(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101072795 B
(45)授权公告日 2014.07.02

(21)申请号 200580041805.X

(22)申请日 2005.12.05

(30)优先权数据
60/633,846 2004.12.06 US
60/724,198 2005.10.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.06.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2005/004146 2005.12.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2006/061723 EN 2006.06.15

(73)专利权人 协和发酵麒麟株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 加藤慎一郎 王荣芳

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 刘玥

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
A61K 39/42(2006.01)
C12N 5/18(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)

(56)对比文件
Wanli Liu 等.Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge.《Immunology Letters》.2004, 第93卷131-136.

Peng Zou 等.The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection.《International Immunopharmacology》.2005, 第5卷631-635.

审查员 王璟

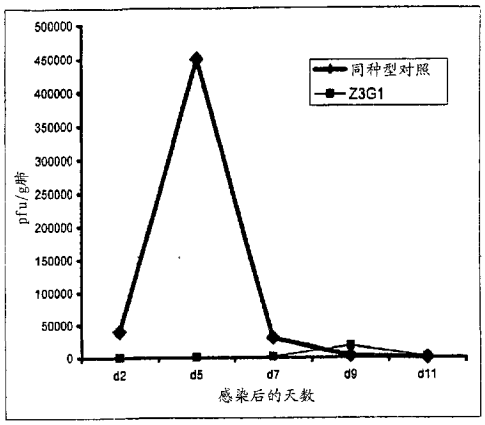
权利要求书1页 说明书51页
序列表27页 附图7页

(54)发明名称

针对流感病毒M2蛋白的人单克隆抗体

(57)摘要

能结合流感病毒M2蛋白的人的、人源化的和嵌合的单克隆抗体。结合具有不同氨基酸序列的流感病毒M2蛋白的人单克隆抗体。所述抗体的用途包括治疗、诊断、纯化和分离M2或流感病毒,以及鉴定M2或流感病毒在样品或受试者内的存在。



CN 101072795 B

1. 一种分离的抗体，其特异性结合于 A 型流感病毒蛋白 M2 细胞外结构域中的表位，其中该抗体包含由保藏号为 ATCC PTA-5968 的杂交瘤或保藏号为 ATCC PTA5967 的 CHO 细胞产生的抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列。

2. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体包含由 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列中氨基酸残基 20-137 组成的重链可变区序列和由 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列的氨基酸残基 20-130 组成的轻链可变区序列。

3. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体包含保藏号为 ATCC PTA-5967 的 CHO 细胞产生的抗体的重链可变区和恒定区序列以及轻链可变区和恒定区序列。

4. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体包含保藏号为 ATCC PTA-5968 的杂交瘤产生的抗体的重链可变区和恒定区序列以及轻链可变区和恒定区序列。

5. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体包含 SEQ ID NO :37 所示的重链可变区和恒定区序列的成熟部分和 SEQ ID NO :35 所示的轻链可变区和恒定区序列的成熟部分。

6. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体是选自人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 和人 IgG4 的亚类。

7. 权利要求 6 的抗体，其中抗体的亚类是人 IgG1。

8. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体选自 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD 同种型。

9. 权利要求 8 的抗体，其中该 IgG 同种型选自 IgG_1，IgG_2，IgG_3 和 IgG_4。

10. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体由保藏号为 ATCC 保藏号 PTA-5967 或 ATCC 保藏号 PTA5968 的 CHO 细胞系或杂交瘤产生。

11. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体与保藏号为 ATCC 保藏号 PTA-5967 或 ATCC 保藏号 PTA5968 的 CHO 细胞系或杂交瘤产生的抗体具有相同的结合亲和力。

12. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体包括抗体多聚物。

13. 权利要求 1 的抗体，其中该抗体是双特异性或双功能抗体。

14. 表达权利要求 1-13 的任一项的抗体的宿主细胞。

15. 编码保藏号为 ATCC 保藏号 PTA-5967 或 ATCC 保藏号 PTA5968 的 CHO 细胞系或杂交瘤产生的抗体的核酸。

16. 插入了权利要求 15 的核酸的载体。

17. 一种组合物，包含权利要求 1-13 的任一项的抗体和抗病毒剂。

18. 一种药物组合物，包含权利要求 1-13 的任一项的抗体和可以药用的载体或赋形剂。

19. 一种药盒，包含权利要求 1-13 的任一项的抗体和关于治疗、抑制、防止一种或多种流感病毒株或分离物感染受试者，或减弱受试者对一种或多种流感病毒株或分离物的易感性的说明书。

针对流感病毒 M2 蛋白的人单克隆抗体

[0001] 及其制备和使用方法

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2004 年 12 月 6 日提交的申请序列号 60/633,846 和 2005 年 10 月 6 日提交的申请序列号 60/724,198 的优先权，在此引入作为参考。

技术领域

[0004] 本发明涉及抗体，更具体地讲，涉及特异性地结合流感病毒 M2 蛋白的人的、人源化的和嵌合的抗体。此外，本发明涉及抗体，更具体地讲涉及最小结合序列是 LLTEVETPIR(SEQ ID NO:1) 的人的、人源化的和嵌合的抗体。

[0005] 导言

[0006] A 或 B 型流感病毒几乎每年冬天都会在所有国家造成疾病的流行，并且，是在发达国家导致死亡的主要原因。在美国，这种冬季流感流行可造成约 10％ -20％的人口发病，并且与每年平均 20,000 人死亡和 114,000 人住院相关。控制流感的现有方法是每年用灭活的完整病毒或亚单位疫苗进行接种。

[0007] 已经证明了流感疫苗具有抗流感感染的保护作用。但是，每年出现的流感病毒的抗原性变体使得监测循环病毒株的流行成为必要。在一些情况下，预测新变异株的困难阻止了疫苗的及时产生 (Frace 等，Vaccine17 :2237(1999))。最近，由于南亚地区禽流感病毒如 H5N1 的出现，流行性禽流感成为了一种严重威胁。目前可以获得的疫苗不能有效抗禽病毒 (Lipatov 等，J.Virology78 :8951(2004) ;Osterholm 等，N Engl.Med.352 :1839(2005))。目前的疫苗的第三个问题是在某些免疫系统受损的人群，例如早产儿、老年人、AIDS 和移植患者中无效。

[0008] 由于不存在抗禽病毒的疫苗，世界各国目前正在尝试储存抗流感药物达菲 (Tamiflu) 来治疗可能的全球流行性感冒，达菲是一种神经氨酸酶抑制剂。该药物目前供应短缺。最近，在越南的一名 14 岁的女孩体内发现了药物抗性禽病毒。也在人类流感中发现了对达菲的抗性 (Mai Le 等，Nature437 :1108(2005))。如果传播到其它人，散发的病毒会成为一个问题，因为达菲是目前最有效的抗流感药物。关于达菲的另一个关注是，虽然它可以加速成人中具有流行性流感株的轻度感染的恢复，但是还不清楚它是否对严重禽流感有效。

[0009] 红细胞凝集素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 是刺激抗体产生的两种主要抗原。由于这两种蛋白经常发生抗原性变异，它们不是开发治疗药物的最佳靶。A 型流感病毒的第三种跨膜蛋白，基质蛋白 2(M2)，是由病毒感染过的细胞大量表达的，其中，认为它能提供病毒复制所必须的跨膜质子流 (Ciampor 等，Virus Research22 :247(1992) ;Grambas and Hay, Virology190 :11(1992) ;Sugrue 等，EMBO J.9 :3469(1990))。与 HA 和 NA 不同，M2 是保守的，并且可以作为开发流感患者的基于抗体的被动免疫治疗的靶 (Ito 等，J.Virology65 :5491(1991) ;Slepushkin 等，Vaccine13 :1399(1995) ;Neirynck 等，Nature Med.5 :1157(1999))。

[0010] 发明概述

[0011] 提供了用于预防和治疗流感感染的组合物和方法。组合物包括全人的、人源化的和嵌合的（如人/小鼠嵌合体）单克隆抗体，其识别来自A/PR/8/34、A/HK/1/68和其它株/分离物的流感基质蛋白2，即M2蛋白，并且对不同的A型流感株/分离物和亚型的具有广泛反应性。方法包括在接触、暴露于或感染流感之前或之后，用结合流感基质蛋白2，即M2蛋白的人的、人源化的和嵌合的（如人/小鼠嵌合体）单克隆抗体，即抗M2抗体进行被动免疫。

[0012] 在给受到A型流感病毒感染之前或之后的动物施用抗体时，人单克隆抗-M2单克隆抗体能够保护小鼠免受A型流感病毒(A/HK/1/68和A/PR/8/34)的致死性攻击。流感病毒复制在体内受到显著抑制。人抗M2抗体包括具有广泛抗原特异性、能够结合多种M2序列的抗体。例如，示例的抗体结合大多数M2序列变体，包括来自潜在流行的禽流感分离物的变体。对M2变体肽具有广泛特异性的所述人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体可以用于抗多种流感株/分离物和亚型。

[0013] 因此，本发明提供了结合流感病毒蛋白M2的人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体，包括人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体的组合物，如包括人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体的药物组合物，以及含有所述抗体的试剂盒。本发明的人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体可用于在感染之前（预防）或感染之后（治疗）治疗患有流感或存在患流感的危险的受试者；流感检测和诊断，包括测定病毒滴度；纯化/分离，包括纯化或分离完整病毒或M2蛋白；以及其他分析系统。因此，本发明还提供了将所述抗体用于治疗（例如，治疗流感病毒感染）和非治疗用途，如诊断（检测或测量样品中流感病毒或M2蛋白的含量）和纯化（纯化或分离流感病毒或M2蛋白）的方法。

[0014] 在一种实施方案中，提供了特异性地结合M2细胞外结构域的至少一部分的人抗体，在此也称作M2胞外域(M2e)。在特定方面，所述细胞外结构域/胞外域包括氨基酸序列：SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:2)。其亚序列或氨基酸变体（例如，氨基酸取代，插入，缺失或添加），或由所述氨基酸序列、其亚序列或氨基酸变体组成。另一方面，所述细胞外结构域/胞外域是包括选自下组的氨基酸序列或由选自下组的氨基酸序列组成的序列：

[0015] SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SE QID NO:3)，

[0016] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO:4)，

[0017] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:5)，

[0018] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:6)，

[0019] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:7)，

[0020] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8)，

[0021] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9)，

[0022] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10)，

[0023] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11)，

[0024] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12)，

[0025] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13)，

[0026] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14)，

[0027] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15)，

[0028] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16),

[0029] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17),

[0030] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18),

[0031] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19),

[0032] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20),

[0033] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21),

[0034] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22),

[0035] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0036] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0037] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25) 和

[0038] SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。另一方面,抗体由命名为 Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 的细胞系 (如杂交瘤或 CHO 细胞系) 产生。

[0039] 本发明的抗体包括多克隆和单克隆抗体以及它们的混合物,它可以是 IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 中的任意一种,以及它们的任何同种型,例如,IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在单克隆抗体的情况下,示例的抗体类型是 IgG。IgG 的亚类包括例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。抗体包括完整的人的、人源化的和嵌合的免疫球蛋白分子,其具有两个全长的重链和两个全长的轻链 (例如,重链和轻链可变区序列的成熟部分) 以及重链或轻链的亚序列 / 片段,它保留了特异性地结合 M2 的亲本完整抗体的至少一部分功能 (M2 结合特异性、M2 结合亲和力或抗 - 流感病毒活性)。亚序列可以与亲本完整的人的、人源化的和嵌合的抗体具有相同或基本相同的结合特异性、结合亲和力或抗流感病毒活性。

[0040] 示例的亚序列包括 Fab、Fab′、$(Fab')_2$、Fv、Fd、单链 Fvs(scFv)、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和 VL 或 VH,或完整的免疫球蛋白的其它 M2 蛋白结合片段。因此,本发明的抗体包括通过以下杂交瘤或 CHO 细胞系产生的抗体的重链可变序列和轻链可变序列 :no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA)。

[0041] 抗体还包括与以下细胞系 (例如,杂交瘤或 CHO 细胞系) 产生的抗体具有相同或基本相同的结合特异性、亲和力或抗流感病毒活性的人的、人源化的和嵌合的抗体 :no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA)。在一种特定实施方案中,与细胞系 (例如,杂交瘤或 CHO 细胞系)no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 产生的抗体具有相同的结合特异性的抗体结合于细胞系 (例如,杂交瘤或 CHO 细胞系)no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养

物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体所结合的M2变体序列中的至少一个序列。在另一个特定实施方案中，与细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体具有基本相同的结合特异性的抗体结合于或弱结合于细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体所结合的M2变体序列中的至少5-10、10-15、15-20、20-25或更多种序列。在另一个特定实施方案中，与细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体具有基本相同的结合特异性的抗体结合于或弱结合于细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体所结合的M2变体序列中的至少10-15、15-20、20-25或更多种序列，但是不结合于或仅仅弱结合于抗M2抗体L66、N547、C40G1或14C2所结合的M2序列。

[0042] 在额外的实施方案中，亲和力或抗流感病毒活性比参照抗体高大约5-1000倍，或低大约5-1000倍。因此，例如，当参照抗体的kd是10^{-9}M时，本发明的抗体包括Kd比10^{-9}M高大约5-1000倍或低大约5-1000倍的抗体。因此，一方面，抗体的结合亲和力比细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体的结合亲和力高大约5-1000倍或低大约5-1000倍。

[0043] 在其它实施方案中，抗体与参照抗体结合于相同的表位。因此，一方面，抗体与细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体结合于相同的表位。另一方面，抗体结合于细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）no.Z3G1(ATCC保藏号PTA-5967；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）和no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC保藏号PTA-5968；2004年3月13日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA）产生的抗体所结合的表位。另一方面，抗体结合于任何M2氨基酸序列内的表位，例如SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO：2)，SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO：3)，

[0044] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO：4)，

[0045] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO：5)，

[0046] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO：6)，

[0047] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO：7)，

[0048] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8),

[0049] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9),

[0050] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10),

[0051] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11),

[0052] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12),

[0053] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13),

[0054] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14),

[0055] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15),

[0056] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16),

[0057] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17),

[0058] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18),

[0059] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19),

[0060] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20),

[0061] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21),

[0062] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22),

[0063] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0064] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0065] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25),

[0066] SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26) 和

[0067] LLTEVETPIR(SEQ ID NO:1)。

[0068] 本发明的抗体还包括结合于M2蛋白的最小结合序列的人的、人源化的和嵌合的抗体。在多个方面，抗体结合于LLTEVETPIR(SEQID NO:1)内的最小结合序列。在特定的方面，用于抗体结合的最小结合序列是LLTEVETPIR(SEQ ID NO:1)。在其它方面，人M2抗体的最小结合序列与LLTEVETPIR(SEQ ID NO:1)相同或基本相同。在其它方面，人M2抗体结合于最小结合序列，其是LLTEVETPIR(SEQ ID NO:1)。其它方面包括结合于以下任何序列中的最小结合序列的M2抗体:SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:2),

[0069] SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3),

[0070] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO:4),

[0071] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:5),

[0072] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:6),

[0073] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:7),

[0074] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8),

[0075] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9),

[0076] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10),

[0077] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11),

[0078] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12),

[0079] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13),

[0080] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14),

[0081] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15),

[0082] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16),

[0083] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17),

[0084] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18),

[0085] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19),

[0086] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20),

[0087] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21),

[0088] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22),

[0089] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0090] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0091] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25) 和 SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。本发明的抗体还包括与细胞系(如杂交瘤或 CHO 细胞系)no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA)和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968;2004 年 3 月 13 日保藏,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA)产生的示例的抗体具有相同功能或活性的人的、人源化的和嵌合的抗体,所述功能或活性例如体外或体内抑制病毒感染的能力或体外或体内抑制细胞(如 MDCK 细胞)的 M2 结合的能力。在多个方面,抗体抑制 MDCK 细胞的流感病毒感染的 EC50 小于 2.0-3.0、1.0-2.0、0.5-1.0、0.1-0.5 或小于 0.1μg/ml(如 0.05-0.1μg/ml),这是通过基于细胞的 ELISA 分析确定的。在其它方面,抗体抑制 M2 与 MDCK 细胞结合的 EC50 小于 2.0-3.0、1.0-2.0、0.5-1.0、0.1-0.5 或小于 0.1μg/ml(如 0.05-0.1μg/ml),这是通过基于细胞的 ELISA 分析确定的。在其它方面,流感病毒是 A 型流感病毒,如 A/PR/8/34(H1N1)或 A/HK/1/68(H3N2)株/分离物,或其它亚型,如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2 或 H5N3。

[0092] 本发明的抗体还包括人的、人源化的和嵌合的抗体,其结合具有不同氨基酸序列(如具有 M2 的不同的细胞外结构域/胞外域序列,即 M2e)的两种或两种以上 M2 蛋白,所述蛋白可任选存在于不同的流感病毒(例如,株/分离物或亚型)上。在一种实施方案中,抗体结合于 M2 细胞外结构域/胞外域序列即 M2e 的至少一部分。在特定方面,M2e 序列包括氨基酸序列 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ IDNO:2)、其亚序列或氨基酸变体(如氨基酸取代、缺失或添加),如 SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3),或由所述氨基酸序列、其亚序列或氨基酸变体组成。在其它特定方面,M2e 序列包括选自下组的氨基酸序列或由选自下组的氨基酸序列组成:

[0093] SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3),

[0094] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO:4),

[0095] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:5),

[0096] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:6),

[0097] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:7),

[0098] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8),

[0099] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9),

[0100] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10),

[0101] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11),

[0102] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12),

[0103] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13),

[0104] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14),

[0105] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15),

[0106] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16),

[0107] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17),

[0108] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18),

[0109] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19),

[0110] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20),

[0111] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21),

[0112] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22),

[0113] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0114] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0115] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25)和SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。本发明的抗体包括业已进行过修饰以便形成寡聚体的形式,例如,通过寡聚化结构域(例如,亮氨酸拉链基序)连接或通过交联剂结合(例如,化学交联剂)连接。因此,本发明的抗体包括多聚物形式,例如,二聚物、三聚物、四聚物或更高级的人的、人源化的和嵌合的抗体寡聚物。与单体形式的抗体相比,所述抗体多聚物通常表现出对M2的较高的抗体亲抗原性。

[0116] 本发明的抗体还包括一个或多个异源结构域,它赋予结合M2的抗体的独特的功能或活性。当一个或多个氨基酸与所述抗体不同时(即,它们不是天然抗体的一部分),抗体包括氨基酸异源结构域。在一种实施方案中,异源结构域包括结合蛋白(例如,报道物或配体结合)、酶活性、药物、抗病毒剂、毒素、免疫调节剂、可检测部分或标记。一方面,所述结合蛋白包括具有不同于能特异性结合流感蛋白M2的人的、人源化的或嵌合的抗体的结合特异性或亲和力的抗体。因此,本发明还提供了多特异性和多功能抗体(例如,双特异性和双功能抗体,如结合两种或两种以上抗原或分别具有两种或两种以上功能或活性的抗体)。

[0117] 本发明的抗体能够结合任选存在于一种或多种流感病毒株/分离物或亚型上的流感M2蛋白。因此,所述抗体对M2或流感病毒的传染性、复制、增殖、滴度、与流感相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性,或流感病毒感染的易感性具有一种或多种作用,即,抗-流感病毒活性。

[0118] 在一种实施方案中,人的、人源化的或嵌合的抗体能抑制一种或多种流感病毒株/分离物或亚型在体外或体内感染细胞,或抑制一种或多种流感病毒株/分离物或亚型在体外或体内结合于细胞。在另一种实施方案中,人的、人源化的或嵌合的抗体能减少一种或多种病毒株/分离物或亚型的流感病毒滴度或流感病毒蛋白的量。在另一种实施方案中,人的、人源化的或嵌合的抗体抑制或阻止一种或多种流感病毒株/分离物或亚型的流感病毒滴度或流感病毒蛋白的量增加。在另一种实施方案中,人的、人源化的或嵌合的抗体能保护受试者免受一种或多种流感病毒株/分离物或亚型感染或降低受试者对一种或多种流感病毒株/分离物或亚型的易感性。在另一种实施方案中,人的、人源化的或嵌合的抗体能

减轻与一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型感染相关的一种或多种症状或并发症（例如、寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛或死亡）的进展、严重性、频率、持续时间或可能性。在多个方面，人的、人源化的或嵌合的抗体是系统施用的（例如，静脉注射、皮下注射、静脉输液、肌内注射），或局部用于受试者的粘膜组织（例如，鼻道、鼻窦、喉、咽、食道、耳或耳道）或肺。在多个方面，所述流感病毒是 A 型流感病毒，并且 A 型流感病毒选自 A/PR/8/34(H1N1) 或 A/HK/1/68(H3N2) 株 / 分离物或亚型，如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2 或 H5N3。

[0119] 还提供了表达本发明的人的、人源化的和嵌合的抗体的宿主细胞。细胞包括，但不限于细菌、酵母、植物、动物（例如，哺乳动物细胞如杂交瘤细胞系和 CHO 细胞系），以及完整的生物，如表达本发明人的、人源化的或嵌合的抗体的非人动物和植物。可以用宿主细胞制备抗体，随后任选分离或纯化所述抗体。

[0120] 还提供了编码本发明抗体的核酸，包括其亚序列 / 片段和变体。在特定实施方案中，核酸编码如实施例 1 所示的重链序列或轻链序列（如 SEQ ID NOs :34、35 和 37）及其亚序列（如可变重链或轻链序列）。核酸包括用于对所述核酸进行克隆或其他遗传学操作或用于在溶液、细胞或任何生物体中表达的载体。因此，可以将核酸用于在溶液（如体外翻译）、细胞中体外或体内生产抗体，随后任选分离或纯化所述抗体。

