



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103214570 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201210506817. 7

(22) 申请日 2008. 09. 12

(30) 优先权数据

60/972, 059 2007. 09. 13 US

(62) 分案原申请数据

200880115546. 4 2008. 09. 12

(83) 生物保藏信息

PTA-9394 2008. 07. 29

PTA-9395 2008. 07. 29

PTA-9396 2008. 07. 29

PTA-9397 2008. 07. 29

PTA-9398 2008. 07. 29

PTA-9399 2008. 07. 29

PTA-9372 2008. 07. 16

PTA-9373 2008. 07. 16

PTA-9374 2008. 07. 16

PTA-8528 2007. 07. 10

PTA-8529 2007. 07. 10

PTA-8526 2007. 07. 10

PTA-8246 2007. 03. 20

(73) 专利权人 淡马锡生命科学研究院有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 钱红亮 F·和 H-S·康

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

C12N 5/20 (2006. 01)

C12N 7/00 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

A61K 39/42 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

C12R 1/91 (2006. 01)

C12R 1/93 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007089753 A2, 2007. 08. 09, 全文.

Juying Yan, et al.. Pathogenic and molecular characterization of the H5N1 avian influenza virus isolated from the first human case in Zhejiang province, China. 《Diagnostic Microbiology and Infectious Disease》. 2007, 第 58 卷 (第 4 期), 第 399-405 页.

Jianfeng Chen, et al.. A Latex Agglutination Test for the Rapid Detection of Avian Influenza Virus Subtype H5N1 and its Clinical Application. 《J Vet Diagn Invest》. 2007, 第 19 卷 (第 2 期), 第 155-160 页.

审查员 高赞

权利要求书1页 说明书24页 附图7页

(54) 发明名称

特异于流感病毒 H5 亚型或者 N1 亚型的血凝素和神经氨酸酶的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了特异性结合禽流感病毒 (AIV) H5 亚型的包膜糖蛋白或者 N1 亚型的神经氨酸酶糖蛋白的单克隆抗体及相关的结合蛋白。所述单克隆抗体及相关的结合蛋白可用于检测 AIV 的 H5 和 N1 亚型, 包括 H5N1 亚型, 本发明提供了危险病毒感染的诊断、监视和治疗方法。

1. 由杂交瘤 3H11 产生的单克隆抗体 3H11, 所述杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心, 保藏号为 PTA-9374。
2. 权利要求 1 的单克隆抗体在制备用于检测生物学样品中 H5 亚型禽流感病毒的试剂盒中的用途。
3. 检测生物学样品中 H5 亚型禽流感病毒的试剂盒, 其包含权利要求 1 的单克隆抗体, 所述试剂盒还具有检测所述抗体与 H5 亚型禽流感病毒包膜糖蛋白结合的至少一种试剂。
4. 权利要求 3 的试剂盒, 其中所述单克隆抗体固定化于固体表面上。
5. 权利要求 3 的试剂盒, 其还包含特异性结合 H5 亚型禽流感病毒的包膜糖蛋白的结合蛋白, 其中所述单克隆抗体是捕获抗体, 所述结合蛋白是含有可检测元件或者与可检测元件缀合的检测结合蛋白。
6. 权利要求 5 的试剂盒, 其中所述结合蛋白是单克隆抗体。
7. 权利要求 5 的试剂盒, 其中所述单克隆抗体固定化于固体表面上。
8. 权利要求 5 的试剂盒, 其中所述结合蛋白含有放射性原子, 与荧光分子缀合, 或者与酶缀合。
9. 权利要求 1 的单克隆抗体在制备用于治疗感染 H5 亚型禽流感病毒的对象药物中的用途。
10. 禽流感病毒株 A/Indonesia/CDC669/2006 (H5N1) 的中和逃逸突变株, 其包含位于由单克隆抗体 3H11 识别的所述毒株 HA 序列的表位内的突变, 由此所述突变病毒不能被所述抗体中和, 其中所述突变为 GenBank 登记号 ABI36428 的第 155 位氨基酸残基处的 Gly 变为 Glu, 所述单克隆抗体由保藏在美国典型培养物保藏中心, 保藏号为 PTA-9374 的杂交瘤 3H11 产生。

特异于流感病毒 H5 亚型或者 N1 亚型的血凝素和神经氨酸酶的单克隆抗体及其应用

[0001] 本申请为申请日为 2008 年 9 月 12 日、申请号为 200880115546.4、发明名称为“特异于流感病毒 H5 亚型或者 N1 亚型的血凝素和神经氨酸酶的单克隆抗体及其应用”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及检测和治疗禽流感病毒 (“AIV”) 的抗体和相关的结合蛋白。更具体地, 本发明涉及可用于检测和治疗 AIV 的高致病性 H5 和 N1 亚型的单克隆抗体及相关的结合蛋白, 以及涉及诊断、监视和治疗动物和人体内 AIV 感染的方法和产品。

[0003] 发明背景

[0004] H5N1 禽流感病毒也许成为下一次流感流行的原因。每年甲型流感感染的爆发是持续的公共健康威胁, 新的流感毒株可以周期性呈现, 人对于其具有较低的免疫性, 导致破坏性流行。1918 年由 H1N1 流感病毒引起的“西班牙流感”爆发导致世界范围内超过 4 千万人死亡。H1N1 的来源也许是从鸟类直接传染人, 或者也许潜伏于中间宿主如猪或者仍未鉴别的另一动物宿主中 (1) (在本文结尾处提供参考书目)。分别由 H2N2 和 H3N2 流感病毒引起的 1957 年和 1968 年流感流行, 可能源自重配事件 (reassortment), 其中一或两种适应人的病毒表面蛋白由禽流感毒株的蛋白质置换 (2)。

[0005] H5N1 病毒具有感染史无前例范围的宿主的能力, 包括食肉动物。1997 年证实第一例感染的人。高致病性 H5N1 感染在禽类和人类中均发生。这是已发现的首次禽流感病毒从鸟类直接传播至人类。之后, 根据世界卫生组织 (WHO) 报告, 人 H5N1 感染病例总数从 2003 年在东南亚开始爆发至今已经有 281 例, 死亡 169 例。印度尼西亚在 2005 年 6 月报道其首例人 H5N1 病毒所致禽流感病例。迄今为止, 这是唯一一个给出 2007 年报道的国家, 截至 2007 年 3 月共 81 例证实的人感染病例, 其中 63 例死亡。

[0006] 流感病毒根据其核蛋白和基质蛋白抗原特异性分类。这些病毒主要被分为 A、B 和 C 血清型, A 型具有 8 个 RNA 节段, 其编码十个病毒蛋白。所有已知的 A 型流感病毒均源自鸟类。这个类别的病毒可以感染其它物种, 如马、猪、猫头鹰和海豹, 并且对人类造成威胁 (23)。根据包膜糖蛋白的抗原性性质, 可以将 A 型流感病毒进一步分为亚型, 根据血凝素 (“HA”) 分为 H1 至 H16 亚型, 根据神经氨酸酶 (“NA”) 分为 N1 至 N9 亚型 (24, 25, 26)。据信在 HA1-HA2 连接处的 HA 蛋白质的蛋白酶解与禽流感毒株的病原性相关, 而且在这个裂解位点周围疏水性氨基酸的存在是 H5 亚型的特点。此外, 据信 HA 蛋白质介导与宿主细胞 sialoside 受体附着, 随后通过膜融合进入细胞 (27), HA 蛋白质被认为作为中和抗体的主要靶位 (26)。

[0007] 在急性呼吸系统疾病爆发期间进行检测可以确定流感是否是爆发原因。在流感季节, 检测呈现与流感一致的呼吸系统疾病的选择患者可帮助确定流感是否存在于特定患者群中, 并且帮助卫生保健人员确定怎样使用其临床判断诊断和治疗呼吸系统疾病。快速流感检测帮助确定是否使用抗病毒药物。一些检测如病毒培养、逆转录酶聚合酶链反

应 (RT-PCR) 以及血清学检测是常规方法,但是不能及时获得结果而为临床医生提供帮助 (3)。目前常用的大多数快速诊断检测是基于单克隆抗体的免疫测定 (3,4,5)。免疫荧光测定 (荧光抗体染色) 是另一种快速流感病毒诊断检测法,其可用于许多医院实验室中,且通常可以在 2-4 小时内产生结果。首要的是特异性单克隆抗体产生是大多数常用的快速、灵敏性和有成本效益的诊断方法的基础。

[0008] 区域性独特的亚系的鉴别表明 H5N1 病毒是地理学广泛分布的,具有遗传和抗原性差异。种系发生学研究示出来自印尼的所有病毒形成 H5N1 基因型 Z 病毒的一个独特亚系,提示这种爆发可能由于单一引入传播遍及整个国家造成的 (14,15)。获得特异性识别印尼流感分离株的单克隆抗体是非常有益的。获得也覆盖越南和新加坡流感分离株的这种 mAb 也是非常有益的。

[0009] 发明目的

[0010] 本发明的目的是提供特异性结合 AIV 的 H5 和 N1 亚型的、特别是结合 H5 和 N1 Indonesia AIV 分离株的单克隆抗体 (mAb) 及相关的结合蛋白。单克隆抗体应答的特异性为有效诊断试剂提供基础。衍生自其中的 mAb 和结合蛋白也可以用作治疗剂。

[0011] 发明概述

[0012] 根据本发明,提供了特异于 H5 亚型血凝素糖蛋白的线性和构象表位或者 N1 亚型神经氨酸酶糖蛋白的线性和构象表位的单克隆抗体及相关的结合蛋白。线性 H5 表位的 mAb 能以良好的特异性和灵敏性检测变性的样品如福尔马林固定的组织样品中的 H5N1 及其它 H5 亚型病毒毒株,而靶向 H5 或者 N1 构象表位的那些 mAb 用于检测未进行预处理的组织如冷冻组织样品及其它生物学组织和体液中的 H5N1 及其它 N1 亚型病毒。H5 表位的 mAb 和 N1 表位的 mAb 可以组合使用,以特异性诊断 H5N1 病毒分离株。

[0013] 具体地,称作 5A5 的 mAb 靶向 H5 亚型血凝素的线性表位。称作 5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11 的其它 mAb 靶向 H5 亚型血凝素的构象表位。称作 8H12 的 mAb 靶向 N1 亚型神经氨酸酶的线性表位,称作 6C6 和 3D4 的两个抗体靶向 N1 亚型神经氨酸酶的构象表位。因此,本发明包含基本上具有如 mAb 5A5 对于线性 H5 亚型血凝素表位的免疫学结合特性的结合蛋白,以及基本上具有如 mAb 8H12 对于线性 N1 亚型神经氨酸酶表位的免疫学结合特性。本发明进一步包含基本上具有如 mAb 5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11 对于 H5 亚型血凝素构象表位的免疫学结合特性的结合蛋白。本发明还包含基本上具有如 mAb 6C6 或 3D4 对于 N1 亚型神经氨酸酶构象表位的免疫学结合特性的结合蛋白。

