,药物组合物可以单剂量产品的形式提供。优选地,药物组合物中抗体或肽/蛋白质的量——具体是如果以单剂量产品形式提供——不超过200mg,更优选不超过100mg,并且甚至更优选不超过50mg。

[0493] 根据本发明的药物组合物可给予一次或重复给予。例如,根据本发明的药物组合物可每天给予,例如每天一次或若干次,例如每天一次、两次、三次或四次,优选每天一次或两次,更优选每天一次持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21或更多天,例如每天一次持续1、2、3、4、5、6个月。优选地,根据本发明的药物组合物可每周给予,例如每周一次或两次持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21或更多周,例如每周一次持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或每周一次持续2、3、4或5年。此外,根据本发明的药物组合物可优选每月给予,例如每月一次,或更优选地,每两月一次持续1、2、3、4或5或更多年。还优选在生命周期内继续给药。另外,还设想仅一次单次给药,具体关于某些适应症,例如(例如在非免疫对象中)在意外暴露的情况下用于预防疟疾。

[0494] 具体地,优选对于单剂量,例如每天、每周或每月剂量,优选每周剂量,根据本发明的药物组合物中的抗体或肽/蛋白质的量不超过1g,优选不超过500mg,更优选不超过200mg,甚至更优选不超过100mg,并且特别优选不超过50mg。

[0495] 药物组合物典型地包括本发明的抗体,或本发明的肽/蛋白质的“有效”量,即足以治疗、改善、减轻或预防期望的疾病或状况、或表现出可检测的治疗效果的量。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精确有效量将取决于其大小、

体重和健康、状况的本质和程度和选择用于给药的疗法或疗法的组合。给定情况的有效量通过常规试验确定,并且在临床医生的判断之内。出于本发明的目的,相对于将给予的个体的体重(例如,以kg计),有效剂量通常将为本发明的抗体(例如药物组合中抗体的量)的约0.005至约100mg/kg,优选约0.0075至约50mg/kg,更优选约0.01至约10mg/kg,并且甚至更优选约0.02至约5mg/kg。

[0496] 此外,根据本发明的药物组合还可包含另外的活性成分,其可以是另外的抗体或不是抗体的成分。另外的活性成分优选是检查点抑制剂。

[0497] 根据本发明的抗体或抗原结合片段和/或根据本发明的肽/蛋白质可如另外的活性成分一样存在于相同的药物组合中,或者优选地,其可由第一药物组合包含,并且另外的活性成分由不同于第一药物组合的第二药物组合包含。因此,如果设想多于一种的另外的活性成分,则每种另外的活性成分和根据本发明的抗体或抗原结合片段或根据本发明的肽/蛋白质优选由不同的药物组合包含。这种不同的药物组合可组合/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)给予。

[0498] 优选地,根据本发明的抗体(或肽/蛋白质)和另外的活性成分提供附加的治疗效果,或优选协同治疗效果。术语“协同”用于描述两种或更多种活性剂的组合效果,其大于每种相应的活性剂的各自效果的和。因此,在两种或更多种试剂的组合效果导致活性或过程的“协同抑制”的情况下,旨在活性或过程的抑制大于每种相应的活性剂的抑制效果的和。术语“协同治疗效果”指代用两种或更多种疗法的组合观察到的治疗效果,其中(通过多种参数中的任一种测量的)治疗效果大于用相应单个疗法观察到的各个治疗效果的和。

[0499] 在一个实施方式中,本发明的组合可包括本发明的抗体,其中抗体可占组合中总蛋白质的至少50重量%(例如,60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)。在这种组合中,抗体优选为纯化形式。

[0500] 在另一实施方式中,本发明的组合可包括本发明的肽/蛋白质,其中肽/蛋白质可占组合中总蛋白质的至少50重量%(例如,60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)。在这种组合中,肽/蛋白质优选为纯化形式。

[0501] 本发明还提供了制备药物组合物的方法,其包括以下步骤:(i)制备本发明的抗体或肽/蛋白质;和(ii)将纯化的抗体或纯化的肽/蛋白质与一种或多种药学上可接受的载剂混合。

[0502] 在另一实施方式中,制备药物组合物的方法包括以下步骤:将抗体与一种或多种药学上可接受的载剂混合,其中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。

[0503] 作为出于治疗目的而递送抗体或B细胞的替代,可将编码抗体或肽/蛋白质的核酸(典型为DNA)递送至对象,使得核酸可在对象中原位表达以提供期望的治疗效果。合适的基因疗法和核酸递送载体是本领域已知的。

[0504] 药物组合可包括抗微生物剂,特别是如果以多剂量形式包装。其可包含洗涤剂,例如,吐温(聚山梨醇酯),如吐温80。洗涤剂通常以低水平例如小于0.01%存在。组合还可包括钠盐(例如,氯化钠)以产生张力。例如,NaCl浓度为 10 ± 2 mg/ml是典型的。

[0505] 进一步,药物组合可包含例如约15-30mg/ml(例如,25mg/ml)的糖醇(例如,甘露醇)或二糖(例如,蔗糖或海藻糖),特别是如果其被冻干或如果其包括已经从冻干物质重构

的物质。冻干前,可将用于冻干的组合物的pH调节至5和8之间、或5.5和7之间、或约6.1。

[0506] 本发明的组合物还可包括一种或多种免疫调节剂。总体上,免疫调节剂包括佐剂。因此,特别是对于疫苗,优选药物组合物包含佐剂。佐剂的实例包括氢氧化铝(**ALHYDROGEL®**,获自Brenntag Biosector, Copenhagen, Denmark and **AMPHOGEL®**, Wyeth Laboratories, Madison, NJ)、弗氏佐剂、MPL™(3-0-脱酰单磷酰脂质A; Corixa, Hamilton, IN)、IL-12(Genetics Institute, Cambridge, MA)、TLR激动剂(如TLR-9激动剂)和QS-21(衍生自皂树*Quillaja saponaria*的纯化的植物提取物)。

[0507] 如本文所用,术语“佐剂”具体指代用于增强抗原性/免疫原性的媒介。佐剂包括吸附有抗原的矿物(明矾、氢氧化铝或磷酸盐)的悬浮液;或油包水乳液,例如,其中抗原溶液在矿物油(弗氏不完全佐剂)中乳化,有时加入杀死的分枝杆菌(弗氏完全佐剂)以进一步增强抗原性(抑制抗原的降解和/或致使巨噬细胞涌入)。免疫刺激性寡核苷酸(如包括CpG基序的那些)也可用作佐剂。佐剂包括生物分子(“生物佐剂”),如共刺激分子。示例性佐剂包括IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L、4-1BBL和toll样受体(TLR)激动剂,如TLR-9激动剂。本领域普通技术人员熟悉佐剂(参见,例如Singh (ed.) *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*. Wiley-Interscience, 2007),例如,可包括在药物组合物中的佐剂。优选地,选择佐剂以在给予药物组合物的对象中引发Th1免疫应答。换言之,药物组合物包含的佐剂优选地促进Th1免疫应答。优选地,佐剂为明矾、水包油组合物、MF59、AS01、AS03、AS04、MPL、QS21、CpG寡核苷酸、TLR7激动剂、TLR4激动剂、TLR3激动剂或其两种或更多种的组合。

[0508] 佐剂可选自无机盐、表面活性剂、微粒、细胞因子、激素、抗原构建体、聚阴离子、聚丙烯酸酯、或油包水乳液。因此,本发明的组合物可包含一种或多种佐剂,例如,一、二、三、四、五、六、七、八、九或十或更多种佐剂。例如,本发明的组合物可包含选自铝(“明矾”)、氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、非离子嵌段聚合物表面活性剂、病毒体、皂苷(QS-21)、脑膜炎球菌外膜蛋白(蛋白体)、免疫刺激复合物(ISCOMs)、蜗形二甲基二十八烷基溴化铵(DDA)、阿夫立定(CP20,961)、生物素A、维生素E、草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)的细胞壁骨架(**Detox®**)、胞壁酰二肽和胞壁酰三肽、苏氨酰基MDP(SAF-1)、丁基酯MDP(**Murabutide®**)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺MTP、单磷酰脂质A、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumonia*)糖蛋白、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和大肠杆菌热不稳定肠毒素、海藻糖二霉菌酸酯、CpG寡脱氧核苷酸、白细胞介素-2、干扰素- γ 、干扰素- β 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、脱氢表雄酮、Flt3配体、1,25-二羟基维生素D3、白细胞介素-1、白细胞介素-6、白细胞介素-12、人生长激素、2-微球蛋白、淋巴细胞趋化因子(lymphotactin)、聚阴离子例如葡聚糖、双链多核苷酸、聚丙烯酸酯例如聚甲基丙烯酸甲酯、与烯丙基蔗糖交联的丙烯酸(Carbopol 934P)、或例如N-乙酰基-氨基葡萄糖糖-3基-乙酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺(CGP-11637)、 γ 旋覆花粉+氢氧化铝(Algamulin)、人树突细胞、溶血磷脂酰甘油、硬脂基酪氨酸、三棕榈酰五肽、Carbopol 974P NF聚合物、油包水乳液、矿物油(弗氏不完全)、植物油(花生油)、角鲨烯和角鲨烷、水包油乳液、角鲨烯+吐温-80+斯盘85(MF59)、或例如脂质体、或例如生物可降解的聚合物微球、丙交酯和乙交酯、聚磷腈、 β -葡聚糖、或例如类蛋白中的一、二、三、四、五、六、七、八、九或十或更多种佐剂。典型使用的疫苗佐剂的列表也可在D. T. O' Hogan编辑的《Vaccine

Adjuvants》, Humana Press 2000中找到。本发明组合中包含的佐剂还可包括例如脂质A的合成衍生物,其中一些是TLR-4激动剂,并且包括但不限于:OM174 (2-脱氧-6-邻-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二烷酰氧基四-癸酰基氨基]-4-邻磷酰基-D-D-吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3-羟基-十四烷酰基氨基]-对D-吡喃葡萄糖基二氢磷酸酯)、(WO 95/14026)OM-294-DP (3S, 9R)-3~[(R)-十二烷酰氧基十四烷酰基氨基]、[(R)-3-羟基十四烷酰基氨基]癸-1,10-二醇、1,10-双(磷酸二氢酯)(WO 99/64301和WO 00/0462)OM 197MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-D(R)-十二烷酰基-氧十四烷酰基氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基四-癸酰基氨基]癸-1,10-二醇、1-二氢磷酸酯-10-(6-氨基己酸酯)(WO 01/46127)。例如,本发明的疫苗可仅包含以上佐剂中的一种、或者例如以上佐剂中的两种,例如组合佐剂,如例如明矾和MPL、或水包油乳液和MPL和QS-21、或脂质体和MPL和QS21。

[0509] 优选根据本发明的疫苗包含选自明矾、Ribi (单磷酰脂质A, MPL) 或MF59的佐剂。因此,本发明的疫苗组合可包含明矾或Ribi (单磷酰脂质A, MPL) 或MF59、或例如明矾和Ribi、或例如明矾和MF59、或例如Ribi和MF59。

[0510] 特别优选的佐剂是无毒的细菌脂多糖衍生物。脂质A的合适的无毒衍生物的优选实例是单磷酰脂质A (MPL), 或者更优选地是3-脱酰基单磷酰脂质A (3DMPL)。参见,例如,美国专利号4,436,727;4,877,611;4,866,034和4,912,094。MPL主要促进具有IFN- γ (Th1) 表型的CD4+T细胞反应。在药物组合中,例如可使用小颗粒3D-MPL。小颗粒3D-MPL具有可通过0.22 μ m过滤器无菌过滤的粒度。这种制剂描述于WO 94/21292中。可选地,脂多糖可以是B (1-6) 葡糖胺二糖,如美国专利号6,005,099和欧洲专利号0 729 473B1中所述。本领域技术人员基于这些参考文献的教导将能够容易地生产各种脂多糖,如3D-MPL。

[0511] 除了(结构与LPS或MPL或3D-MPL类似的) 前述的免疫刺激剂外,作为MPL的以上结构的子部分的酰化单糖和二糖衍生物也是合适的佐剂。

[0512] 可在药物组合中使用的另一种特别优选的佐剂是皂苷,如QS21。QS-21是衍生自皂树*Quillaja saponaria*的活性部分之一(Zhu W.和Tuo W., 2016, Nat Prod Chem Res 3 (4):e113。QS-21:A potent vaccine adjuvant)。QS表示其来源为皂树,并且编号21表示RP-HPLC峰的身份。QS-21是酰化的3,28-bisdesmodic三萜糖苷(1,3)或“皂苷”,分子式为C₉₂O₄₆H₁₄₈,并且分子量为1990Da。皂苷,如QS-21,可优选用作例如,用于全身给药的佐剂。皂苷作为佐剂的应用(例如,衍生自南美树*Quillaja Saponaria Molina*的树皮的Quil A的应用)是本领域普通技术人员所熟悉的(参见,例如,US 5,057,540和EP 0 362 279 B1、EP 0 109 942 B1;WO 96/11711;WO 96/33739)。溶血性皂苷QS21和QS17(Quil A的HPLC的纯化部分)已被描述为有效的全身性佐剂,并且其生产方法公开于美国专利号5,057,540和EP 0 362279B1中。

[0513] 优选地,药物组合物包含单磷酰脂质A (MPL) 和/或皂苷,如QS-21。

[0514] 还优选将Toll样受体 (TLR) 激动剂用作佐剂。例如,药物组合物可包含TLR激动剂。例如,TLR激动剂可以是TLR-4激动剂,如脂质A的合成衍生物(参见,例如WO 95/14026和WO 01/46127)、磷酸烷基葡糖胺 (AGP; 参见,例如WO 98/50399或美国专利号6,303,347;6,764,840)。能够通过TLR-4致使信号传导应答的其它合适的TLR-4配体是例如来自革兰氏阴性细菌的脂多糖及其衍生物,或其片段,具体为LPS的无毒性衍生物(如MPL)。其它合适的TLR激动剂是:热激蛋白 (HSP) 10、60、65、70、75或90;表面活性蛋白A、透明质酸寡糖、硫酸肝素片

段、纤维结合素片段、纤维蛋白原肽和B-防御素-2和胞壁酰二肽(MDP)。例如,TLR激动剂可以是HSP 60、70或90。其它合适的TLR-4配体如WO 2003/011223和WO 2003/099195中所述。