[0121] 还提供了包括本发明的抗体的联合组合物。在一种实施方案中，组合物包括结合流感 M2 蛋白和抗病毒剂的人的、人源化的或嵌合的抗体。在另一种实施方案中，组合物包括结合流感 M2 蛋白的人的、人源化的或嵌合的抗体和抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症（例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、鼻窦感染、耳感染或死亡）的试剂。

[0122] 提供了包括本发明抗体和可以药用的载体或赋形剂的药物组合物。在一种实施方案中，载体适合施用于受试者的粘膜组织（例如，鼻道、鼻窦、咽、喉、食道）或肺。

[0123] 还提供了包括一种或多种本发明抗体的试剂盒。在一种实施方案中，试剂盒包括有关用于治疗（预防或治疗性）、抑制、阻止、减弱对一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型感染受试者的易感性，或减轻与一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型对受试者的感染相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性的说明书。在另一种实施方案中，所述试剂盒包括一种制品，如适合患者吸入或鼻施用的气溶胶、喷雾剂或塑料挤瓶或其它送递装置。在另一种实施方案中，所述试剂盒或制品包括抗病毒剂（例如，抗体或药物）或能抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的试剂。

[0124] 提供了用于治疗受试者的流感病毒感染的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效治疗患者的流感病毒感染的量的特异性结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。在一方面，所述抗体基本在所述受试者感染的同时或者在感染之后施用，即，治疗性处理。在另一方面，所述抗体提供了治疗效果。在多个方面，治疗效果包括减弱或减轻流感病毒感染的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性、一种或多种流感病毒株的病毒滴度、病毒复制或病毒蛋白的量。可以减弱或减轻的流感病毒感染的症状或并发症包括，例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻

感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛或死亡。在另一方面，治疗效果包括加速受试者从流感病毒感染恢复。

[0125] 还提供了抑制一种或多种流感病毒株或分离物对受试者的感染的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用能有效抑制一种或多种流感病毒株或分离物对所述受试者的感染或者减轻所述受试者对流感病毒感染的易感性的量的特异性结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。在多个方面，所述抗体是在受试者感染之前（预防）、基本与感染同时或者在感染之后施用的。在另一方面，所述抗体提供了治疗效果。在各个方面，治疗效果包括减轻或减弱一种或多种流感病毒感染的症状或并发症（例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛或死亡）的进展、严重性、频率、持续时间或可能性、一种或多种流感病毒株或分离物的病毒滴度或病毒蛋白的量，或受试者对一种或多种流感病毒株或分离物感染的易感性。

[0126] 还提供了阻止病毒滴度增加、病毒复制、病毒增殖或减少流感病毒蛋白在受试者体内的量的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用一定量的特异性地结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体，所述量能有效阻止受试者体内病毒滴度增加、病毒复制或减少一种或多种流感病毒株或分离物的流感病毒蛋白的量。

[0127] 还提供了用于保护受试者免受一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型感染或减轻受试者对感染的易感性的方法，即预防方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用能有效保护受试者免受一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型感染或有效减轻受试者对感染的易感性的量的特异性结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。在一方面，所述保护作用包括减轻或减弱与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症（例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛或死亡）。

[0128] 本发明的方法可以用具有由以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）产生的抗体的结合特异性或结合亲和力的抗体实施 :no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA。可以在给受试者施用之前将抗体掺入可以药用的载体或赋形剂。给受试者施用的方法包括系统、区域或局部送递。

[0129] 本发明的方法，包括治疗 / 预防、诊断 / 检测和纯化 / 分离可应用于任何流感病毒株 / 分离物或亚型，或株 / 分离物或亚型的组合。各种实施方案中，流感病毒是 A 型流感病毒，并且 A 型流感病毒选自 A/PR/8/34(H1N1) 或 A/HK/1/68(H3N2) 株 / 分离物或其它亚型，如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2 或 H5N3。

[0130] 提供了生产人 M2 抗体的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物（例如，小鼠）施用 M2 或它的免疫原性亚序列 / 片段 ;筛选表达人 M2 抗体的动物 ;选择产生人 M2 抗体的动物 ;从产生人 M2 抗体的动物分离抗体 ;并且确定所述人 M2 抗体是否与 M2 结合。在另一种实施方案中，一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物（例如，小鼠）施用 M2 或它的免疫原性亚序列 / 片段 ;从产生人 M2 抗体的小鼠体内分离脾细胞 ;

使所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合以便产生杂交瘤；并且筛选能够表达人 M2 抗体的杂交瘤。在多个方面，M2 或它的免疫原性亚序列 / 片段包括 M2 细胞外结构域 / 胞外域，即 M2e 或由 M2e 组成。在额外的方面，M2e 包括针对人 M2 抗体的最小结合序列，它与 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1) 相同或基本相同。在另一方面，M2e 包括最小结合序列，它是 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1)。

[0131] 在另一种实施方案中，该方法包括，提供产生人 M2 抗体的动物（如非人动物）或细胞；并且从动物或细胞分离抗体。在另一种实施方案中，该方法包括，提供产生人 M2 抗体的动物（如非人动物）；从产生人 M2 抗体的动物分离脾细胞；使所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合以便产生杂交瘤；并且筛选能够表达人 M2 抗体的杂交瘤。在多个方面，所述动物或细胞表达具有杂交瘤或 CHO 细胞系 Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA，和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体的结合特异性或与所述杂交瘤或细胞系产生的抗体具有相同或基本相同的结合亲和力或抗病毒活性的抗体。在额外的方面，动物或细胞表达具有对 M2 细胞外结构域的结合特异性的抗体，所述 M2e 细胞外结构域包括与 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1) 相同或基本相同的最小结合序列。在其它方面，动物或细胞表达具有对 M2 细胞外结构域的结合特异性的抗体，所述 M2e 细胞外结构域包括最小结合序列，该最小结合序列是 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1)。在其它实施方案中，动物或细胞表达结合于以下任何序列中的最小结合序列的抗体：SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO :2)，

[0132] SLITEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO :3)，

[0133] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO :4)，

[0134] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO :5)，

[0135] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO :6)，

[0136] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :7)，

[0137] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO :8)，

[0138] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :9)，

[0139] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :10)，

[0140] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO :11)，

[0141] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :12)，

[0142] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :13)，

[0143] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :14)，

[0144] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :15)，

[0145] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :16)，

[0146] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :17)，

[0147] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO :18)，

[0148] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :19)，

[0149] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO :20)，

[0150] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO :21)，

[0151] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO :22)，

[0152] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0153] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0154] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25)和SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。

附图说明

[0155] 图1显示可溶性M2多肽特异性抑制抗体no.Z3G1与A/PR/8/34感染的细胞表面上的M2结合,但无关抗体BSA则并非如此。通过ELISA测量与A/PR/8/34感染的MDCK细胞结合的抗体。

[0156] 图2显示通过施用M2抗体Z3G1(100μg、30μg或10μg/小鼠)或100μg/小鼠的同种型对照抗体(HSA),保护动物免受流感病毒感染诱导的死亡的预防作用。在感染致死剂量的A/HK/1/68前1天施用Z3G1或HAS。感染后1-23天测量存活率。

[0157] 图3显示施用M2抗体Z3G1抑制受感染的动物肺中的病毒复制的预防作用。在施用亚致死剂量A/HK1/68前1天,以30μg/小鼠施用Z3G1或HAS(同种型对照)。通过在指出的时间点进行噬斑测定,测量肺病毒滴度。

[0158] 图4显示与对照抗体(HSA)相比,抗M2抗体Z3G1、L66、N547和C40G1的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。

[0159] 图5显示与对照抗体(HSA)相比,抗M2抗体Z3G1、L66、N547和C40G1的抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性。

[0160] 图6显示M2抗体Z3G1保护缺乏NK细胞的小鼠免受致死剂量的A/HK/1/68攻击。在感染致死剂量的A/HK/1/68前1天,以100μg/小鼠的剂量施用抗M2抗体Z3G1或同种型对照抗体(HSA)。在感染后1-23天观察存活率。

[0161] 图7显示M2抗体以治疗方案保护小鼠免受致死剂量的A/HK/1/68攻击。在感染致死剂量的A/HK/1/68后1天,以每只小鼠200μg、100μg或30μg的剂量给小鼠施用抗M2抗体Z3G1或以每只小鼠200μg的剂量给小鼠施用同种型对照抗体(HSA)。在感染后1-23天观察存活率。

[0162] 详细说明

[0163] 本发明至少部分基于人的、人源化的和嵌合的抗M2单克隆抗体。若干种本发明的抗体对基于不同A型流感病毒株的各种M2细胞外结构域序列具有宽的反应性。在预防性(病毒感染之前)和治疗性(病毒感染之后)小鼠流感模型中,被动转移本发明的人抗M2单克隆抗体,能保护动物免受流感A/PR/8/34的致死剂量的攻击。因此,本发明的抗体可用于治疗多种流感病毒株或分离物。另外,由于本发明的抗体是人的,在反复使用时不大可能诱导超敏性,并且更有可能较长时间地留在受试者(例如,人)体内。

[0164] 因此,根据本发明,提供了特异性结合流感M2蛋白的人的、人源化的和嵌合的抗体。在一种实施方案中,提供了特异性结合流感病毒蛋白M2细胞外结构域/胞外域,即M2e的人的、人源化的或嵌合的抗体。在一个特定方面,M2e包括氨基酸序列SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:2)、它的一部分或它的氨基酸变体(例如,氨基酸取代、插入、缺失或添加),例如SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3)。在特定方面,M2e具有选自下组的氨基酸取代:

[0165] SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3),

[0166] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO:4),

[0167] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:5),

[0168] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:6),

[0169] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:7),

[0170] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8),

[0171] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9),

[0172] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10),

[0173] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11),

[0174] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12),

[0175] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13),

[0176] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14),

[0177] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15),

[0178] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16),

[0179] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17),

[0180] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18),

[0181] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19),

[0182] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20),

[0183] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21),

[0184] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22),

[0185] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23),

[0186] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24),

[0187] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25) 和

[0188] SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。

[0189] 术语"抗体"表示能分别通过重链和轻链可变区,即 V_H 和 V_L 与其他分子(抗原)结合的蛋白。"抗体"表示任何免疫球蛋白分子,如 IgM、IgG、IgA、IgE、IgD,以及它们的任何亚类,如 IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4 等。术语"抗体"还表示免疫球蛋白分子的功能性片段,如 Fab、Fab′、$(Fab')_2$、Fv、Fd、scFv 和 sdFv,除非另有说明。

[0190] 术语"M2 抗体"或"抗-M2 抗体"表示能特异性结合流感 M2 蛋白,如 M2 细胞外结构域/胞外域,即 M2e 的抗体。特异性结合表示对存在于 M2 蛋白中的表位具有选择性。就是说,与除了 M2 以外的其它蛋白结合,以便这种结合不会明显干扰 M2 的检测,除非所述其它蛋白具有与 M2 蛋白相似或相同的表位或最小结合序列,以便由 M2 抗体识别。可以用本领域公知的分析方法区分选择性结合和非选择性结合。

[0191] 当用于修饰本发明的组分(如抗体、修饰形式、亚序列、编码它们的核酸等)时,术语"分离的"表示该组分是人工制备,并且至少部分从它们的天然存在的体内环境分离。一般地,分离的组合物基本不含天然与其正常相关的一种或多种物质,如一种或多种蛋白、核酸、脂质、碳水化合物、细胞膜。术语"分离的"不排除替代的物理形式,如多肽多聚物、翻译后修饰(如磷酸化、糖基化)或衍生化的形式。

[0192] 当不含天然典型相关的大多数或所有物质时,"分离的"组分,如抗体,也可以是

“基本纯的”。因此，基本纯的分离的抗体不包括存在于数百万种其它序列中的多肽或多核苷酸，如抗体文库中的抗体或基因组或 cDNA 文库中的核酸。“基本纯的”分子可以与一种或多种其它分子组合。因此，“基本纯的”不排除组分的组合。

[0193] 本发明的示例的 M2 抗体称作 :no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas,VA,USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas,VA,USA)。示例的重链序列和轻链序列是实施例 1 所述的氨基酸序列 (如 SEQ IDNOs :34、35 和 37)。

[0194] 在本文中，术语 " 单克隆 " 在用于限定抗体时，表示基于、获自或衍生自单一克隆，包括任何真核、原核或噬菌体克隆的抗体。因此，" 单克隆 " 抗体在本文中是结构限定的，而不是以生产它的方法定义的。在本文中，赋予产生抗体的杂交瘤或其他细胞系 (如 CHO) 的具体名称、数字或其他命名，如 no.Z3G1、N547、L66 和 C40G1，也用于表示抗体的名称。

[0195] 术语 " 人的 " 在用于限定抗体时，表示所述抗体的氨基酸序列完全是人的。因此，" 人的 M2 抗体 " 或 " 人的抗 -M2 抗体 " 表示具有人的免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，即，特异性地结合 M2 的人重链和轻链可变区和恒定区。就是说，所述抗体的所有氨基酸都是人的或存在于人的抗体中。因此，例如，可以通过用存在于人抗体中的氨基酸残基取代非人氨基酸残基，使非人抗体成为全人抗体。存在于人的抗体中的氨基酸残基、CDR 区图谱和人抗体共有残基为本领域所公知 (参见，例如，Kabat，Sequences of Proteins of Immunological Interest,4th Ed.,U.S.Department ofHealth and Human Services. PublicHealth Service(1987) ;和 Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.186 :651(1987)。在以下文献中披露了基于对 22 种已知的人 V_H III 序列的测定的人 V_H 亚基 III 的共有序列，和基于对 30 种已知的人 κ I 序列的测定的人 V_L κ 链亚基 I 的共有序列 :Padlan Mol.Immunol.31 :169(1994) ;和 Padlan Mol.Immunol.28 :489(1991)。

[0196] 术语 " 人源化的 " 在用于限定抗体时，表示所述抗体的氨基酸序列在一个或多个决定区 (CDRs) 中具有非人氨基酸残基 (例如，小鼠、大鼠、山羊、兔，等)，它能特异性地结合受体人免疫球蛋白分子中的需要的抗原 (例如，M2)，以及 Fv 构架区 (FR) 中的一个或多个人氨基酸残基，它们是 CDRs 侧翼的氨基酸残基。所述免疫球蛋白的人构架区残基可以用相应的非人残基取代。因此，例如，所述人构架区中的残基可以用来自非人 CDR 供体抗体中的相应残基取代，以便改变，通常是改进抗原亲和力或特异性。另外，人源化的抗体可以包括既不存在于人的抗体中，又不存在于所述供体 CDR 或构架序列中的残基。例如，在人抗体或供体非人抗体中不存在的特定位置上进行的构架取代，预计能够改善人抗体在所述位置上的结合亲和力或特异性。基于分子模拟的抗体构架和 CDR 取代为本领域所熟知，例如，通过模拟 CDR 和构架残基之间的相互作用，鉴定对抗原结合和序列比较重要的构架残基，从而鉴定位于特定位置上的非常见构架残基 (参见，例如，美国专利 No.5,585,089 ;和 Riechmann et al.,Nature332 :323(1988))。在本领域被称作 " 灵长动物化的 " 抗体包括在本文中的 " 人源化 " 的含义内，所不同的是，除了任何人残基之外，所述受体人免疫球蛋白分子和构架区氨基酸残基可以是任何灵长动物氨基酸残基 (如类人猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、短尾猿)。

[0197] 在本文中，术语 " 嵌合的 " 以及它的语法变化形式，在用于限定抗体时，表示所述

抗体的氨基酸序列包括衍生自、获自或分离自，或基于两种或两种以上不同物种的一个或多个部分。就是说，例如，抗体的一部分可以是人的（例如，恒定区）而所述抗体的另一部分是非人的（例如，鼠重链或轻链可变区）。因此，嵌合抗体是这样的分子，其中，抗体的不同部分源于不同物种。与人源化抗体不同，嵌合抗体可以在所述抗体的任何部分具有不同的物种序列。

[0198] 在本文中，术语 " M2 " 、" M2 蛋白 " 、" M2 序列 " 和 " M2 结构域 " 表示 M2 蛋白序列（例如，诸如所述细胞外结构域的亚序列）的全部或一部分，它分离于、基于或存在于任何天然存在的或人工产生的流感病毒株或分离物中。因此，术语 M2 等，包括在病毒生命周期中通过突变产生的，或反应于选择压力（例如，药物治疗、宿主细胞亲嗜性或传染性扩增等）产生的天然存在的 M2 序列变体，以及重组或合成产生的 M2 序列。M2e 用于表示 M2 序列的细胞外部分或“胞外域”。

[0199] 术语“M2 肽”表示全长 M2 蛋白的细胞外氨基酸序列或胞外域，即 M2e。一种示例的 M2e 由序列 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO :2) 组成。其它示例的 M2e 序列由以下序列组成 :

[0200] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO :4),

[0201] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO :5),

[0202] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO :6),

[0203] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :7),

[0204] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO :8),

[0205] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :9),

[0206] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :10),

[0207] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO :11),

[0208] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :12),

[0209] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :13),

[0210] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :14),

[0211] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :15),

[0212] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :16),

[0213] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :17),

[0214] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO :18),

[0215] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO :19),

[0216] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO :20),

[0217] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO :21),

[0218] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO :22),

[0219] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO :23),

[0220] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO :24),

[0221] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO :25) 和 SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO :26)。

[0222] 本发明的 M2 抗体包括具有 K 或 λ 轻链序列的抗体（这两个轻链序列都是天然存在抗体中的全长）、其混合物（即，K 和 λ 链序列的融合体），及其亚序列 / 片段，正如下文

详细披露的。天然存在的抗体分子包括两个 K 和两个 λ 轻链。K 和 λ 轻链之间的主要差别在于恒定区的序列。

[0223] 本发明的 M2 抗体可以属于任何抗体类或亚类。IgG 的示例的亚类是 IgG_1、IgG_2、IgG_3 和 IgG_4。本发明的抗体包括具有抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体介导的细胞毒性 (CDC) 活性这两者中的任意一种或两者活性，其预期可以用于 A 型流感的有效治疗或预防性处理（即杀死 A 型流感病毒感染的细胞或 A 型流感病毒）。IgG 亚类 IgG_1 的示例的 M2 抗体 (Z3G1，ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 表现出 ADCC 和 CDC 活性（参见例如实施例 5）。

[0224] 本发明的 M2 抗体包括具有本文所举例的 M2 抗体的结合特异性，例如，具有以下抗体的结合特异性的抗体 ：no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA5968 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。一方面，M2 抗体具有如下任一抗体所示的重 (H) 或轻 (L) 链序列，或其亚序列 ：nos. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 或 Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)，其前提是所述抗体的重链或轻链序列，或亚序列具有以下抗体的结合特异性 no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 或 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。

[0225] 术语 " 结合特异性 "，在用于限定抗体时表示所述抗体能特异性地结合与参照抗体相同的抗原表位的全部或一部分。因此，具有被称为 Z3G1 的抗体的结合特异性的 M2 抗体，能特异性地结合与被称为 Z3G1 的抗体结合的相同表位的全部或一部分。因此，提供了与细胞系（如杂交瘤或 CHO 细胞系）no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体结合相同的表位或相同表位的一部分的抗体。

[0226] 抗原表位的一部分表示所述表位的亚序列或一部分。例如，如果表位包括 8 个连续氨基酸，因此，表位的亚序列和一部分可能是这 8 个氨基酸序列表位上的 7 个或更少的氨基酸。另外，如果表位包括不连续的氨基酸序列，如彼此不连续的 5 个氨基酸的序列和 8 个氨基酸的序列，但是，由于蛋白折叠能够形成表位，那么表位的亚序列以及它的一部分，可以是单独的那 5 个氨基酸序列或那 8 个氨基酸序列。

[0227] 与本文例举的 M2 抗体具有相同或基本相同的结合特异性的抗体，能竞争以下抗体的结合 ：no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。具有本文所例举的 M2 抗体的结合特异性的本发明的抗体可以通过本领域公知的任何方法表征，以便测定竞争结合，例如，本文所披露的免疫测定。由于所述抗体的结合亲和力可能与作为例举的抗体不同（即具有更高或更低的亲和力），所述抗体会改变它们竞争结合 M2 的能力。所述具有更高或更低亲和力的的抗体可能与例举的抗体具有相同或基本相同的结合特异性。在特定实施方案中，所述

抗体能竞争性抑制至少 95%，至少 90%，至少 85%，至少 80%，至少 75%，至少 70%，至少 65%，至少 60%，至少 55%，至少 50%，至少 45%，至少 40%，至少 35%，或至少 30%，或更低的结合。

[0228] 在特定实施方案中，与细胞系（例如杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体具有相同结合特异性的抗体结合于细胞系（例如杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体所结合的 M2 变体序列中的至少一种。在其它特定实施方案中，与细胞系（例如杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体具有基本相同的结合特异性的抗体结合于或弱结合于细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体所结合的 M2 变体序列中的至少 5-10、10-15、15-20、20-25 或更多种序列。在另一个特定实施方案中，与细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体具有基本相同的结合特异性的抗体结合于或弱结合于细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968；2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 产生的抗体所结合的 M2 变体序列中的至少 10-15、15-20、20-25 或更多种序列，但是不结合于或仅仅弱结合于抗 M2 抗体 L66、N547、C40G1 或 14C2 所结合的 M2 序列。