[0014] 另一方面,本发明包含检测样品中 H5 亚型 AIV 的方法,包括检测 AIV 与基本上具有 mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 或者 3H11 的免疫学结合特性的 mAb 或者结合蛋白的结合。本发明还包含检测样品中 N1 亚型 AIV 的方法,包括检测 AIV 与基本上具有 mAb 6C6、3D4 或者 8H12 的免疫学结合特性的 mAb 或者结合蛋白的结合。具体地,本发明涉及利用这种结合蛋白的免疫荧光测定、免疫组织化学测定以及 ELISA 方法。识别 H5 亚型 AIV 的抗体可以与识别 N1 亚型 AIV 的抗体组合使用,以检测 H5N1 病毒。

[0015] 另一方面,本发明涉及检测 AIV 的试剂盒,其包含基本上具有 mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1、3H11、8H12、3D4 和 / 或 6C6 的免疫学结合特性的结合蛋白。

[0016] 本发明进一步涉及治疗感染 H5 AIV 毒株如 H5N1 AIV 毒株的对象的方法,包括给予这种对象有效量的一或多种基本上具有 mAb 5C5、2D9、4F8、2F11、9C1、3H11、3D4 或者 6C6

的免疫学结合特性的单克隆抗体或者结合蛋白。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1A-1D 示出感染 AIV H5N1 的 MDCK 细胞与无病毒感染的 MDCK 细胞的 IFA 图像对比。图 1A 是在 MDCK 细胞中检测到 H5N1 的图像。在图 1B 中,紫外光与正常光的合并示出由病毒感染的各个细胞与未感染细胞的对比。如图 1C 所示,在无病毒感染的 MDCK 细胞上无荧光信号。图 1D 示出在与图 1C 相同的细胞上紫外光与正常光的合并。

[0019] 图 2A 和 2B 示出 MDCK 细胞上流感病毒的单克隆抗体中和活性。在图 2A 中,在单克隆抗体中和 H5N1 病毒感染后用 FITC 荧光染色 MDCK 细胞。在图 2B 中,用 FITC 荧光染色 MDCK 细胞而无 H5N1 病毒感染的单克隆抗体中和。

[0020] 图 3A 和 3B 示出 SDS-PAGE 和蛋白印迹,用以鉴别 mAb 与线性化重组 HA1 之间的结合。在图 3A 中,在 SDS-PAGE 凝胶中,HA1 为大约 37kD,表达的 GST- 标记的 HA1 为大约 61kD。单独 GST 为 26kD。在图 3B 中,蛋白印迹示出重组 HA1 与 mAb 5A5 反应。除了在 61kD 的主要条带之外还存在较小的条带,提示当 GST-HA1 在大肠杆菌中表达时的降解。泳道 1,无 IPTG- 诱导表达的大肠杆菌样品;泳道 2 和 3,大肠杆菌中 IPTG- 诱导的 GST-HA1 表达;泳道 4,纯化的 GST 样品。

[0021] 图 4A 和 4B 例证了 mAb 5A5 的线性表位作图。图 4A 是血凝素蛋白 HA1 的示意图,示出表达不同长度 HA1 片段的克隆构建体以及其与 mAb5A5 的反应性。图 4B 是突变的血凝素 HA1 片段的示意图,示出表达 HA1 片段上不同突变的克隆构建体以及其与 mAb 5A5 的反应性。

[0022] 图 5A 和 5B 示出 mAb 6C6 或 3D4 与表达的重组 N1 之间的典型反应。图 5A 示出在 Sf9 细胞中检测的表达式重组 N1。在图 5B 中,紫外光与正常光的合并示出各个细胞。

[0023] 图 6A 和 6B 示出 SDS-PAGE 和蛋白印迹以验证表达的 NA。

[0024] 图 7A、7B 和 7C 示出 MDCK 细胞上流感病毒的单克隆抗体中和活性。在图 7A 中,在单克隆抗体中和 H5N1 病毒感染之后通过显微镜观测 MDCK 细胞。在图 7B 中,在作为 CPE 阳性对照的未经单克隆抗体中和 H5N1 病毒感染的条件下,通过显微镜观测 MDCK 细胞。在图 7C 中,在作为 CPE 阴性对照的不存在病毒和 mAb 的条件下示出 MDCK 细胞。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明涉及特异性结合 AIV H5 亚型血凝素糖蛋白或者 AIV N1 亚型神经氨酸酶糖蛋白的 mAb 及相关的抗原结合蛋白。具体地,所述 mAb 或者相关的抗原结合蛋白具有如下抗体的免疫学结合特性:mAb 5A5,由在 2007 年 7 月 10 日在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏的保藏号为 PTA-8528 的杂交瘤 5A5 产生,mAb 5C5,由在 2007 年 7 月 10 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-8529 的杂交瘤 5C5 产生,mAb 6C6,由在 2007 年 7 月 10 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-8526 的杂交瘤 6C6 产生,mAb 2D9,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9396 的杂交瘤 2D9 产生,mAb 4F8,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9397 的杂交瘤 4F8 产生,mAb 1C1,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9398 的杂交瘤 1C1 产生,mAb 3B6,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9399 的杂交瘤 3B6 产生,mAb 3D4,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9395 的杂交瘤 3D4 产生,mAb8H12,由在 2008 年 7 月 29 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9394 的杂交瘤 8H12 产生,mAb 2F11,由在 2008 年 7 月 16 日在 ATCC 中

保藏的保藏号为 PTA-9373 的杂交瘤 2F11 产生, mAb 9C1, 由在 2008 年 7 月 16 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9372 的杂交瘤 9C1 产生, 或 mAb 3H11, 由在 2008 年 7 月 16 日在 ATCC 中保藏的保藏号为 PTA-9374 的杂交瘤 3H11 产生。所有保藏物均根据布达佩斯条约的规定而进行。本发明进一步包含这些杂交瘤, 且提供了本发明的 mAb 和结合蛋白的持续来源。

[0027] 本发明进一步涉及检测和诊断 H5 亚型 AIV 感染的方法以及包含本发明 mAb 或者结合蛋白的试剂盒。本发明进一步涉及通过给予有效量的本发明的一或多种抗体或者相关的结合蛋白治疗 H5 或者 N1 AIV 毒株感染对象的方法。具体地, 在这个实施方案中, 所述对象感染 H5N1 亚型 AIV 印尼分离株。本发明的抗体也可以作为预防措施给予处于可能发生流感流行事件中的对象。在这种情况下, 给予抗体的有效量是用于治疗 H5 或者 N1 AIV 感染的量的大约一半。

[0028] 在本文中使用的各个术语具有如下含义。

[0029] 所有语法形式的术语 mAb 或者相关的结合蛋白的“免疫学结合特性”是指所述 mAb 或者结合蛋白对其抗原的特异性、亲和性和交叉反应性。

[0030] 术语“线性表位”是指形成抗体结合位点的具有大约 4-12 个氨基酸的连续序列。本发明 mAb 的线性表位优选在由 HA1 病毒基因编码的血凝素蛋白的大约第 260 至大约第 269 位氨基酸的区域中。结合 mAb 或者结合蛋白形式的线性表位可以是变性蛋白质, 其基本上没有三级结构。

[0031] 术语构象表位是指在 H5 亚型血凝素糖蛋白或者 N1 亚型神经氨酸酶糖蛋白中以其天然三维形式存在的 mAb 或者相关的结合蛋白的结合位点。

[0032] 术语结合蛋白是指包括如下所述那些的蛋白质, 所述蛋白质包括本发明 mAb 的抗原结合位点或者具有本发明 mAb 的免疫学结合特性的 mAb 的抗原结合位点。

[0033] 本发明有利地提供了通过用 AIV 亚型 H5N2(A/chicken/Singapore/98) 免疫动物制备具有 mAb 5A5 的结合特性的单克隆抗体、通过用 AIV 亚型 H5N2(A/chicken/Singapore/98) 免疫动物制备具有 mAb 5C5 的结合特性的单克隆抗体、或者通过用 AIV 亚型 H7N1(A/chicken/Singapore/94) 免疫动物制备具有 mAb 6C6 的结合特性的单克隆抗体的方法。本发明进一步有利地提供了通过用 AIV 亚型 H5N2(A/chicken/Singapore/98) 免疫动物制备具有 mAb2D9 和 mAb 3B6 的结合特性的单克隆抗体的方法。本发明还提供了通过用亲代禽流感病毒 A/Vietnam/1203/2004/H5N1 在第 205 位氨基酸具有由赖氨酸突变为甲硫氨酸的逃逸突变株免疫动物制备具有 mAb 2F11 或者 9C1 的结合特性的单克隆抗体的方法, 或者通过用 AIV 亚型 A/Indonesia/CDC669/2206/H5N1 免疫动物制备具有 mAb 3H11 的结合特性的单克隆抗体的方法。本发明另外提供了通过用 AIV 亚型 H7N1(A/chicken/Singapore/94) 免疫动物制备具有 mAb 3D4 和 mAb 8H12 的结合特性的单克隆抗体的方法, 以及通过用 AIV 亚型 H5N2(A/chicken/Singapore/98) 免疫动物制备 mAb 4F8 和 1C1 的方法。任何这种抗原均可用作免疫原以产生具有希望的免疫学结合特性的抗体。这种抗体包括但不限于包含 mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1、3H11、8H12、6C6 或者 3D4 的抗原结合序列的单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段和蛋白质。

[0034] 本发明的 mAb 可以通过持续培养细胞系产生抗体分子的任何技术产生。这种方法包括但不限于最初由 Kohler and Milstein(Nature 256:495-497) 在 1975 年揭示的杂交瘤技术, 以及三源杂交瘤技术、人 B- 细胞杂交瘤技术 (Kozbor et al., 1983, Immunology

Today 4:72) 以及 EBV- 杂交瘤技术以产生人单克隆抗体 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy Alan R. Liss, Inc., pp77-96(1985))。可以使用人抗体且其可以通过使用人杂交瘤获得 (Cote et al., 1983, Proc. Nat' l. Acad. Sci. U. S. A., 80:2026-2030) 或者通过用 EBV 病毒在体外转化人 B 细胞获得 (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96)。此外, 可以使用产生“嵌合抗体”或者“人源化抗体”的技术 (Morrison et al., 1984, J. Bacteriol. 159-870; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454), 通过导入来自本发明小鼠抗体分子如 mAb 5C5、5A5、6C6、2D9、4F8、1C1、3B6、3D4、8H12、2F11、9C1 或者 3H11 的序列与来自具有合适生物学活性的人抗体分子的基因产生所述抗体。嵌合抗体是含有人 Fc 部分和小鼠 (或者其它非人动物) Fv 部分的那些抗体。人源化抗体是在人抗体中掺入小鼠 (或者其它非人动物) 互补决定簇 (CDR) 的那些抗体。嵌合抗体和人源化抗体均是单克隆抗体。优选这种人或者人源化嵌合抗体用于人类疾病的体内诊断或者治疗中。

[0035] 根据本发明, 可以对产生单链抗体的技术 (美国专利 4, 946, 778) 加以调整, 以提供本发明的单链抗体。本发明的另一实施方案利用构建 Fab 表达文库的技术 (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281), 以快速及简便地鉴别对于本发明的抗体具有希望的特异性的单克隆 Fab 片段或者其衍生物或者类似物。

[0036] 含有抗体分子独特型的抗体片段可以通过已知技术产生。例如, 这种片段包括但不限于: $F(ab')_2$ 片段, 其可以通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生; Fab' 片段, 其可以通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键而产生; 以及 Fab 片段, 其可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而产生。这种抗体片段可以从本发明的任何多克隆或者单克隆抗体中产生。