[0515] 另外的TLR激动剂(如能够通过TLR信号传导途径致使信号传导应答的试剂)也可用作佐剂,如TLR2、TLR3、TLR7、TLR8和/或TLR9的激动剂。因此,组合物可进一步包括选自下列的佐剂:TLR-1激动剂、TLR-2激动剂、TLR-3激动剂、TLR-4激动剂、TLR-5激动剂、TLR-6激动剂、TLR-7激动剂、TLR-8激动剂、TLR-9激动剂或其组合。例如,可使用能够通过TLR-1致使信号传导应答的TLR激动剂,例如来自下列的一种或多种:三酰化脂肽(LPs);酚溶性调节素(phenol-soluble modulin);结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)LP;S-(2,3-双(棕榈酰氧基)-(2-RS)-丙基)-N-棕榈酰-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-L-ys(4)-OH、模拟细菌脂蛋白的乙酰化氨基末端的三盐酸盐(Pam3Cys)LP和来自博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)的OspA LP。例如,可使用能够通过TLR-2致使信号传导应答的TLR激动剂,如脂蛋白、肽聚糖、来自结核分枝杆菌、博氏疏螺旋体或梅毒螺旋体(*T. pallidum*)的细菌脂肽;来自包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的物种的肽聚糖;脂磷壁酸、甘露糖醛酸、奈瑟氏菌孔蛋白(*Neisseria porins*)、细菌鞭毛、耶尔森氏菌毒力因子(*Yersinia virulence factors*)、CMV病毒体、麻疹血细胞凝集素和来自酵母的酵母聚糖中的一种或多种。此外,可使用能够通过TLR-3致使信号传导应答的TLR激动剂,如双链RNA(dsRNA)、或聚肌苷酸聚胞苷酸(Poly IC)、与病毒感染相关的分子核酸模式中的一种或多种。此外,可使用能够通过TLR-5致使信号传导应答的TLR激动剂,如细菌鞭毛蛋白。而且,可使用能够通过TLR-6致使信号传导应答的TLR激动剂,如分枝杆菌脂蛋白、二酰化LP和酚溶性调节蛋白中的一种或多种。另外的TLR6激动剂描述于WO 2003/043572中。例如,使用能够通过TLR-7致使信号传导应答的TLR激动剂,如单链RNA(ssRNA)、洛素立宾(loxoribine)、N7和CS位置的鸟苷类似物、或咪唑喹啉化合物或其衍生物中的一种或多种。在一个实施方式中,TLR激动剂可以是咪喹莫特(imiquimod)。另外的TLR-7激动剂描述于WO 2002/085905中。此外,可使用能够通过TLR-8致使信号传导应答的TLR激动剂。合适地,能够通过TLR-8致使信号传导应答的TLR激动剂为单链RNA(ssRNA),其是具有抗病毒活性的咪唑喹啉分子,例如瑞喹莫德(resiquimod)(R848);瑞喹莫德也能够被TLR-7识别。可使用的其它TLR-8激动剂包括描述于WO 2004/071459中的那些。此外,佐剂可包括能够通过TLR-9诱导信号传导应答的TLR激动剂。例如,佐剂可包括HSP90、细菌或病毒DNA和/或含有未甲基化CpG核苷酸(例如,CpG寡核苷酸)的DNA。例如,含CpG的寡核苷酸包括主要的Th1应答。这种寡核苷酸是公知的并且描述于例如WO 95/26204、WO 96/02555、WO 99/33488和美国专利号5,278,302、5,666,153和6,008,200和5,856,462中。因此,公开的组合物中的用作佐剂的寡核苷酸包括含有含寡核苷酸例如含有两个或更多个二核苷酸CpG基序的CpG。还包括具有混合的核苷酸间键的寡核苷酸。

[0516] 佐剂还可包括无机盐,如铝或钙盐,具体为氢氧化铝、磷酸铝和磷酸钙。

[0517] 不同佐剂的组合也可用于本文所述的药物组合物中。例如,如已经指出的,QS21可与(3D-)MPL一起配制。QS21:(3D-)MPL的比典型地将为1:10至10:1的顺序;如1:5至5:1,并且通常实质上为1:1。典型地,(3D-)MPL:QS21(如AS01(GlaxoSmithKline))的比在2.5:1至1:1范围内。佐剂制剂的另一组合包括(3D-)MPL和铝盐,如氢氧化铝(如AS04(GlaxoSmithKline))。当组合配制时,这种组合可增强抗原特异性Th1免疫应答。佐剂制剂

可包含无机盐,如钙或铝(明矾)盐,例如磷酸钙、磷酸铝或氢氧化铝。此外,佐剂可包括油和水乳液,例如水包油乳液(如MF59(Novartis)或AS03(GlaxoSmithKline))。水包油乳液的一个实例包含水性载体中的可代谢的油,如角鲨烯、母育酚如生育酚,例如 α -生育酚和表面活性剂,如脱水山梨醇三油酸酯(斯盘85)或聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温80)。

[0518] 此外,根据本发明的药物组合物,具体为疫苗还优选包含可与根据本发明的肽/蛋白质聚集以形成聚集体(如颗粒)的另外的组分,如肽或蛋白质。这种组分的实例为本文所述的HBsAg或其片段。因此,本文所述的HBsAg或其片段可以是(i)根据本发明的(融合)蛋白所包含的,(ii)存在于根据本发明的药物组合物(“游离”HBsAg)中,其中(融合)蛋白可与“游离”HBsAg聚集以形成颗粒。

[0519] 医学治疗、试剂盒和应用

[0520] 医学治疗

[0521] 在进一步方面,本发明提供了

[0522] (i) 根据本发明的肽;

[0523] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0524] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0525] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0526] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0527] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0528] (vii) 编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0529] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;

[0530] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞;和/或

[0531] (x) 根据本发明的药物组合物

[0532] 作为药物的应用。

[0533] 优选地

[0534] (i) 根据本发明的肽;

[0535] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0536] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0537] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0538] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0539] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0540] (vii) 编码根据本发明的抗体或其抗体片段的核酸;

[0541] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;

[0542] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞;和/或

[0543] (x) 根据本发明的药物组合物

[0544] 用于在预防和/或治疗疟疾中应用。

[0545] 换言之,根据本发明抗体或其抗原结合片段优选用于在预防和/或治疗疟疾中应用。还优选根据本发明的肽和/或蛋白质用于在预防和/或治疗疟疾中应用。最优选地,上述根据本发明的药物组合物用于在预防和/或治疗疟疾中应用。

[0546] 优选地,待预防和/或治疗的疟疾是由恶性疟原虫(感染)致使的。

[0547] 疟疾的预防具体指代预防性设置,其中对象未诊断出患有疟疾(未进行诊断或诊断结果为阴性)和/或对象未显示疟疾症状。优选地,本发明的产品在感染例如恶性疟原虫之前被给予。然而,疟疾的预防还包括“暴露后预防”(PEP),即在可能的恶性疟原虫感染后,例如蚊子在恶性疟原虫感染区域叮咬后的预防治疗。疟疾的预防在高风险对象如在疟疾区域中停留的对象(如生活在疟疾影响区域或前往疟疾影响区域)中特别有用。

[0548] 因此,根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物优选用于在未诊断患有疟疾的对象或未显示疟疾症状的对象中预防疟疾。

[0549] 相反,在治疗设置中,对象典型地诊断患有疟疾和/或显示疟疾症状。注意,术语“治疗”和“疗法”/“治疗的”疟疾包括(完全)治愈以及减轻疟疾。

[0550] 因此,根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物优选用于在诊断患有疟疾的对象或显示疟疾症状的对象中治疗疟疾。

[0551] 还优选根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于在无症状的对象中预防和/或治疗疟疾。那些对象可诊断或未诊断出患有疟疾。

[0552] 优选地,根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于预防疟疾,其中根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在(可能的)疟原虫感染之前上至三个月,优选在(可能的)疟原虫感染之前上至一个月,更优选在在(可能的)疟原虫感染之前上至两周,甚至更优选在(可能的)疟原虫感染之前上至一周,并且最优选在(可能的)疟原虫感染之前上至一天被给予。这种治疗方案具体指代预防性设置。

[0553] 总体上,根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可给予一次或重复给予。因此,在第一次给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可进行一次或多次随后给药,优选每天或每隔两天一次单剂量持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1、15、16、17、18、19、20或21天。还优选第一次给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可进行一次或多次随后给药,优选每周一次或两次单剂量持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、1、15、16、17、18、19、20或21周。还优选第一次给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可进行一次或多次随后给药,优选每2周或4周一次单剂量持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1、15、16、17、18、19、20或21周。还优选第一次给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可进行一次或多次随后给药,优选每两个月或四个月一次单剂量持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1、15、16、17、18、19、20或21个月。还优选第一次给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物后,可进行一次或多次随后给药,优选每年一次或两次单剂量持续1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0554] 优选地,根据本发明的肽、根据本发明本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物以0.005至100mg/kg体重的(单)剂,优选0.0075至50mg/kg体重的(单)剂,更优选0.01至10mg/kg体重的(单)剂,甚至更优选0.05to 5mg/kg体重的(单)剂,并且特别优选0.1至1mg/kg体重的(单)剂给予。

[0555] 根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可以任何数量的途径如口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、经皮、经皮肤、局部、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径给予。优选静脉内给药或皮下给药或肌内给药,并且更优选静脉内或皮下给药。

[0556] 因此,本发明还提供了预防和/或治疗对象中疟疾的方法,其中方法包括向有此需要的对象给予

[0557] (i) 根据本发明的肽;

[0558] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0559] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0560] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0561] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0562] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0563] (vii) 编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0564] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;

[0565] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞;和/或

[0566] (x) 根据本发明的药物组合物。

[0567] 这种方法的优选实施方式对应于上述医疗应用的优选实施方式。

[0568] 进一步应用和试剂盒

[0569] 在进一步方面,本发明还提供了通过检测所述疫苗的抗原含有正确构象的特定表

位而将根据本发明的抗体或其抗体片段或根据本发明的药物组合物用于监测抗疟疾疫苗的质量的应用。这种待检测的抗疟疾疫苗所包含的优选抗原包括上述根据本发明的肽。

[0570] 此外,本发明还提供了

[0571] (i) 根据本发明的肽;

[0572] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0573] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0574] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0575] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0576] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0577] (vii) 编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0578] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;

[0579] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞;和/或

[0580] (x) 根据本发明的药物组合物

[0581] 在诊断疟疾感染中的应用。

[0582] 另外还提供了

[0583] (i) 根据本发明的肽;

[0584] (ii) 根据本发明的蛋白质;

[0585] (iii) 编码根据本发明的蛋白质或肽的核酸;

[0586] (iv) 根据本发明的病毒样颗粒;

[0587] (v) 根据本发明的蛋白质纳米颗粒;

[0588] (vi) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0589] (vii) 根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0590] (viii) 包含根据本发明的核酸的载体;

[0591] (ix) 表达根据本发明的抗体或肽,或包含根据本发明的载体的细胞;和/或

[0592] (x) 根据本发明的药物组合物

[0593] 在确定分离的血液样品(例如,全血、血清和/或血浆)是否被疟原虫感染中的应用。

[0594] 诊断方法可包括使根据本发明的抗体或肽/蛋白质与样品接触。这种样品可从对象分离,例如从例如鼻道、鼻腔、唾液腺、肺、肝脏、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,优选血浆或血清获取的分离的组织样品。诊断的方法还可包括检测抗原/抗体复合物,具体在使根据本发明的抗体或肽/蛋白质与样品接触之后。这种检测步骤典型在工作台上进行,即不与人体或动物体有任何接触。检测方法的实例是本领域技术人员公知的,并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0595] 在进一步方面,本发明还提供了多部分试剂盒(kit of parts),其包含至少一种根据本发明的肽、至少一种根据本发明的蛋白质、至少一种根据本发明的病毒样颗粒、至少一种根据本发明的蛋白质纳米颗粒、至少一种根据本发明的药物组合物、至少一种根据本发明的抗体或其抗原结合片段、至少一种根据本发明的核酸、至少一种根据本发明的载体、至少一种根据本发明的细胞和/或至少一种根据本发明的药物组合物。另外,试剂盒可包含具有用于给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、编码根据本发明的蛋白质或肽的核

酸、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗体片段、编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸、包含根据本发明的核酸的载体、表达根据本发明的抗体或肽或包含根据本发明的载体的细胞和/或根据本发明的药物组合物的说明和/或用于给予根据本发明的肽、根据本发明的蛋白质、根据本发明的蛋白质或肽的核酸、根据本发明的病毒样颗粒、根据本发明的蛋白质纳米颗粒、根据本发明的抗体或其抗体片段、编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸、包含根据本发明的核酸的载体、表达根据本发明的抗体或肽或包含根据本发明的载体的细胞和/或根据本发明的药物组合物的手段如注射器或容器的传单(leaflet)。

附图说明

[0596] 在下文中,将给出附图的简要描述。附图旨在更详细地示例本发明。然而,其不旨在以任何方式限制本发明的主题。

[0597] 图1显示了实施例1的通过单克隆抗体MGG1、MGG2、MGG3、MGG4和MGG8(其各自基于从供体G分离的抗体的VH/VL基因)和通过对照抗体BKC3进行的恶性疟原虫子孢子的示例性染色。孢子用SYBR Green I标记,并与单克隆抗体一起培育。用与荧光团缀合的抗人IgG进行抗体检测。

[0598] 图2显示了实施例2的(A)所用测定的示意图和(B)通过人单克隆抗体MGG1、MGG2、MGG3、MGG4、MGG8、MGH1、MGH2、MGH3和对照抗体2A10对肝细胞的孢子遍历(traversal)和侵入的抑制(ISTI)。

[0599] 图3显示了实施例2的(A)对孢子侵入的体内人源化小鼠模型的实验设计的示意图和(B)通过选择的抗体MGG4、MGG8、MGH1、MGH2和MGH3在体内减少孢子。

[0600] 图4显示了实施例3的(A)恶性疟原虫环孢子蛋白SP,信号肽;RI,区域I的示意图。(B)PfCSP的序列(分离株NF54,Uniprot登记号P19597;SEQ ID NO:24)。功能上重要的区域I以粗体显示。(C)通过抗体:22-110-肽(SEQ ID NO:27)、NPDP-肽(SEQ ID NO:23)和NANP-肽(SEQ ID NO:26)结合测试的CSP肽的序列。属于区域I的氨基酸以粗体显示。