[0229] 表位通常是短的氨基酸序列，例如，长度大约为 5-15 个氨基酸。可以通过例如实施例 3 的方法鉴定表位。鉴定表位的系统技术也是本领域所公知的，并且披露于例如，美国专利 No.4,708,871。简单地讲，可以合成源于 M2 抗原的一系列重叠的寡肽（例如 M2e），并且结合在针的固相阵列上，在每个针上有一种独特的寡肽。所述针的阵列可以包括 96- 孔微量滴定板，使得人们可以同时分析所有 96 种寡肽，例如，用于结合抗 M2 单克隆抗体。另外，噬菌体展示肽文库试剂盒 (New England BioLabs) 现在商购，用于表位作图。采用上述方法，可以确定连续氨基酸的每一种可能的亚型的结合亲和力，以便鉴定特定抗体结合的表位。当表位长度肽序列被用于免疫获得了与所述肽序列结合的抗体的动物时，还可以通过推断鉴定表位。也可以用本领域公知的计算机程序例如 BEPITOPE 预测连续表位 (Odorico 等，J.Mol.Recognit.16：20(2003))。

[0230] 针对 Z3G1 的 M2e 的示例表位在氨基酸序列 LLTEVETPIR(SEQID NO：1) 中。针对

Z3G1 的示例表位也在以下氨基酸序列中：

[0231] SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD(SEQ ID NO:3)，

[0232] SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD(SEQ ID NO:4)，

[0233] SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:5)，

[0234] SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:6)，

[0235] SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:7)，

[0236] SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD(SEQ ID NO:8)，

[0237] SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:9)，

[0238] SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:10)，

[0239] SLLTEVETPIRSEWGCRYNDSSD(SEQ ID NO:11)，

[0240] SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:12)，

[0241] SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:13)，

[0242] SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:14)，

[0243] SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:15)，

[0244] SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:16)，

[0245] SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:17)，

[0246] SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD(SEQ ID NO:18)，

[0247] SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD(SEQ ID NO:19)，

[0248] SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD(SEQ ID NO:20)，

[0249] SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD(SEQ ID NO:21)，

[0250] SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD(SEQ ID NO:22)，

[0251] SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD(SEQ ID NO:23)，

[0252] SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD(SEQ ID NO:24)，

[0253] SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD(SEQ ID NO:25) 和

[0254] SLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD(SEQ ID NO:26)。

[0255] 当限定 M2 肽时，本文用到的术语“最小结合序列”表示抗 M2 抗体结合 M2 肽最少需要的 M2 肽的连续氨基酸序列（如 SEQ ID NO:1)。最小结合序列是通过建立多个由 N 末端截短的 M2 肽和 C 末端截短的 M2 肽组成的肽，并且基于实施例 3 描述的方法测量抗体与这些肽的结合而确定的。因此，最小结合序列代表了抗体与肽结合最少需要的 M2 肽中的序列的 N 末端和 C 末端边界。如实施例 3 所公开的，示例的最小结合序列包括 Z3G1 的最小结合序列 LLTEVETPIR(SEQID NO:1)。

[0256] 最小结合序列 (MBS) 含有 M2 抗体的抗原互补位结合的表位的全部或部分，其足够介导抗 M2 抗体结合。表位含有最小结合序列中的介导抗体结合的 3-4 个或更多个连续或不连续的氨基酸序列。

[0257] 术语“相同的最小结合序列”表示抗体的最小结合序列与参照抗体的该序列相同。因此，与称作 Z3G1 的抗体具有相同的最小结合序列的 M2 抗体特异性结合与称作 Z3G1 的 M2 抗体所结合的最小结合序列相同的最小结合序列。术语“基本相同的最小结合序列”及其语法变化形式表示与参照抗体的最小结合序列相比，在 N 末端和 / 或 C 末端具有单个氨基酸添加或缺失的抗体的最小结合序列。因此，与称作 Z3G1 的抗体具有基本相同的最小结合

序列的 M2 抗体特异性结合相对于称作 Z3G1 的 M2 抗体的最小结合序列，在 N 末端和 / 或 C 末端具有单个氨基酸添加或缺失的最小结合序列。

[0258] 作为结合于相同或基本相同的最小结合序列的抗体的非限制性实例，Z3G1 的最小结合序列是 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1)。因此，与 Z3G1 具有相同的最小结合序列的抗体具有 LLTEVETPIR(SEQ IDNO :1) 最小结合序列。Z3G1 的基本相同的最小结合序列可以是例如 LTEVETPI(SEQ ID NO :27)，LLTEVETPI(SEQ ID NO :28)，SLLTEVETPIR(SEQ ID NO :29)，LLTEVETPIRN(SEQ ID NO :30)，LTEVETPIR(SEQ ID NO :31) 等。因此，与 Z3G1 结合基本相同的最小结合序列的抗体能够结合于例如 LTEVETPI(SEQ ID NO :27)，LLTEVETPI(SEQ ID NO :28)，SLLTEVETPIR(SEQ ID NO :29)，LLTEVETPIRN(SEQ ID NO :30)，LTEVETPIR(SEQ ID NO :31) 等的任何一个序列。因此，本发明提供了与此处例举的抗 M2 抗体 Z3G1 具有相同或基本相同的最小结合序列的抗体。

[0259] 为了获得与另一种抗 M2 抗体具有相同或基本相同的最小结合序列的抗 M2 抗体，用常规的竞争结合分析筛选竞争抗体与 M2 肽结合的抗体。按照实施例 3 的描述，选择与参照抗体具有相同或基本相同的最小结合序列的经过筛选的抗体。作为非限制性实例，对于 Z3G1，第一步，用竞争结合分析在抗 M2 抗体中筛选与 Z3G1 竞争结合 M2 肽的抗体。第二步，基于与 Z3G1 结合相同或基本相同的最小结合序列，即 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1) 最小结合序列，或基本相同的最小结合序列例如 LTEVETPI(SEQ ID NO :27)，LLTEVETPI(SEQID NO :28)，SLLTEVETPIR(SEQ ID NO :29)，LLTEVETPIRN(SEQID NO :30)，LTEVETPIR(SEQ ID NO :31) 等的能力，选择与 Z3G1 竞争结合 M2 的抗体。

[0260] 本发明的 M2 抗体还包括与本文所例举的 M2 抗体具有相同的结合亲和力和具有基本相同的结合亲和力的人的、人源化的和嵌合的抗体。例如，本发明的 M2 抗体的亲和力比参考抗体高或低 2-5、5-10、10-100、100-100 或 1000-10,000 倍，或所述范围内的任何数值或数值的范围。因此，本发明的其他实施方案提供了与以下抗体具有相同的结合亲和力和具有基本相同的结合亲和力的 M2 抗体 :no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)，前提是重链或轻链序列，或其亚序列具有以下抗体的结合特异性 :no.Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no.Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC Deposit No.PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。

[0261] 结合亲和力可以通过缔合 (K_a) 和解离 (K_d) 速度确定。平衡亲和常数 K 是 K_a/K_d 的比值。在本文中，术语 " 相同的 " 在用于限定抗体结合亲和力时，表示解离常数 (K_d) 在参考抗体的约 1-100 倍内 (比参考抗体的亲和力高或低 1-100 倍，或所述范围内的任何数值或数值的范围)。术语 " 基本相同的 " 在用于限定抗体结合亲和力时，表示解离常数 (K_d) 在参考抗体的约 5-5000 倍内 (比参考抗体的亲和力高或低 5-5000 倍)。术语 " 相同的 " 在用于限定缔合常数 (K_a) 时，表示它在参考抗体的约 1-100 倍内 (比参考抗体的缔合常数 K_a 高或低 1-100 倍)。术语 " 基本相同的 " 在用于限定缔合常数 (K_a) 时，表示它在参考抗体的缔合常数 K_a 约 5-5000 倍内 (比参考抗体的高或低 5-5000 倍)。

[0262] 当抗体具有较低亲和力时，至少部分亲和力可以是例如低 1-3 倍、1-5 倍、2-5 倍、

5-10 倍、5-15 倍、10-15 倍、15-20 倍、20-25 倍、25-30 倍、30-50 倍、50-100 倍、100-500 倍、500-1000 倍、1000-5000 倍、或更低（如 K_d），或所述范围内的任何数值或数值的范围。当抗体具有较高亲和力时，至少部分亲和力可以是例如高 1-3 倍、1-5 倍、2-5 倍、5-10 倍、5-15 倍、10-15 倍、15-20 倍、20-25 倍、25-30 倍、30-50 倍、50-100 倍、100-500 倍、500-1000 倍、1000-5000 倍、或更高（如 K_d），或所述范围内的任何数值或数值的范围。

[0263] 可以用表面等离子共振 (SPR) 测量缔合 (K_a) 和解离 (K_d) 速度 (Richand Myszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11 :54(2000) ;Englebienne, Analyst. 123 :1599(1998))。用于实时检测和监测结合速度的仪器和方法是公知的，并且可以商购 (BiaCore2000, Biacore AB, Upsala, Sweden ;and Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27 :335(1999))。此处的示例抗体的 K_d 值定义为使 A/PR/8/34 或 A/HK/1/68 感染的 MDCK 细胞表面上的 M2 抗原上的一半 (50％) 结合位点饱和的抗体浓度。

[0264] 本发明所包括的其他抗体具有抗体 no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA) 的结合特异性，和对 M2 的结合亲和力，其解离常数 (K_d) 小于 $5x10^{-2}M$、$10^{-2}M$、$5x10^{-3}M$、$10^{-3}M5x10^{-4}M$、$10^{-4}M5x10^{-5}M$、$10^{-5}M5x10^{-6}M$、$10^{-6}M5x10^{-7}M$、$10^{-7}M5x10^{-8}M$、$10^{-8}M5x10^{-9}M$、$10^{-9}M5x10^{-10}M$、$10^{-10}M5x10^{-11}M$、$10^{-11}M5x10^{-12}M$、$10^{-12}M5x10^{-13}M$、$10^{-13}M5x10^{-14}M$、$10^{-14}M5x10^{-15}M$ 和 $10^{-15}M$。本发明还包括结合于抗体 no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA) 所结合的表位的抗体。额外的抗体抑制 MDCK 细胞的 A 型流感病毒感染的 EC50 小于 2.0-3.0、1.0-2.0、0.5-1.0、0.1-0.5 或小于 0.1 μg/ml（例如 0.05-0.1 μg/ml），这是通过基于细胞的 ELISA 分析确定的。

[0265] 发明的人 M2 抗体包括具有本文所例举的 M2 抗体的一种或多种抗 - 流感活性（例如，抑制流感病毒在体外或体内对细胞的感染，抑制流感病毒增殖或复制，减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症，减弱对流感病毒感染的易感性，加速从流感病毒感染恢复）的至少一部分的抗体。因此，本发明的其他实施方案提供了具有以下抗体的一种或多种抗流感病毒活性的至少一部分的 M2 抗体 :no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA) 或 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

[0266] 术语 " 活性 " 在用于比较抗体和参照抗体时，表示所述抗体至少具有参照抗体的一部分活性，例如，结合亲和力（如 K_d）、结合特异性或抗流感活性。因此，具有被称为 Z3G1 的 M2 抗体的活性的抗体具有被称为 Z3G1 的 M2 抗体的一种或多种活性的至少一部分。术语 " 至少一部分 " 表示所述抗体具有较弱的活性，但是，所述抗体至少保留了参照 M2 抗体的可测量或可检测量的活性，例如，对 M2 的至少部分结合亲和力、至少部分抗流感病毒活性等。具有此处例举的 M2 抗体的一种或多种活性的至少一部分的本发明的人 M2 抗体可能也具有比参照抗体，如此处例举的 M2 抗体高的活性。

[0267] 具有举例说明的人 M2 抗体活性的抗体可以通过此处公开的或本领域公知的多种方法鉴定。例如，用平板结合的 M2 肽作为包被抗原的结合测定 (ELISA)，对病毒感染的 MDCK

细胞上的M2蛋白的结合测定（基于细胞的ELISA），以及通过M2肽特异性抑制抗体与病毒感染的MDCK细胞上的M2的结合（M2e）。其他测定包括流感病毒的体外细胞感染性测定（Zebedee等J Virology62:2762(1988)）以及体内动物测定，如在实施例1,3和4中所披露的。

[0268] 在本文中披露了人多克隆和单克隆抗体生产方法，并且为本领域所熟知。例如，正如本文所披露的，将与KLH或BSA偶联的M2肽和M2SG肽用于对人转染色体KM小鼠™(WO02/43478)或HAC小鼠(WO02/092812)进行免疫。KM™小鼠或HAC小鼠表达人免疫球蛋白基因。采用常规杂交瘤技术，分离了来自对M2抗原高反应的免疫过的小鼠的脾细胞，并且与骨髓瘤细胞融合。获得了称作Z3G1的单克隆抗体，它与M2肽和/或M2-BSA偶联物反应，但是不能结合BSA或KLH载体。在以下文献中披露了用于生产人抗体的技术的综述:Lonberg and Huszar(Int.Rev.Immunol.13:65(1995))。披露了不能表达内源免疫球蛋白的具有一个或多个人免疫球蛋白基因（κ或λ）的转基因动物，例如，参见美国专利No.5,939,598。披露了用于生产人抗体和人单克隆抗体的其他方法（参见，例如，WO98/24893;WO92/01047;WO96/34096;WO96/33735;美国专利Nos.5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;和5,939,598）。

[0269] 还可以用其他技术方便地制备M2单克隆抗体，这些技术包括杂交瘤，重组，噬菌体展示技术，或它们的组合（参见美国专利Nos.4,902,614,4,543,439和4,411,993;还可参见Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,Kennett,McKearn,and Bechtol(eds.),1980,和Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor LaboratoryPress,2nd ed.1988)。还可以在所述方法中使用的合适技术包括M2亲和纯化、非变性凝胶纯化、HPLC或RP-HPLC、在蛋白A柱上纯化，或这些技术的任意组合。抗体同种型可以通过ELISA测定而确定，例如，可以用小鼠Ig-吸附的抗-人Ig鉴定人Ig。

[0270] 可以通过本领域已知的多种技术将抗体人源化，例如，CDR-嫁接(EP239,400;WO91/09967;美国专利Nos.5,225,539;5,530,101;和5,585,089)、镶面或再涂层(EP592,106;EP519,596;Padlan,Molecular Immunol.28:489(1991);Studnicka等,Protein Engineering7:805(1994);Roguska.等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA91:969(1994))；和链改组（美国专利No.5,565,332)。人的共有序列(Padlan Mol.Immunol.31:169(1994);和Padlan Mol.Immunol.28:489(1991))以前业已被用于将抗体人源化(Carter等Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:4285(1992);和Presta等J.Immunol.151:2623(1993))。

[0271] 用于生产嵌合抗体的方法为本领域所公知（例如，Morrison,Science229:1202(1985);Oi等,BioTechniques4:214(1986);Gillies等,(1989)J.Immunol.Methods125:191;和美国专利Nos.5,807,715;4,816,567;和4,816,397)。在以下文献中披露了这样的嵌合抗体，其中，来自一个物种的抗体的可变区被来自另一个物种的抗体的可变区所取代，例如，参见Munro,Nature312:597(1984);Neuberger等,Nature312:604(1984);Sharon等,Nature309:364(1984);Morrison等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA81:6851(1984);Boulianne等,Nature312:643(1984);Capon等,Nature337:

525(1989);和 Traunecker 等,Nature339:68(1989)。

[0272] 适合制备抗体的 M2 蛋白可以通过本领域已知的多种标准蛋白纯化或重组表达技术中的任意一种生产。例如,M2 可以通过标准肽合成技术生产,如固相合成。所述蛋白的一部分可以包括氨基酸序列,如 T7 标记或聚组氨酸序列,以便有利于表达或合成的 M2 的纯化。M2 可以在细胞中表达,并且可以纯化由所述细胞产生的蛋白。M2 蛋白可以作为较大蛋白的一部分,通过重组方法表达。

[0273] 适合产生免疫应答的 M2 的形式包括全长 M2 的肽亚序列,如 M2(例如,长度通常为 4-5 个氨基酸或更多)。其他形式的 M2 包括含有制剂或提取物的 M2、部分纯化的 M2 以及能表达 M2 的细胞或病毒,或所述表达细胞或病毒的制剂。

[0274] 可以免疫的动物包括小鼠、兔、大鼠、绵羊、母牛或公牛、山羊、或豚鼠;这些动物可以进行遗传学修饰,以便包括人 IgG 基因座。因此,这些动物可以用于根据本发明生产抗体。另外,为了增强免疫应答,可以将 M2 与另一种蛋白偶联,如卵白蛋白或匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白和破伤风类毒素,或与诸如弗氏完全或不完全佐剂的佐剂混合。最初的以及任何随后任选的免疫可以通过腹膜内、肌内、眼内、或皮下途径施用。随后的免疫可以与 M2 抗原制剂的浓度相同或不同,并且能够以规则的或不规则的间隔进行。

[0275] 因此,在另一种实施方案中,本发明提供了生产人 M2 抗体,包括具有一种或多种抗流感活性的抗体的方法,所述活性如抑制流感病毒感染、复制、增殖或滴度,或抑制病毒复制的增强、增殖或滴度,或减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性、或对感染的易感性,或具有抗各种流感病毒株或分离物的宽的反应性。在一种实施方案中,一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物(例如,小鼠、母牛或公牛)施用 M2 或它的免疫原性片段;筛选表达人 M2 抗体的动物;选择产生人 M2 抗体的动物;从产生人 M2 抗体的动物分离抗体;并且确定所述人 M2 抗体是否与 M2 结合。在另一种实施方案中,一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物(例如,小鼠、母牛或公牛)施用 M2 或它的免疫原性片段;从产生人 M2 抗体的小鼠分离脾细胞;使所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合以便产生杂交瘤;并且筛选能够表达具有抗流感活性的人 M2 抗体的杂交瘤。

[0276] 本发明还提供了修饰的人 M2 抗体。修饰的例子包括所述抗体的一个或多个氨基酸取代、添加或缺失,其前提是所述修饰的抗体具有未修饰过的 M2 抗体的全部或至少一部分活性,例如,结合亲和力、特异性或抗流感活性。

[0277] 修饰的一种特殊例子是将本发明的抗体改变为具有不同的同种型或亚类,例如,通过取代重链恒定区(参见,例如,实施例 2)。将 M2 抗体 Z3 的 Ig 亚类从 IgG3 改变成 IgG1,导致了抗流感活性的提高。因此,修饰包括从本发明的抗体上缺失小和大区域的氨基酸序列,以及用另一种氨基酸序列取代缺失的区域,无论所述序列的长度比缺失的区域长还是短。

[0278] 本发明包括的其他 M2 抗体的修饰是抗体衍生物,即,任何类型的分子与抗体的共价连接。抗体衍生物的具体例子包括糖基化的、乙酰化的、磷酸化的、酰胺化的、甲酰化的、遍在蛋白化的抗体,以及通过保护/封闭基团进行的衍生化和多种化学修饰中的任意一种。

[0279] 氨基酸取代可以用相同氨基酸进行,所不同的是,天然存在的 L- 氨基酸被 D- 型氨基酸取代。因此,修饰包括用一个或多个 D- 氨基酸取代 L- 氨基酸,或用 D- 氨基酸的混合

物取代 L- 氨基酸。修饰进一步包括结构和功能类似物，例如，具有合成或非天然氨基酸或氨基酸类似物和衍生化形式的肽模拟物。

[0280] 修饰包括环状结构，如分子的氨基和羧基末端之间的末端与末端的酰胺键，或分子内或分子间二硫键。可以在体外或体内修饰多肽，例如，进行翻译后修饰，以包括例如糖残基、磷酸基团、遍在蛋白、脂肪酸、脂质等。

[0281] 修饰包括参照组分的活性或功能（例如与 M2 的特异性结合）。可以用本领域公知的方法生产具有改变的特征，如增加的结合特异性的修饰抗体。例如，可以用亲和力成熟技术改进抗体结合亲和力 (US2004/0162413A1 ；美国专利 Nos. 6,656,467、6,531,580、6,590,079 和 5,955,358 ；Fiedler 等，Protein Eng. 15 ：931(2002) ；Pancook 等，Hybrid. Hybridomics20 ：383(2001) ；Daugherty 等，Protein Eng. 11 ：825(1998) ；Wu 等，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA95 ：6037(1998) ；和 Osbourn 等，Immunotechnology2 ：181(1996))。

[0282] 修饰的蛋白可以具有氨基酸取代、添加或缺失（如 1-3、3-5、5-10 或更多残基）。在特定的非限制性实例中，取代是保守性氨基酸取代。

[0283] 氨基酸取代可以是保守性的或非保守性的，并且可能位于所述抗体的恒定区或可变区。在恒定区或可变区的一个或几个保守性氨基酸取代可能是能够耐受的。在超变区发生的多个氨基酸的非保守性取代有可能影响结合活性、特异性或抗体功能或活性。

[0284] 区域突变能力分析可以用于预测 CDR 和 FR 结构域中的特定取代的作用 (Shapiro 等，J Immunol. 163 ：259(1999))。简言之，序列比较表明位于 Ig 内含子 DNA 内的二核苷酸和三核苷酸序列之间的突变能力的等级，这预测了更容易突变或不容易突变的区域。可以用定量结构 - 活性关系 (QSAR) 鉴定抗体识别结构域的性质，因此，可以鉴定参与配体结合的氨基酸。随后可以用基于 QSAR 的预测模型预测突变的作用。例如，已经采用突变对与抗原相互作用的抗体的缔合和解离速度的作用构建两种动力学 (K_a 和 K_d) 常数的定量预测模型，随后可用此模型预测其它突变对抗体的作用 (De Genst 等，J Biol. Chem. 277 ：29897(2002))。

[0285] 可以测定取代的作用，从而鉴定保留了未取代的抗体的至少一部分结合活性、特异性或抗体功能或活性的抗体。例如，可以测定高变区中的氨基酸取代的结合活性或特异性，或抗流感活性。包括了所述具有氨基酸取代的所述抗体，前提是取代的抗体保留参照抗体（如未修饰的人 M2 抗体）的至少一部分结合亲和力、结合特异性或抗流感活性。