[0037] 在抗体的产生中, 可以通过本领域已知技术筛选希望的抗体, 所述技术例如放射免疫测定、ELISA (酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定 (例如使用胶体金、酶或者放射性同位素标记)、蛋白印迹、沉淀反应、凝集试验 (例如凝胶凝集试验、凝血试验)、免疫荧光测定以及免疫电泳测定。在一个实施方案中, 通过检测一抗上的标记检测抗体结合。在另一个实施方案中, 通过检测二抗或者其它试剂与一抗的结合检测一抗。在再一个实施方案中, 二抗是标记的。本领域已知在免疫测定中检测结合的方式, 且包含在本发明范围内。

[0038] 前述抗体可用于本领域已知关于检测或者定位 H5 或者 N1 亚型 AIV 的方法中, 例如蛋白印迹、ELISA、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫组织化学测定等。本文揭示的技术可用于定性和定量确定 H5 亚型 AIV, 以及用于诊断和监视病毒感染的动物或者人。

[0039] 本发明还包括定性和 / 或定量确定 H5 亚型 AIV 的测定和检测试剂盒。这种测定系统和检测试剂盒可包含标记的成分, 所述标记的成分例如通过用放射性原子、荧光基团或者酶标记、与本发明的 mAb 或者相关的结合蛋白或者其结合配体结合而制备。这种测定或者检测试剂盒进一步可包含试剂、稀释剂和使用说明书, 这些为免疫测定技术领域技术人员熟知。

[0040] 在本发明的某些实施方案中, 根据选择的方法如“竞争性”、“夹心”、“DASP”等方法, 这种试剂盒至少含有本发明的 mAb 或者相关的结合蛋白、检测所述 mAb 或者相关的结合蛋白与生物学样品中的 AIV 免疫特异性结合的工具, 以及使用说明书。所述试剂盒也可以

含有阳性和阴性对照物。它们可以被设计为与自动分析仪或者自动免疫组织化学玻片染色设备一起使用。

[0041] 本发明的测定试剂盒可进一步包含可以被标记或者可以被提供用于附着于固体支持物（或者附着于固体支持物）的二抗或者结合蛋白。这种抗体或者结合蛋白可例如是结合 AIV 的抗体或结合蛋白。这种二抗或者结合蛋白可以是多克隆或者单克隆抗体。

[0042] H5 亚型血凝素或者 N1 亚型神经氨酸酶蛋白的单克隆抗体可以通过用 AIV 或者其 H5 或 N1 蛋白或片段免疫动物而制备。制备 H5 亚型血凝素蛋白的抗体的优选方法是扩增 H5 亚型 HA1 基因，随后表达该基因，回收并纯化 H5 亚型重组蛋白以及将该纯化的蛋白质用作免疫原。例如，通过用可获得的毒株接种鸡胚以增殖 H5N1 AIV，随后分离该病毒 RNA。通过逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增 HA1 基因，然后将其克隆进杆状病毒载体中，用于在昆虫细胞中表达 H5 蛋白质。然后可将如此产生的蛋白质用于免疫小鼠或者其它合适物种，以产生杂交瘤。相似的程序可用于获得 N1 蛋白质以产生杂交瘤。

[0043] 筛选杂交瘤产生能特异性结合 H5 或 N1 蛋白质的高亲和性 mAb 的能力，并将其与其它 AIV 亚型区分。根据本发明，发现具有病毒中和能力的抗体能识别 H5 亚型血凝素蛋白中的构象表位。这个发现得自在 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞或者鸡胚中 1-2 次选择循环之后在存在每种中和 mAb 的条件下病毒逃逸突变株的产生。通过 RT-PCR 从这些中和逃逸突变株中克隆所述 HA1 基因并测序，以鉴别点突变。在这组抗体中，在 mAb 5C5、2F11、9C1 和 3H11 中发现中和表位。使用凝血抑制试验证实中和逃逸能力。

[0044] HA1 含有 338 个氨基酸，包括具有 16 个氨基酸的信号肽。为了研究线性表位在蛋白质上的分布，有利地检测截短的和突变的片段与 mAb 的结合，例如通过蛋白印迹或者相似技术检测。可以鉴别线性表位，其是 mAb 的结合靶位，在使用免疫组织化学染色方法检测如在福尔马林固定的组织中存在的变性的 H5 亚型蛋白中具有良好性能。以这种方式对 H5 亚型 mAb 作图提供了进一步研究和更有效地临床诊断感染性 H5N1 AIV 的平台。

[0045] 本发明还提供了对于 AIV H5 血凝素和 N1 神经氨酸酶分子的抗原性结构的更好的了解。本发明的 mAb 及相关的结合蛋白提供了在冷冻切片和生物学样品中检测这种高致病性病毒的方式和方法。

[0046] 检测石蜡切片中的病毒的能力具有重要意义。在大多数情况中，感染的组织切片中的 AIV 抗原由于固定过程而被破坏。福尔马林和乙醇具有除去脂质包膜和包膜糖蛋白包括血凝素的潜力，因此增加了病毒抗原检测的难度。因此，本发明这种形式的诊断具有提供更安全和更精确诊断 AIV 感染的动物和人体组织的潜力。

[0047] 如在下文实施例中例证，mAb 5A5 对于福尔马林固定的组织中的病毒抗原是高效且灵敏的。这种抗体使得感染区域易于在光学显微镜下被观测到。抗体 5A5 不具有血凝素抑制作用或者病毒中和活性；然而其在免疫荧光测定和蛋白印迹分析中呈现出阳性结果，观测到相应于重组 H5N1-HA 蛋白 (MW 36kDa) 的强条带。

[0048] mAb 8H12 对于福尔马林固定的组织中的病毒抗原也是高效和灵敏的。这个抗体也使得感染区域易于在光学显微镜下被观测到。

[0049] 相反，mAb 5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、6C6、3D4、2F11、9C1 和 3H11 对于冷冻组织切片是高效的，但是在福尔马林固定的组织中未检测到抗原。这些结果提示着两组 mAb 与不同的病毒表位反应。通过表位作图，确定 mAb 5A5 和 8H12 靶向线性表位。仅当对组织进行强

力热处理时,它们可以检测病毒抗原。在这种严苛的抗原提取方法中,病毒的表面蛋白被破坏,使得病毒的核蛋白被暴露。因此,靶向线性表位的 mAb 对于冷冻组织切片不起作用。

[0050] 确定单克隆抗体 5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、6C6、3D4、2F11、9C1 和 3H11 靶向 H5N1 病毒的构象表位。表位作图用于对 mAb 5C5、2D9、4F8、2F11、9C1 和 3H11 作出这种确定;对 mAb 6C6 和 3D4 的确定是基于所述抗体不能识别来自 SDS-PAGE 的变性的神经氨酸酶。这些抗体能结合且识别病毒抗原,而不用对组织切片进行预先处理。

[0051] 本发明提供了检测 AIV 的 H5 和 N1 亚型的便利的高特异性且灵敏的方式和方法。一种这样的方式和方法是 ELISA。在优选的实施方案中, mAb5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11 单独或者组合地用作捕获抗体。已经发现 mAb 5A5 与 5C5 的组合与单独使用抗体或者本文所述其它组合相比在检测 H5 亚型 AIV 中提供高光密度读数。不受理论的约束,对于这些结果的一种可能的解释是这两种抗体与 HA1 蛋白上的不同表位反应且是不同的抗体亚类,因此提供多个结合位点。

[0052] 如果单独使用抗体,可以使用选择的抗体例如作为捕获抗体,且与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的相同抗体可用作检测抗体。6C6、3D4 和 8H12 抗体可相似地用作捕获抗体以检测 AIV 的 N1 亚型毒株。

[0053] 构象表位的单克隆抗体保持重要的生物学功能,如凝血抑制作用和中和活性,而针对线性表位的 mAb 也有利于诊断应用。因此,使用分别针对线性和构象表位的 mAb 5A5 以及 mAb 5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11,可以明显提高 ELISA 方法的灵敏性。相似地,使用分别针对 N1 神经氨酸酶的线性和构象表位的 mAb 8H12 以及 mAb 6C6 和 3D4,可以明显提高 ELISA 方法的灵敏性。使用两种 mAb 的方法也可以用于开发检测 H5 和 N1 病毒的其它免疫学方法,例如通过点-印迹 (dot-blot) 和原位杂交方法。

[0054] 本发明的优选 ELISA 测试在印尼 H5N1 AIV 感染的禽类和人体中能检测出 HA 抗原,表明本发明在检测禽和人 H5N1 感染中的用途。

[0055] 本发明的 H5 亚型和 N1 亚型 mAb 具有优于目前作为诊断工具的其它方法的优势。首先, mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11 对于高感染性 H5 亚型 AIV 具有高特异性,且除了 9C1 mAb 之外所有 mAb 均示出识别所有或者几乎所有已知的 H5N1 印尼株。此外, mAb6C6、3D4 和 8H12 对于 N1 亚型 AIV 是高特异性的,且可以用于诊断 N1 亚型病毒感染,包括所有或者几乎所有已知的 H5N1 印尼株。这种高特异性单克隆抗体代表禽流感诊断领域的突破。在本发明之前,未报到有单克隆抗体可以检测所有或者几乎所有印尼 H5N1 病毒。而除了一种抗体之外,本发明的所有单克隆抗体均示出识别在最近两年内在印尼收集的所有或者基本所有 H5N1 病毒。MAb 6C6、3D4 或者 8H12 可以与 mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、3B6、2F11 或者 3H11 组合使用(一起或相继使用),以确认一特定的分离株是 H5N1 分离株。此外,所述 mAb 在感染的福尔马林固定组织以及血清学检测如 HI 和 IFA 中检测及精确定位 H5 病毒抗原的能力呈现出独特优势。再者,这些 mAb 提供了检测 H5 和 N1 AIV 感染的安全且便利的诊断方法。冷冻的切片玻片可以低温长期贮存,且便于感染的进一步诊断和监视。本发明的抗体因此可用于诊断 H5N1 感染。如下文论述,本发明的 mAb 也可用于治疗 H5N1 感染。因此,本发明的 mAb 在遏制潜在流感流行中是非常有效的工具。

[0056] 本发明的另一实施方案涉及 H5 禽流感的中和逃逸突变株。术语中和逃逸突变株是指由在编码血凝素的基因中的点突变产生的突变病毒,所述点突变导致 H5 或者 N1 病毒

中抗原漂移,且影响中和表位。中和逃逸突变株可以逃避在中和其亲代病毒中有效的某些单克隆抗体的中和作用。在逃逸突变株的人工筛选中,将亲代病毒与某一中和抗体一起保温并接种于宿主如 MDCK 细胞或者鸡胚中。在 2-3 次筛选循环之后,克隆所述中和 mAb 的逃逸突变株,并对其进行 HA1 基因测序。突变的氨基酸通过与亲代病毒序列对比而确定,且突变的位点精确示出包含由所述中和 mAb 识别的中和表位的氨基酸之一。在本发明中,通过 5C5 中和单克隆抗体从 A/Indonesia/CDC669/H5N1 AIV 中产生 5C5 逃逸突变株。所述突变位点列于下文实施例 3 和表 4 中。通过 2F11 中和单克隆抗体从 A/Vietnam/1203/2004/H5N1 中产生 2F11 逃逸突变株。通过 9C1 中和单克隆抗体从 A/Vietnam/1203/2004/H5N1 的 K189M 突变株中产生 9C1 逃逸突变株。此外,3H11、2F9 和 9C 1 逃逸突变株从 A/Indonesia/CDC669/2006/H5N1 中产生。所述突变位点在下文实施例 3 和表 4 中列出。