[0601] 图5显示了实施例3中通过ELISA将单克隆抗体与不同的肽结合。测试了与CSP肽(序列如图4所示)结合的不同稀释度的抗体,并计算每种抗体的EC₅₀值。将在体内小鼠模型中测试的抗体加框。在这种模型中显示出最佳保护作用的两种抗体(MGG4和MGH2)显示与NPDP肽良好结合并使用VH3-30。与NPDP强烈结合的所有其它抗体(EC₅₀<100ng/mL)也使用VH3-30。一种抗体MGV3相对较弱地结合NPDP和22-110,但不是NANP重复区。

[0602] 图6显示了实施例4中单克隆抗体MGV3、MGG4、MGU5和MGG1与来自CSP的重叠肽结合。仅显示了显示通过单克隆抗体结合的CSP的区域。

[0603] 图7显示了实施例5中通过不同单克隆抗体对MGV3结合的抑制。通过与孢子结合的IgG的中值荧光强度(FI)计算结合的抑制。MGU3是与CSP的C-末端结合的抗体,MGV3与N-末端的NPDP区域结合,并且其余抗体与CSP的重复区结合。

[0604] 图8显示了实施例6的与CSP中的C-末端结合位点结合的抗体的鉴定。简而言之,以1μg/ml的浓度包被C末端肽282-383,并从1/3稀释度至1/648稀释度测试B细胞上清液。MGU3可与肽结合,而MGU1、MGU5和MGU8显示为不能与肽结合的抗体的实例。

具体实施方式

[0605] 实施例

[0606] 在下文中,呈现了示例本发明的各种实施方式和方面的特定实施例。然而,本发明的范围不应受到本文所述的具体实施方式的限制。给出以下制剂和实施例以使本领域技术人员更清楚地理解和实践本发明。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旨在作为本发明的单个方面的示例,并且功能上等效的方法在本发明的范围内。实际上,从前述描述、附图和以下实施例,除本文所述的内容外,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。所有这些修改都落入所附权利要求的范围内。

[0607] 实施例1:结合恶性疟原虫子孢子的人单克隆抗体的分离

[0608] 选择四个免受疟疾攻击的坦桑尼亚供体(确定为供体G、H、U和V)用于分离人单克隆抗体。为此,从四个供体的血液样品分离外周血单核细胞(PBMC)。通过磁性细胞分选从冷冻的外周单核细胞(PBMCs)分离IgG记忆B细胞。将B细胞与0.5 μ g/mL抗CD19-PECy7抗体一起在冰上培育20min,并且然后与小鼠抗PE微珠一起在冰上培育30min。然后在冰上用3.75 μ g/mL山羊Alexa Fluor 647缀合的抗人IgG将细胞染色20min并通过FACS分选。如先前在Traggiari等人(2004)Nat Med.10,871-875中所述,分选的B细胞用爱泼斯坦-巴尔(EBV)病毒永生,并在CpG和照射的PBMC饲养细胞的存在下涂平板于单细胞培养物中。14天后,使用高通量流式细胞仪筛选培养上清液使孢子染色的能力。在这种测定中,孢子用6.25x SYBR Green I标记并在室温下以1/2稀释度与B细胞培养上清液一起培育30min。无需任何洗涤步骤,孢子然后与1 μ g/mL山羊Alexa Fluor 647缀合的抗人IgG在4 $^{\circ}$ C下一起培育1h并通过流式细胞仪进行分析。

[0609] 对于使用重组单克隆抗体进行孢子染色,孢子用6.25x SYBR Green I染色,并在室温下与单克隆抗体一起培育30min。然后将孢子洗涤一次并用2.5 μ g/mL山羊Alexa Fluor 647缀合的抗人IgG在室温下染色30min,并通过流式细胞仪进行分析。

[0610] 孢子染色的实例显示于图1中。图1显示了通过单克隆抗体MGG1、MGG2、MGG3、MGG4和MGG5(其各自基于从供体G分离的抗体的VH/VL基因)和通过阴性对照抗体对恶性疟原虫子孢子的示例性染色。

[0611] 扩增阳性培养物并对来自各个克隆的VH和VL基因进行测序,并将其克隆成基本由(Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H(2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 329:112-124)描述的(由Michel Nussenzweig, Rockefeller University, New York, US友情提供)的人IgG1、Ig κ 和Ig λ 表达载体,并通过利用聚乙烯亚胺(PEI)瞬时转染Expi293F细胞来表达。

[0612] 下表5显示了发现与恶性疟原虫子孢子结合的示例性人单克隆抗体,以及其VH和VL应用(SEQ ID NOs参见表1和2):

		重链		轻链		
		VH	JH	VL	JL	
[0613]	供体 G	MGG1	VH3-20	JH6	VL1-51	JL3
		MGG2	VH3-74	JH5	VL7-46	JL2/JL3
		MGG3	VH3-30	JH2	VK2-29	JK1
		MGG4	VH3-30	JH3	VK4-1	JK4
		MGG8	VH3-73	JH5	VK2D-29	JK1
[0613]	供体 H	MGH1	VH1-2	JH4	VK2-30	JK2
		MGH2	VH3-30	JH4	VK2-30	JK1
		MGH3	VH3-21	JH4	VK1-47	JK3
[0613]	供体 U	MGU1	VH3-30	JH3	VL4-69	JL3
		MGU3	VH3-48	JH4	VK1-33	JK4
		MGU5	VH3-30	JH3	VK1-33	JK4
		MGU8	VH3-30	JH3	VK1-33	JK1/JK4
		MGU10	VH3-30	JH3	VL4-69	JL3
		MGU11	VH3-33	JH3	VK2-30	JK3
		MGU12	VH3-30	JH3	VK1-5	JK1
[0613]	供体 V	MGV3	VH3-66	JH6	VK3-20	JK2

[0614] 实施例2:若干单克隆抗体显示有效的体外和体内抗孢子功能

[0615] 在疟原虫生命周期的肝脏阶段期间,子孢子在富有成效侵入 (productive invasion) 靶标肝细胞之前通常遍历 (traverse) 肝细胞。在体外测试示例性单克隆抗体 MGG1、MGG2、MGG3、MGG4、MGG8、MGH1、MGH2和MGH3 (SEQ ID NOs参见表1和2) 的抑制孢子遍历和侵入肝细胞的能力。为此,使用基于定量流式细胞术的测定,其描述于Kaushansky A, Rezakhani N, Mann H, Kappe SH, 2012: Development of a quantitative flow cytometry-based assay to assess infection by Plasmodium falciparum sporozoites. Mol Biochem Parasitol. 183(1):100-3中。图2A显示了此测定的示意图。简而言之,在此测定中,肝细胞HC04细胞系在FITC-葡聚糖的存在下被恶性疟原孢子感染。子孢子遍历通过FITC-葡聚糖的摄取测量,所述FITC-葡聚糖可进入肝细胞并在遍历期间损伤膜。通过用抗环孢子蛋白 (抗CSP) 抗体对肝细胞中的子孢子进行染色测量子孢子侵入。作为对照,使用鼠单克隆抗体2A10,其靶向环孢子蛋白的NANP重复区 (Zavala F. 等人, 1983, J. Exp. Med. 157:1947-1957; Wirtz R.A. 等人, 1987, Bulletin of the World Health Organization 65(1):39-45)。

[0616] 结果显示于图2B中。本文,测量相对于添加无关IgG时,在目的单克隆抗体的存在下子孢子侵入或遍历的百分比。低百分比表示单克隆抗体的良好抑制。在此测定中,MGG4、MGH1、MGH2和MGH3显示对子孢子侵入的最大抑制。因此,选择这些抗体以及MGG8用于进一步测试。

[0617] 然后,在FRG huHEP肝嵌合小鼠模型中测试选择的单克隆抗体,基本上如Sack等人 (Sack等人, 2014, Infection and Immunity 82(2):808-817. Model for in vivo assessment of humoral protection against malaria sporozoite challenge by passive transfer of monoclonal antibodies and immune serum) 并且具体地也如Vaughan等人 (Vaughan等人, 2012, J Clin Invest 122, 3618-3628. The FRG huHEP liver-

chimeric mouse model measures sporozoite invasion and liver-stage parasite multiplication in mice with humanized livers) 中所述。图3A显示了实验设计的示意图。在此模型中,首先将抗体注射到小鼠中,然后在16-24h后通过蚊子叮咬使其感染恶性疟原虫孢子。然后在感染六天后通过成像检测肝脏寄生虫负担。

[0618] 结果显示于3B中。测量注射有目的单克隆抗体的小鼠的肝脏负担,并计算为注射非特异性IgG的小鼠的肝脏负担的百分比。在注射抗体MGG4或MGH2的小鼠中观察到肝脏负担最大减少(与阴性对照小鼠相比,分别仅显示2.5%和5.5%的肝脏负担)。

[0619] 实施例3:有效的单克隆抗体显示结合CSP的独特模式并使用VH3-30

[0620] 疟原虫环孢子蛋白(CSP)是包被整个孢子表面并在孢子功能中发挥重要作用的免疫显性蛋白。如图4A所示,此蛋白含有以信号肽(SP)开始并以区域I(RI)结束的N-末端区段。区域I是参结合肝细胞和蚊子唾液腺的五肽(KLKQP;SEQ ID NO:25)。在CSP中,区域I后是NANP重复区,即抗体的免疫显性位点和含有T细胞表位的C-末端血小板反应素样结构域(图4A)。图4B显示了恶性疟原虫分离株NF54的环孢子蛋白的示例性序列(SEQ ID NO:24)。

[0621] 如实施例1中所述的抗原无关方法(antigen-agnostic approach)用于鉴定可结合孢子表面的任何抗体。在此方法中,发现表5中显示的所有抗体均结合CSP,确认此蛋白的免疫显性(数据未显示)。

[0622] 接下来,测试抗体与来自图4C中所示的CSP的不同部分的肽的结合。在此测定中,将半区96孔ELISA平板用完整的重组CSP(SEQ ID NO:24;1 μ g/mL)、NANP-肽(SEQ ID NO:26;2 μ g/mL)、NPDP-肽(SEQ ID NO:23;5 μ g/mL)或22-110-肽(SEQ ID NO:27;1 μ g/mL)包被在4 $^{\circ}$ C下过夜。平板用PBS中的1%牛血清白蛋白封闭,并与滴定的抗体一起培育,然后与AP缀合的山羊抗人IgG一起培育。然后洗涤平板,添加底物(p-NPP)并在405nm下读取平板。

[0623] 结果显示于图5中,其中方框显示了在体内小鼠模型中测试的抗体。有趣的是,在体内测定测试的五种抗体(MGG4、MGG8、MGH1、MGH2、MGH3)中,在体内测定中显示最佳功能的两种抗体(MGG4、MGH2,参见实施例2)与NPDP-肽(SEQ ID NO:23),即N-末端和NANP重复区之间的连接处的CSP结合良好。体内测定中测试的其它三种抗体(MGG8、MGH1、MGH3)仅显示与此区域结合差或忽略不计。相反,与仅含有重复区的肽或整个CSP结合的亲和力在体内测定中不区分具有不同功能能力的抗体。

[0624] 有趣的是,最有效的抗体MGG4和MGH2结合的CSP区域,即N-末端和NANP重复区之间的连接处,不包括在领先的疟疾疫苗RTS,S中。而是,RTS,S并入了NANP重复区的C-末端的一半和C-末端结构域。目前的数据表明N-末端和NANP重复区之间的连接处是来自受保护个体的在体内模型中显示最有效功能的抗体的重要靶标。不受任何理论的束缚,本发明人设想此区域由于其与区域I接近而可以是重要的,区域I被认为是在肝细胞侵入期间切割CSP的N-末端的寄生虫蛋白酶的靶标(Coppi等人(2011) J Exp Med 208,341-356;Coppi等人(2005) J Exp Med 201,27-33)。

[0625] 与NPDP-肽(SEQ ID NO:23)良好结合的进一步抗体包括MGG3、MGU5、MGU8和MGU12。

[0626] 此外,与NPDP-肽良好结合的所有抗体(MGG4、MGH2、MGG3、MGU5、MGU8和MGU12)使用VH3-30,表明此VH的应用优先结合此关键区域。

[0627] 发现一种抗体MGV3相对较弱地结合NPDP-肽和22-110-肽,但不是NANP-肽。这表明

抗体MGV3识别CSP的N-末端和NPDP区域,但不识别NANP重复区。因此,与MGG4、MGH2、MGG3、MGU5、MGU8和MGU12的结合位点相比,MGV3似乎稍微结合N-末端。

[0628] 发现其它抗体与NANP-肽结合良好,但与NPDP-肽和22-110-肽结合弱(如果有的话),由此指示在NANP重复区的(中间)的结合位点。这种抗体包括MGU11、MGU1、MGH3、MGH1、MGG8,并且较小程度上包括MGG2和MGG1。

[0629] 仅抗体MGU3显示不与任何使用的CSP-肽(22-110、NPDP-肽、NANP-肽)结合,尽管其显示结合整个PfCSP。这可表明MGU3的结合位点,其位于CSP中的NANP重复序列的C-末端。

[0630] 实施例4:单克隆抗体的精细表位作图

[0631] 为鉴定单克隆抗体靶向的CSP的精确区域,针对CSP进行选择抗体的线性表位作图(PEPperPRINT GmbH,Heidelberg,Germany的PEPperMAP®)。为此,测试抗体MGV3、MGG4、MGU5和MGG1与覆盖整个蛋白质的(由单个氨基酸移位的)一系列15-aa CSP肽的结合(图6)。简而言之,孢子蛋白(CSP)的序列在C-和N-末端被中性GSGSGSG接头(SEQ ID NO:28)延长以避免截短的肽。延长的抗原序列被翻译成线性15个氨基酸的肽,其中肽-肽重叠14个氨基酸(图6)。所得的CSP肽微阵列含有重复打印的457个不同的肽(914个肽点)、另外的定制对照肽(每个对照2个点)、c-Myc对照(2个点)和HA对照肽的框架(82个点)。将CSP肽微阵列与浓度1 μ g/ml、10 μ g/ml和100 μ g/ml的抗体样品一起在培育缓冲液中培育,然后用二抗和对照抗体染色,以及用LI-COR Odyssey成像系统读取。用PepSlide® Analyzer测量点强度和肽注射。