[0286] “保守取代”表示用生物学、化学或结构相似的残基代替一个氨基酸。生物学相似表示该取代与生物活性相容，如特异性结合 M2。结构相似表示氨基酸的侧链具有相似长度，如丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸，或相似大小。化学相似性表示残基具有相同的电荷或都是亲水性或疏水性的。特定的非限制性实例包括用一个疏水性残基，例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个氨基酸，或用一个极性残基取代另一个残基，如用精氨酸取代赖氨酸、用谷氨酸取代天冬氨酸，或用谷氨酰胺取代天冬酰胺、用丝氨酸取代苏氨酸等。

[0287] 修饰的抗体包括与称作 no. Z3G1 的单克隆抗体的序列具有 50-100％、or50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或更高同一性的氨基酸序列。同一性可以在蛋白的一个确定范围（区域或结构域）。

[0288] 术语“同一性”及其语法变化形式表示两种或多种提到的实体是相同的。因此，当两种抗体序列相同时，它们具有相同的氨基酸序列。“具有同一性的范围、区域或结构域”表

示两个或多个提到的实体的一部分是相同的。因此，当两个抗体序列在一个或多个序列区域相同时，它们在这些区域具有同一性。术语“显著同一性”表示同一性是结构或功能上显著的。也就是说，同一性使分子在结构上相同或具有至少一种相同功能（例如与 M2 特异性结合），即使分子是不同的。

[0289] 由于结构和功能相关的蛋白之间的序列保守量的不同，显著同一性的序列同一性的量依赖于蛋白、区域和该区域的功能。尽管具有显著同一性的蛋白可能具有低至 30％的序列同一性，一般地，应该与参照序列具有更多同一性，例如 50％、60％、75％、85％、90％、95％、96％、97％、98％同一性。对于核酸序列，50％或更多的序列同一性典型地构成了显著同一性，但仍然依赖于比较区及其功能（如果有）而改变。

[0290] 可以用本领域公知的计算机程序和数学算法确定两个序列之间的同一性程度。所述计算序列同一性（同源性）百分比的算法通常考虑比较区中的序列空位和错配。例如，BLAST（如 BLAST2.0）检索算法（参见例如，Altschul 等，J.Mol.Biol.215 :403(1990)，公众可以从 NCBI 得到）具有以下示例的参数 :错配 -2 ;空位开放 5 ;空位延伸 2。对于多肽序列比较，通常将 BLASTP 算法与评分矩阵，如 PAM100、PAM250、BLOSUM62 或 BLOSUM50 组合使用。也将 FASTA（如 FASTA2 和 FASTA3）和 SSEARCH 序列比较程序用于对同一性程度进行定量 (Pearson 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA85 :2444(1988) ;Pearson，Methods Mol Biol.132 :185(2000) ;和 Smith 等，J.Mol.Biol.147 :195(1981))。也开发了用基于 Delaunay 的拓扑学作图对蛋白结构相似性进行定量的程序 (Bostick 等，Biochem BiophysRes Commun.304 :320(2003))。

[0291] 本发明的人单克隆 M2 抗体包括本文所披露的亚序列（例如，片段）和修饰形式（例如，序列变体）。在特定实施方案中，人 M2 抗体亚序列包括 Fab、Fab′ 和 F(ab′)2、Fd、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和 V_L 或 V_H 结构域片段。在特定方面，Fab、Fab′ 和 F(ab′)2、Fd、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和 V_L 或 V_H 结构域亚序列具有相同的结合亲和力、基本相同的结合亲和力、相同的结合特异性，或一种或多种抗流感活性，例如，与参照 M2 抗体（例如，全长的或未修饰的 M2 抗体）相同的体外或体内抑制流感病毒感染细胞的效力。可以组合各个 M2 结合抗体。例如，可以通过接头序列将 V_L 或 V_H 亚序列的组合连接起来，从而形成 V_L-V_H 嵌合体。可以通过接头序列将单链 Fvs(scFv) 亚序列的组合连接起来，从而形成 scFv-scFv 嵌合体。包括单链抗体在内的 M2 结合抗体亚序列，包括单独的可变区或可变区与其它亚序列的全部或部分组合，以及，可变区与以下一个或多个成分的组合 :铰链区、CH1、CH2 和 CH3 结构域。还包括可变区与铰链区、CH1、CH2 和 CH3 结构域的任意组合的抗原结合亚序列。

[0292] 本发明的 M2 抗体亚序列（例如，Fab、Fab′ 、F(ab′)2、Fd、scFv、sdFv 和 V_L 或 V_H）可以通过抗体的蛋白水解制备，例如，通过用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整的抗体。术语 " 功能性亚序列 " 和 " 功能性片段 " 在用于限定本发明的抗体时，表示保留了完整参照抗体的一种或多种功能或活性的至少一部分的抗体的一部分。

[0293] 抗体片段可以是通过用胃蛋白酶酶促切割产生的，提供被称为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段。该片段可以用硫醇还原剂进一步切割，以便产生 3.5S 的 Fab′ 单价片段。另外，用胃蛋白酶进行的酶促切割，直接产生了两种单价 Fab′ 片段和 Fc 片段（参见，例如，Goldenberg，美国专利号 4,036,945 和 4,331,647 ；以及 Edelman 等 Methods inEnymology1 :

422(1967))。还可以使用切割抗体的其他方法,如分离重链,以便形成单价轻-重链片段、进一步切割片段,或其他酶促或化学方法。遗传学技术包括在诸如 Cos 细胞或大肠杆菌的宿主细胞中表达 M2 抗体的全部或一部分。所述重组宿主细胞能合成完整的或单链抗体,如 scFv(参见,例如,Whitlow 等,In :Methods :A Companionto Methods in Enzymology2 :97(1991),Bird 等,Science242 :423(1988) ;和美国专利号 4,946,778)。单链 Fvs 和抗体可以按照披露于以下文献中的方法生产 :美国专利号 4,946,778 和 5,258,498 ;Huston 等,Methods Enzymol.203 :46(1991) ;Shu 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90 :7995(1993) ; 和 Skerra 等,Science240 :1038(1988)。

[0294] 包括在本发明中的 M2 抗体的其它修饰是抗体添加 / 插入。例如,添加可以是将任何类型的分子共价或非共价结合到抗体上。抗体添加的特定实例包括糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、甲酰化、遍在蛋白化和通过保护 / 封闭基团衍生化,以及多种化学修饰中的任意一种。

[0295] 添加进一步包括融合(嵌合)多肽序列,其是共价连接于序列的、具有正常情况下不存在于参照天然(野生型)序列中的一个或多个分子的氨基酸序列。特定实例是另一种抗体的氨基酸序列,以产生多特异性抗体。

[0296] 具有氨基酸添加的修饰的 M2 抗体另外一个具体例子是这样的抗体,其中,连接了第二个异源序列,即,异源功能性结构域,它能够赋予抗体上的独特的或补充的功能。例如,氨基酸标记如 T7 或聚组氨酸可以与 M2 抗体连接,以便有利于 M2 或流感病毒的纯化或检测。另一个例子是与 M2 抗体连接的抗病毒剂,以便靶定受到流感病毒感染的细胞,实现病毒杀伤、增殖抑制、复制抑制等。因此,在其他实施方案中,本发明提供了 M2 抗体和异源结构域,其中,所述结构域能够赋予独特功能,即,抗体上的异源功能性结构域。

[0297] 异源功能性结构域不局限于氨基酸残基。因此,异源功能性结构域可以由多种不同类型的小的或大的功能性部分的任何一个组成。所述部分包括核酸、肽、碳水化合物、脂质或小的有机化合物,如药物(例如,抗病毒剂)、金属(金、银)等。

[0298] 可以将接头序列插在抗体序列和异源功能性结构域之间,以便这两个实体至少能部分保持独特的功能或活性。接头序列可具有一种或多种特性,包括柔性构象,不能形成有序的二级结构或疏水性或带电荷的特征,这些特征能够促进任意结构域或与任意结构域相互作用。通常出现在柔性蛋白区的氨基酸包括 Gly、Asn 和 Ser。其他接近中性的氨基酸,如 Thr 和 Ala,也可用于接头序列。接头序列的长度可以改变,而不明显影响融合蛋白的功能或活性(参见,例如,美国专利 No.6,087,329)。接头进一步包括化学部分和偶联剂,如硫代-琥珀酰衍生物(硫代 -SMCC、硫代 -SMPB)、辛二酸二琥珀酰酯 (DSS)、戊二酸二琥珀酰酯 (DSG) 和酒石酸二琥珀酰酯 (DST)。

[0299] 异源功能性结构域的其他例子是可检测的标记。因此,在另一种实施方案中,本发明提供了可检测标记的人 M2 抗体。

[0300] 可检测标记的具体例子包括荧光团、生色团、放射性同位素(例如,S^{35}、p^{32}、I^{125}),电子密集试剂、酶、配体和受体。酶通常是通过其活性检测的。例如,辣根过氧化物酶通常是通过其将诸如 3,3′ -,5,5′ -四甲基联苯胺 (TMB) 的底物转化成蓝色色素的能力检测的,可以对所述色素进行定量。配体可以结合其他分子,如生物素,它能够结合亲和素或链亲和素,以及 IgG,它们能够结合蛋白 A。

[0301] 可以理解的是 M2 抗体可能具有两种或两种以上变异、修饰或标记。例如，单克隆抗体可以与生物素偶联，以便通过亲和素检测它的存在，以及用 I^{125} 标记，以便提供可检测信号。本领域普通技术人员能够方便地理解其他改变和可能性，并且被视为属于本发明的范围。

[0302] 本发明还提供了编码本发明的人 M2 抗体的核酸，包括修饰的形式、亚序列 / 片段、嵌合体等。在特定实施方案中，核酸编码如下的完整或单链 M2 抗体 :no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC Deposit No. PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。在额外实施方案中，核酸编码如实施例 1 所述的完整或单链抗体 (SEQ ID NOs :34、35 和 37)。

[0303] 术语 " 核酸 " 或 " 多核苷酸 " 可互换用于表示所有形式的核酸，包括脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。所述核酸可以是双链、单链或三链，线性或环状的。核酸包括基因组 DNA、cDNA 或反义核酸。RNA 核酸可以是剪接过的或未剪接过的 mRNA、rRNA、tRNA 或反义的。本发明的核酸包括天然存在的、合成的核酸以及核苷酸类似物和衍生物。例如，所述改变的或修饰的多核苷酸包括能提供核酸酶抗性的类似物。

[0304] 核酸可以具有任意长度。例如，no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 或 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 的亚序列，其编码具有一种或多种抗流感活性的蛋白。在一种具体实施方案中，核酸包括实施例 1 所示出的重链序列和轻链序列 (SEQ IDNOs :32、33 和 36)。在另一种实施方案中，核酸编码实施例 1 所示出的重链序列和轻链序列 (SEQ ID NOs :34、35 和 37)。

[0305] 由于遗传密码的简并性，核酸包括针对编码以下抗体的序列而进行了简并的序列 :(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 和 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)、其亚序列，和本文所阐述的修饰的形式。

[0306] 核酸可以是通过多种众所周知的标准克隆和化学合成方法生产的，并且可以通过本领域技术人员所公知的定点诱变或其他重组技术有意地加以改变。多核苷酸的纯度可以通过测序、凝胶电泳等确定。

[0307] 可以将本发明的核酸插入核酸构建体，其中，核酸的表达是受 " 表达控制元件 " 影响或调节的，在这里该元件被称为 " 表达盒 "。术语 " 表达控制元件 " 表示一个或多个核酸序列元件，其调节或影响可操作地与其连接的核酸序列的表达。如果合适，表达控制元件可以包括启动子、增强子、转录终止子、基因沉默子、位于蛋白编码基因前面的起始密码子 (例如，ATG) 等。

[0308] 可操作地连接在核酸序列上的表达控制元件能够控制转录，并且，如果合适，能够控制核酸序列的翻译。术语 " 可操作地连接 " 表示并列，其中，有关成分的关系使得它们能够以预期的方式起作用。典型的表达控制元件是在所述基因的 5′ 或 3′ 末端并列的，不过，还可以是内含的。

[0309] 表达控制元件包括能够组成型地激活转录的元件，它是诱导型的 (即，需要外部信号激活)，或解除阻抑的 (即，需要信号结束转录 ；当所述信号不再存在时，转录被激活

或"解除阻抑")。本发明的表达盒中还包括足以将基因表达控制在特定细胞类型或组织的控制元件(即,组织特异性控制元件)。通常,所述元件位于编码序列的上游或下游(即,5′和3′)。启动子通常位于编码序列的5′末端。通过重组DNA或合成技术生产的启动子,可用于提供本发明多核苷酸的转录。"启动子"表示足以指导转录的最小序列元件。

[0310] 可以将本发明的核酸插入质粒,用于在宿主细胞中繁殖,并且,如果需要,用于随后的遗传学操作。质粒是能够在宿主细胞中稳定繁殖的核酸,质粒可任选包括表达控制元件,以便驱动编码M2抗体的核酸在宿主中表达。本文所用的载体与质粒是同义词,并且还可以包括用于在宿主细胞中表达的表达控制元件。质粒和载体通常包括至少一个用于在细胞中繁殖的复制起点和启动子。因此,质粒和载体可用于M2抗体编码核酸的遗传学操作,例如,生产M2抗体或反义形式,以及在宿主细胞或生物体中表达M2抗体。

[0311] 编码抗体重链和轻链的可变区,或编码全长的抗体重链和轻链的核酸可以是从杂交瘤中分离的。可以将分离的核酸插入合适的表达载体,并且导入合适的宿主细胞,如酵母或CHO细胞,它们可以进行培养以便生产重组M2抗体。

[0312] 细菌系统启动子包括T7和诱导型启动子,如噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂交启动子)和四环素反应性启动子。昆虫细胞系统启动子包括组成型或诱导型启动子(例如,蜕皮激素)。哺乳动物细胞组成型启动子包括SV40、RSV、牛乳头瘤病毒(BPV)和其他病毒启动子,或源于哺乳动物细胞基因组(例如,金属硫蛋白IIA启动子;热激启动子)或源于哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;诱导型小鼠乳腺瘤病毒长末端重复)的诱导型启动子。另外,逆转录病毒基因组可以是遗传学修饰过的,以便导入并且指导M2抗体在合适宿主细胞中的表达。

[0313] 表达系统还包括为了体内使用而设计的载体。具体的非限定性例子包括腺病毒载体(美国专利Nos.5,700,470和5,731,172),腺伴随病毒载体(美国专利No.5,604,090),单纯疱疹病毒载体(美国专利No.5,501,979),逆转录病毒载体(美国专利Nos.5,624,820,5,693,508和5,674,703),BPV载体(美国专利No.5,719,054)和CMV载体(美国专利No.5,561,063)。

[0314] 酵母载体包括组成型和诱导型启动子(参见,例如,Ausubel等,In:Current Protocols in Molecular Biology,Vol.2,Ch.13,ed.,GreenePublish.Assoc.&Wiley Interscience,1988;Grant等Methods inEnzymology,153:516(1987),eds.Wu & Grossman;Bitter Methodsin Enzymology,152:673(1987),eds.Berger & Kimmel,Acad.Press,N.Y.;和Strathern等,The Molecular Biology of the YeastSaccharomyces(1982)eds.Cold Spring Harbor Press,Vols.I and II)。可以使用诸如ADH或LEU2的组成型酵母启动子或诸如GAL的诱导型启动子(R.Rothstein In:DNA Cloning,A Practical Approach,Vol.11,Ch.3,ed.D.M.Glover,IRL Press,Wash.,D.C.,1986)。能够促进外源核酸序列通过诸如同源重组的方式整合到酵母染色体上的载体,为本领域所公知。当插入的多核酸对于更常见的载体来说太大时(例如,超过大约12kb),通常使用酵母人工染色体(YAC)。

[0315] 还提供了包括编码人M2抗体的核酸的宿主细胞。在一种实施方案中,所述宿主细胞是原核细胞。在另一种实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞。在多个方面,所述真核细胞是酵母或哺乳动物(例如,人,灵长类等的)细胞。

[0316] 在本文中，" 宿主细胞 " 是导入了一种核酸的细胞，所述核酸可以繁殖、转录或编码表达的 M2 抗体。该术语还包括所述宿主细胞的任何后代或亚克隆。后代细胞和亚克隆不一定与亲代细胞相同，因为在复制和增殖期间可能发生了突变。不过，这样的细胞被视为本发明的宿主细胞。

[0317] 宿主细胞包括，但不局限于微生物，如细菌和酵母；以及植物、昆虫和哺乳动物细胞。例如，用重组噬菌体核酸、质粒核酸或粘粒核酸表达载体转化的细菌；用重组酵母表达载体转化的酵母；用重组病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒 CaMV；烟草花叶病毒 TMV）感染的或用重组质粒表达载体（例如，Ti 质粒）转化的植物细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，逆转录病毒、腺病毒、牛痘病毒）感染的动物细胞系统，或为了稳定表达而工程改造的转化的动物细胞系统。

[0318] 表达载体还可以包括赋予对选择压力的抗性的选择标记或可识别标记（例如，β - 半乳糖苷酶），以便使得具有待选择的载体的细胞能够生长和扩增。另外，选择标记可以存在于第二种载体上，所述载体是与含有本发明多核苷酸的第一种载体共同转染到宿主细胞中的。

[0319] 选择系统包括但不局限于单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (Wigler 等，Cell11：223(1977))、次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (Szybalska 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA48：2026(1962))，和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy 等，Cell22：817(1980)) 基因，它们分别可应用于 tk-，hgprt- 或 aprt- 细胞。另外，可以将抗代谢物抗性用做选择 dhfr 的基础，它能够赋予对氨甲蝶呤的抗性 (O′ Hare 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA78：1527(1981))；gpt 基因，它能赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan 等，Proc.Natl.Acad.Sci USA78：2072(1981))；新霉素基因，它能赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Colberre-Garapin 等，J.Mol.Biol.150：1(1981))；嘌呤霉素；以及潮霉素基因，它能赋予对潮霉素的抗性 (Santerre 等，Gene30：147(1984))。其他选择基因包括 trpB，它使得细胞能够利用吲哚以取代色氨酸；hisD，它使得细胞能够利用组胺醇以取代组氨酸 (Hartman 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA85：8047(1988))；和 ODC（鸟氨酸脱羧酶），它能赋予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂 2-(二氟甲基)-DL- 鸟氨酸，即 DFMO 的抗性 (McConlogue(1987)In：Current Communication in MolecularBiology，Cold Spring Harbor Laboratory)。

[0320] 用于治疗受试者的流感病毒感染的方法包括给受试者施用能有效治疗受试者的流感病毒感染的量的特异性结合流感病毒 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。所述抗体可以在受试者感染之前（即预防）、基本与感染同时或在感染之后（即治疗）施用的。

[0321] 本发明的方法包括给受试者提供治疗益处，例如减轻或减弱流感病毒感染的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性，减少或抑制病毒滴度的增加、病毒复制、病毒增殖或一种或多种流感病毒株或分离物的病毒蛋白的量，或稳定状况（即预防或抑制与流感病毒感染相关的症状或并发症的恶化或感染的进展）。与流感病毒感染相关的症状或并发症（其进展、严重性、频率、持续时间或可能性可以减轻或减弱）包括，例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染或耳痛。治疗益处还可以包括减弱受试者对流感病毒感染的易感性，或加速受试者从流感病毒感染恢复。

[0322] 在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用一定量的特异性结合流感病

毒 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体，该量能够有效抑制病毒感染所述受试者，或减弱所述受试者对一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的易感性。在多个方面，所述抗体是在所述受试者感染之前（预防），或基本同时或在感染之后（治疗）施用的。所述抗体能够提供治疗益处，其中包括，例如，减轻或减弱流感病毒感染的一种或多种症状或并发症（例如，寒战、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染或耳痛）的进展、严重性、频率、持续时间、或可能性，一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的病毒滴度或病毒蛋白的量，或受试者对一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的易感性。

[0323] 因此，还提供了治疗益处，以及用于预防或抑制病毒滴度增加、病毒复制、病毒增殖或流感病毒蛋白在受试者体内的量的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效抑制受试者体内病毒滴度的增加、病毒复制或一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的流感病毒蛋白的量的特异性地结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。

[0324] 另外，还提供了用于保护受试者免受感染，减轻受试者对感染的易感性和促进或加速受试者从一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的感染恢复的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效保护所述受试者免受感染，有效减弱所述受试者对感染的易感性或促进或加速受试者从一种或多种流感病毒株 / 分离物或亚型的感染中恢复的量的特异性结合流感 M2 的人的、人源化的或嵌合的抗体。

[0325] 本发明的方法可以用具有通过以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）产生的抗体的结合特异性或与其相同或基本相同的结合亲和力的抗体实施 :no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 或 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。本发明的方法可以用与以下抗体识别相同表位或结合相同或基本相同的最小结合序列的抗体实施 :no. Z3G1(ATCC 保藏号 PTA-5967 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA) 或 no. Z3G3(Z3. 16. 25. 1)(ATCC 保藏号 PTA-5968 ;2004 年 3 月 13 日保藏，美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA)。

[0326] 本发明的方法，包括可应用于任何流感病毒株 / 分离物或亚型或株 / 分离物或亚型的组合的治疗、诊断和纯化 / 分离方法。流感病毒株的具体的非限定性例子是 A/PR/8/34(H1N1) 或 A/HK/1/68(H3N2) 株 / 分离物或亚型，如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2 或 H5N3。