[0057] 中和逃逸突变株与其亲代病毒不同,其不再可以由特异性结合亲代病毒的某些中和抗体识别。鉴于此,根据上述教导,这些突变株可用于免疫小鼠以产生新的单克隆抗体。在新的 mAb 中,可以筛选出精确识别突变表位的单克隆抗体,并将其用于提供对于不同于亲代病毒的禽流感病毒的互补监视。通过重复这种方法通过几个世代,可以发现进一步的逃逸突变株,以及获得进一步的中和抗。这些抗体可用于本发明的方法中。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,可以给予本发明的抗体和相关的结合蛋白以治疗受累于 H5 AIV 感染的对象,特别是 AIV 的 H5N1 亚型感染对象。本发明的抗体和相关的结合蛋白在流感流行或者潜在流行的情况中也可以作为预防措施给予对象。所述抗体及相关的结合蛋白可以以单一剂量或者重复给予,任选以缓释形式给予。可以通过使所述抗体到达治疗对象体内其作用部位的任何方式给予,例如通过静脉内、肌内、皮内、口服或者经鼻给予。典型地,所述抗体在药物可接受的稀释剂或者载体如无菌水溶液中给予,且所述组合可进一步包含一或多种稳定剂、佐剂、增溶剂、缓冲液等。在治疗时根据治疗对象的个体需要以及考虑到如对象的年龄、体重、一般状况及其症状的性质和程度以及给予的治疗频率等因素,确定精确的给予方法、成分和特定剂量。一般地,当给予所述抗体治疗受累于 H5 AIV 感染的患者时,所述抗体的给予剂量在大约 0.1mg/kg 至大约 1mg/kg 体重范围内。典型地,当作为预防措施给予时,给予剂量降低大约一半,即在大约 0.05mg/kg 至大约 0.5mg/kg 体重范围内。

[0059] 为了进行治疗,可以给予本发明的单一中和抗体或者结合蛋白,或者可以给予两或多种抗体的组合。如果已经产生中和逃逸突变株的一或多个世代的抗体,上述本发明的这些抗体可以作为治疗性抗体混合物给予。优选用作治疗剂的抗体包括 5C5、2D9、2F11、9C1、3H11 和 4F8mAb。

[0060] 提供了如下实施例以例证本发明的优选实施模式。本发明不限于所述实施例,而是与所附权利要求书的整个范围一致。

[0061] 实施例 1:杂交瘤的产生

[0062] 除了 H5N1/PR8 之外,所有活的野生型 H5N1 流感病毒均得自印尼。H5N1/PR8 得自美国疾病控制中心。其是非病原性重组病毒,含有在越南感染人的 AIV H5N1 病毒的 HA 和 NA 基因 (A/Vietnam/1203/2004)。H5N2 (A/chicken/Singapore/98) 和 H7N1 (A/chicken/Singapore/94) 得自新加坡农粮兽医局 (AVA)。这些病毒原种用于感染 9 天和 11 天龄的含胚鸡卵 (Chew's Poultry Farm, 新加坡),并使其复制两个世代。然后,吸取尿囊液并使用

凝血试验 (HA) 确定病毒效价。失活的 H5N1 (A/goose/Guangdong/97) 用于 RNA 提取, 以通过 RT-PCR 扩增 HA1 基因。将 Madin Darby 肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34) 在具有 10%FBS 的 DMEM 培养基中在 37°C 在具有 5%CO₂ 条件下生长。

[0063] 通过对含有病毒的尿囊液在 10,000rpm 离心 30 分钟除去碎片, 随后在 40,000rpm 对上清超离心 3 小时, 从而对病毒进行纯化。将病毒沉淀悬浮于 PBS 中。

[0064] 使用蛋白质 A 亲和性层析柱 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) 和 **Immunopure®** IgM 纯化试剂盒 (Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA), 根据厂商指导从澄清液中纯化单克隆抗体。使用 ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, USA) 测量抗体浓度。

[0065] 使用体积为 0.2ml 的失活的禽流感病毒 H5N2 (A/chicken/Singapore/98) 或者 H7N1 (A/chicken/Singapore/94) 以及油性佐剂 Montanide ISA563 (Seppic, 法国) 对 BALB/c 小鼠进行免疫接种。在第 0、14、28 和 42 天通过腹膜内注射给予。收集来自经免疫的小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞 (SP2/0), 并且如 De St. Groth and Scheidiger 所述融合产生杂交瘤 (16)。在用次黄嘌呤-氨嘌呤-胸苷 (HAT) 培养基选择之后, 通过免疫荧光测定 (IFA) 检测在 14 天后示出明显生长的杂交瘤的培养基中抗 H5N1/PR8- 感染的 MDCK 细胞的特异性抗体的存在情况。通过限制性稀释克隆选择的杂交瘤, 再次鉴别, 第二次克隆, 以及通过 IFA 再次检测。一旦确定, 则将该杂交瘤在组织培养中增殖, 并且在液氮中冷冻以进一步使用。

[0066] 从中获得本发明的每种特异性单克隆抗体的杂交瘤是根据这些一般程序制成的。

[0067] 实施例 2: 通过 IFA 筛选 mAb

[0068] 使用免疫荧光测定检测抗体与抗原靶之间的相互作用。将已经过夜感染流感病毒 (H5N2 (A/chicken/Singapore/98) 或者 H7N1 (A/chicken/Singapore/94) 的 MDCK 细胞在 96 孔平板中用 PBS-T (在 PBS 中 0.05% Tween-20, pH 7.4) 漂洗。通过将细胞在预冷的 100% 乙醇中保温 10 分钟进行固定。将该细胞在 PBS-T 中洗涤 3 次, 然后在 1%BSA、PBS-T 中保温 30 分钟以阻断与抗体的非特异性结合。然后将其与 100 μL 杂交瘤培养液在 96 孔平板中在室温保温 2 小时或者在 4°C 保温过夜。将细胞用 PBS-T 洗涤并与 1:100 稀释度的二抗-荧光标记的山羊/兔抗小鼠抗体 (DakoCytomation, USA)- 在 1%BSA、PBS-T 中在室温保温 60 分钟。将该平板孔用 PBS-T 洗涤。弃去 PBS-T 并加入在 PBS 中的 50% 甘油。在显微镜下用紫外光检测荧光信号。

[0069] 未感染的 MDCK 细胞用作阴性对照。来自用失活的 H5N1 病毒免疫接种的小鼠的血清用作阳性抗体对照。通过将各个杂交瘤上清保温的 MDCK 细胞与对照组进行对比, 选择产生阳性染色的杂交瘤上清, 用于通过限制稀释进行克隆。通过这种方法获得稳定产生 mAb 的杂交瘤。

[0070] 发现称作 mAb 5A5、5C5、2D9、4F8、1C1、2F11 和 3B6 的抗体结合来自印尼所有 25 个分离株的 H5N1 血凝素, 以及结合 H5N1/PR8 和 H5N2。MAb 3H11 结合来自几乎所有 25 个印尼分离株的血凝素, 但是不结合 H5N1/PR8 和 H5N2。发现 mAb 6C6、3D4 和 8H12 结合来自所有印尼 H5N1 分离株的神经氨酸酶, 以及 H5N1/PR8 和 H7N1。mAb 9C1 已经示出结合特异性 H5N1 印尼株, 因为这个抗体从特定毒株的逃逸突变株中产生, 其特异性结合在 H5 的第 205 位氨基酸是非赖氨酸的 AIV 毒株进化枝 1 毒株。9C1mAb 的这个独特性质使得其可以与其它 205- 赖氨酸特异性 mAb 组合用于治疗而无需考虑病毒逃脱问题 (evasion)。

[0071] 与本发明的 mAb 反应的 AIV 毒株在下文表 1 中列出。

[0072] 代表性 IFA 图像在图 1 中示出。

[0073] 表 1

[0074]

MAbs (target)	5A5 (H5)	5C5 (H5)	6C6 (N1), 3D4 (N1)	1C1 (H5), 3B6 (H5)	2D9 (H5), 4F8 (H5)	8H12 (N1)	2F11 (H5)	3H11 (H5)	9C1 (H5)
A/Indonesia/ chicken/ 60/2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC7/ 2005 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC326/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC329/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC370/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC390/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC523/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	-	N.T.
A/Indonesia/ CDC594/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A/Indonesia/ CDC623/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC644/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ CDC669/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/Indonesia/ TLL001/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL002/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL003/2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL004/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.

[0075]

A/Indonesia/ TLL005/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL006/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL007/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL008/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL009/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL010/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL011/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL012/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
A/Indonesia/ TLL013/ 2006 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	N.T.
H5N1/PR8	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A/chicken/ Singapore/ 98 (H5N2)	+	+	-	+	+	-	+	-	-
(H7N1)	-	-	+	-	-	+	-	-	-
(H3N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(H9N2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(H10N5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0076] Target : 靶

[0077] 注：“+”是指阳性，“-”是指阴性，“N.T.”是指未进行检测。

[0078] 实施例 3 : H5- 和 N1- 亚型 mAb 的鉴定

[0079] mAb 的同种型确定

[0080] 使用小鼠 mAb 同种型确定试剂盒 (Amersham Bioscience, England) 根据该试剂盒中提供的方案进行同种型确定 (数据未示出)。确定 mAb 5A5、6C6、2D9、4F8、1C1、3B6、3D4、8H12、9C1 和 3H11 均是 IgG1。确定 mAb 5C5 是 IgG2a, 确定 mAb 2F11 是 IgM。

[0081] 凝血抑制试验 (HI)

[0082] 将常量凝血 (HA) 抗原加入微滴定平板 (NUNC) 的每个孔中。然后将检测抗体置于第一个孔中并连续稀释。将该平板保温 1 小时, 然后向每个孔中加入鸡红细胞 (RBC)。如果测试血清中存在抗体, 则 RBC 与 HA 抗原不凝集。HI 阴性孔具有弥漫的凝集 RBC 片层覆盖在

孔的底部。HI 阳性孔具有非凝集的 RBC 的边界清楚的花结 (well-circumscribed button)。

[0083] 培养液中的 mAb 5C5、2D9、2F11 和 4F8 对所有印尼 H5N1 分离株以及与 H5N1/PR8 具有 16-64 的 HI 活性。MAb 9C1 和 3H11 对这些印尼 H5N1 分离株的一些具有 HI 活性。基于 mAb 3H11 靶向的抗原表位,该抗体能特异性及灵敏性识别进化枝 2.1.3 中的 H 毒株。MAbs 5A5、1C1 和 3B6 无 HI 活性。