[0632] 结果显示于图6中。发现识别N-末端和NPDP肽(图5)但不识别NANP重复区的肽MGV3似乎结合NPDP基序,然而MGG4和MGU5能够结合靠近此区域的第一个NANP重复序列。

[0633] 实施例5:MGV3与完整孢子结合的抑制

[0634] 接下来,在结合阻断(BOB)测定中测试单克隆抗体MGG1、MGG4、MGU5和MGU3是否可抑制MGV3与完整孢子的结合。在此测定中,孢子用3.3x SYBR Green I染色并与(0.1至100 μ g/mL)滴定的单克隆抗体在室温下一起培育20min。无需洗涤,孢子随后与10 μ g/mL生物素标记的MGV3在室温下一起培育20min。将孢子洗涤两次,在室温下与和Alexa Fluor 647缀合的链霉抗生物素一起培育20min,并通过流式细胞仪进行分析。Alexa Fluor 647通道中的中值荧光强度(中位数FI)的降低用于测量生物素化MGV3的结合的抑制程度。

[0635] 结果显示于图7中。发现与NPDP肽良好结合并且可与基于肽阵列结果(图6)的第一NANP重复序列结合的MGG4和MGU5可抑制MGV3的结合,而进一步远离N-末端结合的MGG1不能有效地抑制结合。这证实了实施例3和4的结果,即与NDPD-肽结合的抗体(如MGG4和MGU5)比不与NDPD-肽结合的那些抗体(如MGG1或MGU3)结合CSP的更多N-末端区域。总之,数据表明与NDPD-肽结合的抗体(如MGG4和MGU5)由于其更靠近N-末端的结合能力而具有有效的功能活性。

[0636] 值得注意的是,未标记的MGV3不能抑制结合,因为总体上这种抗体以低亲和力结合孢子,并且使用的生物素化的MGV3的浓度远低于其饱和点。

[0637] 实施例6:与CSP中C-末端结合位点结合的抗体的鉴定

[0638] 由于实施例3的数据(图5)表明在所有测试的抗体中,仅抗体MGU3结合CSP中C-末端结合位点,测试不同的抗体结合CSP的C-末端的能力。

[0639] 为此,用表1中显示的抗体进行与实施例3中所述的基本相同的实验。然而,代替本

实验实施例3中所述的CSP-测试肽(即,22-110-肽、NPDP-肽、NANP-肽),使用C-末端肽282-383(SEQ ID NO:312)。简而言之,以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度包被C-末端肽282-383,并从1/3稀释度至1/648稀释度测试B细胞上清液。

[0640] 选择的抗体MGU1、MGU3、MGU5和MGU8的结果显示于图8中(未显示表1中其它抗体的数据)。从实施例3和5的结果可以预期,仅抗体MGU3结合C-末端肽282-383,然而所有其它测试的抗体不结合CSP的C-末端。这些结果证实抗体MGU3结合CSP的C-末端,然而其它抗体不结合CSP的区域。

[0641] 序列列表和SEQ ID号(序列列表):

[0642]

SEQ ID NO	序列	Remarks
SEQ ID NO: 1	NPDP	CSP表位
SEQ ID NO: 2	NPDPN	CSP表位
SEQ ID NO: 3	NPDPNA	CSP表位
SEQ ID NO: 4	NPDPNAN	CSP表位
SEQ ID NO: 5	NPDPNANP	CSP表位
SEQ ID NO: 6	NPDPNANPN	CSP表位
SEQ ID NO: 7	GNPDPNANP	CSP表位
SEQ ID NO: 8	GNPDPNANPN	CSP表位
SEQ ID NO: 9	DGNPDPNANP	CSP表位
SEQ ID NO: 10	NPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 11	DGNPDPNANPN	CSP表位
SEQ ID NO: 12	GNPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 13	DGNPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 14	ADGNPDPNANPN	CSP表位
SEQ ID NO: 15	QPADGNPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 16	ADGNPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 17	PADGNPDPNANPNK	CSP表位
SEQ ID NO: 18	ADGNPDPNANPNKN	CSP表位
SEQ ID NO: 19	PADGNPDPNANPNKN	CSP表位
SEQ ID NO: 20	QPADGNPDPNANPNKN	CSP表位
SEQ ID NO: 21	PADGNPDPNANPNKNN	CSP表位
SEQ ID NO: 22	QPADGNPDPNANPNKNN	CSP表位
SEQ ID NO: 23	KQPADGNPDPNANPNKNN	NPDP肽
SEQ ID NO: 24	MMRKLAILSVSSFLFVEALFQEYQCYGSSSNT RVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENW YSLKKNRSRLGENDDGNNEDNEKLRKPKHKK LKQPADGNPDPNANPNVDPNANPNVDPNANP NVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNVDPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN NNQGNGQGHMNPDPNRNVDENANANS AVKNNNNEEPSDKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCS VTCGNGIQVRIKPGSANKPKDEL DYANDIEKK ICKMEKCSSVFNVVNSSIGLIMVLSFLFLN	PfCSP
SEQ ID NO: 25	KLKQP	CSP区域I
SEQ ID NO: 26	NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN	NANP肽
SEQ ID NO: 27	EYQCYGSSSNT RVLNELNYDNAGTNLYNELE MYYGKQENWYSLKKNRSRLGENDDGNNED NEKLRKPKHKKLKQPADGNPDPNANPNV	22-110肽
MGG1		
SEQ ID NO: 28	GFTFDDYA	CDRH1 aa

[0643]

SEQ ID NO: 29	INWNGGST	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 30	ARLGRAAREYYYYMDV	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 31	SSNIGNNY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 32	DNN	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 33	LIYDNNKRP	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 34	GTWSSLSAGV	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 35	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRSLCAASGFTFDD YAMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT ALYHCARLGRAAREYYYYMDVWGKGTTV TVSS	VH aa
SEQ ID NO: 36	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSG SKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLS AGVFGGKTLTVLGQ	VL aa
SEQ ID NO: 37	ggattcaccttfgatgattatgcc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 38	attaattggaatggtggtagcaca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 39	gegagactgggagagcagcccgtagtactactactacatgg acgtc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 40	agctccaacattggaataattat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 41	gacaataat	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 42	ctcatttatgacaataataagcgaccc	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 43	ggcacatgggatagcagcctgagtgctggagtg	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 44	gaggtgcagctggtggagctgggggaggtgtgtacggcctggggg gtccctgagactctctgtgcagcctctggattcaccttfgatgattatg ccatgagctgggtccccaagctccaggaaggggctggagtggtct ctggtattaattggaatggtgtagcacaggtatgcagactctgtgaa gggccgattcaccatctccagagacaacccaagaactccctgtatctg caaatgaacagtctgagagccgaggacacggcctgtatcactgtgcga gactgggagagcagcccgtagtactactactacatggacgtc tggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctca	VH nuc
SEQ ID NO: 45	cagtctgtgtgacgcagccgccctcagtgtctcgggccccaggacag aaggtcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattggaataat tatgtatcctggtaccagcagctcccaggaacagccccaaactcctca tttatgacaataataagcgacccctcaggattcctgaccgattctctggc tccaagtctggcagctcagccacctgggcatcaccggactccagact ggggacgagccgattactcgggcacatgggatagcagcctga gtgctggagtgctggcggaggaccaagctgaccgtcctaggtcag	VL nuc
MGG2		
SEQ ID NO: 46	GFTLNNYW	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 47	INIDGSTT	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 48	AKGSIKAGGFWSGYSNWFDP	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 49	PGPVTSGHY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 50	DTS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 51	LIYDTSNKH	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 52	LLSYGGAPV	CDRL3 aa

[0644]

SEQ ID NO: 53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLNN YWMHWVRQAPGKGLVWVAHINIDGSTTTY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGSIKAGGFWSGYSNWFDPWGQG TLVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 54	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCDSDPGPVTSG HYPYWFQQKPGQVPRTLIYDTSNKHSWTPAR FSGSLLGGKAALTLGAQPEDEADYYCLLSY GGAPVFGGGTKLTVL	VL aa
SEQ ID NO: 55	ggattcaccctcaataactactgg	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 56	attaatatcgatggcagctactaca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 57	gcaaaaggaagtattaaggccggaggttttggagtgggtactcca actgggtcgacccc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 58	cctggacctgtcaccagtggctattat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 59	gataccagc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 60	ctgatttatgataccagcaacaaacac	CDRL2 长nuc
SEQ ID NO: 61	ctgctctcgatgggtggcctctga	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 62	gaggtgcagctgggtggagtcgggggaggcttagttcagccgggggg gtccctgagactctctgtgcagcctct ggattcaccctcaataactact ggatgcactgggtccgccaagctccagggaaggggctggtctgggtcg cacatattaatatcgatggcagctactacaacctacgggactccgtga agggccgattaccatctccagagacaacgcaagaacacgctgtatct gcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtctattactgtgca aaggggaagtattaaggccggaggttttggagtgggtactccaactg gttcgacccctggggccagggaacctggtcaccgtctcctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 63	caggctgtgggtgactcaggagccctcactgactgtgtccccaggaggg acagtcactctcactgtgactccgacct ggacctgtcaccagtggte attatccctactggtccagcagaagcctggccaagtcgccaggacact gatttatgataccagcaacaaactcctggacacctgcccggtttcag gtccctccttgggggcaagctgcctgaccttccgggtgcgcagcc tgaggatgaggtgactattactgcctgctctcgatgggtggcctct gtattcggcggagggaacaaactgacctcctaa	VL nuc
MGG3		
SEQ ID NO: 64	GFTFSTFG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 65	IWYDGSSK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 66	VKVGANWGWRYFDL	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 67	QSLHSDGNTY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 68	EVS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 69	LIYEVSSRF	CDRL2 长aa
SEQ ID NO: 70	MQGIHSWT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 71	QEQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSTF GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSSKYHA DSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAM YYCVKVGANWGWRYFDLWGRGTLVTVSS	VH aa

[0645]

SEQ ID NO: 72	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSD GNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCMQG IHSWTFGQGTKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 73	gattcaccttcagtaacctttggc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 74	atctggtatgatggaagtagtaaa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 75	gtgaaagtcggagctaactggggatggaggtaactcgaatc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 76	cagagcctcctacatagtgatggaacacctat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 77	gaagttcc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 78	ctgatctat gaagttcc agccggctc	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 79	atgcaaggcatacactcgtggagc	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 80	caggagcaactggtggagtctggggaggcgtggtccagcctgggaa gtccctgagactcctctgtgcagcctct ggattcaccttcagtaacctttg gc atgcactgggtccgcaggctccaggcaaggggctggagtgggtg gcagt catctggtatgatggaagtagtaaa taccatgcagactccgtg aagggccgattcacatcctcagagacaattccaagagcacgctgtatct gcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctatgtattact gtg aaagtcggagctaactggggatggaggtaactcgaatc ctggggcc gtggcaccctggtcaccgtctcctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 81	gatattgtgatgaccagactcactctctctgctcaccctggaca gccggcctccatctctgcaagtctag tcagagcctcctacatagtgat ggaacacctatt gtcttggtaactgcagaagccagccagctccac agctcctgatctat gaagttcc agccggttctctggagtccagatagg tcagcggcagcgggtcaggacagattcacactgaaatcagccgg gtggaggctgacgatgtggggttactact gc at gcaaggcatacact ctggagc gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaac	VL nuc
MGG4		
SEQ ID NO: 82	GFRFSDYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 83	IWYDGSNE	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 84	AKLLVGITTDVFDV	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 85	QSVLSSSNKNKY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 86	WAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 87	LIYWASTRE	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 88	QQYYTASPF	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 89	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFRFSD YGMHWVRQAPGKGLEWVALIWYDGSNESY LDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLR TEDTA VYYCAKLLVGITTDVFDVWVGQTVVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 90	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLSS NNKNYLAWYQHKPRQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQ YYTASPF GGG TKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 91	ggattcaggttcagtgactatggc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 92	atatggtatgatggaagtaatgaa	CDRH2 nuc

SEQ ID NO: 93	gcgaaactactagtggaattactactgatgttttgatgtc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 94	cagagtgtttatccagctccaacaataagaactac	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 95	tgggcactct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 96	ctcatttactgggcactctaccgggaa	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 97	cagcaatattatactgcttcccatt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 98	caggtgcagctggtggagctgggggagggcgtggtccagcctgggag gtccctgagactctctgtgcagcctct ggattcagggtcagtactatg gc atgcactgggtccgccaggtccgggcaagggctggagtgggtg gcact tatatggatgatggaagtaata ctatttagactccgtgaa gggcccattaccatctccagagacaattccaagaacacactgtatctgc aaatgaacaacctgagaactgaggacacggctgtgtattactgt gcgaa actactagtggaattactactgatgttttgatgct ggggccaagg gacagtggcaccgtctctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 99	gacatggtgatgaccagctccagactccctggtgtgtctctgggcca gagggccaccatcaactgcaggtccagc cagagtgtttatccagctc caacaataagaactact tagcttgggtaccagcacaaccacgacagcc tctaaactgctcatttact gggcactct accgggaatccgggtccctg accgattcagtggcagcgggtctgggacagattcactctaccatcagc agcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgt cagcaatattatac tgttcccattttc ggcggaggggaccaaggtagagatcaaac	VL nuc
MGG8		
SEQ ID NO: 100	GFMISGSV	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 101	IRDKANNEAT	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 102	TRGIIVGDTWHFDP	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 103	ESLLRSDGKTY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 104	EVS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 105	LMYEVSKRF	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 106	MQSIQLVT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 107	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFMISGS VLHWVRQASGKGLEWLGR IRDKANNEATAY AASVKGRFTISRDDSKDTTYLQMNSLR IEDTA VYYCT TRGIIVGDTWHFDP WGQGTLVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 108	DIVMTQTPLSLSVTPGQTASISCKSS ESLLRSD GKTYLYWYLQKPGQSPQLLMYEVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISR VETDDVGIYYCMQS IQLVTFGQGTKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 109	gggttcatgatcagtggtctgtt	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 110	attagagacaaagctaacaatgagcgaca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 111	acgaggggtatcatagtaggtgacacctggcacttcgacccc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 112	gagagcctcctgagaagcgatggaagacctc	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 113	gaagttcc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 114	ctgatgtat gaagttcca agcgttc	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 115	atgcaaaagtatacagcttgtgact	CDRL3 nuc