[0327] 本发明的人的、人源化的和嵌合的 M2 抗体可以单独使用，或与具有抗流感病毒活性的治疗剂，例如，能够抑制流感病毒感染、复制、增殖，或减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间、或可能性的试剂组合使用。所述组合的例子包括含有两种或两种以上不同的 M2 抗体的合并的单克隆抗体或多克隆抗体，所述抗体具有不同的结合特异性、结合亲和力或抑制流感病毒体外或体内感染细胞的效力。因此，提供了包括 M2 抗体的联合组合物，以及在本发明的方法中使用所述组合的方法。

[0328] 本发明的方法，包括治疗流感或与流感病毒感染相关的疾病或并发症，有可能导致受试者状况的改善，减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间、或可能性，或降低所述受试者出现症状或接触所述感染的危险，例如，

对流感病毒感染的易感性。因此，所述改善包括减弱或减轻的病毒增殖、复制或滴度，或与流感病毒感染相关的症状或并发症中的一个或多个。改善还包括减少用于治疗患有或具有患流感病毒感染的危险，或与流感病毒感染相关的症状或并发症的抗病毒药物或其他试剂的需要、用药频率或用量。

[0329] 所述改善不必完全消除与流感病毒感染相关的任何或所有症状或并发症。相反，治疗可以是任何客观或主观的可测定的或可检测的抗流感病毒效果或改善。因此，当短期或长期（小时、天、周、月等）使改善有所增强或受试者的状况或相关的症状或并发症部分减轻，或抑制了状况的恶化或进展（稳定一种或多种症状或并发症）时，就获得了令人满意的临床结果。

[0330] 在本发明的提供上文所述的对流感病毒的客观或主观益处的方法（其中改善是需要的结果），如受试者的预防性或治疗性处理中，可以以足量或有效量施用抗体。此处用到的“足量”或“有效量”是指这样的量，其以单剂或多剂、单独或与一种或多种其它治疗、治疗方案或试剂（如药物）组合时，在特定受试者中能够提供长期或短期可检测反应、需要的结果或有益效果，它们是可测定或可检测程度的，或持续任何时间（如持续数分钟、小时、天、月、年，或治愈）。

[0331] 足量或有效量可以在单次施用中提供，但并不一定如此，并且可以与另一种化合物、试剂、治疗或治疗方案组合，但不一定如此。此外，如果单次或多次施用而不与第二种化合物、试剂、治疗或治疗方案组合时，足量或有效量不一定是足够或有效的，因为高于和超过所述施用的另外的施用、量或持续时间或额外的药物、试剂、治疗或治疗方案可以被引入，以便在特定受试者中达到有效或足够。此外，足量或有效量不一定在每一个和全部预防性或治疗性处理的受试者中有效，也不一定在特定组或群体中的大多数受治疗的受试者中有效。足量或有效量表示在特定受试者而不是组或普通群体中足够或有效。对于所述方法典型的是，一些受试者将表现出对治疗方法的更高或更低的反应。

[0332] 适合治疗的受试者包括患有流感病毒感染或具有流感病毒感染危险的受试者。目标受试者还包括具有出现流感相关的症状或并发症的危险的受试者。因此，本发明的方法可应用于治疗具有流感病毒感染或具有与流感病毒感染相关的并发症的危险性的受试者。因此，包括预防方法。

[0333] “预防”及其语法变化形式表示本发明的方法，其中在表现或出现流感病毒感染（或相关症状）之前给受试者接触、施用或体内送递，使得可以消除、防止、抑制、减弱或减少出现流感病毒感染的症状的可能性或易感性。如此处所述和本领域公知，流感的目标受试者可以具有流感感染的危险性（可能性或易感性）。

[0334] 适合治疗的有危险的受试者包括暴露于其他具有流感病毒的患者，或由于病毒感染性或细胞亲嗜性、免疫学易感性（例如，免疫受损的受试者）或环境因子的改变而导致流感病毒感染的危险性增强的受试者。适合治疗的有危险的受试者因此包括暴露于野生或农业环境（如禽类饲养场）中的鸟类或有暴露于所述鸟类的受试者，所述鸟类可能感染或没有感染流感，或是或不是流感的携带者。

[0335] M2 抗体可以根据本发明的方法作为一剂或多剂施用，例如，每天、每周、每月或每年一次或多次，或约 1-10 周，或者长到，例如，适合实现与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性的减轻。剂量可以根据所述治疗是

预防性的或治疗性的，接受治疗的相关疾病或并发症的进展、严重性、频率、持续时间或可能性，治疗针对的流感病毒分离物 / 株或亚型，希望的临床结果，以前的或同时进行的治疗，所述受试者的一般健康状况、年龄、性别或种族，以及本领域技术人员能够理解的其他因素而改变。本领域技术人员能够理解可能影响提供足以产生治疗益处所需的剂量和时间的因素。

[0336] 典型地，对于治疗性处理，将在受试者暴露于或接触流感病毒后 24-72 小时内，或在出现与病毒感染相关的一种或多种症状后 24-48 小时内施用 M2 抗体。对于预防性处理，可以在暴露于或接触流感病毒 0-4 周如 2-3 周内施用 M2 抗体。可以根据经验确定剂量，用动物疾病模型或任选在人类临床试验中确定。最初的研究剂量可以基于此处描述的动物研究，对于体重约 30 克的小鼠，施用量是约 10-1000μg/ 动物。可以根据受试者体重调整剂量，例如，约 10-50μg/kg、50-100μg/kg、100-500μg/kg、500-1,000μg/kg、1-5mg/kg、5-10mg/kg、10-20mg/kg、20-50mg/kg 或更多，或每小时、每天、每周、每月或每年两次、三次、四次或更多次。

[0337] 根据感染的状态或处理或治疗的任何不良副作用，可以按比例增加或减少剂量、频率或持续时间。被认为是足够和有效的，因此认为是有益的剂量、频率或持续时间是导致另一种治疗或治疗方案或计划的使用减少的那些。

[0338] 术语 " 受试者 " 表示动物，通常是哺乳动物，如非人灵长类（类人猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、短尾猿）、家畜（狗和猫）、农畜（禽类，如鸡和鸭、马、牛、山羊、绵羊、猪）、实验动物（小鼠、大鼠、兔、豚鼠）和人。受试者包括动物疾病模型，例如，本文所举例说明的流感病毒感染的小鼠动物模型。

[0339] 本发明的 M2 抗体，包括修饰过的形式、其变体和亚序列 / 片段，以及编码 M2 抗体的核酸，可以掺入药物组合物。所述药物组合物可用于给受试者体内或离体施用。

[0340] 在给受试者施用之前，抗体可以包含在可以药用的载体或赋形剂中。在本文中，术语 " 可以药用的 " 和 " 生理学上可接受的 " 表示适于一种或多种施用途径、体内送递或接触的生物学可接受的气态、液态或固态制剂，或其混合物。所述制剂包括与药物施用或体内接触或送递相容的溶剂（含水或无水）、溶液（含水或无水）、乳液（含水或无水）、悬浮液、糖浆、酏剂、分散和悬浮介质、包衣、等渗的和吸收促进或延缓剂。含水和无水溶剂、溶液和悬浮液可以包含悬浮剂和增稠剂。所述可以药用的载体包括片剂（包衣的或未包衣的）、胶囊（硬的或软的）、微珠、粉末、颗粒和晶体。还可将补充性活性化合物（例如，防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂）掺入所述组合物中。

[0341] 药物组合物可以配制成与特定施用途径相容。因此，药物组合物包括适合通过各种途径施用的载体、稀释剂或赋形剂。组合物可任选配制成的示例的接触或体内送递施用途径包括呼吸系统（鼻、吸入、呼吸、插管、肺内滴注）、口服、经颊、肺内、直肠、子宫内、皮内、表面、真皮、肠胃外、舌下、皮下、血管内、鞘内、关节内、腔内、经皮、离子电渗、眼内、眼、光学、静脉内、肌内、腺体内、器官内、淋巴内。

[0342] 鼻和滴注制剂通常包括任选含有一种或多种防腐剂或等渗剂的活性成分（化合物或试剂）水溶液。所述制剂通常调节为与鼻粘膜相容的 pH 和等渗状态。溶剂可能仅仅包括水，或可以是水和一种或多种其它成分（如乙醇）的混合物。典型地，乙醇最多是大约 70-75％体积百分比。其余的体积可能由各种比例的水或一种或多种其它溶剂组成。

[0343] 适于肠胃外施用的制剂包括活性化合物的含水和不含水的溶液、悬浮液或乳液，该制剂典型是无菌的，并且可以与预期接受者的血液等渗。非限制性实例包括水、盐水、右旋糖、果糖、乙醇、动物、植物或合成油。

[0344] 为了经粘膜或经皮施用（如表面接触），将渗透剂用于所述药物组合物。所述渗透剂为本领域普遍公知，并且，例如，对于经粘膜施用来说，包括去污剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。为了经皮施用，可以将活性成分配制成本领域技术人员普遍公知的气溶胶、喷雾、油膏、药膏、凝胶，或霜剂。为了与皮肤接触，药物组合物典型地包括油膏、霜、洗液、糊、凝胶、喷雾、气溶胶或油。可以使用的载体包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇、经皮增强剂及其组合。

[0345] 可以在制剂中加入共溶剂和佐剂。共溶剂的非限定性实例包括羟基或其它极性基团，例如醇，如异丙醇；甘醇，如丙二醇、聚乙二醇、聚丙二醇、甘醇醚；甘油；聚氧乙烯醇和聚氧乙烯脂肪酸酯。佐剂包括例如表面活性剂，如大豆卵磷脂和油酸；山梨聚糖酯，如三油酸山梨聚糖酯；和聚乙烯吡咯烷酮。

[0346] 补充活性化合物（如防腐剂、抗氧化剂、抗微生物剂，包括杀生物剂和生物抑制剂，如抗细菌、抗病毒和抗真菌剂）也可以掺入组合物。因此，药物组合物也可以包括防腐剂、抗氧化剂和抗微生物剂。

[0347] 也可以用防腐剂抑制微生物生长或增加活性成分的稳定性，因此延长药物制剂的保质期。合适的防腐剂是本领域公知的，并且包括例如 EDTA、EGTA、苯扎氯铵或苯甲酸或苯甲酸盐，如苯甲酸钠。抗氧化剂包括例如抗坏血酸、维生素 A、维生素 E、生育酚和相似的维生素或维生素原。

[0348] 抗微生物剂或化合物直接或间接抑制、减少、延迟、停止、消除、停滞、阻抑或防止致病或非致病微生物的感染或生长、感染性、复制、增殖、繁殖。抗微生物剂的类型包括抗细菌、抗病毒、抗真菌和抗寄生虫剂。抗微生物剂包括杀灭微生物或破坏（杀微生物）或抑制（抑微生物）微生物的感染或生长、感染性、复制、增殖、繁殖。

[0349] 示例的抗细菌剂（抗生素）包括青霉素类（如青霉素 G、氨苄青霉素、甲氧苯青霉素、苯唑西林和阿莫西林）、头孢菌素类（如头孢羟氨苄、头孢雷特、头孢氨噻和头孢曲松）、四环素类（如强力霉素、氯四环素、米诺环素和四环素）、氨基糖苷类（如阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、链霉素、奈替米星、巴龙霉素和妥布拉霉素）、大环内酯类（如 azithromycin、克拉霉素和红霉素）、喹诺酮类（如环丙沙星、洛美沙星和诺氟沙星）以及其它抗生素包括氯霉素、氯林可霉素、环状丝氨酸、异烟肼、立福平、万古霉素、氨曲南、克拉维酸、亚胺培南、多粘菌素、杆菌肽、两性霉素和制霉菌素。

[0350] 抗病毒剂的特定非限制性类型包括逆转录酶抑制剂；蛋白酶抑制剂；胸苷激酶抑制剂；糖或糖蛋白合成抑制剂；结构蛋白合成抑制剂；核苷类似物和病毒成熟抑制剂。抗病毒剂的特定非限制性实例包括奈韦拉平、地拉韦定、依非韦伦、沙奎那韦、利托那韦、吲哚那韦、奈非那韦、安泼那韦、齐多夫定 (AZT)、司他夫定 (d4T)、lamivudine(3TC)、地达诺新 (DDI)、扎西胞苷 (ddC)、阿波卡韦、阿昔洛韦、喷昔洛韦、伐昔洛韦、更昔洛韦、1，-D- 呋喃核糖基 -1,2,4- 三唑 -3 甲酰胺、9->2- 羟基 - 乙氧基 - 甲基鸟嘌呤、金刚烷胺、5- 碘 -2′ - 脱氧尿苷、三氟胸苷、干扰素和阿糖腺苷。

[0351] 适用于本发明的组合物和方法的药用制剂和送递系统为本领域所公知（参

见，例如，Remington :The Science and Practice of Pharmacy(2003)20th ed.，Mack Publishing Co.,Easton,PA ;Remington'sPharmaceutical Sciences(1990)18th ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA ;The Merck Index(1996)12th ed.,Merck PublishingGroup, Whitehouse，NJ ;Pharmaceutical Principlesof Solid DosageForms(1993)，Technonic Publishing Co.，Inc.，Lancaster，Pa. ;Anseland Stoklosa，Pharmaceutical Calculations(2001)11th ed.，LippincottWilliams&Wilkins，Baltimore，MD； 和 Poznansky et al.，DrugDelivery Systems(1980)，R.L.Juliano，ed.，Oxford，N.Y.，pp.253-315)。

[0352] 抗体及其药物组合物可以包装成单位剂型（如胶囊、锭剂、扁胶囊、糖锭或片剂）以便于施用和剂量的统一性。在本文中，“单位剂型”表示适合作为接受治疗的受试者的单元剂量的物理上独立的单位；每个单位包括预定量的活性成分，其任选与可以药用的载体（赋形剂、稀释剂、运载体或填充剂）缔合，当以一剂或多剂施用时，计算出产生需要的效果（如预防或治疗效果）。单位剂型也包括例如安瓿和管形瓶，其可以包含冷冻干燥或冻干状态的组合物；无菌液体载体，例如，可以在体内施用或送递前添加。单位剂型可以额外包括，例如分散了液体组合物的安瓿和管形瓶。单位剂型进一步包括用于经皮施用的组合物，如适于长或短时间保持与目标接受者的表皮接触的“贴片”。可以将各个单位剂型包括在多剂量试剂盒或容器中。可以将药物制剂包装在单个或多个单位剂型中，以便容易施用和剂量的统一性。

[0353] 本发明提供了包装在合适的包装材料中的包括 M2 抗体、编码 M2 抗体的核酸以及它的药用制剂的试剂盒。试剂盒通常包括标签或包装插页，其中包括对成分的说明或有关其中的成分在体外、体内，或离体的使用的说明。试剂盒可以包括所述成分的集合，例如，单独或与抗病毒剂或药物组合物的两种或两种以上人 M2 抗体。

[0354] 术语 " 包装材料 " 表示将所述试剂盒的成分包在里面的物理结构。所述包装材料可以保持所述成分的无菌性，并且可以是用常用于这种目的的材料制造（例如，纸、波纹纤维、玻璃、塑料、金属薄片、安瓿、管形瓶、试管等）。

[0355] 本发明的试剂盒可以包括标签或插页。标签或插页包括 " 印刷品 "，例如纸或纸板，或单独存在或固定于一种成分、试剂盒或包装材料（如盒子）上，或附着于含有试剂盒成分的安瓿、试管或管形瓶上。标签或插页还可以包括计算机可读介质上，如磁盘（如软盘、硬盘、压缩磁盘）、光盘如 CD- 或 DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带、或电储存介质，如 RAM 和 ROM 以及所述方式的组合，如磁 / 光储存介质、FLASH 介质或记忆卡。

[0356] 标签或插页可以包括鉴定其中的一种或多种成分、剂量、活性剂的临床药理学，包括作用机理、药动学和药效学的信息。标签或插页可以包括鉴定制造商信息、批号、制造商位置和日期的信息。

[0357] 标签或插页可以包括关于可以采用试剂盒成分的状况、病症或疾病的信息。标签或插页可以包括指导医生或受试者在一种方法、治疗方案或治疗计划中使用一种或多种试剂盒成分的说明。说明可以包括剂量、频率或持续时间，和实施任何此处描述的方法、治疗方案或治疗计划的说明。示例的说明包括如本文所述或本领域公知的治疗流感病毒感染的说明。因此，本发明的试剂盒可以额外包括用于实施本文所述的任何方法的标签或说明，包括治疗、检测、监测或诊断方法。因此，例如，试剂盒可以包括具有此处的一种或多种抗流感

活性的人 M2 抗体以及在本发明的方法中施用抗体的说明。

[0358] 标签或插页可以包括关于成分可以提供的任何益处，如预防或治疗益处的信息。标签或插页可以包括关于可能的不良副作用的信息，如对受试者或医生的警告，其涉及不适于使用特定组合物的状况。当受试者服用过、将服用或目前正在服用与组合物可能不相容的一种或其它药物，或受试者进行过、将进行或正在进行另一种可能与组合物不相容的治疗方案或治疗计划时可能发生副作用，因此，说明中可以包括关于所述不相容性的信息。

[0359] 本发明的试剂盒还可以在含有人的、人源化的或嵌合的 M2 抗体的药用制剂中包括生长介质（例如，用于 M2 抗体生产细胞系）、缓冲剂，或防腐剂或稳定剂。所述试剂盒的每一种成分可以分别包装在独立的容器中，并且将所有容器包装在单个包装中。可以将本发明的试剂盒设计成适合冷储存。还可以将本发明的试剂盒设计成包括产生人的、人源化的或嵌合的 M2 抗体的杂交瘤或其他宿主细胞（例如，CHO 细胞）。所述试剂盒中的细胞可以在合适的储存条件下保存，直至准备使用所述细胞。例如，包括一个或多个杂交瘤或其他细胞的试剂盒可以包括合适的细胞储存介质（例如，在组织培养生长培养基，如 DMEM、α -MEM 等中的 10-20％ DMSO），以便所述细胞可以解冻并且生长。

[0360] 本发明的人的、人源化的或嵌合的 M2 抗体可用于分离、检测或纯化 M2 多肽。所述方法包括让被怀疑含有 M2 的样品（存在于溶液、固相、体外或体内，或存在于完整的细胞或生物体中）与 M2 抗体在允许结合的条件下接触，并且检测 M2 的存在，或纯化结合的 M2 蛋白。

[0361] 因此，本发明还提供了用于检测测试样品中的 M2 或流感病毒的方法。在一种实施方案中，一种方法包括让具有或被怀疑具有 M2 或流感病毒的样品与 M2 抗体在允许检测所述样品中的 M2 的条件下接触，并且确定 M2 是否存在于测试样品中。M2 或流感病毒的检测可以通过常规方法进行，如，免疫沉淀、Western 印迹、免疫组织化学染色或或流式细胞术和 ELISA。

[0362] M2 和流感病毒检测方法可用于检测 M2 和流感病毒的诊断方法中。例如，当升高或降低水平的流感病毒与流感病毒感染的发生、进展或消退相关时，可以将本发明的抗体用于检测 M2 或流感病毒的任何增加或减少。另外，当进行能够降低 M2 或流感病毒水平的治疗之后，需要监测 M2 或流感病毒水平时，可以将本发明的抗体用于在治疗之前、期间或治疗之后，长期或短期检测 M2 或流感病毒水平的这种提高或降低。

[0363] 因此，本发明还提供了用于检测 M2 或流感病毒在受试者的测试样品（包括生物流体、细胞，或组织或器官样品，如活组织检查样品）中的存在的方法。在一种实施方案中，一种方法包括让来自受试者的具有或被怀疑具有 M2 或流感病毒的样品与人 M2 抗体或流感病毒抗体在允许检测所述样品中的 M2 或流感病毒抗体的条件下接触，并且确定 M2 或流感病毒是否存在于来自所述受试者的样品中。

[0364] 为了诊断或随后对受试者进行治疗，或测定受试者体内的 M2 含量，还可以将人的、人源化的或嵌合的 M2 抗体用于监测 M2 或流感病毒的存在。例如，在允许结合的条件下，按照上述方法将被怀疑含有 M2 或流感病毒的痰与 M2 抗体一起温育，检测 M2 或流感病毒的存在。

[0365] 除非另有说明，本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员所普遍理解的相同含义。尽管可以将与本文所披露的方法和材料类似或相同的

方法和材料用于本发明的实施或检测，合适的方法和材料是本文所披露的。

[0366] 本文所引用的所有申请，公开文件，专利和其他参考文献，GenBank 引用和本文引用的 ATCC 保藏号，被以它们的全文形式收作本文参考。在发生冲突的情况下，将对包括定义在内的说明进行控制。

[0367] 在本文中，单数形式 " 一个 " ，和 " 一种 " 以及 " 所述 " 包括多个指示物，除非文章中明确排除了这种情况。因此，例如，在提到 " 一种 M2 抗体 " 时，包括多种这样的抗体，并且在提到 " 一种抗流感病毒活性或功能 " 包括一种或多种活性或活性，如此等等。

[0368] 此处用到的所有数值或数值范围包括所述范围内的整数和范围内的值或整数的小数。因此，例如 90-100％的范围包括 91％、92％、93％、94％、95％、95％、97％等，以及 91.1％、91.2％、91.3％、91.4％、91.5％等，92.1％、92.2％、92.3％、92.4％、92.5％等。

[0369] 此处用肯定的语言描述了多个实施方案，从而一般性地公开了本发明。本发明也具体地包括一些实施方案，其中完全或部分排除了特定主题，如物质或材料、方法步骤和条件、方案、过程、测定或分析。因此，尽管没有指出本发明不包括的内容，此处公开的内容仍然包括了不特意包括在本发明中的方面。

[0370] 业已披露了本发明的多种实施方案。不过，可以理解的是，在不超出本发明范围的前提下可以进行各种改进。因此，以下实施例是用于说明而不是限定权利要求书所披露的范围。