[0084] 病毒微量中和测定

[0085] MDCK 细胞用于确定 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀)。将两倍连续稀释的抗体加入 96 孔细胞培养平板中。将稀释的抗体与等体积的含有稀释剂的 100TCID₅₀/孔流感病毒混合。在 37℃ 在 5%CO₂ 湿润环境中保温 2 小时之后,在每个孔中加入 1.5×10^5 /ml 的 100 μ l MDCK 细胞。将该平板在 37℃ 和 5%CO₂ 条件下保温 18 小时。用 PBS 洗涤单层,并将其在 100% 乙醇中固定 10 分钟。使用抗流感病毒 H5N1 的小鼠血清通过 ELISA 检测病毒蛋白的存在情况。

[0086] 在室温进行 ELISA。将固定的平板用 PBS-T (含有 0.05%Tween 20 的 PBS) 洗涤 3 次。将在含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS-T 中 1/500 稀释的小鼠血清抗体加入每个孔中,并在室温保温 1 小时。将该平板在洗涤缓冲液中洗涤 4 次,并向每个孔中加入 1/2000 稀释的 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 (DakoCytomation, USA)。将该平板在室温保温 1 小时,然后用洗涤缓冲液洗涤 6 次。将 100 μ l 新鲜制备的底物 (10mg 邻苯二胺二盐酸盐 /20ml 0.05M 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液, pH 5.0, 含有 0.03% 高硼酸钠) 加入每个孔中,并将该平板在室温保温大约 5 分钟。使用 50 μ l 2N 硫酸终止反应。使用自动平板分光光度计 (Mitenyi Biotec) 在 490nm (A₄₉₀) 测量吸光度。

[0087] 表 2

[0088]

MAb5C5	MAb+Virus		Virus	
	#1	#2	#3	#4
A/Indonesia/chicken/60 (H5N1)	0.637	0.664	1.187	1.213
A/Indonesia/CDC7/2005 (H5N1)	0.4	0.404	1.613	1.468
A/Indonesia/CDC370/2006 (H5N1)	0.379	0.376	1.738	1.727
A/Indonesia/CDC594/2006 (H5N1)	0.417	0.361	1.032	0.968
A/Indonesia/CDC623/2006 (H5N1)	0.311	0.306	1.416	1.491
A/Indonesia/TLL006/2006 (H5N1)	0.261	0.259	1.775	1.626
A/Indonesia/TLL007/2006 (H5N1)	0.637	0.598	1.266	1.224
A/Indonesia/TLL008/2006 (H5N1)	0.592	0.574	1.557	1.575
A/Indonesia/TLL013/2006 (H5N1)	0.548	0.539	0.974	1.034
H5N1/PR8	0.224	0.208	0.532	0.588
DMEM Medium	0.089	0.09	0.079	0.074

[0089] Virus:病毒;DMEM Medium:DMEM 培养基

[0090] 如表 2 所示, mAb 5C5 中和感染的 MDCK 细胞上的 H5N1 分离株。在存在单克隆抗体的条件下, ELISA 读数结果降低至在不存在所述抗体的条件下得自所述细胞的数值的大约一半, 表明所述病毒颗粒被中和。

[0091] 由于 ELISA 读数具有高背景, 同时 IFA 是可见的, 因此通过对于 MDCK 细胞的 IFA 检测方法进行中和试验, 以检测单克隆抗体的中和活性。mAb5C5 可以中和所有 H5N1 分离株的感染。这些结果与 IFA 检测结果一致。

[0092] 图 2A 和 2B 例证了对于 AIV 感染的 MDCK 细胞的 mAb 中和活性。图 2A 和 2B 分别示出在 mAb 中和病毒感染及不存在 mAb 中和作用的情况中 FITC 荧光染色的 MDCK。

[0093] 对在 MDCK 细胞上和鸡胚中的病毒中和的滴定

[0094] MDCK 细胞和 10 天龄的鸡胚分别用于确定 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 和 50% 鸡胚感染剂量 (EID₅₀)。使 MDCK 细胞 (2×10^4 /ml) 生长至 70%-90% 铺满。

[0095] 使用从 10^{-1} 至 10^{-8} 连续稀释倍数的各个病毒感染鸡胚, 随后检测尿囊液的 TCID₅₀ 和 EID₅₀。然后将所述病毒用于感染指数期的 MDCK 细胞 (对于病毒感染灵敏性最高) 和 10 天龄的鸡胚。未感染的 MDCK 细胞和尿囊液用作阴性对照。将该细胞在 35℃ 保温, 观

测 CPE。使用 Reed and Muench 数学技术 (17), 感染性效价表示为 $TCID_{50}/100 \mu l$ 和 $1000 EID_{50}/200 \mu l$, 各个病毒均稀释为在 $50 \mu l$ 和 $100 \mu l$ 分别具有 $100TCID_{50}$ 和 $500EID_{50}$ 。

[0096] 连续稀释的 mAb 5C5 能中和感染的 MDCK 细胞和鸡胚中终浓度为 $100TCID_{50}$ 和 $500EID_{50}$ 的病毒 (例如 A/Indonesia/DCD669/H5N1)。见表 3 所示。表 3 中的数字反映出 H5N1 病毒的最高稀释比率, 在此比率 mAb 仍能检测和中和感染的 MDCK 细胞和鸡胚中终浓度为 $100TCID_{50}$ 和 $500EID_{50}$ 的病毒。

[0097] 表 3

[0098]

	5C5
MDCK	160
胚胎	40

[0099] MAbs 2D9、3H11、9C1、2F11 和 4F8 与 mAb 5C5 相似, 识别 H5 的构象表位且具有中和 MDCK 细胞上病毒感染的能力。如上文针对 mAb 5C5 所述进行病毒中和和 50% 组织培养感染剂量 ($TCID_{50}$) 确定。使 MDCK 细胞 ($2 \times 10^4/ml$) 生长至 70%–90% 铺满。然后使用病毒 A/Indonesia/CDC669/H5N1 感染指数期 MDCK 细胞 (对于病毒感染灵敏性最高)。未感染的 MDCK 细胞用作细胞病变效应 (CPE) 阴性对照, 感染的细胞作为 CPE 阳性对照。将细胞在 $35^{\circ}C$ 保温, 每日检查 CPE 情况。结果示于图 7A、7B 和 7C。在存在单克隆抗体的条件下, MDCK 细胞未示出 CPE, 因此表明所述 mAb 具有中和能力。

[0100] MAbs 1C1 和 3B6 也识别 H5 的构象表位, 通过相似分析示出其缺乏中和 MDCK 细胞上的流感病毒感染的能力。

[0101] 1. 表位特性和作图

[0102] 1a. mAb 5A5 的线性表位作图

[0103] 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白印迹用于鉴别和定位单克隆抗体 5A5 的线性表位, 如图 4A 和 4B 所示。如 Ausubel et al. (18) 所述进行 SDS-PAGE 和蛋白印迹。表达来自 H5N1 的 GST- 标记的重组 HA1 并进行 10% SDS-PAGE。重组 HA1 为大约 32kD, 表达的 GST- 标记的 HA1 为大约 57kD。通过将蛋白质样品与样品缓冲液混合并在 $100^{\circ}C$ 加热 5 分钟制备蛋白质样品。在简短旋转之后, 加样全细胞裂解物。通过 SDS-PAGE 分离的蛋白质通过用考马斯蓝 (0.25% 考马斯亮蓝 R-250, 40% 甲醇和 10% 冰醋酸) 染色 30 分钟及随后在脱色溶液 (40% 甲醇和 10% 冰醋酸) 中脱色过夜进行观测。对于蛋白印迹, 使用 Transblot Cell (Bio-Rad) 将蛋白质从凝胶中移至硝化纤维膜上。在电转移之后, 以如上所述点印迹相同方式将膜用在 PBS-T 中的 5% 脱脂乳 (Bio-Rad) 封闭。将膜用在具有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBS-t) 中的 5% 脱脂乳 (Bio-Rad, Canada) 封闭 60 分钟。在封闭之后, 将含有 mAb 的未稀释的杂交瘤培养液与膜一起保温 60 分钟, 用 PBS-T 洗涤, 然后与山羊抗小鼠辣根过氧化物酶缀合的抗体 (1:2000 稀释) (DakoCytomation) 一起保温 60 分。洗涤该膜, 然后用 ECL 蛋白印迹检测试剂 (Amersham Biosciences) 生色, 并曝光于 KODAK Scientific 成像胶片 (KODAK BioMAX MS, USA)。

[0104] MAbs 5A5 与变性的重组 HA1 反应, 提示 MAbs 5A5 的表位是线性的。MAbs 5C5 不能与

变性的重组 HA1 反应,表示这个 mAb 的表位是构象表位。

[0105] 为了作图 mAb 5A5 的线性表位,将 H5 亚型的 HA1 通过 PCR 切割成 3 个重叠片段,并且表达为 6-组氨酸-标记融合蛋白。通过对 mAb5A5 进行蛋白印迹,发现所述表位主要在片段 B 和 C 的重叠区域(第 201-271 位氨基酸)中。设计 5 个截短的片段以通过蛋白印迹进一步作图(图 4A),所述表位缩小在第 258 至 271 位氨基酸之间。为了查明该线性表位的准确氨基酸序列,构建具有各个氨基酸点突变的 9 个突变体。HA1 上的第 259-264 和 268-271 位氨基酸,除了第 269 位氨基酸之外,均通过某些引物单独地被改变为丙氨酸,第 269 位氨基酸从丙氨酸被改变为脯氨酸(图 4B)。从图 4B 所示蛋白印迹结果可以看出,mAb5A5 靶向的线性表位的序列是亚型 5H 的血凝素上第 260-269 位氨基酸,即 AsnGlyAsnPhelleAlaProGluTyrAla(NGNFIAPEYA)。

[0106] 1b. mAb 8H12 线性表位的确定

[0107] 根据前文针对 mAb 5A5 在 1a 章节所述方法,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白印迹检测 mAb 8H12 的线性表位。表达来自 H5N1 的 MBP-标记的重组 NA1,并进行 10%SDS-PAGE。重组 NA1 为大约 36kD,表达的 MBP-标记的 NA1 为大约 82kD。mAb 8H12 与变性的 NA1 反应,提示该抗体的表位是线性的。

[0108] 1c. 2D9、4F8、1C1、3B6、2F11、9C1 和 3H11 构象表位的确定

[0109] 使用 mAb 2D9、4F8、3B6、1C1、2F11、9C1 和 3H11 中每一个抗体进行上文 1a 章节所述方法。这些抗体无一与变性的 HA1 反应,表明这些 mAb 的表位是构象表位。

[0110] 1d. mAb 6C6 和 3D4 构象表位的确定

[0111] 使用 mAb 6C6 和 3D4 进行如上文 1b 章节所述的方法。无一抗体与变性 NA1 反应,表明这两个抗体的部位是构象表位。

[0112] 2. H5 亚型 mAb 的逃逸突变株的选择及构象/中和表位作图

[0113] 将连续 10 倍稀释的亲代病毒 A/Indonesia/CDC669/2006(H5N1)与等体积的 mAb 混合。在室温保温 1 小时后,将该混合物接种于在 DMEM 培养基中的 MDCK 细胞单层上,所述培养基含有 200 μ g/ml TPCK-处理的胰蛋白酶(Sigma)和 0.001%DEAE-葡聚糖(Sigma)。在 35℃培养 7 天后,收集病毒上清并进行进一步选择。使用另一种方法产生逃逸突变株,其中将亲代毒株与过量的 mAb 在室温保温至少 0.5 小时。然后将此混合物接种于 10 天龄鸡胚中。在 35℃培养 2 或 3 天后,收集病毒上清并进行进一步选择。在每种方法之后,克隆所述逃逸突变株并收集以提取 RNA。造成 mAb 中和抗性的点突变通过于亲代病毒进行序列对比确定。使得突变病毒逃逸 mAb 中和作用的这种突变的能力通过中和试验和血凝素抑制试验检测。