[0646]

[0647]

SEQ ID NO: 116	gaagtgcagctggtggagtcgggggaggcctggccagcctggggggtccctgaaactctctgtgcagcctctgggttcattgatcagtggtctgtftctacactgggtccgccaggcctccgggaaaggctggagtggcttgcccgtattagagacaagctaacaatgagggcagacagcatatgcagcgtcggtgaaaggcaggttcaccatctccagagatgattcaaaggacacacatactgcaaatgaacagcctgagaatcaggacacggcctgtattactgtacgaggggtatcatagtaggtgacacctggcacttcgacccctggggccagggaacctggtcaccgtctctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 117	gatattgtgatgaccagactccactctctgtcctgcaccctggacagacggcctcctcctgcaagtctagtgagagcctcctgagaagegatggaaagacctactgtattggtatctgcagaagccagccagctccaagcctctgatgatgaagttccaagcgtctctggagtccagataggttcagtggcagcgggtcaggaacagatttacactgaaatcagccgggtggagactgatgatgttgcaattattactgatgcaaaagtatacagcttgtgacttccggccaagggaccaaggtggaatcaaac	VL nuc
MGH1		
SEQ ID NO: 118	GYTFTDYY	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 119	INPYIGVS	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 120	AACSNVGCYVY	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 121	QSLVYSDGNTY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 122	KVS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 123	LIYKVSNRD	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 124	MQGTHWPDT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 125	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVVSCKTSGYTFTDYYVHWVRQAPGHGLECMGWINPYIGVSKYAKKFQGRVTLTRDTSISTAYMEISRLTSDDTAVYYCAACSNVGCYVYWGQGLVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 126	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVAIYFCMQGTHWPDTFGQGTKLEIK	VL aa
SEQ ID NO: 127	ggatacacgttcaccgactactat	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 128	atcaatccttacattggtgtctca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 129	gcggtttagtaacgttggtctacgtctat	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 130	caaagtctcgtgtacagtgatggaacacctac	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 131	aaggtttct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 132	ctaattataaggtttctaatcgggac	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 133	atgcaaggtacacactggcctgacact	CDRL3 nuc

[0648]

SEQ ID NO: 134	cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagagctctctgcaagacatct ggatacacgttcaccgactac tatgtccactgggtgcgacaggccccaggacacgggcttgagtgcattg ggctggatacaatcctfacattgggtctcaagatgacagaaagttca gggcagggtcacctgaccaggacacgtccatcagcacagcctacat ggaaattagcaggctaacatctgacgacacggcctctattactgtgcg ctttagtaacgttggtgctactctattggggccagggatcgctggt caccgtctctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 135	gatggtgatgactcagctccactctccctgccctgaccctggacagccggcctccatctctcaggtctag caagctcgtgtacagtgatg gaaacacctact gaattggttcagcagaggccaggccaatctcaaggcgcctaattata aaggttct aatcgggactctggggtcccagacagattcagcggcagtggtcaggcactgattcacactgaaaatcagcagggtggaggctgaggatggtgcgattattctgc atgcaaggtacacact ggcctgacact ttggccaggggaccaaactggagatcaaac	VL nuc
MGH2		
SEQ ID NO: 136	GFSFSSYA	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 137	TRYDGSNK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 138	AKVGDGTVAGTIDY	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 139	QSLVYSDGNTY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 140	KVS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 141	LIYKVSNRD	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 142	MQGTHWWT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 143	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTAS GFSFSSY AMHWVRQAPGKGLEWVAY TRYDGSNK FYL DSVQGRFTISRDNKNTLYLEMDSLRLEDTAV YFCA AKVGDGTVAGTIDY WGQGLTVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 144	YIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS QSLVYSD GNTY LNWYQQRPGQSPRRLIY KVS NRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQ GTHWWT FGQGTKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 145	ggtttcagcttcagtagttatgcc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 146	acacgggtatgatggaagtaataag	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 147	gcgaaagtgggggacgggacagtggctggtactattgacta	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 148	caaagcctcgatatagtgatggaacacctac	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 149	aaggtttct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 150	ctaattata aaggttct aatcgggac	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 151	atgcaaggtacacactgggtggacg	CDRL3 nuc

[0649]

SEQ ID NO: 152	caggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctggggggtccctgagactctctgtacagcgtctggttcagcttcagtagttatg ccatgcaactgggtcccgccaggctccaggaaggactggagtgggtg gcatatacaggtatgatggaagtaataagtctacactagactccgtgc agggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg gaaatggacagcctgagacttgaggacacggctgtctatttctgtgcaaa agtgggggacgggacagtggtgactattgactactggggccag ggaacgctggtcaccgtctctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 153	tatattgtgatgactcagctcctcctgcccgtcaccctggagac ccggcctccatctctgcaggctctagcaaaagcctctatatagtgatg gaaacacctactggaattggtatcagcagagccaggccaatctcaa ggcgcctaattataagggttctaatcgggactctgggtcccagacag atttagcggcagtggtcaggcactgattcacactgaaaatcagcagg gtggaggctgaggatgtgggtttattactgatgcaaggtacacact ggtggacgttcggccaagggaaccaaggtggaatcaaac	VL nuc
MGH3		
SEQ ID NO: 154	GFTFSSYT	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 155	ISSSGSYI	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 156	ARNVLDSSGYPTYFDY	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 157	QSLLYSNGYNY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 158	LGS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 159	LIYLGSNRA	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 160	MQAVQTPLT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 161	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSY TMNWVRQAPGKGLEWVSS ISSSGSYI YYADS VKGRCTISRDNKNSLDLQMN SLRAEDAAVY YCARNVLDSSGYPTYFDYWGQGLTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 162	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS QSLLYSN GYNYLDWYVQKPGQSPRLLIYLGSNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGFYY CMQA VQTPLTFGGGTKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 163	ggattcaccctcagtagttatacc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 164	attagtagtagtggtagttacata	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 165	gcaagaaatgtcttggacagtagtggttaccacgactttgacta	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 166	agagcctcctatataagtaatggatacaactat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 167	ttgggttct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 168	ctgatctatt ttgggttct aatcgggcc	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 169	atgcaagetgtacaaactcccctact	CDRL3 nuc

[0650]

SEQ ID NO: 170	gaggtgcagctggtggagctctgggggaggcctggcaagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctct ggattcacttcagtagttataccat gaactgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcatcc attagtagtagtggtagttacata tattacgcagactcagtgaagggccgatgcaccatctccagagacaacgccaagaactcactggatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacgcgctgtgtattactgt caagaaatgtcttggacagtagtggttaccccacttcttactattg ggccagggaacgctggcaccgtctctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 171	gatattgtgatgactcagctccactctccctgcccgtcaccctggagagccggcctccatctctgaggtctagt agagcctctatataagtaattggatacaactat ctggattggtacgtgcagaagccaggggcagctccaagcctctgatctatt ttgggttct aatgggctccggggtccctgacaggttcagtggcagtgatcaggcacagattttactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggttttattactg catgcaagctgtacaaactccccactt tcggcggagggaccaaggtggagatcaaac	VL nuc
MGU1		
SEQ ID NO: 172	GFAFSSYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 173	IWHDGTNK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 174	AIWYLDSPDHGFDI	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 175	NGHSSNA	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 176	VNSDGS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 177	QAWDSGIWV	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 178	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFAFSSYGMN WVRQAPGKGLEWVAVI IWHDGTNKY YRDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMDLSAEDTAMYYCAI IWYLDSPDHGFDI WGRGTMVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 179	QLVLTQSPSASASLGVSVTLTCTLN NGHSSNAI AWHQQPGKGPRLMK VNSDGS HNKGAAVPDRFSGSSSGTERHLTISSLQSDDEADY YCQAWDSGIWV FGGKLTVL	VL aa
SEQ ID NO: 180	ggattegcttcagtagttatg gc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 181	atttggcatgatggaccaataa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 182	gccatttggatcttgatagctctgatcatggttfcgata tc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 183	aatggccacagttccaatgc	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 184	gttaatagtgatggcagca	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 185	caggcctgggacagtgccatttgggt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 186	caggtgcagctggtggagctctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcatgtgcagcctcc ggattegcttcagtagttatggcat gaactgggtccgcccaggctccaggcaagggactggagtgggtggcagtt atttggcatgatggaccaataa actatagagactccgtgaaggccgattcatctccagagacaatccaagaacacctgtatctgcaaatggacagcctgagcctgaggacacggctatgtattactgt gccatttggatcttgatagctctgatcatggttfcgata ctggggccgagggacaatggcaccgtctctcag	VH nuc

[0651]

SEQ ID NO: 187	cagcttgctctgactcaatgcacctctgacctgacctccctgggagctctggtcaccctcacctgtactctgaacaatggccacagttccaatgccatgcatggcatcaacagcagccaggggaagggccctcgtaattgatgaaggttaatagtgatggcagccacaataagggggccgctgtccctgatcgcttctcaggctctagtctgggactgagcgcacctcaccatctccagcctccagtctgacgataggctgactattatgtcaggcctgggacagtgggcatftgggttttcggcgaggaccaggtgaccgtctag	VL nuc
MGU3		
SEQ ID NO: 188	GFTFSDYN	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 189	ISHSSSTT	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 190	ARLRPLSYSGRYRDY	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 191	QDVSNY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 192	DAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 193	LIYDASTLQ	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 194	QQYDSLPLT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 195	EVLLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDY NMHWVRQAPGKGLEWLSY ISHSSSTT YYADS VRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY Y CARLRPLSYSGRYRDY WGQGLVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 196	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQAS QDVSNY VNWYQQKPGKAPKVL YDASTLQ TGVPSRFS GSGSGTDFTFSSISLQPEDATYYC QQYDSLPL TFGGGTKVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 197	ggattcaccttcagtactataac	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 198	attagtcatagtagtagtaccaca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 199	gcgagacttcgtcccttatcgatatagtgccaggtaccgcgactac	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 200	caggacgttagtaattat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 201	gatgatcc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 202	ctgatctac gatgatcc actttgcaa	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 203	cagcagtatgatagcctcccactcaact	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 204	gaggtgctactagtggagtctggggaggcttggtacaacctggggggtccctgagactctctgtgcagcctct ggattcaccttcagtactataa catgcactgggtccgccaggtccaggggaaggggctggagtggctttc ata cattagtcatagtagtagtaccacatactacgcagactctgtgagg ggccgaticaccatctccagagacaatgccaagaactcactgtatctgca aatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgt gcgag acttcgtcccttatcgatatagtgccaggtaccgcgactactggggcca gggaacgctggtcaccgtctctcag	VH nuc

[0652]

SEQ ID NO: 205	gacatccagatgacccagctccatcctccctgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcacttgccaggcgagtcaggacgtagtaattatgt aaattggatcagcagaaccagggaagccctaaggctctgatctac gatgcatcc actttgcaaacaggggtccatcaagggtcagtggaagtg gateggggacagatttactttcagcagcagcagcctgcagcctgaagat attgcaacatattactgt cagcagtagatagcctccactcact ttcgg cggagggaccaaggtggagatcaaac	VL nuc
MGU5		
SEQ ID NO: 206	GFSFSSYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 207	IWHDGTNK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 208	TKRAGWGDALDI	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 209	QDISNY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 210	DAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 211	LIYDASNLE	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 212	QQQRI	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFSFSSY GMHWVRQAPGKGLDWVAL IWHDGTNK FYT DSVKGRFTISRDNKDTLFLQMNSLRVEDTAV YYCT TKRAGWGDALDI WGQGMVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 214	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQAS QDISNYL NWYQQKPGKAPKLLIY DASNLE TGVPSRFGSGS GSATDFTLTISLQSEDIATYYC QQQRIF GGGT KVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 215	ggattcagcttcagtagttatg gc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 216	atatggcatgatggaactaataa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 217	acgaagcgggctggctggggtgatgctcttgat atc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 218	caggacattagcaactat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 219	gatgcatcc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 220	ctgatctac gatgcatcc aatttgaa	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 221	caacaacaaggatt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 222	caggtgcagttggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggag gtccctgagactctctgtgcagcctct ggattcagcttcagtagttatg gcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaagggctggattgggtg ctct tatatggcatgatggaactaataa atttacagactccgtgaag ggccgattcaccatctccagagacaattccaaggacacactgtttctgca aatgaacagtctgagagttgaggacacggctgtgtattactgt acgaag eggctggctggggtgatgctcttgat atctggggccaagggacaat ggtcaccgtctctcag	VH nuc

[0653]

SEQ ID NO: 223	gacatccagatgacccagctccatcctccctgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcaacttgccaggcgagtcaggacattagcaactatt aaattggatcagcagaaccagggaaagccctaaactcctgatctac gatgcatcca atttggaaacaggggtcccatcaagggtcagtggaagt gatctgacagatcttactctcaccatcagcagcctgagctctgaagac attgcaacatattactgt caacaacaaggatt tctggcgaggacc aaggtggagatcaaac	VL nuc
MGU8		
SEQ ID NO: 224	GFTFSNYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 225	IWHDGTNK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 226	TKRGGWGDGSDI	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 227	QDVDNY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 228	DAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 229	LIYDASNLA	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 230	QQQRI	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 231	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAAGGFTFSN YGMHWVRQAPGKGLEWVALIWHDGTNKFY ADSVKGRFTISRDN SKNTLSLQMDSLTTEDTAI Y FCTKRGGWGDGSDI WGQTMVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 232	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCQASQDVDNY LNWYQHKGPKAP KLLIYDASN LATGVPSRFS GSGSSTDFTLT ISSLQSDDFATYYCQQQRIFGG GTRVEIK	VL aa
SEQ ID NO: 233	ggattfacctcagtaactatg gc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 234	atatggcatgatggaactaataa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 235	acgaagcgaggtggctggggtgatggttctgat atc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 236	caggacgtgacaactat	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 237	gatgcatcc	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 238	ctgatctac gatgcatcca atttggcg	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 239	caacaacaaggatt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 240	caggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggag gtccctaagactcctgtgcaagcgg tgattfacctcagtaactatg gatgca ctgggtccgcccaggctccaggcaaggggctggagtggtg gca ctatatggcatgatggaactaataa ttctatgcagactcctga agggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtctctg caaatggacagcctgacaactgaggacacggctatata ttctgacgaa gcgaggtggctggggtgatggttctgata tctggggccaagggaca tggtcaccgtctctcag	VH nuc