[0371] 实施例

[0372] 实施例 1

[0373] 本实施例披露了各种材料和方法。

[0374] 肽合成和肽 -BSA 缀合物的制备 ：由 A&A Labs LLC(SanDiego,CA) 合成 M2(SEQ ID NO ：2，表 4) 和 M2SG(SEQ ID NO ：3，表 4) 肽。通过 HPLC 测定每种肽的纯度大于 95％。SEQ ID NO ：2(M2) 列出的序列是很多 A 型流感病毒株中存在的流感病毒基质 M2 蛋白的细胞外的 23 个氨基酸组成的肽的典型序列。根据制造商的说明，通过 EDC 缀合试剂盒 (PIERCE Biotechnology，Inc.，Rockford，IL) 将这两种肽缀合于牛血清白蛋白 (BSA，Sigma，St.Louis，MO)。将 BSA 缀合的 M2 和 M2SG 肽用于免疫小鼠。

[0375] 用于表位确定和人抗 M2 抗体的结合特异性的研究中使用的肽的氨基酸序列列于表 4 和 7。基于 GenBank 数据库中列出的突变 A 型流感病毒株中鉴定的 M2 突变蛋白的序列信息，设计用于分析结合特异性的 M2 突变肽类似物。由 A&A Labs LLC(San Diego，CA) 合成 M2 类似物肽和截短的 M2 肽。

[0376] 小鼠 ：获得了包括人免疫球蛋白区的人染色体片段的人转染色体小鼠 (WO02/43478，WO02/092812，Ishida 和 Lonberg，IBC ′ s11thAntibody Engineering Meeting.Abstract(2000) ；和 Kataoka，S.IBC ′ s13thAntibody Engineering Meeting.Abstract(2002)) 是从 KirinBrewery 有限公司 (日本) 获得的。C57BL/6J 小鼠是从位于 BarHarbor，ME 的 Jackson 实验室购买的。

[0377] 免疫 ：将 M2-BSA 和 M2SG-BSA(1 ：1 溶于 PBS(磷酸缓冲液，GIBCO BRL，Rockville，MD)) 与等体积的完全弗氏佐剂 (CFA)(Sigma，St.Louis，MO) 混合，并且制备乳液。用溶解在 CFA 中的 20μg 的混合物通过皮下途径对小鼠进行免疫，并且，在第 21 天，用溶解在不完全弗氏佐剂 (IFA)(Sigma，St.Louis，MO) 中的相同量的 M2-BSA 和 M2SG-BSA 的混合物进行

皮下加强接种，然后在第 42 天用 RIBI(Corixa，Hamilton MT) 进行第三次腹膜内注射。在融合之前 3 天最后腹膜内和静脉注射 10μg 没有佐剂的 M2 肽。

[0378] ELISA：通过 ELISA 测定抗体滴度和抗体特异性以及杂交瘤的抗体生产。简单地讲，将 50μl 的 M2-BSA 或 M2 肽包被在 96- 孔平底平板 (Nunc，Denmark) 上，浓度为在碳酸缓冲液 (pH9.6) 的 1μg/ml，在 4℃下过夜，或在 37℃下 1 小时。在用 PBS/0.1% Tween20 洗涤两次之后，在 37℃下，用 PBS/1% BSA(Sigma，St.Louis，MO) 封闭平板 30 分钟，将所述抗体或血清添加到孔中，并且在 37℃下温育所述平板 1 小时。在洗涤四次之后，将稀释过的 HRP 缀合的山羊抗 - 人免疫球蛋白 γ 链特异性抗体 (Jackson ImmunoresearchLaboratory，West Grove，PA) 添加到孔中，并且在 37℃下温育 1 小时。在洗涤四次之后，添加 TMB 底物溶液 (DAKO，CA)，并且在室温下温育 30 分钟。通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度。

[0379] 同种型 ELISA：通过 ELISA 测定由杂交瘤产生的抗体的同种型。简单地讲，将 50μl 的 M2-BSA 或 M2 肽包被在 96- 孔平底平板 (Nunc，Denmark)(Nunc，Denmark) 上，浓度为碳酸缓冲液 (pH9.6) 中的 1μg/ml，在 4℃下过夜，或在 37℃下 1 小时。在用 PBS/0.1% Tween20 洗涤 2 次之后，用 PBS/1% BSA(Sigma，St.Louis，MO) 在室温下封闭平板 1 小时，将所述抗体添加到所述孔中，并且在室温下温育所述平板 1 小时。在洗涤 3 次之后，将稀释的 HRP- 偶联的小鼠抗 - 人 IgGI、IgG2、IgG3 和 IgG4 重链检测抗体 (Zymed，SanFrancisco，CA) 中的任意一种添加到所述孔中，并且在室温下温育 1 小时。在洗涤 3 次之后，添加 TMB 底物溶液 (DAKO，CA) 并且在室温下温育 30 分钟。通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度。

[0380] 基于 A 型流感病毒感染的细胞的 ELISA：以在含有 1% 非必需氨基酸、2mM L- 谷氨酰胺、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 硫酸链霉素、1mM 丙酮酸钠 (cMEM)(InVitrogen，Carlsbad，CA) 中的 $1.5x10^5$ 细胞 /mL 或以 150μl/ 孔的密度将 MDCK 细胞 (Madin-Darby 犬肾上皮细胞；ATCC，Rockville，MD) 铺平板到 96- 孔平底平板 (Falcon®) 上，并且在 7% CO_2 中温育 48 小时。在 48 小时之后，用 PBS 洗涤所述平板 2 次，并且在室温下用 30μl 的 100- 倍 $TCID_{50}$A 型流感病毒 (A/PR/8/34 或 A/HK/8/68；ATCC，Rockville，MD) 感染 30 分钟，该过程中进行定期搅拌。在感染之后，用 PBS 洗涤平板一次，添加 150μl 的溶解在基本必需培养基 (Invitrogen Corp，CA) 中的 1μg/mL 胰蛋白酶 (TPCK- 处理过的，Worthington，Biochem.Corp.)，并且将所述平板温育 27 小时。在感染之后，用 PBS/1% FCS(GIBCOBRL，Rockville，MD) 洗涤所述细胞单层 3 次，并且，在室温下用 PBS/1% BSA/5% FCS 封闭 30 分钟。稀释所述抗体，并且将 50μl 添加到每个孔中，并且在室温下温育 45 分钟。在洗涤 4 次之后，以 1：3000 的比例稀释 HRP 缀合的兔抗 - 人免疫球蛋白 γ 链抗体 (DAKO，Denmark)，并且将 50μl 添加到每个孔中，并且在室温下温育平板 30 分钟。在洗涤 5 次之后，添加 100μl 的含有 1mM 左旋咪唑溶液 (Vector Laboratories Inc.Burlingame，CA) 的 TMB 底物 (DAKO，Denmark)，并且在室温下温育平板 15 分钟。将 50μl 上清液转移到装有 100μl 终止溶液 (1N H_2SO_4) 的新的 96- 孔平板 (Nunc，Denmark) 上，并且通过通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度 (OD)。按照以前披露的方法计算每种抗体的 EC_{50}(Sette 等 Nature328：395(1987))。将解离常数 (K_d) 定义为使 A/PR/8/34 或 A/HK/1/68 感染的 MDCK 细胞表面上的 M2 抗原上的结合位点的一半 (50%) 饱和所需的抗体浓度。

[0381] 在基于A型流感病毒感染的细胞的ELISA中的肽竞争：按照上述方法制备病毒感染的MDCK细胞。混合M2肽和抗M2抗体，并且在室温下温育30分钟。在温育之后，在细胞中添加50μl肽和抗体的混合物，并且在室温下温育30分钟。在洗涤四次之后，以1:3000的比例稀释HRP缀合的兔抗-人免疫球蛋白γ链抗体(DAKO，Denmark)，并且将50μl添加到每个孔中，并且在室温下温育平板30分钟。在洗涤五次之后，添加100μl含有1mM左旋咪唑溶液(VectorLaboratories Inc.Burlingame，CA)的TMB底物(DAKO，Denmark)，并且在室温下温育平板15分钟。将50μl上清液转移到装有100μl终止溶液(1NH_2SO_4)的新的96-孔平板(Nunc，Denmark)上，并且通过微量滴定板读数器在450nm波长下测定光密度。

[0382] 杂交瘤生产：选择具有最高抗体滴度的小鼠，用于单克隆抗体生产。收获脾细胞，并且使用50％PEG(Boehringer Mannheim，Indianapolis，IN)将单细胞悬浮液与骨髓瘤细胞系(SP2/0-Ag14)(ATCC，Rockville，MD)以3:1的比例融合。以一定的光密度将所述融合物铺平板到96-孔平板上，并且在完全RPMI-10培养基(RPMI1640，含有10％FCS、1％非必需氨基酸、2mML-谷氨酰胺、50μM2-ME、100U/ml青霉素和100μg/ml硫酸链霉素)中，在5％CO_2中，37℃的温育器中温育。通过ELISA筛选每种融合物的大约2000个杂交瘤生长孔。将M2肽结合阳性细胞转移到24孔平板上，并且进行4轮有限稀释，以便获得单克隆抗体。通过基于A型流感病毒感染的细胞的ELISA进一步证实抗-M2单克隆抗体。

[0383] 抗体纯化：为了进行抗体纯化，在Integra系统(INTEGRABioscience，Inc.Ijamsville，MD)中，将所述杂交瘤与杂交瘤-SFM(GIBCO BRL，Rockville，MD)一起培养。使用蛋白A-Sepharose FastFlow凝胶(Amersham Pharmacia Cat#17-0618-02，Uppsala，Sweden)从培养基中纯化人单克隆抗体。简单地讲，用0.22μm的圆片过滤器(Minisarto-plus，SartoriusCat#17822，Gettingen，Germany)对含有适合柱容量的量的抗体的条件培养基进行过滤，并且加样到用磷酸缓冲液(PBS)平衡的2.0ml蛋白A-Sepharose Fast Flow柱上。用超过40ml的PBS洗涤所述柱，并且用0.1M Gly-HCl，pH3.6、0.15MNaCl洗脱所述抗体。在最初的1.0ml洗脱缓冲液通过之后，以每管5.0ml的体积收集3个独立的洗脱级份并且立即用250μl的1MTris-HCl，pH8.0中和。重复该纯化过程，直到所有条件培养基都处理过。用人IgG-特异性ELISA测定抗体浓度，并且合并所有含有抗体的级份，并且通过离心浓缩仪(Vivaspin20，30，000MWCO：Sartorius Cat#VS2022，Gettingen，Germany)浓缩。

[0384] 为了消除热原，将浓缩的样品通过缓冲液交换进入20mM磷酸钠，pH6.6中，并且加样到用相同的缓冲液平衡的0.5ml SP-SepharoseHP柱(Amersham Pharmacia，Cat#17-1087-01，Uppsala，Sweden)上。通过让所述样品首先通过与SP-Sepharose HP柱系列连接的2mlQ-Sepharose Fast Flow柱(Amersham Pharmacia，Cat#17-0510-01，Uppsala，Sweden)，消除所述热原。在加样之后，去掉所述Q-SepharoseFast Flow柱，并且用0-0.5M的氯化钠线性梯度洗脱抗体。在280nm波长下检测所述抗体，并且合并含有抗体的级份。通过离心浓缩仪浓缩所述样品，并且通过使用NAP25脱盐柱(Amersham Pharmacia，Cat#17-0852-02，Uppsala，Sweden)，通过缓冲液交换进入PBS。通过人IgG特异性ELISA对抗体浓度进行定量。按照LimulusAmebocyte Lysate(LAL)测定(Associates of Cape Cod，Inc.，Falmouth，MA)确定样品的热原水平低于0.13EU/mg蛋白。

[0385] 人抗-M2抗体(Z3)基因的分离:通过离心收集能产生Z3抗体(同种型:IgG3)的培养的杂交瘤细胞(113Z-3)。使用Rneasy试剂盒(QIAGEN Inc.,Valencia,CA),按照制造商的说明从所述细胞中纯化总RNA(140μg)。使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒(ClontechCo.,Ltd.,Palo Alto,CA),从作为来源的杂交瘤细胞的总RNA克隆免疫球蛋白基因的可变区的cDNA。简单地讲,通过逆转录酶由2μg mRNA制备第一条cDNA链。将该cDNA用做聚合酶链反应(PCR)的模板,以便扩增包括前导序列的重链和轻链可变区(分别是HV和LV)。所述反应如下:2.5U KOD-Plus-DNA聚合酶(TOYOBO,Tokyo,Japan);0.2μM用于一侧的引物(对于重链来说:IgG1p,对于轻链来说:LCR276,参见表2);用于另一侧的1X Universal引物混合物A(装于SMART RACE试剂盒的UMP引物混合物A);每种dNTP混合物各200μM;1mM MgSO4;KOD-Plus-缓冲液(终浓度是1x);和cDNA模板。

[0386] 热循环程序为94℃5分钟,然后进行30个循环的94℃10秒,和68℃1分钟,在72℃下延伸3分钟。在乙醇沉淀之后收集扩增的DNA片段,然后进行琼脂糖凝胶电泳,并且通过QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen Co.,Ltd.,Germany)纯化。用Zero Blunt TOPOPCR克隆试剂盒(Invitrogen,Carlsbad,CA)将HV和LV的纯化DNA片段整合到PCR4Blunt-TOPO载体中,将每个构建体质粒转化到大肠杆菌中,然后克隆。用特定引物(HV:M13F,M13R和hh-4,LV:M13F,M13R和LCR88,参见表2)分析构建体质粒中的每个插入片段(HV和LV)。

[0387] 分别来自8个独立克隆的HV和LV的核苷酸序列是完全相同的。基于获自LV的序列,设计了寡核苷酸引物Z3LP5BGL和Z3LP3ERI(表2)。采用第一链cDNA作为模板,Z3LP5BGL和Z3LP3ERI作为引物,用KOD-Plus-DNA聚合酶通过PCR获得了编码全长ORF(LVC),包括可变区和恒定区的轻链cDNA序列。下面示出了HV和LV的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0388] Z3重链可变区(HV)的cDNA的核苷酸序列(从起始密码子(ATG)到可变区的末端)-

[0389] ATGGACTGGA CCTGGAGCAT CCTTTTCTTG GTGGCAGCAG CAACAGGTGC CCACTCCCAG 60

[0390] GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC 120

[0391] TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC TATGGTATCA GCTGGGTGCG ACAGGCCCCT 180

[0392] GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGGATGGATC AGCGCTTACA ATGGTAACAC AAACTATGCA 240

[0393] CAGAAGCTCC AGGGCAGAGT CACCATGACC ACAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG 300

[0394] GAGCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG GGCAGCAGCT 360

[0395] GGCGGATACT TCCAGCACTG GGGCCAGGGC ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A411(SEQ ID NO:32)

[0396] Z3轻链可变区和恒定区(LVC)的cDNA的核苷酸序列(从起始密码子(ATG)到恒定区的末端(加下划线的))-

[0397] ATGGCCAGCT TCCCTCTCCT CCTCACCCTC CTCACTCACT GTGCAGGGTC CTGGGCCCAG 60

[0398] TCTGTGCTGA CTCAGCCACC CTCAGCGTCT GGGACCCCCG GGCAGAGGGT CACCATCTCT 120

[0399] TGTTCTGGAA GCAACTCCAA CATCGGAAGT AAAACTGTAA ACTGGTACCA GCAGCTCCCA 180

[0400] GGAACGGCCC CCAAACTCCT CATCTCTAGT AATAATCAGC GGCCCTCAGG GGTCCCTGAC 240

[0401] CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG GCTCCAGTCT 300

[0402] GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGAATGG TGTGGTATTC 360

[0403] GGCGGAGGGA CCAAGCTGAC CGTCCTAGGTCAGCCCAAGG CTGCCCCCTC GGTCACTCTG 420

[0404] TTCCCACCCT CCTCTGAGGA GCTTCAAGCC AACAAGGCCA CACTGGTGTG TCTCATAAGT 480

[0405] GACTTCTACC CGGGAGCCGT GACAGTGGCC TGGAAGGCAG ATAGCAGCCC CGTCAAGGCG 540

[0406] GGAGTGGAGA CCACCACACC CTCCAAACAA AGCAACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC 600

[0407] CTGAGCCTGA CGCCTGAGCA GTGGAAGTCC CACAAAAGCT ACAGCTGCCA GGTCACGCAT 660

[0408] GAAGGGAGCA CCGTGGAGAAGACAGTGGCC CCTACAGAAT GTTCATAG 708(SEQ ID NO:33)

[0409] Z3 重链可变区 (HV) 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区)-

[0410] MDWTWSILFL VAAATGAHSQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS YGISWVRQAP 60

[0411] GQGLEWMGWI SAYNGNTNYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCARAAA 120

[0412] GGYFQHWGQG TLVTVSS137(SEQ ID NO:34)

[0413] Z3 轻链可变区和恒定区 (LVC) 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体)、可变区和恒定区 (加下划线的))-

[0414] MASFPLLLTLLTHCAGSWAQ SVLTQPPSAS GTPGQRVTIS CSGSNSNIGS KTVNWYQQLP 60

[0415] GTAPKLLISS NNQRPSGVPD RFSGSKSGTS ASLAISGLQS EDEADYYCAA WDDSLNGVVF 120

[0416] GGGTKLTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA 180

[0417] GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HKSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS 235(SEQ IDNO:35)

[0418] 制备同种型改变的人抗 -M2 抗体 (Z3-IgG1 型) 的表达载体 : 构建了 IgG1 型同种型转换的 Z3 抗体 (原始同种型是 IgG3) 的表达载体。简单地讲,设计用分别含有 5′ -BglII 和 3′ -EcoRI 限制酶敏感性突出端位点的寡核苷酸引物 Z3LP5BGL 和 Z3LP3ERI(表 2) 通过 PCR 扩增全长轻链 (LVC)。用第一链 cDNA 作为模板, Z3LP5BGL 和 Z3LP3ERI 作为引物,用 KOD-Plus-DNA 聚合酶进行 PCR。通过 BglII 和 EcoRI 消化 PCR 产物后,将 718-bp 的片段亚克隆到表达载体 (IDECPharmaceuticals,San Diego,CA,N5KG1-Val Lark(N5KG1 的改进载体,美国专利 No.6,001,358)) 中,该载体用 BglII 和 EcoRI(8.6 千碱基 DNA 片段) 预先消化过。分析分离的构建体 (N5L3G1-Z3_LF) 的插入片段的核苷酸序列,确定轻链的全长 ORF(LVC) 的存在。插入片段 (LVC) 的 DNA 序列与 Z3(LV) 的轻链可变区序列和人 λ 免疫球蛋白轻链恒定区 IGLC3(GenBank 获取号 NG_000002 :22 号染色体上的人免疫球蛋白 λ 基因座) 相同。

[0419] 作为第二步,按照以下方法将 HV 插入 N5L3G1-Z3_LFDNA 载体 : 用两种 DNA 限制酶 NheI 和 SalI 消化所述 DNA 载体,并且,随后进行脱磷酸化。分离 9.2kb 的 DNA 片段 (片段 A)。与轻链构建体类似,将用于 HV 的 PCR 的引物组设计成在 HV 的两侧具有对限制酶敏感的区域。所使用的引物是 Z3HP5SAL 和 Z3HP3NHE(表 2),并且将 HV 的构建体质粒用作模板。将纯化的 PCR- 扩增的 HV 产物亚克隆到 pGEM®-T Easy 载体系统中。证实亚克隆构建体中的插入片段的核苷酸序列。用两种限制酶 NheI 和 SalI 消化所述质粒 DNA,并且分离 0.44kb 的 DNA 插入片段 (片段 B),并且在琼脂糖凝胶电泳之后纯化。

[0420] 用 T4DNA 连接酶连接两种 DNA 片段, A 和 B,并且将连接的构建体 (N5LG1_M2_Z3) 电穿孔到大肠杆菌 ΔH5 株中,以便制备转化体。选择阳性大肠杆菌转化体。纯化该表达载体,并且用特异性引物 (SEQ ID NOs :46-49,表 2) 证实 LV 和 HV 区的核苷酸序列。在该过程中,没有导入突变。

[0421] 下文示出了 Z3G1 的重链的全长 ORF 的核苷酸和氨基酸序列。Z3G1 的轻链的全长 ORF 的核苷酸和氨基酸序列与上文示出的 Z3 的 LVC 的核苷酸和氨基酸序列相同。

[0422] Z3G1 重链可变区和恒定区的 cDNA 的核苷酸序列（从起始密码子 (ATG) 到恒定区的末端（加下划线的））-

[0423] ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACTCCCAGGTTCAG

[0424] CTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC

[0425] TGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG

[0426] GATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCA

[0427] CCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGAC

[0428] ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGCAGCAGCTGGCGGATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCAC

[0429] CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA

[0430] GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA

[0431] CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT

[0432] CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA

[0433] TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT

[0434] GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC

[0435] TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG

[0436] GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA

[0437] TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG

[0438] TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA

[0439] GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT

[0440] GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT

[0441] ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC

[0442] GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG

[0443] GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA

[0444] GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA(SEQ ID NO:36)

[0445] Z3G1 重链可变区和恒定区的 cDNA 的氨基酸序列（前导序列（粗体）、可变区和恒定区（加下划线的））-

[0446] MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLE

[0447] WMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAAAGGYFQHWGQG

[0448] TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

[0449] YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

[0450] TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

[0451] GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

[0452] GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQID NO:37)

[0453] 表 1：合成的 DNA 引物 (SEQ ID NOS:38-51)

[0454]