[0114] 使用中和的 mAb 5C5 选择一些逃逸突变株。克隆所述逃逸突变株并收集以提取 RNA。根据序列对比,点突变分别发生在 HA 序列上第 524/503 和 602 位核苷酸(序列得自 GenBank, GenBank 登记号 #CY014481;GenBank GI#113497155)。第 524 位核苷酸 AC 改变为 AT,导致第 175 位氨基酸从苏氨酸突变为异亮氨酸。第 503 位核苷酸 A 改变为 T,导致第 168 位氨基酸从赖氨酸突变为异亮氨酸。第 602 位核苷酸 C 改变为 A,导致第 201 位氨基酸从丙氨酸突变为谷氨酸。通过中和试验和血凝素抑制试验证实,这种突变使得突变病毒逃逸 mAb 5C5 抗体中和作用。这个结果表明 mAb 5C5 靶向血凝素上含有第 168/175 和 201 位氨基酸的表位。结果在表 4 中示出,图中示出 AIV(A/Indonesia/CDC669/H5N1)的血凝素分

子上 mAb 中和表位的位置。

[0115] 相似地确定针对其它 mAb 的点突变,如表 4 所示。

[0116] 表 4

[0117]

Parental Virus	Mab	Nucleotide	Nucleotide Change	Amino acid	Amino acid Change
	5C5	524	C to T	175	Thr to Ile
		503	A to T	168	Lys to Ile
		602	C to A	201	Ala to Glu
	3H11	464	G to A	155	Gly to Glu

[0118]

CDC669	2F11	772	G to A	258	Gly to Lys
		628	C to T	210	Pro to Ser
	9C1	599	C to A	200	Ala to Glu
	2D9	717	T to A	239	Ser to Arg
		613 717	A to T T to A	205 239	Arg to Trp Ser to Arg
		470 717	C to T T to A	157 239	Pro to Leu Ser to Arg
	4F8	512 715	G to T A to C	171 239	Ser to Ile Ser to Arg
		512	G to T	171	Ser to Ile
	VN1203	2F11	C to T	210	Pro to Val
			G to A	258	Glu to Lys
		2D9	A to G	234	Lys to Glu
		4F8	A to G	205	Lys to GLU
VN1203 K198M)	9C1	614	T to A	205	Met to Lys

[0119] Parental virus: 亲本病毒;

[0120] Nucleotide: 核苷酸; Nucleotide change: 核苷酸改变;

[0121] Amino acid: 氨基酸; Amino acid change: 氨基酸改变

[0122] MA6 6C6、3D4 和 8H12 识别 H5N1 神经氨酸酶

[0123] 1. 在杆状病毒 /Sf9 系统中表达的重组神经氨酸酶用于证实 mAb 6C6 与神经氨酸酶之间的反应

[0124] 使用 LS Trizol 试剂 (Invitrogen) 根据厂商指导, 从病毒感染的 MDCK 细胞中分离病毒 RNA。进行逆转录和 PCR 扩增神经氨酸酶基因 H5N1/PR8, 使用引物 N 1(entry)F(CA CCATGAATCCAAATCAGAAGATAACAACC) 和 N1(entry)R(CTTGTCATGGTGAATGGCAA) 进行。根据

厂商指导,将 PCR 产物克隆进 pGEM-T Easy 克隆载体 (Promega, WI, USA) 中。对含有编码神经氨酸酶的序列的重组质粒进行测序,证实与数据库中参考序列一致。作为瞬时步骤将神经氨酸酶基因亚克隆进载体 pENTR/TEV/D-TOPO 中,然后根据供应商 (Invitrogen, CA, USA) Gateway System 指导插入杆状病毒中。根据供应商 (Invitrogen) 指导,将此具有神经氨酸酶基因的重组杆状病毒用于转染 Sf9 昆虫细胞并表达。固定具有表达的神经氨酸酶的 Sf9 昆虫细胞,并且使用 mAb 6C6 进行 IFA,与上文关于 MDCK 细胞进行 IFA 程序相同。

[0125] 图 5A 和 5B 示出 mAb 6C6 与表达的重组 N1 之间的典型反应。mAb 3D4 与表达的重组 N1 之间的反应相似。图 5A 示出表达的重组 N1 在 Sf9 细胞中检测到。在图 5B 中,紫外光和正常光合并表示各个细胞。

[0126] 2. mAb 6C6 和 3D4 的表位是构象表位而不是线性表位

[0127] 用具有 NA 插入的杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞,在 28℃ 保温 96 小时。收集细胞,与样品缓冲液混合,并加样于 SDS-PAGE 凝胶,分别用 mAb6C6 (的抗 -H5N1 小鼠血清) 或者 mAb 3D4 进行考马斯蓝染色以及蛋白印迹。蛋白印迹证实重组 NA 在 Sf9 细胞中表达。通过蛋白印迹示出无 mAb6C6 或 3D4 信号条带,表明 mAb 6C6 和 3D4 的表位是构象表位。

[0128] 图 6A 和 6B 示出 SDS-PAGE 和蛋白印迹,以证实表达的 NA。图 6A 示出在 SDS-PAGE 凝胶上 NA 的分子量为大约 49kDa。在图 6B 中,蛋白印迹示出重组 NA 与作为抗体的抗 H5N1 小鼠血清反应。

[0129] 预防和治疗

[0130] 基于 mAb 5C5 中和 MDCK 细胞和鸡胚上的 H5N1 的能力及其 IgG2a 同种型, mAb 5C5 及包含该抗体可变区的重组抗体可用于预防和治疗目的。基于在小鼠中的研究 (19, 20, 21),通常认为中和 IgG 抗体具有预防和治疗能力。

[0131] 相似地,鉴于 mAb 2D9、2F11、3H11、9C1 和 4F8 中和 MDCK 细胞上 H5N1 的能力及其 IgG1 或 IgM 同种型,这些 mAb 及包含这些抗体的可变区的重组抗体可用于预防和治疗目的。

[0132] 如下试验例证了 mAb 5C5 的预防和治疗特性。

[0133] 将一组 6 只雌性 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄) 的实验动物用作动物模型,研究通过给予 mAb 5C5 对免于病毒致命性攻击的保护作用。在生物学研究安全室内由穿戴动力空气净化呼吸器的技术人员进行小鼠接种和血液收集。将流感病毒感染的动物圈养在 3 级生物学研究安全水平 (BSL3) 的动物实验室中。

[0134] 为了评估单克隆抗体在动物模型中作为预防剂的效力 (即在病毒感染之前),经腹膜内 (i. p.) 给予小鼠 10mg/kg 纯化的 mAb 5C5。在 i. p. 之后 24 小时,对小鼠进行放血以测量 H5N1 的 HI 效价,然后经鼻内 (i. n.) 给予 20 μ l 的 10LD₅₀ 的 A/Indonesia/CDC669/H5N1。对照组 (共 6 只小鼠) 接受 IgG1 的 mAb5C4,其是针对细菌 *C. jejuni* 制成的内部 (in-house) 小鼠单克隆抗体。对于生存分析,每天观测小鼠共 14 天。在对照组中,6 只小鼠在感染后 10 天内全部死亡。相反, mAb 5C5- 处理的小鼠显然得到保护,该组中所有 6 只小鼠在观测的 14 天期间结束后均仍存活。给予 mAb 5C5 的小鼠血清具有高于 64 的 A/Indonesia/CDC669/H5N1 的 HI 效价。这些数据表明给予的 IgG2amAb 5C5 可以渗入小鼠血液中,并且最终促进小鼠体内病毒清除。

[0135] 为了评估 mAb 5C5 的治疗效力,在病毒感染之后给予所述抗体。在给予 6 只小鼠的每一只小鼠 20 μ l 的 10 LD₅₀ 致死剂量 A/Indonesia/CDC669/H5N1 之后第一天 (24 小时),通

过腹膜内注射给予 10mg/kg 的 mAb 5C5。对照组 (6 只小鼠) 接受 IgG1 mAb 5C4, 其是针对 C. jejuni. 制成的内部抗体。在对照组中, 6 只小鼠在感染后 10 天内全部死亡。在 mAb5C5 组中, 6 只小鼠中有 5 只小鼠在病毒攻击后 14 天仍存活。

[0136] 这些数据表明 mAb 5C5 即使在病毒感染后给予仍是有效的, 表明所述抗体可用于预防和治疗目的。

[0137] 实施例 4 : 组合使用针对 N1 亚型的 mAb6C6 及针对 H5 亚型的 mAb5C5 进行抗原捕获 ELISA (AC-ELISA) 以鉴别 H5N1 亚型 AIV

[0138] 如上所述, 含有 H5N1 病毒的样品通过使用 mAb 5C5 或者 mAb 5A5 可以将其鉴别为 H5 亚型, 使用 mAb 6C6 可以将其单独鉴别为 N1 亚型。通过组合使用前者抗体之一与后者抗体也可以将样品鉴别为 H5N1。设计 AC-ELISA 以检测 H5N1 病毒。在 100 μ l PBS 中将 mAb 5C5 以 0.5 μ g/孔及 100 μ l/孔的量在 96 孔平板 (U96MaxiSorp NUNC-immuno plate) 中在 4°C 保温过夜。在用 PBS-T 漂洗该平板之后, 将包被的平板用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 在室温封闭 1 小时。然后弃去封闭溶液, 将在 PBS 中的 20HA 单位 100 μ l 稀释的失活的 H5N1 分离株加入每个孔中, 保温 2 小时。

[0139] 用洗涤缓冲液 PBS-T 洗涤该平板 4 次, 向每个孔中加入 1/500 稀释的 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的 mAb 6C6。将该平板在室温进一步保温 1 小时, 然后用洗涤缓冲液洗涤 6 次。将 100 μ l 新鲜制备的底物 (10mg 邻苯二胺二盐酸盐 / 20ml 0.05M 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液, pH 5.0, 含有 0.03% 高硼酸钠) 加入每个孔中, 将平板在室温保温大约 5 分钟。加入 50 μ l 2N 硫酸终止反应。使用自动平板分光光度计 (Mitenyi Biotec) 在 490nm (A490) 测量吸光度。H5N1 病毒产生显著的 A490 读数, 而作为阴性对照的 H7N1 病毒产生较低的读数。示于表 5 中的结果表明组合 mAb 5C5 与 mAb 6C6 可用于鉴别 H5N1 AIV。含有 H5N1 AIV 的样品可以通过单独使用 mAb 5C5 和 mAb 6C6 鉴别, 但是使用所述组合抗体可以减少需要的样品量。