[0654]

SEQ ID NO: 241	gacatccagatgaccagctccatcctccctgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcactgccaggcagtcaggacgttgacaactatfta aattggatcagcataaaccagggaagcccctaagctcctgatctacga tgcatccaattggcgacaggggtcccaaggtcagtggaagtgga tcttcgacagatttactctcaccatcagcagcctgcagctgatgacttg caacatattactgtcaacaacaaggatttcggcggaggaccaggg tggaatcaaac	VL nuc
MGU10		
SEQ ID NO: 242	GFAFSNYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 243	IWHDGSLK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 244	TVWYLETPDDGFDI	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 245	HGHTSKA	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 246	VNSDGS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 247	QAWDSGIWV	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 248	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSN YGMNWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGSLKYY TQSVKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLSADDTA MYYCTVWYLETPDDGFDIWGRGTMVTVSS	VH aa
SEQ ID NO: 249	QLVLTQPPSASASLGVSVTLTCTLSHGHTSKA IAWHQQQPGKGPRLMKVNSDGSHTKGA AV PDRFSGSTSGAERHFTISNLQSDDEADYYCQA WDSGIWVFGGGTKLTVL	VL aa
SEQ ID NO: 250	ggattegcttcagcaattatggc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 251	atttggcatgacggcagctcttaa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 252	accgtttggtaccttgaactcctgatgatggttctgatatt	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 253	catggccacacctccaagcc	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 254	gttaatagtgatggcagccac	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 255	caggcctgggacagtggttgggtt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 256	caggtgcagctggtggagctcggggaggcgtggtccagcctgggag gtcctgagactctcatgtgcagcctcggattegcttcagcaattatg gcatgaactgggtccgccaggctccaggcaaggactggaatgggtg gcagttatttggcatgacggcagctctaaatattatacacagctccgtgaa gggccgattaccatctccagagacaatccaagaacacgtgtttctcc aaatggacagcctgagcgtgacgacacggctatgtattattgtaccgtt tggtaccttgaactcctgatgatggttctgatatttggggccgaggg acaatggtcaccgtctcgtcag	VH nuc
SEQ ID NO: 257	cagctgtcctgactcaaccgccctctgctctgctcctgggagctc ggteacctcactgtactctgagtcattggccacacctccaagccatc gcgtggcatcaacagcagccagggaaggccctcgtatttgatgaaa gttaatagtgatggcagccac actaagggggccgctgtcctgatc cttctcaggtctactctgggctgagcgcacttcaccatctccaact ccagctgacgataggctgattattgtcaggcctgggacagtggc atttgggttctggcggaggaccgaagtgaccgtctag	VL nuc
MGU11		

[0655]

SEQ ID NO: 258	GFSFSSYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 259	IWYDGTNK	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 260	ANDIAGWGYDGSNA	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 261	QSLVYSDGNTY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 262	KVS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 263	LIYKVSNRD	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 264	MQGTVGFT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 265	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFSFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGTNKYY ADSVKGRFTISRDN TKNTLYLQMNSLRADDT AMYVCANDIAGWGYDGSNAWGQGLTVTS S	VH aa
SEQ ID NO: 266	LSLPVTGPQPASISCKSSQSLVYSDGNTYLNW FQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTVGFTFG PGTTVDIK	VL aa
SEQ ID NO: 267	ggattcagcttcagtagctatggc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 268	atatggtatgatggaaccaataaa	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 269	gcaaatgatattgcgggggtgggctatgatgtagtaaatgcc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 270	caaagcctcgtatatagtgatggaacacactac	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 271	aaggtttct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 272	ctaattataaaggtttctaacggggac	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 273	atgcaaggtacagtggggttact	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 274	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtagtcagcctgggag gtcctgagactctcctgcgtagcctctggattcagcttcagtagctatg gcatgcactgggtccgcaggctccaggcaagggctggagtgggtg gcagttataggtatgatggaaccaataaaactatgcagattccgtga agggccgattcaccatctccagagacaataccaagaacacgtgtacct gcaaatgaacagcctgagagcggacgacacggctatgtattactgtgcg aatgatattgcgggggtgggctatgatgtagtaaatgcctggggcca gggaacctgtgtaccgtctcctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 275	ctctcctgccctgaccctggacagccggcctccatctcctgcaagt ctagtcaaagcctcgtatatagtgatggaacacactacttgaattggtt tcagcagaggccaggccaatctccaaggccttaattataaaggtttct aacgggactctgggtcccagacagattcagcggcagtggtggtcagg cactgattcactgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgtggg gtttattactgatgcaaggtacagtggggttacttccggccctggga ccacagtggatatcaaac	VL nuc
MGU12		
SEQ ID NO: 276	GFSFSSYG	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 277	IWHDGSYS	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 278	VKVEDYVRGSSHGGAFHI	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 279	QTINNW	CDRL1 aa

[0656]

SEQ ID NO: 280	KAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 281	LIYKASSLE	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 282	QQYSSYWT	CDRL3 aa
SEQ ID NO: 283	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGPEWVAVIWHDGSYSYYA DSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTGM YHCVKVEDYVRGSSHGGAFHIWGQGMVT VSS	VH aa
SEQ ID NO: 284	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQTINNW LAWYQWKPGKAPELLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYSSYWTF GQGTKVDIK	VL aa
SEQ ID NO: 285	ggattcagcttcagtagttatggc	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 286	atttggcatgatggaagttacagt	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 287	gtgaaagttgaggattacgttagggggagttcacatgggggtgcttt tcatate	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 288	cagactattaataactgg	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 289	taaggcgtct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 290	ctgatctataaggegtctagtttagaa	CDRL2长nuc
SEQ ID NO: 291	caacagtatagtagttattggacg	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 292	caggtacaactgggtggaatctgggggagggcgtggtccagcctgggag gtccctgagactctctgtgcagcctccggattcagcttcagtagttatg gcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggccggagtgggtg gcagtgatttggcatgatggaagttacagttactatgcagactccgtga ggggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg caaatgaacagcctgagacctgaggacacgggatgtatcactgtgtg aaagttgaggattacgttagggggagttcacatgggggtgctttca tatctggggccaagggacaatggcaccgtctcttcag	VH nuc
SEQ ID NO: 293	gacatccagatgaccagctctcctccacctgtctgcatctgtagggga cagagtcaccatcactgcccggccagtcagactattaataactgggt ggcctggtatcagtggaaccggggaaagcccctgagctcctgatctat aaggcgtctagtttagaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagt ggatctgggacagaattcactctccatcagcagcctgcagcctgatg atfttgaacttactgccaacagtatagtagttattggacgttcggc caagggaccaaggtggacatcaaac	VL nuc
MGV3		
SEQ ID NO: 294	GFTVSDSY	CDRH1 aa
SEQ ID NO: 295	IYGSST	CDRH2 aa
SEQ ID NO: 296	ARGPNDYRNRKYYYYMDV	CDRH3 aa
SEQ ID NO: 297	QSVDSPY	CDRL1 aa
SEQ ID NO: 298	GAS	CDRL2 aa
SEQ ID NO: 299	LIFGASIRA	CDRL2长aa
SEQ ID NO: 300	HQYGNAPYI	CDRL3 aa

SEQ ID NO: 301	EVQVVESGGDLVQPGGSLRLSCAVY GFTVSD SYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGSSTYY IDS VKGRFTISRDRSKNTLYLQMNTLRVEDTALY YC ARGPN DYRNRK YYYYMD VWGKGTAVTV SS	VH aa
SEQ ID NO: 302	EIVLTQSPDTLSLSAGERVTLSCRAS QSVDS PY LAWYQQRPGQTPRLLIF ASIR ATDIPDRFSGG GSGTDFTLISRLEPEDSGV YYCHQYGN APIYI FGQGTKLEIK	VL aa
SEQ ID NO: 303	ggattcaccgctcagtgacagctac	CDRH1 nuc
SEQ ID NO: 304	atctatagtggtagtagtaca	CDRH2 nuc
SEQ ID NO: 305	gcgagaggccctaatgactacagaaatcgcaatattactactaca tggacgctc	CDRH3 nuc
SEQ ID NO: 306	cagagtgtgacagctcctac	CDRL1 nuc
SEQ ID NO: 307	ggtgectct	CDRL2 nuc
SEQ ID NO: 308	ctcatttt ggtgectct attagggcc	CDRL2 长nuc
SEQ ID NO: 309	caccagtatggtaacgcacctacatt	CDRL3 nuc
SEQ ID NO: 310	gaggtgcaggtggtggagtctgggggagacttggccagccgggggg gtccctgagactctcctgtgcagtctat ggattcaccgctcagtgacagct acatgagctgggtccgccaggctccgggaaggggctggagtgggtc tcagtt atctatagtggtagtagtac atactacatagactccgtgaagg ccgattcaccatctccagagacaggccaagaacacctgtatctcaaat gaacacctgagagttgaggacacggctctttattact gcgagagggc cctaatgactacagaaatcgcaatattactactacatggacgctc g gggcaaagggaccggtcaccgtctcctcag	VH nuc
SEQ ID NO: 311	gaaattgtgtgacacagctccagacacctgtcctgtctgcagggga aagagtcacctctcttgcagggccagtc agagtgtgacagtcctta cttagcctggtatcagaaagacctggccagactcccaggctcctcattt tt ggtgectct attagggccactgacatccagacaggtcagtgggg tgggtctgggacagactcactctcaccatcagcagactggaacctgaa gattctggagtgtattactgt caccagtatggtaacgcacctacatttt ggccaggggaccaagctggagatcaaac	VL nuc
SEQ ID NO: 312	KNNQNGQGHNMPNDPNRNVDENANANSA VKNNNNEEPSDKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPC SVTCGNGIQVRIKPGSANKPKDEL DYANDIEK KICKMEKCS	CSP C-末端肽 282 - 383
SEQ ID NO: 313	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	IgG1 CH1-CH2-CH3 aa

[0657]

SEQ ID NO: 314	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC	IgG CK aa
SEQ ID NO: 315	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS	IgG CL aa
SEQ ID NO: 316	gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaaga gcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggcaaggactact tccccgaacctgtgacggctcgtggaactcaggcgcctgaccagcg gcgtgcacacctccccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctca gcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggacccagacctaca tctgcaactgtaatacaagcccagcaaccaagggtggacaagagag ttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagca cctgaactcctggggggaccgtcagttctcttcccccaaaacccaa ggacacctcatgatctcccggacctgaggtcatatgctggtggtg gacgtgagccacgaAgaCctgaggtcaagttcaactggtactgga cggcgtggaggtgcataatgcaagacaagcccggggaggagcagt acaacgacgtacctgtggtcagcgtcctaccgtcctgaccagga ctggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaaaaagccctc ccagcccccacgagaaaacctcctcaaaagccaaagggcagccccg agaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgaccaa gaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggttctatccagcgac atcgcctggagtgaggagcaatgggcagccggagacaactacaa gaccacgctccccgtgctggactccgacggctcttctctctatagca agctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcat gctcctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct ctcctgtccccgggtaaa	IgG1 CH1-CH2-CH3 nuc
SEQ ID NO: 317	cgTacGgtggctgcaccatctgttctatcttcccacctgatgagca gttgaaatctggaactgctctgtgtgctgctgaataacttctatccca gagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgacctcaatcgggta actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac agcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaaca caaagtctacgctgcgaagtaccatcaggcctgagctgcccgtc acaaagagctcaacaggggagagtg	IgG CK nuc
SEQ ID NO: 318	ggtcagcccaaggtgccccctcggctactctgttcccgcctcctctga ggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtacttct accggggagccgtgacagtggttggaaagcagatagcagccccgtc aaggcgggagtgagaccaccacacctccaacaagcaacaaca gtacgcccagcagctatctgagcctgacgctgagcagtggaagtc ccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtgg agaagacagtgcccctacagaatgtca	IgG CL nuc

[0658]

[0659]

SEQ ID NO: 319	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDS WWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCP PTCPGYRWMCLRRFIIFLIFILLCLIFLLVLLDY QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVI WMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI	HBsAg S结构域
SEQ ID NO: 320	MMRKLAILSVSFLFVEALFQEYQCYGSSSNT RVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENW YSLKKNRSRLGENDDGNNEDNEKLRKPKHKK LKQPADGNPDP	CSP的N-末端
SEQ ID NO: 321	KKLLKQPA	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 322	HKLLKQPAD	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 323	KHKLLKQPADG	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 324	KHKLLKQP	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 325	RKPKHKLLKQP	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 326	PKHKLLKQPADGN	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 327	KPKHKLLKQPADGNP	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 328	RKPKHKLLKQPADGNPD	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 329	NEKLRKPKHKLLKQP	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 330	NEKLRKPKHKLLKQPADG	CSP的N-末端区域
SEQ ID NO: 331	MLSKDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWC YTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNE NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQ HISESINNIVDHAIKGKDHA TFNFLQWYVAEQ HEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVK GIAKSRKS	铁蛋白多肽
SEQ ID NO: 332	MEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLY GRKFVDVEGPGWEYAAHPLGEVEVLSDENE VVKWGLRKSPLIELRATFTLDLWELDNLERG KPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIFRGCEKSG VKGLLSFEERKIECGSTPKDLLEAIVRALSIFSK DGIEGPYTLVINTDRWINFLKEEAGHYPLEKR VEECLRGGKIHTPRIEDALVVSERGGDFKLIL GQDLSIGYEDREKDAVRLFITETFTFQVVNPEA LILKF	包裹蛋白多肽