编号	名称	5’到3’的序列	长度
(SEQ ID NO:38)	IgG1p	TCTTGTCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTG TG	31 聚体
(SEQ ID NO:39)	LCR276	GGGGCCACTGTCTTCTCCACGGTGCTC	27 聚体
(SEQ ID NO:40)	hh-4	GGTGCCAGGGGGAAGACCGATGG	23 聚体
(SEQ ID NO:41)	LCR88	CACGGCTCCCGGGTAGAAGTCACT	24 聚体
(SEQ ID NO.42)	M13F	GTAAAACGACGGCCAGTG	18 聚体
(SEQ ID NO:43)	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17 聚体
(SEQ ID NO:44)	Z3HP5SAL	AGAGAGAGAGGTCGACCCAC CATGGACTGG ACCTGGAGCATCCTTTT	47 聚体
(SEQ ID NO:45)	Z3HP3NHE	GAGAGAGAGGCTAGCTGAGG AGACGGTGAC CAGGGTG	37 聚体
(SEQ ID NO:46)	Z3LP5BGL	AGAGAGAGAG ATCTCACCAT GGCCAGCTTC CCTCTCCTCC T	41 聚体
(SEQ ID NO:47)	Z3LP3ERI	AGAGAGAGAGGAATTCCTATGAACATTCT GTAGGGGCCACTGTC	44 聚体
(SEQ ID NO:48)	SEQU1783	GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA	27 聚体
(SEQ ID NO:49)	SEQU4618	TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC	27 聚体
(SEQ ID NO:50)	IgG2pG134	TGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCCTGAGTT CC	31 聚体
(SEQ ID NO:51)	LC3F81	TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC	27 聚体

[0455] 来自CHO细胞的重组人抗-M2抗体的生产：为了生产重组抗体，将含有抗M2抗体的N5LG1_M2_Z3载体电穿孔到中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞，ATCC#CRL-9096)的宿主细胞dhfr-缺陷株中，从转染的细胞的上清液分离重组抗体。简单地讲，用DNA限制酶AscI将10微克纯化的DNA表达载体N5LG1_M2_Z3线性化，并且使用Bio Rad电穿孔仪(350V，500pF)，将所述DNA转染到$4x10^6$个CHO细胞中。将转染的细胞接种到96-孔培养平板上，并且在含有遗传霉素(Gibco-BRL)的培养基中培养细胞，以便选择含有DNA载体的CHO细胞。在选择若干稳定的转染细胞系之后，通过ELISA筛选高的人IgG生产者，并且用于生产重组抗体。

[0456] 重组抗体蛋白的分离和纯化：用不含血清的EX-Cell325-PE(JRHBioscience，Co.，Ltd.)培养表达重组抗体的CHO细胞，所述培养基补加了2mM谷氨酰胺、100单位/ml青霉素、100μg/ml链霉素以及次黄嘌呤和胸苷(HT)补充物(1:100)(Invitrogen)，该培养在5%CO_2，37℃温育器中进行。按照以下方法，将20升培养上清液用于纯化抗体蛋白：将所述上清液加样到MabSelect蛋白A柱(AmershamPharmacia Biotech，Co.，Ltd.)上。为了将抗体吸附到蛋白A上，使用了磷酸缓冲液(PBS)，而为了洗脱，使用了20mM柠檬酸钠缓冲液和50mM氯化钠(pH2.7)。通过添加50mM磷酸钠缓冲液(pH7.0)，将洗脱级份的pH调整到5.5。通过添加1.5体积的Milli-Q级水(Millipore，Bedford，MA)将所加材料的传导性调节到<4ms/cm，然后使样品首次通过2ml Q-Sepharose Fast Flow柱(AmershamPharmacia，Cat#17-0510-01，Uppsala，Sweden)，该柱子连接了一系列0.5ml SP-Sepharose HP柱(Amersham Pharmacia，Cat#17-1087-01，Uppsala，Sweden)。这些步骤后，除去Q-Sepharose Fast Flow柱，用PBS洗脱抗体。

[0457] 通过用Super Cup100Capsule膜过滤器(0.22μm直径孔径)过滤，对纯化的抗体

进行消毒。通过在280nm波长下进行分光光度测定，测定纯化抗体的浓度，其中，1mg/ml的蛋白在280nm波长下表现出1.4的OD。从20升CHO细胞培养上清液中纯化重组Z3G1抗体(41mg)。根据Limulus Amebocyte Lysate(LAL)测定、Pyrocell Single测试(SEIKAGAKU Corp.，Tokyo，Japan)，确定样品的热原水平小于0.1EU/mg。

[0458] 病毒分离和滴度测量：为了病毒分离，在感染后的各天取出感染的小鼠肺，在液氮中冷冻，在预先称重的试管中称重。减去试管重量，计算实际肺重量，以1:10的重量（克）与体积(mL)比加入PBS，然后用Fisher TissueMiser(Fisher Scientific，Pittsburgh，PA)匀浆。用Centra GP8R离心机(International Equipment Company，NeedhamHeights，MA)以3000rpm将样品离心5分钟，以除去细胞碎片。等分含有病毒体的上清液，冷冻在液氮中。将病毒在-80℃下储存。

[0459] 通过噬斑测定测量病毒滴度。简言之，用病毒在总体积为100μl的PBS中的10倍稀释液感染6孔平底板中的铺满的MDCK细胞单层，在定期搅拌的条件下感染30分钟。用PBS洗涤单层1次，在含有1%非必需氨基酸、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100μg/ml硫酸链霉素、1mM丙酮酸钠(GIBCO BRL，Rockville，MD)和1μg/ml胰蛋白酶(TPCK-处理的，Worthington，Biochem.Corp.，Lakewood，NJ)的MEM中用46℃预先加热的0.9%超纯琼脂(Invitrogen，Carlsbad，CA)覆盖。在37℃，5% CO2温育器中温育细胞。在感染后3天观察噬斑，用10%甲醛溶液中的0.1%结晶紫染色。对噬斑数目进行计数。

[0460] 实施例2

[0461] 本实施例披露了人的和嵌合的M2单克隆抗体的生产和表征。本实施例描述的数据也表明抗M2人单克隆抗体Z3G1具有宽的M2结合谱，并且能够进行高亲和力结合。

[0462] 采用重组技术，将Z3的同种型转化为具有Z3Fab的IgG1和重组IgG1型Z3(Z3G1)的CHO表达系统。用于生产Z3G1抗体的方法如实施例1的描述。

[0463] 以与原始Z3相似的方式，Z3G1特异性结合M2肽和M2-BSA缀合物，但不结合BSA、KLH(免疫的载体)或mGAD(一种合成的无关肽，来源于小鼠谷氨酸脱羧酶的氨基酸246-266)。

[0464] 表2：Z3G1对M2具有特异性

[0465]

mAbs	M2肽*	感染的细胞上的M2**	BSA	OVA	KLH	mGAD***
C40G1	+	+	-	-	-	-
L66	+	+	-	-	-	-
N547	+	+	-	-	-	-
Z3G1	+	+	-	-	-	-

[0466] *：M2蛋白的最常见的细胞外部分；该序列是：

[0467] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(SEQ ID NO:1)

[0468] **：在A/PR/8/34和A/HK/1/68感染的MDCK细胞上表达的M2

[0469] ***：来源于小鼠GAD的246-266位的合成肽

[0470] +阳性定义为比对照抗体或无抗体的情况下的OD_{450nm}高2倍以上

[0471] 通过基于细胞的ELISA进一步证实Z3G1的结合特异性。Z3G1识别流感病毒感染

的 MDCK 细胞上表达的 M2 蛋白的细胞结构域 / 胞外域 (M2e)(表 2)。此外，当加入 M2 肽时，结合于病毒感染的细胞的 Z3G1 抗体被特异性抑制 (图 1)。因此，Z3G1 对 M2 肽具有特异性，并且对 A 型流感病毒感染的 MDCK 细胞表面上表达的 M2 蛋白也具有特异性。通过相对较低的 Kd 值反映出 Z3G1 的结合亲和力略微高于三种其它的人单克隆抗 M2 抗体 (C40G1、N547 和 L66)，这是通过基于细胞的 ELISA 确定的 (表 3)

[0472] 表 3 :人抗 M2 抗体之间的亲和力比较

[0473]

Abs	亚类	轻链使用	$K_d(x10^{-9}M)$ * PR8 感染的	$K_d(x10^{-9}M)$ * HK1 感染的
Z3G1	IgG1	λ	0.497±0.030	0.488±0.070
C40G1	IgG1	κ	0.519±0.033	0.542±0.063
N547	IgG1	λ	1.047±0.165	1.219±0.061
L66	IgG1	λ	0.563±0.099	0.531±0.048

[0474] 表 3 中两种病毒株，即 A/PR/8/34 和 A/PR/1/68 的 M2 序列的细胞外结构域 / 胞外域的差别在于单个氨基酸 :A/PR/8/34 株的 M2 的细胞外部分 20 位的天冬氨酸取代为甘氨酸。来源于 A/HK/1/68 的序列 (称作 M2e) 在大多数流感病毒株中是共有的 (Neirynck 等，NatureMed. 5 :1157(1999))。

[0475] Z3G1 抗体识别两种病毒株感染的 MDCK 细胞上表达的 M2e 蛋白 (表 3)。该结论得到了表 5 中示出的肽 ELISA 数据的支持 (Z3G1 抗体与 M2 和 M2G 的 + 结合，M2 和 M2G 的序列参见表 4)。这些结果表明 Z3 识别感染了这两种不同病毒株的 MDCK 细胞上表达的 M2 和 M2G 蛋白。

[0476] 抗体 nos. Z3G1、N547、L66、C40G1 的反应性相似，都比 Z3G1 的结合亲和力 (Kd) 略好 (表 3)。如预期的，同种型匹配的无关人抗 HSA 抗体 (抗人血清白蛋白) 不显示任何反应性 (图 1)。

[0477] 表 4. M2 变体 / 突变体肽的序列

[0478]

M2 肽	序列	SEQ ID NO
M2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	(SEQ ID No:2)
M2SG	SLLTEVETPIR**S**EWGCRCNDS**G**D	(SEQ ID No:3)
M2EG	SLLTEVETPIRNEW**E**CRCN**G**SSD	(SEQ ID No:4)
M2P	SL**P**TEVETPIRNEWGCRCNDSSD	(SEQ ID No:5)
M2G	SLLTEVETPIRNEWGCRCN**G**SSD	(SEQ ID No:6)
M2DLTGS	SLLTEV**D**T**LT**RN**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:7)
M2KNS	SLLTEVETPIR**K**EWGC**N**C**S**DSSD	(SEQ ID No:8)
M2LGS	SLLTEVET**L**IRN**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:9)
M2LTKGS	SLLTEVET**LTK**N**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:10)
M2SY	SLLTEVETPIR**S**EWGCR**Y**NDSSD	(SEQ ID No:11)
M2TGEKS	SLLTEVETP**T**RN**G**W**E**C**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:12)
M2HTGEKS	SLLTEVET**HT**RN**G**W**E**C**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:13)
M2KTGEKS	SLLTEV**K**TP**T**RN**G**W**E**C**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:14)
M2LTGS	SLLTEVET**LT**RN**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:15)
M2TDGEKS	SLLTEVETP**T**R**DG**W**E**C**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:16)

[0479]

M2TGS	SLLTEVETP**T**RN**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:17)
M2TGEK	SLLTEVETP**T**RN**G**W**E**C**K**CNDSSD	(SEQ ID No:18)
M2LTGEKS	SLLTEVET**LT**RN**G**W**E**C**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:19)
M2K	SLLTEVETPIRNEWGC**K**CNDSSD	(SEQ ID No:20)
M2FG	S**F**LTEVETPIRNEWGCRCN**G**SSD	(SEQ ID No:21)
M2TGE	SLLTEVETP**T**RN**G**W**E**CRCNDSSD	(SEQ ID No:22)
M2KGENS	SLLTEVETPIR**KG**W**E**C**N**C**S**DSSD	(SEQ ID No:23)
M2TES	SLLTEVETP**T**RNEW**E**CRC**S**DSSD	(SEQ ID No:24)
M2GHTGKS	SLLT**G**VET**HT**RN**G**WGC**K**C**S**DSSD	(SEQ ID No:25)
M2PHTGS	SLL**P**EVET**HT**RN**G**WGCRC**S**DSSD	(SEQ ID No:26)

[0480] 加下划线的粗体字母是与 SEQ ID NO :2 的 M2 序列相比的突变区。

[0481] 采用在 A 型流感病毒株中报道的 25 种不同的 M2 肽 (SEQ IDNOs :2-26，表 4) 用 ELISA 测定分析抗 M2 抗体与突变的 M2 肽的结合活性。在该研究中使用了人抗 M2 抗体 nos. Z3G1、C40G1、L66、N547 和小鼠 14C2 抗体 (Affinity Bioreagents，Golden，CO)。

[0482] 表 5 中的结果表明 Z3G1 结合几乎所有的 M2 突变体 (除 M2GHTGKS 和 M2PHTGS)，并且它结合野生型 M2 肽。甚至在采用 M2LTGEKS 时也是如此，M2LTGEKS 与野生型 M2 肽在六个氨基酸位置不同。尽管 L66 和 N547 显示出与 M2 突变体 M2P、M2LGS 和 M2FG 的结合较低，但 Z3G1 结合于 M2P、M2LGS 和 M2FG 的每一个。此外，C40G1 和 14C2 与 M2LGS、M2LTKGS、M2HTGEKS、M2KTGEKS、M2LTGS、M2TGEK、M2LTGEKS 和 M2TGE 不结合或结合活性较低，但 Z3G1 抗体结合所有这些变体 / 突变体 M2 肽。这些结果证明 Z3G1 以高亲和力与不同的 M2 突变体肽结合，表明 Z3G1 比 L66、N547 和 C40G1 结合 M2e 序列的范围更宽。因此，Z3G1 抗体可以用于治疗具有不同 M2 序列的 A 型流感病毒的各种菌株 / 分离物和亚型。

[0483] 表 5. 抗 M2 抗体与 M2 肽的交叉反应性*

[0484]

M2 类似物	Z3G1	L66	N547	C40G1	14C2**
M2	+	+	+	+	+
M2SG	+	+	+	+	+
M2EG	+	+	+	+	+
M2P	+	-	-	+	+
M2G	+	+	+	+	+
M2DLTGS	+	W	+	+	W
M2KNS	+	+	+	+	+
M2LGS	+	W	W	W	-
M2LTKGS	+	+	+	-	-
M2SY	+	+	+	+	+
M2TGEKS	+	+	+	+	-
M2HTGEKS	+	+	+	-	-
M2TGEKS	+	+	+	-	-
M2LTGS	+	+	+	-	-
M2TDGEKS	+	+	+	+	-
M2TGS	+	+	+	W	+
M2TGEK	+	+	+	W	-
M2LTGEKS	+	+	+	W	-
M2K	+	+	+	+	+
M2FG	+	W	W	+	+
M2TGE	+	+	+	W	-
M2KGENS	+	+	+	-	+
M2TES	+	+	+	+	W
M2GHTGKS	-	+	+	-	-
M2PHTGS	W	+	+	-	-

[0485] *与野生型 M2 肽 (SEQ ID NO:1) 的结合相比的百分比：

[0486] <10% :-

[0487] 10-50% :W(弱)

[0488] >50% :+.

[0489] **[1]4C2 是商购的 M2 肽的小鼠单克隆抗体。

[0490] 表 6. 抗 M2 抗体与来自最近的禽流感爆发的 M2 肽变体的结合

[0491]

禽流感	年	亚型	M2 变体	Z3G1	L66	N547	C40G1	14C2
香港	1997	H5N1	M2DLTGS	+	W	+	+	W
			M2LTKGS	+	+	+	—	—
			M2LTGS	+	+	+	—	—
香港	1999	H9N2	M2LTGEKS	+	+	+	W	—
东南亚	2004/2005	H5N1	M2TES	+	+	+	+	W

[0492] 最近的禽流感爆发的 A 型病毒株的 M2e 序列来自疾病控制中心 (CDC) 流感数据库，网址是 http://www.flu.lanl.gov/，这些病毒株如表 4 和 6 所示。M2DLTGS、M2LTKGS 和 M2LTGS 序列来自 1997 年作为对人类的流行性威胁出现的禽类 H5N1A 型流感病毒，M2LTGEKS 和 M2TES 分别来自 1999 和 20004 年爆发的禽流感 A 型病毒。所有这三种病毒株都是高度致病的，导致人类中的高死亡率 (Suzuki，Biol.Pharm.Bull.28 :399(2005) ;Katz，AvianDis.47(3suppl) :914(2003))。为了鉴定能够治疗这些可能的流行性感染的人抗体，研究了人类抗 M2 抗体 nos.Z3G1、L66、N547 和 C40G1 与这 5 种 M2e 变体肽的结合 (表 6)。

[0493] 如表 6 所示，Z3G1 和 N547 结合所有这 5 种 M2e 变体肽和野生型 M2 肽。L66 也与大多数变体结合，M2DLTGS 除外。但是，C40G1 不结合 M2LTKGS 和 M2LTGS，并且仅仅弱结合 M2LTGEKS。作为参照，小鼠单克隆抗 M2 抗体 14C2 仅仅弱结合 M2DLTGS 和 M2TES，而不结合 M2LTKGS、M2LTGS 和 M2LTGEKS。

[0494] 这些结果表明，Z3G1 以及 L66 和 N547 可以提供治疗流行性 H5N1 和 H9N2 威胁和其它潜在的禽流感爆发的强效策略。这些结果也表明，Z3G1 以及 L66 和 N547 能够结合 A 型流感病毒株中存在的宽范围的 M2e 肽。CDC A 型流感病毒数据库的进一步分析表明某些 M2e 序列在人和禽流感病毒中占优势。野生型 M2(SEQ ID NO :2) 主要在人 A 型流感病毒株中表达，M2TES 通常在禽类病毒株中表达。由于 Z3G1、L66、N547 和 C40G1 能够结合 M2TES，这些人抗 M2 抗体可以作为大多数禽流感病毒株 / 分离物和亚型的可能的治疗药物。

[0495] 实施例 3

[0496] 该实施例包括的数据表明 Z3G1 识别的抗原决定簇，其不同于人抗 M2 单克隆抗体 L66、N547 和 C40G1 识别的那些。用具有 M2N 末端和 C 末端截短的多种肽 (表 7 和 8) 对抗体的最小结合序列进行作图。每种抗体的表位在最小结合序列内。

[0497] 数据表明 N547 的抗原决定簇 (即表位) 在氨基酸序列 LLTEVETPIRNEWGC(SEQ ID NO :52) 内 ;L66 识别的表位在氨基酸序列 SLLTEVETPIRNEWGC(SEQ ID NO :53) 内 ;C40G1 识别的表位在氨基酸序列 TPIRNE(SEQ ID NO :54) 内。

[0498] 采用 N 末端的 12 个氨基酸组成的肽 (NM12，SEQ ID NO :69)，通过 ELISA 没有观察到与 C40G1、L66 和 N547 的结合，或仅仅观察到弱结合 (表 7)。相反，Z3G1 与 NM12 的结合良好。进一步用一系列 N 末端肽进行研究，与 M16(16 聚体) 阳性结合，但与其它截短物阴性结合，表明 Z3G1 耐受从 N 末端缺失一个氨基酸 (即 +1 位的丝氨酸)。

[0499] Z3G1 显示与 NM11 的显著结合，而抗体没有可检测地结合 NM10。综合起来，确定 Z3G1 抗体的最小结合序列是 LLTEVETPIR(SEQ ID NO :1)，表明 Z3G1 识别的表位在序列 LLTEVETPIR(SEQ IDNO :1) 内。数据也表明抗体 Z3G1 识别来自 N547、L66 和 C40G1 抗体的不同表位。

[0500] 表 7. 抗 M2 单克隆抗体与 M2 截短肽的结合活性

[0501]

M2 肽	氨基酸序列 Seq ID	ELISA (OD_{450})* Z3G1	L66	N547	C40G1	No.
M2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	2.45	1.04	1.26	2.38	1
M16	LLTEVETPIRNEWGCR	1.73	0.27	1.68	1.75	55
M15	LTEVETPIRNEWGCR	0.05	0.20	0.18	1.93	56
M12	VETPIRNEWGCR	0.05	0.19	0.14	1.95	57
CM17	ETPIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.14	0.14	3.01	58
CM16	TPIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.13	1.41	59
CM15	PIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.15	0.10	60
CM14	IRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.13	0.10	61
CM13	RNEWGCRCNDSSD	0.06	0.15	0.16	0.11	62
CM12	NEWGCRCNDSSD	0.05	0.16	0.14	0.11	63
NM17	SLLTEVETPIRNEWGCR	2.48	1.92	2.22	2.18	64
NM16	SLLTEVETPIRNEWGC	2.38	2.52	2.78	2.17	65
NM15	SLLTEVETPIRNEWG	1.75	0.28	0.33	2.67	66
NM14	SLLTEVETPIRNEW	2.00	0.16	0.16	1.93	67
NM13	SLLTEVETPIRNE	0.13	0.17	0.16	1.82	68
NM12	SLLTEVETPIRN	1.32	0.12	0.16	0.16	69
NM11	SLLTEVETPIR	0.69	0.17	0.15	0.15	29
NM10	SLLTEVETPI	0.09	0.16	0.14	0.11	70
NM9	SLLTEVETP	0.06	0.16	0.13	0.13	71
NM8	SLLTEVET	0.06	0.18	0.15	0.10	72
NM7	SLLTEVE	0.05	0.18	0.14	0.09	73

[0502] *:所有的抗体都以 10μg/ml 使用。

[0503] 表 8. 抗 M2 抗体的最小结合序列

[0504]

抗体	最小结合序列	SEQ ID NO
L66	**SLLTEVETPIRNEWG**	**74**
C40G1	**TPIRNE**	**54**
N547	**LLTEVETPIRNEWG**	**75**
Z3G1	**LLTEVETPIR**	**1**