[0140] 相似地, 组合 mAb 5A5 与 mAb 6C6 或者本发明 mAb 的其它合适组合也可以用于鉴别 H5N1 AIV。

[0141] 表 5 : 组合使用 mAb 5C5 和 mAb 6C6 鉴别 H5N1 的 AC-ELISA 结果

[0142]

	#1	#2	#3
A/Indonesia/CDC644/H5N1	1.364	1.275	1.298
A/Indonesia(CDC623/H5N1	1.148	1.162	1.198
A/Indonesia/CDC594/H5N1	0.605	0.589	0.6
A/Indonesia/CDC329/H5N1	1.201	1.165	1.143
A/chicken/Singpaore/94 (H7N1)	0.206	0.197	0.193
PBS as negative control	0.188	0.171	0.177
Blank	0.053	0.06	0.058

[0143] Blank : 空白

[0144] 实施例 5 :mAb 2F11、9C1 和 3H11 的活性

[0145] 在使用 H5N1-AIV- 感染的 MDCK 细胞的间接免疫荧光测定 (IFA)、蛋白印迹 (WB)、凝血抑制试验 (HI) 和病毒中和试验 (VN) 中评估 mAb 2F11、9C1 和 3H11 的结合活性。

[0146] 试验结果在下表 6-8 中示出。

[0147] 表 6 :与 H5N1 AIV(A/Vietnam/1203/2004/H5N1) 逃逸突变株 K205M 的结合活性

[0148]

MAB	IFA	WB	HI	VN
2F11	+	--	+	+
9C1	+	--	+	+
3H11	--	--	--	--

[0149] 表 7 :与 H5N1AIV(A/Indonesia/CDC669/2206/H5N1) 的逃逸突变株 K205M 的结合活性

[0150]

Mab	IFA	WB	HI	VN
2F11	+	--	+	+
9C1	+	--	+	+
3H11	+	--	+	+

[0151] 逃逸突变株 K205M 从 H5N1AIV(A/Vietnam/1203/2004/H5N1) 中通过 mAb 6B8 筛选产生, mAb 6B8 是于 2007 年 3 月 20 日以保藏号 ATCC CRL PTA-8246 保藏在美国典型培养物保藏中心的单克隆抗体。mAb 9C1 和 2F11 与这些 K205 突变株的特异性相互作用提示这两个 mAb 与 mAb 6B8 一起在抑制逃逸突变株产生中的潜在应用。

[0152] 实施例 6 :mAb 2F11 和 9C1 的治疗应用

[0153] 2F11 和 9C1 均从 H5 毒株 A/Vietnam/1203/2004/H5N1 的 K205M 逃逸突变株中产生,因此可以与靶向相同突变株的另一种单克隆抗体组合,但是不能结合或者以较低活性结合野生型毒株,如 mAb 6B8(由杂交瘤 6B8 产生,根据布达佩斯条约于 2007 年 3 月 20 日保藏在 ATCC,保藏号为 CRLPTA-8246),这是作为治疗剂靶向 VN1203 毒株中野生型 205K 毒株的 mAb。MAb 9C1 识别 K205M 突变株,但是不能结合野生型毒株 VN1203,这表明该 mAb 靶向毒株 VN1203 中第 205 位甲硫氨酸表位。包含 mAb 9C1 和 6B8 的单克隆抗体混合物可以有效地抑制 H5N1 感染,且防止逃逸突变株在体外和体内产生。

[0154] 表 9 :mAb 6B8 与 9C1 的 HI 活性对比

[0155]

MAb	Vietnam 1203 (进化枝 1)	
	WT205K	K205M
8B6	+	--
9C1	--	+

[0156] 为了例证 6B8 和 9C1mAb 的活性,将 16HA 单位 AIV 与下表所示 mAb 一起在室温保温至少 1.5 小时。将该混合物接种于 10 天龄鸡胚内。每日评估 HA 效价和鸡胚的存活率。结果示于表 10。

[0157] 表 10

[0158]

mAb		1203 (进化枝 1, 16HA)
6B8 (1 μ g)	病毒 HA	+ 2 天 p.i.
	鸡存活性	-- 2 天 p.i.
6B8 (1 μ g)+9C1 (0.1 μ g)	病毒 HA	-- 3 天 p.i.
	鸡存活性	+
6B8 (1 μ g)+9C1 (1 μ g)	病毒 HA	-- 3 天 p.i.
	鸡存活性	+
6B8 (1 μ g)+9C1 (5 μ g)	病毒 HA	-- 3 天 p.i.
	鸡存活性	+
9C1 (1 μ g)	病毒 HA	+ 1 天 p.i.
	鸡存活性	-- 2 天 p.i.

[0159] “-”表示 HA 试验阴性或者鸡胚死亡,

[0160] “+”表示 HA 试验阳性或者鸡胚存活,

[0161] p. i. 表示感染后。

[0162] 参考文献

[0163] 1. Jeffery K. Taubenberger, Ann H. Reid¹, Raina M. Lourens¹, Ruixue Wang, Guozhong Jin and Thomas G. Fanning¹. 2006. Molecular virology: Was the 1918 pandemic caused by a bird flu? Was the 1918 flu avian in origin? Nature. 440: E9-E10.

[0164] 2. Ann H. Reid, Jeffery K. Taubenberger & Thomas G. Fanning. 2004. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. Nature Reviews Microbiology 2: 909-914.

[0165] 3. Patrick J Gavin, Richard B Thomson, Jr. 2003. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. Clinical and Applied Immunology Reviews 4: 151-172.

[0166] 4. Gregory A. Storch, MD. Rapid diagnostic tests for influenza. 2003.

Current Opinion in Pediatrics. 15:77–84.

[0167] 5. Yuen K Y, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, et al. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*. 351:467–71.

[0168] 6. Varghese, J. N. et al. 1998. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* 6:735–746.

[0169] 7. Le, Q. M. et al. 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 438:754.

[0170] 8. Kiso, M. et al. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 364:759–765.

[0171] 9. de Jong, M. D. et al. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N. Engl. J. Med.* 353:2667–2672.

[0172] 10. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443, 45–49.

[0173] 11. Cameron P, Simmons, Nadia L, Bernasconi, Amorsolo L, Suguitan, Jr., Kimberly Mills, Jerrold M Ward, Nguyen Van Vinh Chau, Tran Tinh Hien, Federica Sallusto, Do Quang Ha, Jeremy Farrar, Menno D de Jong, Antonio Lanzavecchia, and Kanta Subbarao. 2007. Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Human Monoclonal Antibodies against H5N1 Influenza. *PLoS Med.* 4:e178.

[0174] 12. Brendon J Hanson, Adrianus CM Boon, Angeline PC Lim, Ashley Webb, Eng Eong Ooi, and Richard J Webby. 2006. Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Respir Res.* 7:126.

[0175] 13. Jiahai Lu, Zhongmin Guo, Xinghua Pan, Guoling Wang, Dingmei Zhang, Yanbin Li, Bingyan Tan, Liping Ouyang, and Xinbing Yu. 2006. Passive immunotherapy for influenza A H5N1 virus infection with equine hyperimmune globulin F(ab')₂ in mice. *Respir Res.* ;7:43.

[0176] 14. Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YH, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TS, Yuen KY, Hassan SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2845–50.

[0177] 15. Smith GJ, Naipospos TS, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JS, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and

human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 350:258–68.

[0178] 16. De St. Groth, S. F., and D. Scheidigger. 1980. Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 35:121.

[0179] 17. Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J. Hyg.* 27:493–497.

[0180] 18. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and K. Struhl. 1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York, N. Y.

[0181] 19. Huber, Victor C, McKeon, Raelene M., Brackin, Martha N., Miller, Laura A., Keating, Rachael, Brown, Scott A., Makarovna, Natalia, Perez, Daniel R., MacDonald, Gene H., McCullers, Jonathan A. 2006. Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1(IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:981–990.

[0182] 20. Yuichi Harada, Masamichi Muramatsu, Toshikatsu Shibata, Tasuku Honjo, and Kazumichi Kuroda. Unmutated Immunoglobulin M Can Protect Mice from Death by Influenza Virus Infection. *J. Exp. Med.* 197:1779–1785.

[0183] 21. Palladino, G, Mozdzanowska, K, Washko, G, Gerhard, W. 1995. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G(IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. *J. Virol.* 69:2075–2081.

[0184] 22. Krystyna Mozdzanowska, Jingqi Feng, and Walter Gerhard. J. 2003. Virus-Neutralizing Activity Mediated by the Fab Fragment of a Hemagglutinin-Specific Antibody Is Sufficient for the Resolution of Influenza Virus Infection in SCID Mice. *J. Virol.* 77:8322–8328.

[0185] 23. Lu J, Guo Z, Pan X, Wang G, Zhang D, Li Y, Tan B, Ouyang L, Yu X. 2006. Passive immunotherapy for influenza A H5N1 virus infection with equine hyperimmune globulin F(ab')₂ in mice. *Respiratory Research*. 7:43.

[0186] 24. Horimoto, T. et al. Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *J. Vet. Med. Sci.* 66:303–5. 25. Iwasaki, T., et al. *Acta Neuropathol. (Berl)*., 108:485–92.

[0187] 26. Steven, J, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312:404–10.

[0188] 27. Robert G. Webster, A. G. 1994. *Encyclopedia of Virology*, 2:709–724.