[0660] 在VH/VL序列中,三个粗体序列依次显示CDR1、CDR2和CDR3。

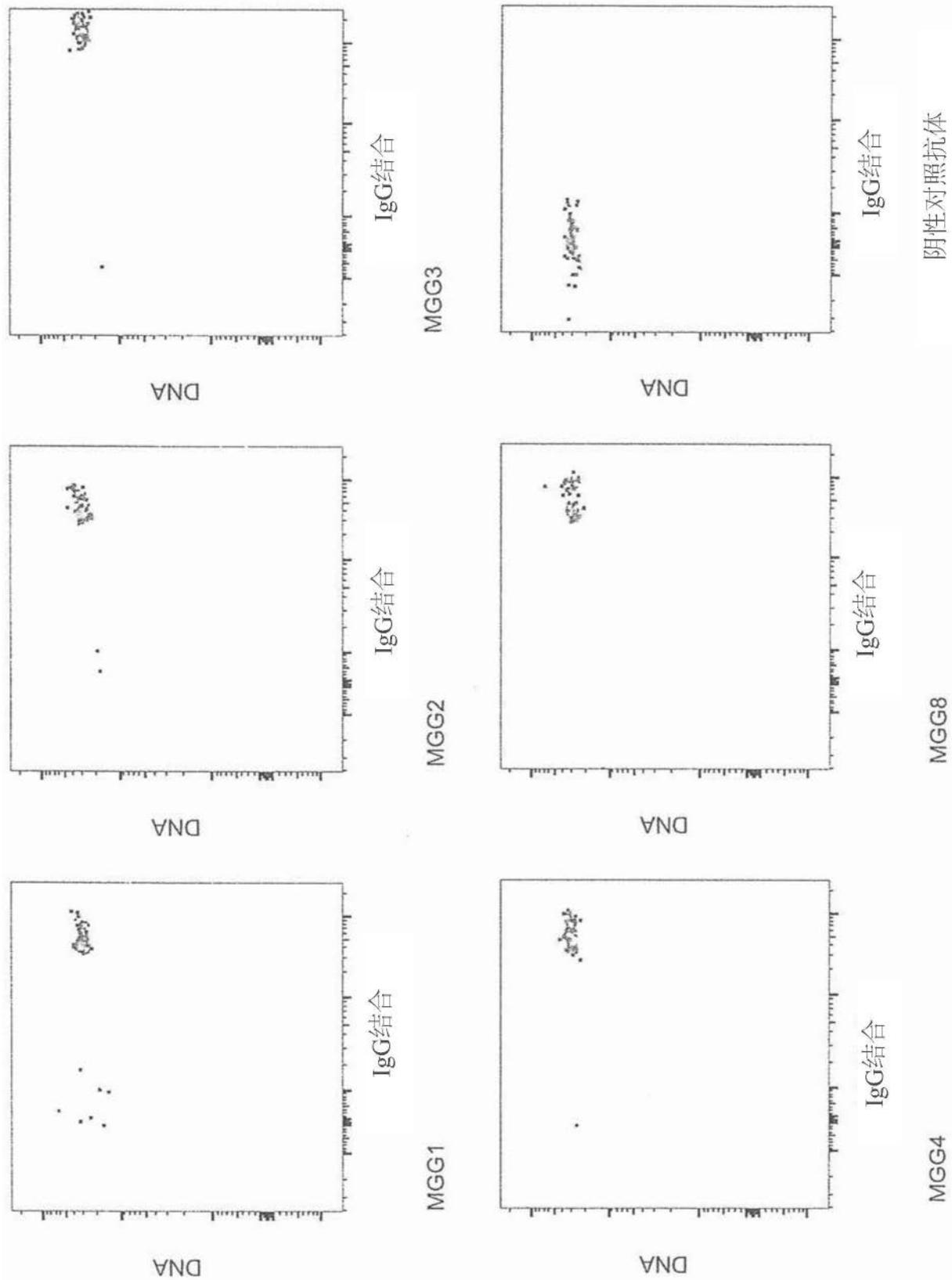
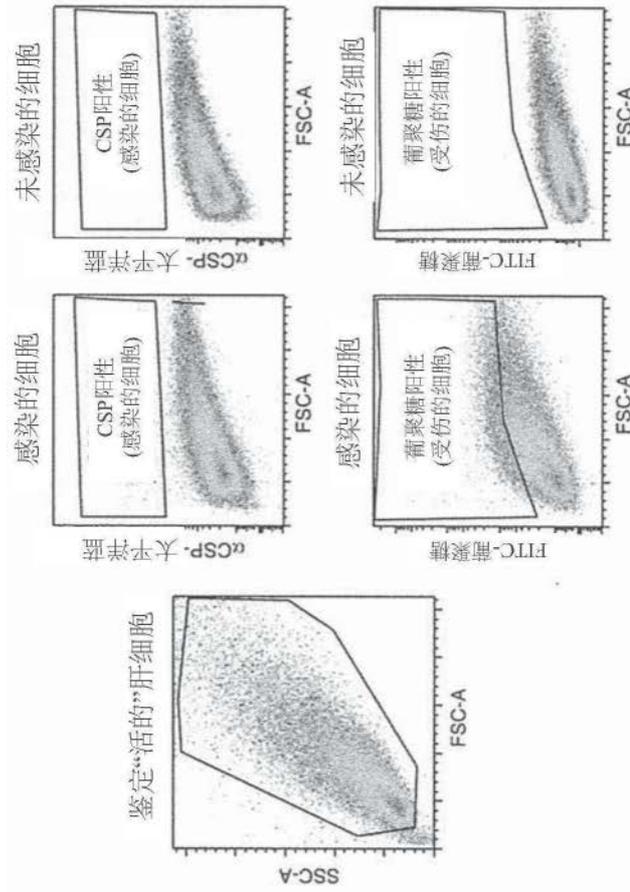


图1



Kaushansky 等人 (2012) *Mol Biochem Parasitol* 183, 100-103

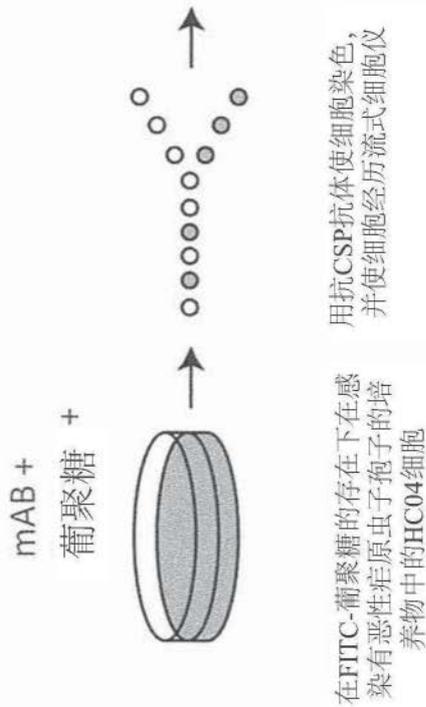


图2A

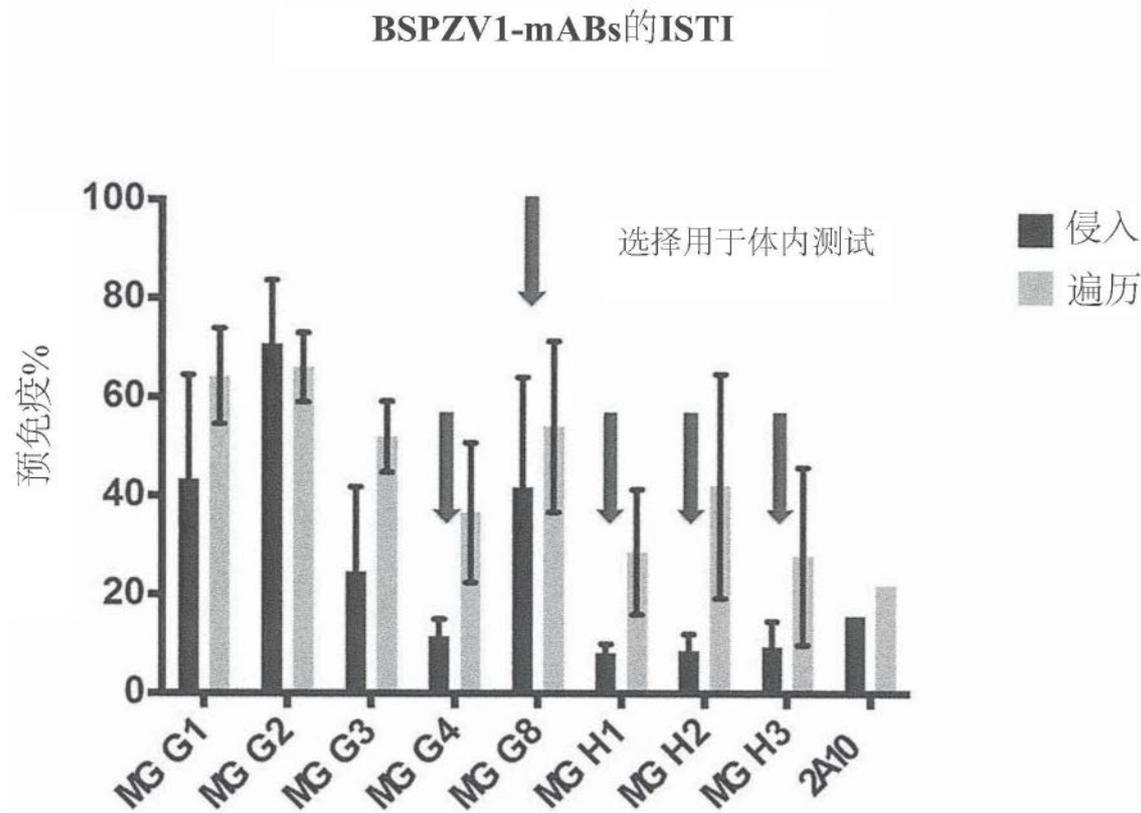
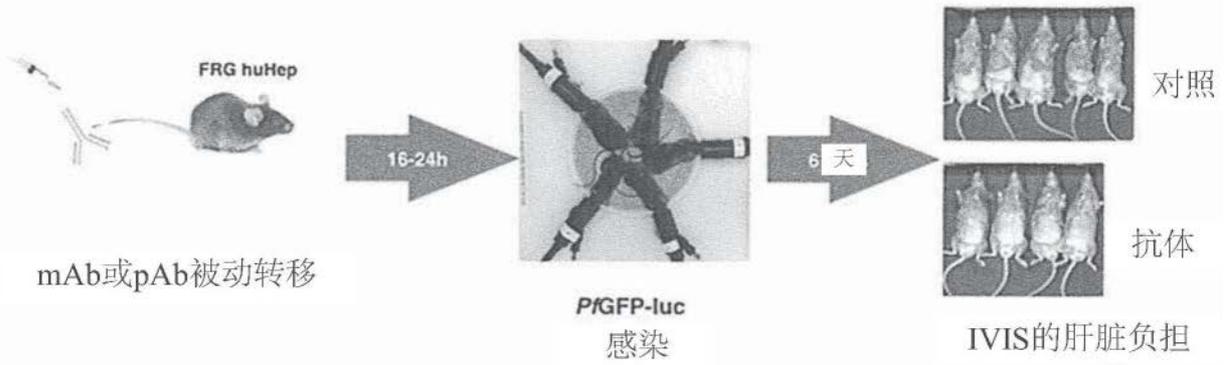


图2B

A



B

BSPZV1-mABs在体内减少孢子

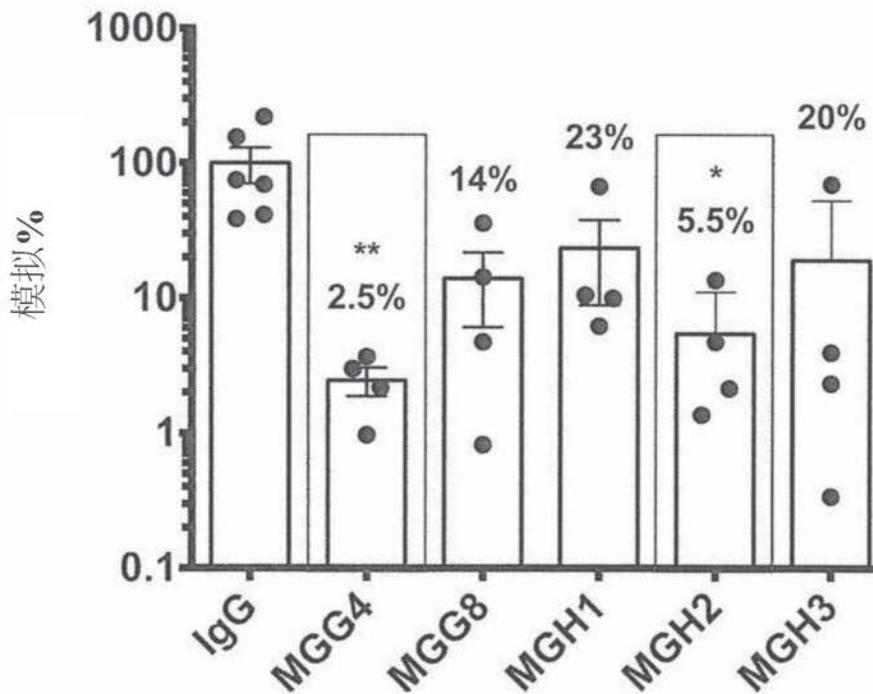


图3



图4A

恶性疟原虫环孢子蛋白(PfCSP):

```
MMRKLAILSVSSFLFVEALFQEYQCYGSSSNTRVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSL
KKNSRSLGENDDGNNEDNEKLRKPKHKHKKLKQPADGNPDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNV
DPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN
ANPNANPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN
NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNKNNQGNGQGHNMPNDPNRNVDENANANSA
VKNNNNEEPSDKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPKDELVDYANDIEKKIC
KMEKCSSVFNVVNSSIGLIMVLSFLFN
```

图4B

肽 „22-110“

```
EYQCYGSSSNTRVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSLKKNSRSLGENDDGNNEDNE
KLRKPKHKHKKLKQPADGNPDPNANPNV
```

肽 „NPDP“

```
KQPADGNPDPNANPNKNN
```

肽 „NANP“

```
NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN
```

图4C

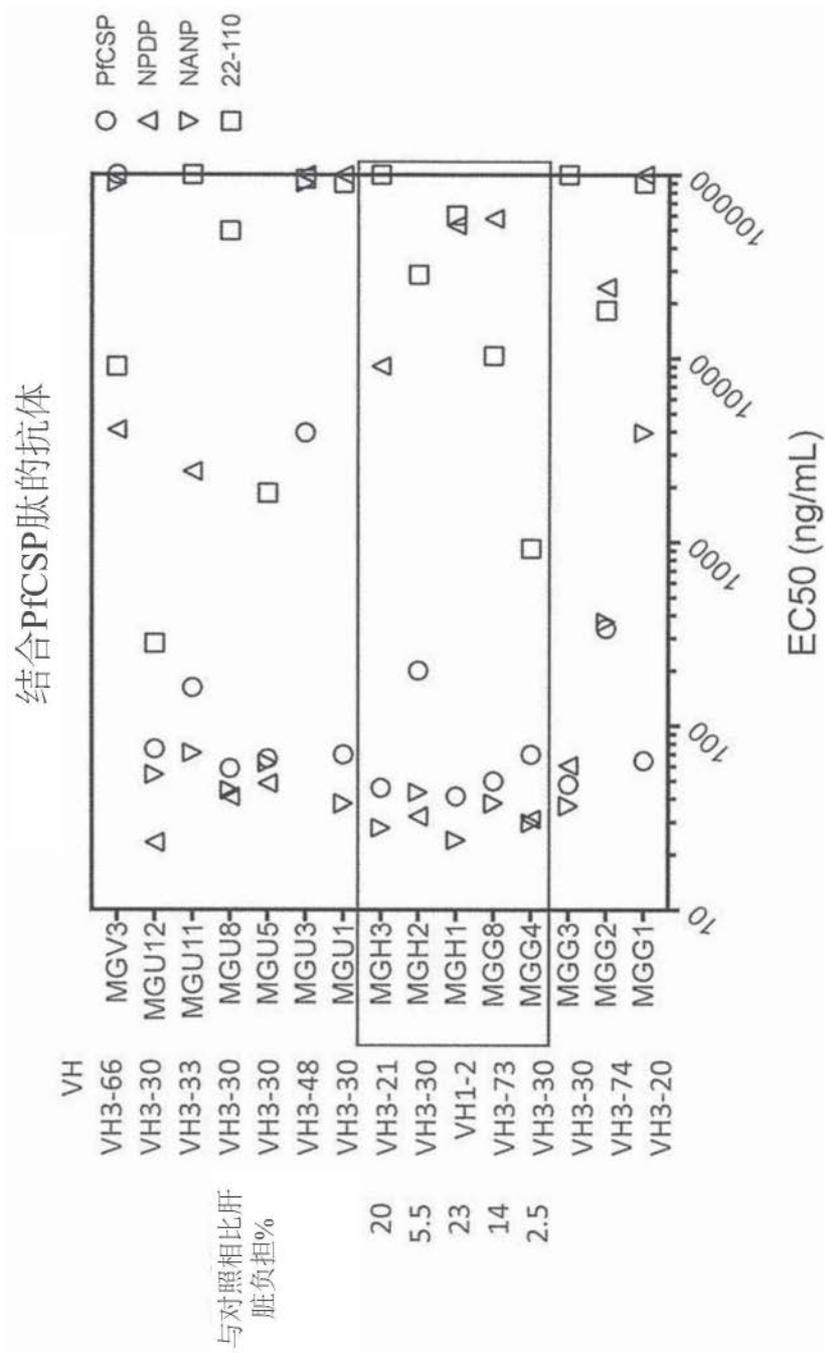


图5

肽	MGV3	MGG4	MGU5	MGG1
RKPKHKKQPADGN	0.0	0.0	0.0	0.0
KPKHKKQPADGNP	0.0	0.0	0.0	0.0
PKHKKQPADGNPD	65.5	0.0	0.0	0.0
KHKKQPADGNPDP	353.0	0.0	0.0	0.0
HKKKQPADGNPDPN	65,305.0	0.0	0.0	0.0
KKKQPADGNPDPNA	25,218.8	0.0	0.0	0.0
KKQPADGNPDPNAN	19,858.8	14.0	0.0	49.0
LKQPADGNPDPNANP	25,589.0	0.0	0.0	670.0
KQPADGNPDPNANPN	16,479.5	3,647.5	2,858.8	131.5
QPADGNPDPNANPNV	6,223.5	7,415.5	8,118.5	427.5
PADGNPDPNANPNVD	8,418.0	7,365.8	3,256.5	8,164.3
ADGNPDPNANPNVDP	4,631.0	3,931.0	4,114.8	28,778.5
DGNPDPNANPNVDPN	6,963.3	8,036.8	634.0	10,711.3
GNPDPNANPNVDPNA	6,128.0	5,229.5	0.0	7,671.5
NPDPNANPNVDPNAN	2,726.0	3,927.5	0.0	3,601.5
PDPNANPNVDPNANP	473.0	3,717.3	89.5	6,644.0
DPNANPNVDPNANPN	32.0	10,003.8	4,878.5	1,525.0
PNANPNVDPNANPNV	0.0	11,297.5	8,538.5	1,718.0
NANPNVDPNANPNVD	0.0	10,546.8	3,049.5	14,591.3
ANPNVDPNANPNVDP	0.0	6,409.5	3,471.8	30,281.5
NPNVDPNANPNVDPN	0.0	8,800.8	1,136.0	12,921.0
PNVDPNANPNVDPNA	470.5	6,690.8	150.0	7,129.3
NVDPNANPNVDPNAN	221.5	3,230.5	0.0	2,247.3
VDPNANPNVDPNANP	0.0	3,681.0	147.5	7,003.0
PNANPNVDPNANPNA	0.0	12,183.8	18,119.5	900.0
NANPNVDPNANPNAN	0.0	10,024.0	5,485.8	792.0
ANPNVDPNANPNANP	0.0	8,529.5	7,731.8	604.5
NPNVDPNANPNANPN	0.0	13,300.5	4,013.5	185.0
PNVDPNANPNANPNA	0.0	13,697.0	11,744.0	118.0
NVDPNANPNANPNAN	0.0	10,949.5	2,358.5	63.0
VDPNANPNANPNANP	0.0	9,428.5	3,599.5	244.0
DPNANPNANPNANPN	0.0	14,818.8	2,083.5	19.0
PNANPNANPNANPNA	0.0	18,444.0	9,874.3	88.5
NANPNANPNANPNAN	0.0	14,367.5	1,897.8	73.5
ANPNANPNANPNANP	0.0	11,851.3	3,748.8	363.0
NPNANPNANPNANPN	0.0	18,170.8	2,888.8	70.0
PNANPNANPNANPNV	0.0	18,711.0	5,521.5	457.5
NANPNANPNANPNVD	0.0	17,796.3	1,708.5	8,856.0
ANPNANPNANPNVDP	0.0	12,414.8	620.0	18,103.3
NPNANPNANPNVDPN	0.0	12,595.5	0.0	18,009.5
PNANPNANPNVDPNA	0.0	12,657.3	57.0	5,421.5
NANPNANPNVDPNAN	256.3	6,398.5	0.0	1,778.8
ANPNANPNVDPNANP	310.0	7,064.0	65.5	5,238.5
NPNANPNVDPNANPN	95.5	13,513.0	3,525.0	750.8
PNANPNANPNANPNK	0.0	35,510.0	15,806.3	29.5
NANPNANPNANPNKN	0.0	22,891.0	1,523.3	2.0
ANPNANPNANPNKNN	0.0	18,718.0	2,221.8	0.0
NPNANPNANPNKNNQ	0.0	12,025.8	360.0	0.0
PNANPNANPNKNNQG	0.0	2,272.5	4.5	0.0
NANPNANPNKNNQGN	0.0	243.5	0.0	0.0
ANPNANPNKNNQGNG	0.0	68.5	0.0	0.0
NPNANPNKNNQGNGQ	0.0	23.0	0.0	0.0
PNANPNKNNQGNGQG	0.0	0.0	0.0	0.0

图6

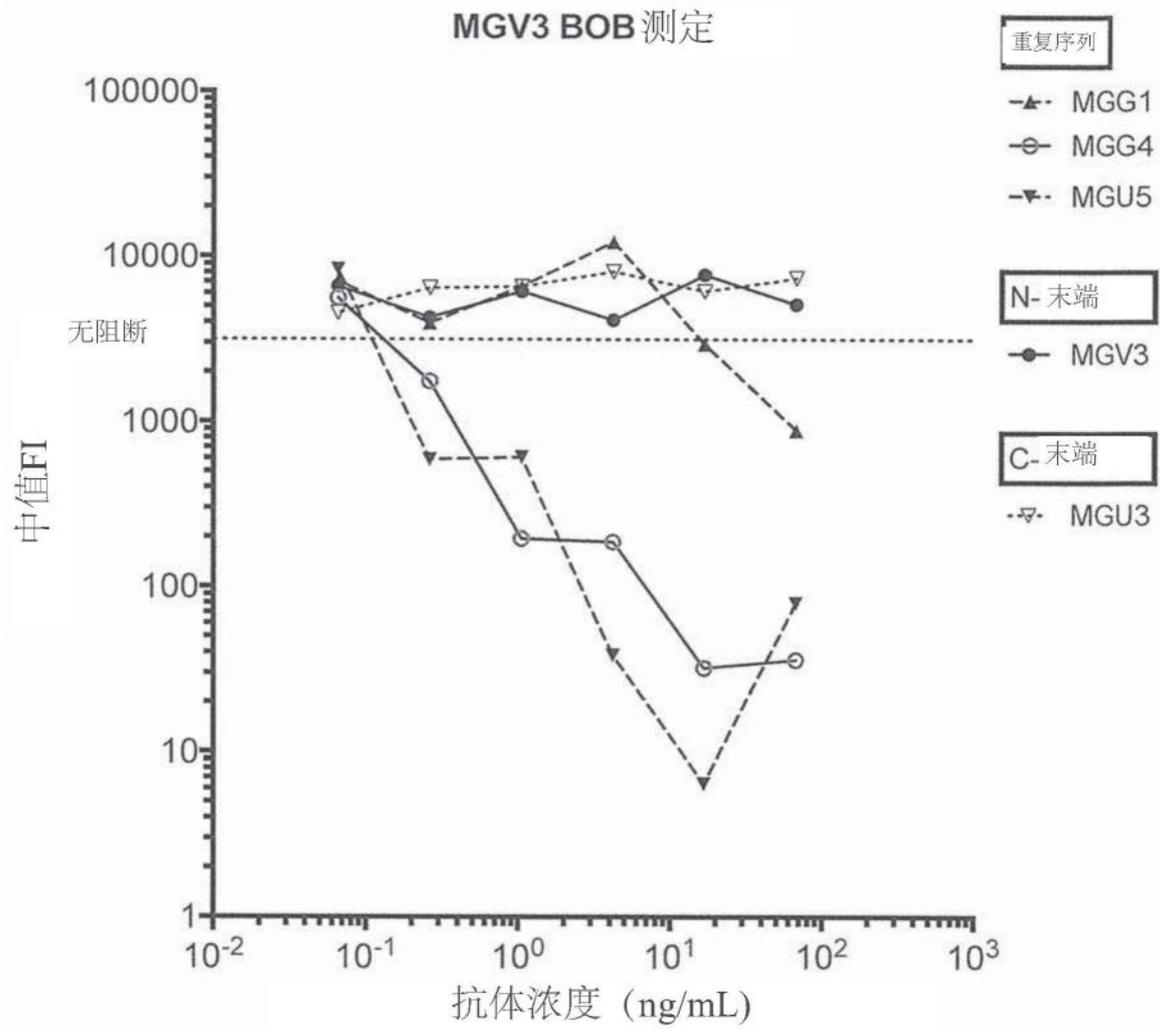


图7

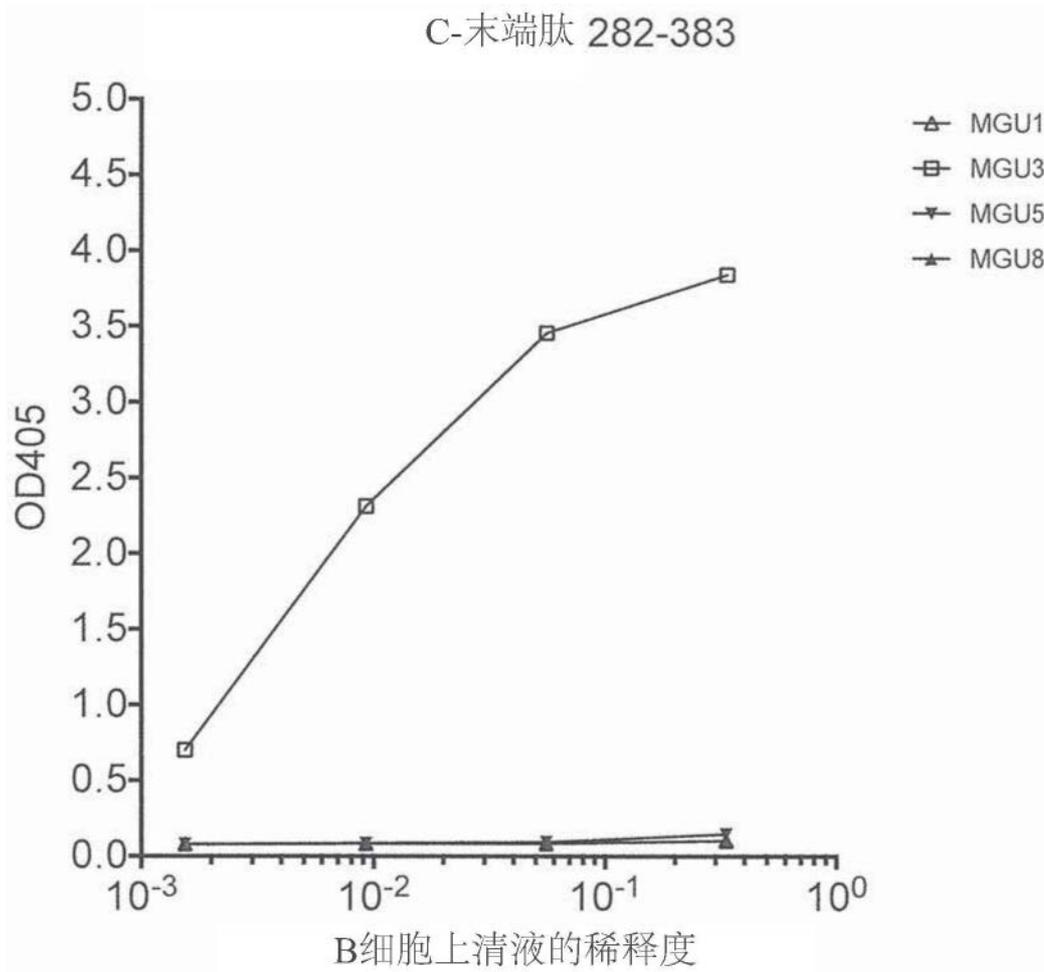


图8