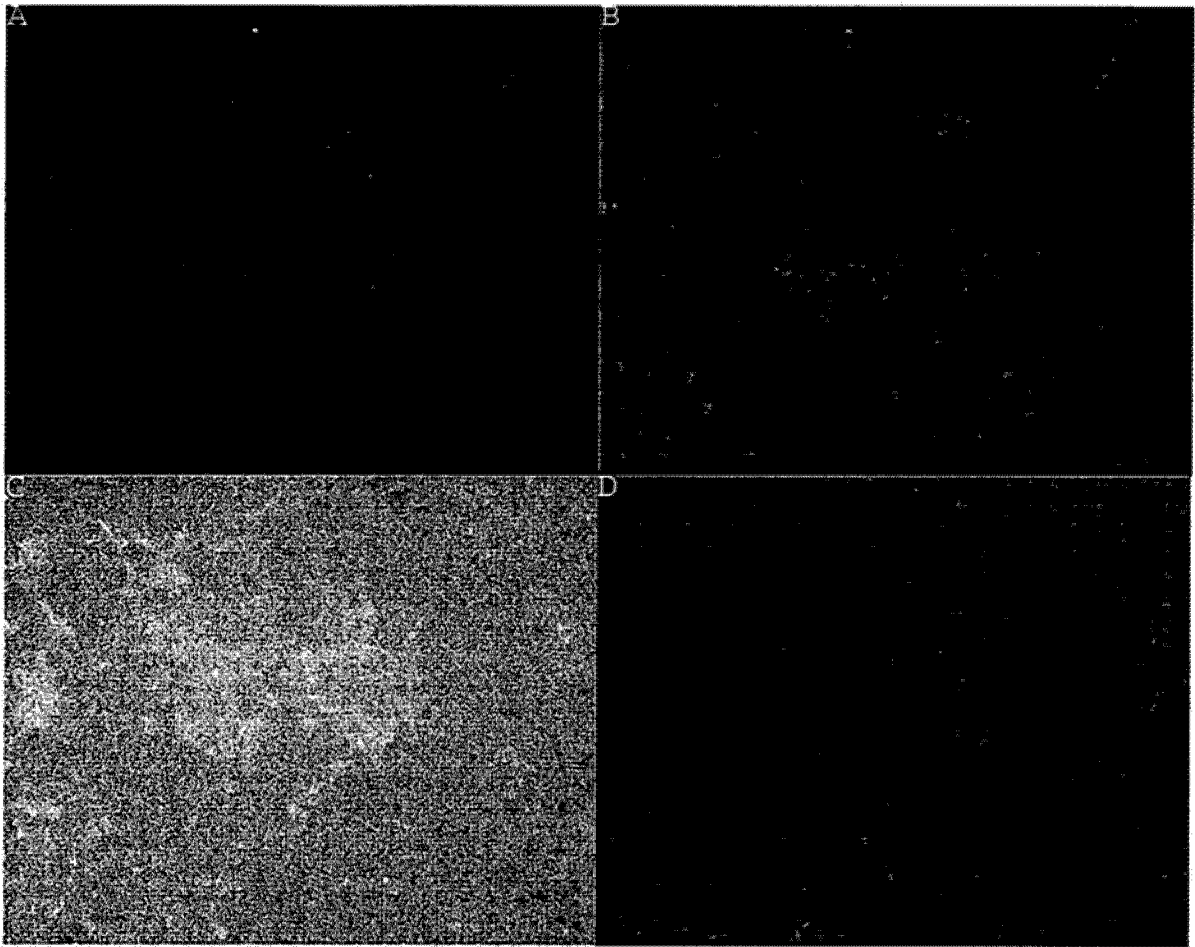


图 1



图 2

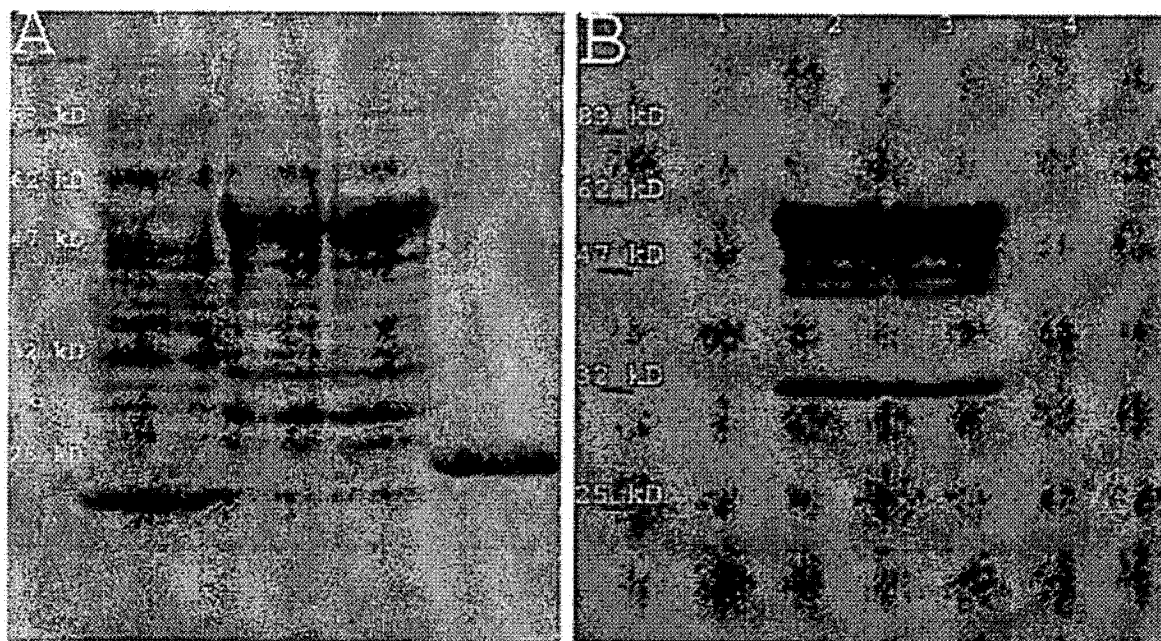
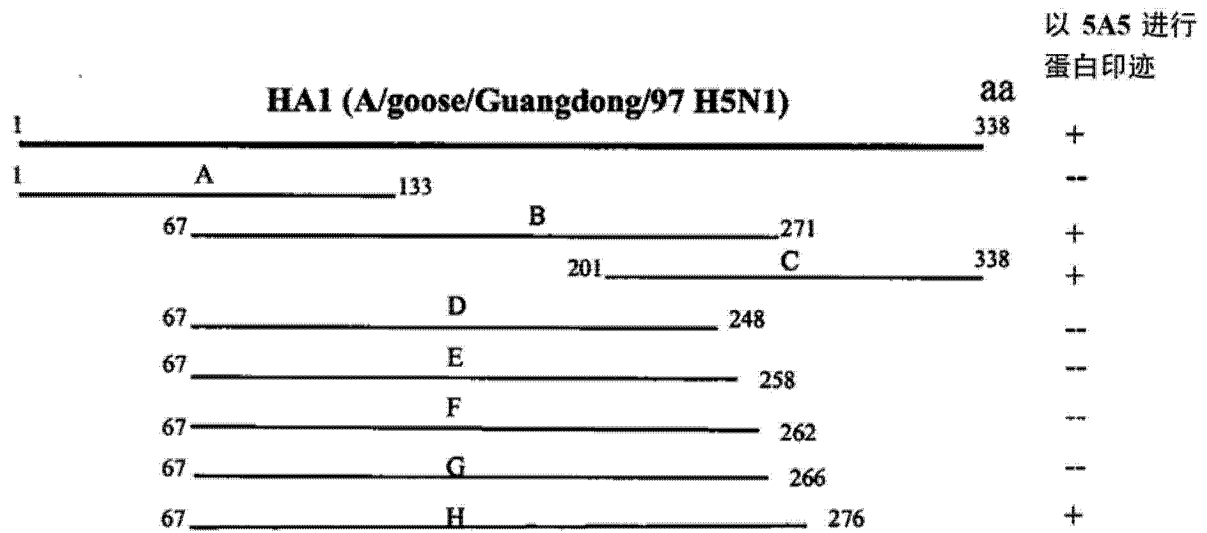


图 3

A



B

			以 5A5 进行 蛋白印迹
259	SNGNFI APEYAYK	271	+
259	SNGNFI APEYAYA <u>A</u>	271	+
259	SNGNFI APEYAAK	271	+
259	SNGNFI APEYPYK	271	—
259	SNGNFI APEAAAYK	271	—
259	SNGNFA <u>A</u> APEYAYK	271	—
259	SNGN <u>A</u> I APEYAYK	271	—
259	SNG <u>A</u> FI APEYAYK	271	—
259	SN <u>A</u> NF I APEYAYK	271	—
259	S <u>A</u> GNF I APEYAYK	271	—
259	<u>A</u> NGNF I APEYAYK	271	+

图 4



图 5

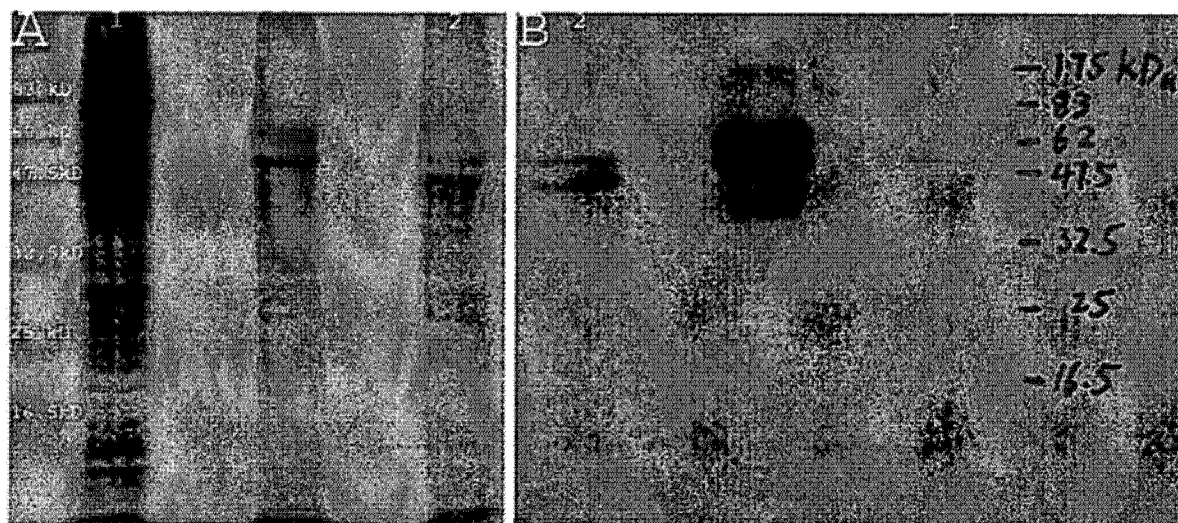
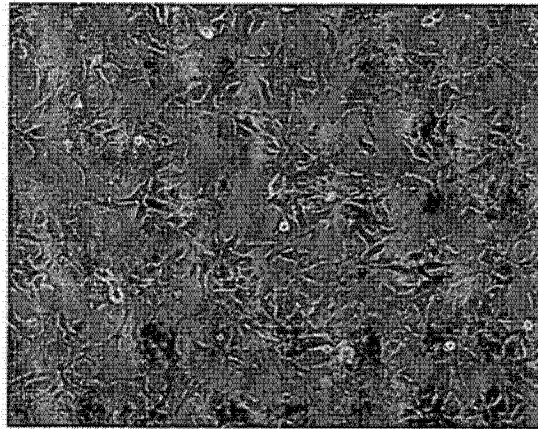
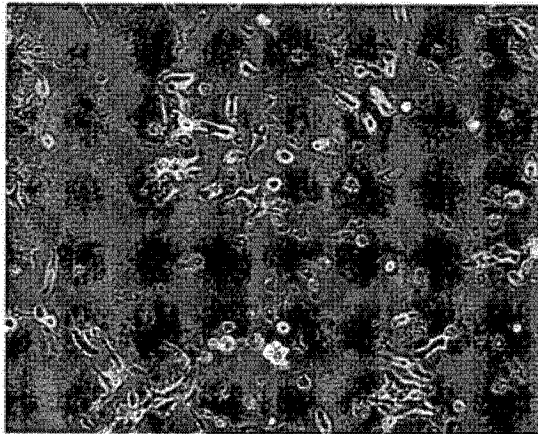


图 6

A



B



C

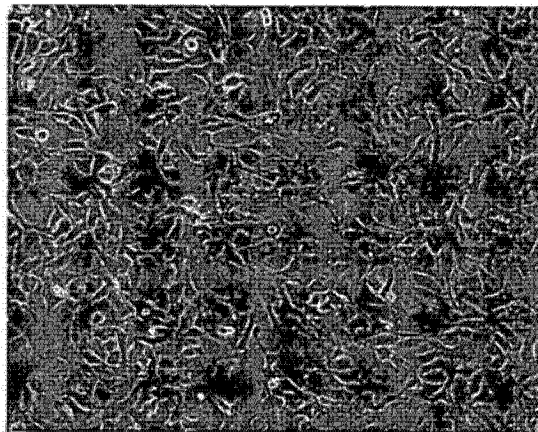


图 7