[0505] 实施例 4

[0506] 本实施例披露了一些动物模型研究，表明在用流感病毒感染之前，施用本发明的 M2 单克隆抗体能够保护动物免受随后的致死病毒攻击。

[0507] 在小鼠 A 型流感病毒模型中抗 M2 单克隆抗体用于预防性处理（在病毒感染之前）的体内效力：

[0508] 为了评估抗 M2 人单克隆抗体在动物模型中的效力，以 100、30 和 10μg/ 小鼠的剂

量，给雌性 C57BL/6J 小鼠 (8-10 周龄) 腹膜内施用抗体 no.Z3G1。抗体施用后 1 天，通过鼻内途径用 30μl(MLD50 的 3.2 倍) 的致死剂量的流感 A/HK/1/68(CDC，Atlanta，GA) 感染麻醉 (15μl/g 的阿佛丁 (1 :1w/v 的 2,2,2 三溴乙醇 :叔 - 戊基 -OH，Sigma，St.Louis，MO)) 的小鼠。作为对照，使用了用 KM 小鼠 TM 制备的同种型匹配的人单克隆抗 -HSA IgG1 抗体 (Kirin，Japan)。每天观察小鼠，一共观察 23 天，以便进行存活分析。在经过所述时间之后，处死存活的小鼠，并且将肺取出，以便进行组织学分析。

[0509] 甚至在低至 10μg/ 小鼠的剂量，抗 M2 抗体 no.Z3G1 处理的小鼠显著受到了保护 (图 2)。10 只小鼠中的全部 10 只 (100％) 在 23 天观察期中仍然存活。相反，在对照组中，10 只小鼠中的 9 只 (90％) 在感染后 22 天内死亡 (图 2)。

[0510] 在小鼠 A 型流感病毒感染模型中通过噬斑测定测量的 Z3G1 对病毒复制的体内抑制

[0511] 用 30μl 亚致死剂量的流感病毒 A/HK/1/68(CDC,Atlanta,GA) 鼻内感染麻醉的雌性 C57BL/6J 小鼠 (6-8 周龄)。麻醉是用阿佛丁按照上文的描述进行的。在第 2、5、7、9、11 天取出感染的小鼠的肺，通过噬斑测定确定病毒滴度。为了确定抗 M2 单克隆抗体对流感病毒的预防性处理的效力，在病毒感染前 1 天施用 30μg Z3G1。同种型匹配的抗 HSA IgG1 抗体用作对照。

[0512] 图 3 的结果表明，在感染后 2 天，在 Z3G1 处理的小鼠中检测不到病毒。相反，在感染后 2 天，在同种型对照 (HSA) 处理的小鼠中观察到肺中存在 $3.95x10^4$pfu/g 的病毒。感染后 5 天，Z3G1 处理的小鼠的肺中存在 212pfu/g 的病毒。相反，在感染后 5 天，在对照 (HSA) 处理的小鼠中病毒滴度增加到 $45x10^4$pfu/g 肺。因此，Z3G1 处理导致病毒滴度减少约 1,000-10,000 倍。在感染后 7 天，病毒滴度下降，在感染后 11 天，病毒基本清除，这可能是基于宿主获得性免疫对病毒的清除。数据证明抗 M2 抗体 Z3G1 在体内有效抑制流感病毒复制。

[0513] 实施例 5

[0514] 该实施例描述的研究表明本发明的 M2 单克隆抗体具有补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性。

[0515] 抗 M2 抗体的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性

[0516] 由于 M2 蛋白在感染的细胞表面高表达，抗 M2 抗体保护宿主细胞免受 A 型流感病毒感染的机理之一是激活补体，其增强调理，并且裂解感染的细胞，从而杀灭病毒并且防止病毒体内繁殖。因此，研究了抗 M2 抗体在体外对 A 型流感病毒感染的细胞的补体依赖性细胞毒性。

[0517] 将 MDCK 细胞以 $2.5x10^5$ 细胞 /mL 和 150μl/ 孔铺板到 96 孔平底平板 (**Falcon®**) 上的完全基本必需培养基 (cMEM) 中，该培养基含有 20mM L 谷氨酰胺、10mM 丙酮酸钠、1000 单位 /mL 青霉素 - 链霉素、MEM 维生素溶液、补加了 10％胎牛血清 (FBS) 的 MEM Eagle 非必需氨基酸 (Invitrogen,Carlsbad,CA)，将细胞在 7％ CO_2，37℃下培养 24 小时。24 小时后，用 PBS 洗涤平板两次，室温下定期搅拌的条件下用 30μl/ 孔的 10 倍 TCID50A 型流感病毒 (A/PR/8/34 ;ATCC,Rockville,MD) 感染 30 分钟。感染后，用 PBS 洗涤平板 1 次，加入溶于 cMEM 中的 150μl 1μg/mL 的胰蛋白酶 (TPCK- 处理的，Worthington，Biochem.Corp.)，将平板在 7％ CO_2，37℃下温育 26 小时。然后用基本必需培养基 (MEM) 洗涤细胞单层三次。以需要的

浓度将抗体在封闭缓冲液（用于基于细胞的ELISA的相同缓冲液）中稀释，在每个孔中加入50μl，室温下温育30分钟。温育后，用MEM洗涤孔一次。在孔中加入在1mL MEM中重配并且进一步稀释为1:10的100μL Low Tox M兔补体(Cedarlane Lab Limited-Accurate, Hornby, Ontario, CANADA)。37℃下温育1小时后，用MEM洗涤细胞单层三次，按照制造商的说明，用CellTiter **96®** AQ_{ueous} 一溶液细胞增殖测定(Promega, Madison, WI)确定存活细胞的数目。存活细胞的数目越大，495nm处的光密度越高。

[0518] 如图4所示，当用去污剂(Triton X-100)裂解细胞时，光密度低于0.2。这被认为是显示最大杀伤的阳性对照。同种型对照人抗体(HSA)在任何浓度都不能裂解A型流感病毒感染的MDCK细胞。相反，研究中的所有人抗M2抗体(Z3G1、L66、N547和C40G1)都以剂量依赖性方式裂解病毒感染的MDCK细胞。所有抗体在1μg/mL都裂解细胞，裂解作用接近在10μg/mL剂量观察到的最大杀伤。

[0519] 抗M2抗体的抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性

[0520] 由抗M2抗体结合的A型流感病毒感染的细胞可以被称作天然杀伤细胞(NK细胞)的特化的非T、非B淋巴样细胞杀灭。NK细胞对抗体结合的靶细胞的破坏称作抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)，并且是抗M2抗体能够保护宿主免受A型流感病毒感染的另一种机理。

[0521] 将MDCK细胞以$0.25x10^5$细胞/mL添加10％FBS的cMEM和150μl/孔铺板到96孔平底平板（**Falcon®**）上，在7％CO_2，37℃下培养24小时。24小时后，用PBS洗涤平板两次，室温下定期搅拌的条件下用30μl/孔的10倍TCID50A型流感病毒(A/PR/8/34；ATCC, Rockville, MD)感染30分钟。感染后，用PBS洗涤平板1次，加入溶于cMEM中的150μl 1μg/mL的胰蛋白酶(TPCK-处理的，Worthington, Biochem.Corp.)，将平板在7％CO_2，37℃下温育22小时。然后用封闭缓冲液洗涤细胞单层三次。以5μg/mL将抗体加入50μL/孔的封闭缓冲液中，在室温下温育30分钟。温育后，用封闭缓冲液洗涤孔1次，根据制造商的说明，用MACS纯化系统(MiltenyiBiotec, Inc., Auburn, CA)纯化来自正常人外周血的NK细胞。以不同的细胞数目将在含有RPMI1640(无酚红)的10％低IgFCS(Invitrogen, Carlsbad, CA)中与200ng/mL人IL-2一起预先温育的NK细胞加入孔中。根据制造商的说明，通过CytoTox **96®**非放射性细胞毒性测定系统(Promega, Madison, WI)确定细胞裂解。

[0522] 当存在$0.5x10^5$个NK细胞时，研究中的所有人抗M2抗体，即Z3G1、L66、N547和C40G1，都能够裂解大约50％的病毒感染的MDCK细胞。相反，用IgG1同种型对照抗体(HSA)仅仅观察到25％的裂解。在对照组中观察到了所述25％的非抗体包被的靶细胞裂解，这是因为激活的NK细胞能够裂解病毒感染的细胞和非自身细胞如MDCK细胞。但是，当靶细胞结合于抗M2抗体时，裂解可以增强到50％。因此，所有四种人抗M2抗体都具有ADCC活性。

[0523] 实施例6

[0524] 该实施例包括证明了抗M2人单克隆抗体Z3G1的预防和治疗活性的研究。该实施例也包括了表明抗M2人单克隆抗体Z3G1在猴中具有很少毒性（如果有）的研究。

[0525] 抗M2人单克隆抗体Z3G1对NK细胞消除（免疫受损）的动物中A型流感病毒感染的体内预防作用

[0526] NK细胞消除：为了消除NK细胞，用100μgPK136(ATCC, Manassas, VA)处理

C57BL/6J 小鼠，所述 PK136 是一种小鼠单克隆 IgG2a 抗体，其针对已知在 NK 细胞中特异性表达的 NK1.1 抗原。同种型匹配的抗体（克隆 C44，ATCC）用作对照。在感染前 2 和 5 天，以及感染后 1 和 4 天给予抗体。注射三次抗 NK1.1 抗体或对照抗体后，处死每组各一只小鼠，收集淋巴结、脾和外周血。通过红细胞裂解缓冲液 (Sigma，St Louis，MO) 裂解红细胞后，制备单细胞悬浮液，用抗 Fc 受体抗体（来自 eBioscience 的克隆 2.4G2）封闭 20 分钟后，在冰上用 DX5FITC 和 CD3PE(eBioscience，San Diego，CA) 或合适的同种型对照染色 45 分钟。用含有 2％ FCS、10mM EDTA、0.05％ NaN3 的 PBS 洗涤两次后，再用 PBS 洗涤一次后，用 4％低聚甲醛将细胞固定 30 分钟，然后通过流式细胞术分析。DX5 是小鼠中的 NK 标记。基于悬浮液中总细胞数中的 DX5 阳性细胞数，计算每种组织中存在的 NK 细胞百分比。

[0527] 抗 M2 抗体对 NK 细胞消除的小鼠中 A 型流感感染的治疗：

[0528] 在病毒感染前一天，以 100μg/ 小鼠的剂量腹膜内施用抗 M2 抗体 Z3G1。作为对照，以 100μg/ 小鼠施用同种型匹配的人单克隆抗人血清白蛋白 (HSA)IgG1 抗体。为了病毒感染，用 15μl/g 的阿佛丁 (1：1w/v 的 2，2，2 三溴乙醇：叔－戊基 -OH，Sigma，St.Louis，MO)) 麻醉小鼠，鼻内施用 30μL 致死剂量的 (MLD50 的 3.2 倍）的流感病毒 A/HK/1/68(CDC，Atlanta，GA)。然后每天观察小鼠的存活，观察 23 天。

[0529] 如下表 9 所示，与同种型对照抗体处理的小鼠相比，NK 细胞百分比在用抗 NK1.1 抗体处理的小鼠中分析的所有三种组织中都减少。在淋巴结中，代表 NK 细胞的 DX5 阳性细胞从 0.93％减少到 0.02％，在脾中从 1.74％减少到 0.52％，在外周血中从 3.45％减少到 0.75％。这些结果表明，用抗 NK1.1 处理，有效消除了 NK 细胞。

[0530] 表 9：用抗 NK1.1 抗体处理的小鼠和用同种型对照抗体处理的小鼠中的 DX5+ 细胞百分比

[0531]

	淋巴结（％）	脾（％）	外周血（％）
同种型对照抗体处理的小鼠	0.93	1.74	3.45
抗 NK1.1 抗体处理的小鼠	0.02	0.52	0.75

[0532] 抗 M2 抗体 Z3G1 对 NK 细胞消除的小鼠中的 A 型流感感染的保护作用

[0533] 100μg/ 小鼠的抗 M2 抗体 Z3G1 在 NK 细胞消除 (Z3G1/NK-) 或未消除 (Z3G1/NK+) 的条件下都保护小鼠免受 A/HK/1/68 感染；而同种型对照抗 HSA 抗体不保护小鼠免受病毒感染，无论 NK 细胞是否消除（图 6；HSA/NK- 和 HSA/NK+)。在 Z3G1/NK- 和 Z3G1/NK+ 组中，分别有 7 只小鼠中的 6 只和 8 只小鼠中的 6 只在 23 天的观察期中存活。在这两组中没有观察到统计学差异 ($p>0.05$，通过 Kaplan Meier 存活分析）。相反，在 HSA/NK- 和 HSA/NK+ 组中，分别是 8 只小鼠中的 1 只和 8 只小鼠中的 0 只存活。在 NK 消除和未消除条件下 Z3G1 处理和抗 HAS 处理组之间受感染小鼠的存活时间的改变是统计学显著的 ($p<0.001$)。

[0534] 已经报道了关于包含与 HBc（乙型肝炎病毒核心颗粒）偶联的 M2 细胞外部分的疫苗的作用 (Jegerlehner，等，J.Immunol.172：5598(2004))。这些作者报道了在 NK 细胞消除条件下疫苗对感染的作用减弱。此外，这些作者报道，当 NK 细胞消除时，从 M2-HBc 接种的小鼠获得的血清的被动转移不保护小鼠免受 A 型流感病毒的致死攻击。这些结果表明，M2-HBc 疫苗对 A 型流感病毒感染的保护作用主要是由 NK 细胞介导的。相反，即使是在 NK 细胞消除条件下，抗 M2 抗体 Z3G1 有效保护小鼠免受致死的 A 型流感病毒攻击。这些结果表明，抗 M2 人单克隆抗体 Z3G1 在免疫受损的受试者如 NK 功能可能受损的癌症患者中是有

效的。这些结果也表明，用抗 M2 抗体 Z3G1 进行的被动免疫治疗与疫苗相比可能提供更优越的抗 A 型流感病毒感染的保护作用。

[0535] 抗 M2 抗体 Z3G1 对小鼠中 A 型流感病毒感染的治疗作用

[0536] 用 30μL 致死剂量的 (MLD50 的 3.2 倍) 的流感病毒 A/HK/1/68(CDC,Atlanta,GA) 鼻内感染麻醉的小鼠 (15μl/g 的阿佛丁 (1:1w/v 的 2,2,2 三溴乙醇:叔-戊基-OH(Sigma, St.Louis,MO))。以 200、100 和 30μg/ 小鼠的剂量，给雌性 C57BL/6J 小鼠 (8-10 周龄) 腹膜内施用 Z3G1。作为对照，以 200μg/ 小鼠施用同种型匹配的人单克隆抗 HSA IgG1 抗体。观察小鼠存活，共观察 23 天。

[0537] 数据示于图 7。在对照抗 HSA IgG1 组中，到感染后 11 天，8 只小鼠中有 7 只死亡。相反，在 200μg/ 小鼠 Z3G1 处理的组中，到感染后 11 天，8 只小鼠中有 7 只存活，在第 23 天，8 只小鼠中有 4 只存活。对照组和 200μg/ 小鼠 Z3G1 处理的组之间存活率的时程改变是统计学显著的 ($p<0.02$，Kaplan Meyer 存活分析)。在 100μg/ 小鼠的剂量，在第 11 天和 23 天，分别有 8 只小鼠中的 7 只和 8 只小鼠中的 3 只存活，但与对照组相比，该差异不是统计学显著的 ($p = 0.068$)。在 30μg/ 小鼠的剂量，在第 11 天和 23 天，分别有 8 只小鼠中的 3 只和 8 只小鼠中的 1 只存活，与对照组相比，在治疗组中没有观察到保护作用。这些结果表明，即使在流感病毒感染后施用抗体，抗 M2 抗体 Z3G1 对 A 型流感病毒感染也具有治疗作用。

[0538] 单剂 Z3G1 在猕猴中的毒性研究

[0539] 为了评估 Z3G1 的毒性，通过静脉输注，在大约 45 分钟的时间中以 30mg/kg 的单剂给两只猕猴施用抗体。研究动物 3 周，此后尸检。作为对照，将运载体 PBS 给予两只猕猴。与对照组相比，用 30mg/kgZ3G1 处理没有有意义地改变临床观察结果，如摄食和体重。抗体对血液学参数和血清化学没有特定作用，表明临床病理也没有有意义的改变。综合起来，用 30mg/kg Z3G1 单次静脉内处理猕猴，基于测试的参数，如血清化学、血液学、摄食、体重、大体病理或组织病理，没有表现出任何可注意的毒性。看起来 Z3G1 是良好耐受的。

[0001]

序列表

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA
KATO, Shinichiro
WANG, Rongfang

<120> 针对流感病毒 M2 蛋白的人单克隆抗体及其制备和使用方法

<130> PH-2791-PCT

<140> PCT/IB2005/004146
<141> 2005-12-05

<150> 60/633,846
<151> 2004-12-06

<150> 60/724,198
<151> 2005-10-06

<160> 75

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 1

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg

1 5 10

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 2

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

[0002]

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 3

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Gly Asp
20

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 4

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp
20

<210> 5
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 5

Ser Leu Pro Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

[0003]

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 6

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp
20

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 7

Ser Leu Leu Thr Glu Val Asp Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 8

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Lys Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Asn Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 9
<211> 23

[0004]

<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 9

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Ile Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 10

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 11

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Tyr Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

[0005]

<400> 12

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 13

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 14
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 14

Ser Leu Leu Thr Glu Val Lys Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 15

[0006]

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 16
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 16

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asp Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 17

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 18

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

[0007]

Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 19

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 20

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 21

Ser Phe Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

[0008]

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp
20

<210> 22
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 22

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 23
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 23

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Lys Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Asn Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 24
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 24

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

[0009]

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 25

Ser Leu Leu Thr Gly Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 26
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 26

Ser Leu Leu Pro Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 27

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒

[0010]

<400> 28

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile
1 5

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 29

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 30

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 31

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg
1 5

<210> 32
<211> 411
<212> DNA
<213> 人

<400> 32
atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

[0011]

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccagc tatggtatca gctgggtgcg acaggccccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgcttaca atggtaacac aaactatgca 240

cagaagctcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag ggcagcagct 360

ggcggatact tccagcactg gggccagggc accctggtca ccgtctcctc a 411

<210> 33
<211> 708
<212> DNA
<213> 人

<400> 33
atggccagct tccctctcct cctcaccctc ctcactcact gtgcagggtc ctgggcccag 60

tctgtgctga ctcagccacc ctcagcgtct gggacccccg ggcagagggt caccatctct 120

tgttctggaa gcaactccaa catcggaagt aaaactgtaa actggtacca gcagctccca 180

ggaacggccc ccaaactcct catctctagt aataatcagc ggccctcagg ggtccctgac 240

cgattctctg gctccaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg gctccagtct 300

gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgaatgg tgtggtattc 360

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 420

ttcccaccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480

gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540

ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 600

ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacaaaagct acagctgcca ggtcacgcat 660

gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag 708

<210> 34
<211> 137
<212> PRT
<213> 人

[0012]

<400> 34

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 35
<211> 235
<212> PRT
<213> 人

<400> 35

Met Ala Ser Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly
1 5 10 15

[0013]

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile
35 40 45

Gly Ser Lys Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
85 90 95

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp
100 105 110

Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
115 120 125

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

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
195 200 205

[0014]

Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 36
<211> 1404
<212> DNA
<213> 人

<400> 36
atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccagc tatggtatca gctgggtgcg acaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgcttaca atggtaacac aaactatgca 240

cagaagctcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag ggcagcagct 360

ggcggatact tccagcactg gggccagggc accctggtca ccgtctcctc agctagcacc 420

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

[0015]

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 37
<211> 467
<212> PRT
<213> 人

<400> 37

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

[0016]

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

[0017]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

[0018]

<210> 38
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 38
tcttgtccac cttggtgttg ctgggcttgt g 31

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 39
ggggccactg tcttctccac ggtgctc 27

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 40
ggtgccaggg ggaagaccga tgg 23

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 41
cacggctccc gggtagaagt cact 24

[0019]

<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：引物

<400> 42
gtaaaacgac ggccagtg 18

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：引物

<400> 43
caggaaacag ctatgac 17

<210> 44
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：引物

<400> 44
agagagagag gtcgacccac catggactgg acctggagca tcctttt 47

<210> 45
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：引物

<400> 45
gagagagagg ctagctgagg agacggtgac cagggtg 37

[0020]

<210> 46
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 46
agagagagag atctcaccat ggccagcttc cctctcctcc t 41

<210> 47
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 47
agagagagag gaattcctat gaacattctg taggggccac tgtc 44

<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 48
ggtacgtgaa ccgtcagatc gcctgga 27

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 49

[0021]

tctatataag cagagctggg tacgtcc 27

<210> 50
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 50
tgcacgccgc tggtcagggc gcctgagttc c 31

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 51
tctcataagt gacttctacc cgggagc 27

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 52

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 53

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

[0022]

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 54

Thr Pro Ile Arg Asn Glu
1 5

<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 55

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg
1 5 10 15

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 56

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg
1 5 10 15

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 57

Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg
1 5 10

<210> 58
<211> 17

[0023]

<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 58

Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser
1 5 10 15
Asp

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 59

Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 60

Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
1 5 10 15

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 61

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 流感病毒

[0024]

<400> 62

Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
1 5 10

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 63

Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
1 5 10

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 64

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15
Arg

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 65

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 66

[0025]

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

<210> 67
<211> 14
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 67

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp
1 5 10

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 68

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu
1 5 10

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 69

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5 10

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 70

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile
1 5 10

[0026]

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 71

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 72

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 73

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu
1 5

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 74

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

<210> 75

[0027]

<211> 14
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 75

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10

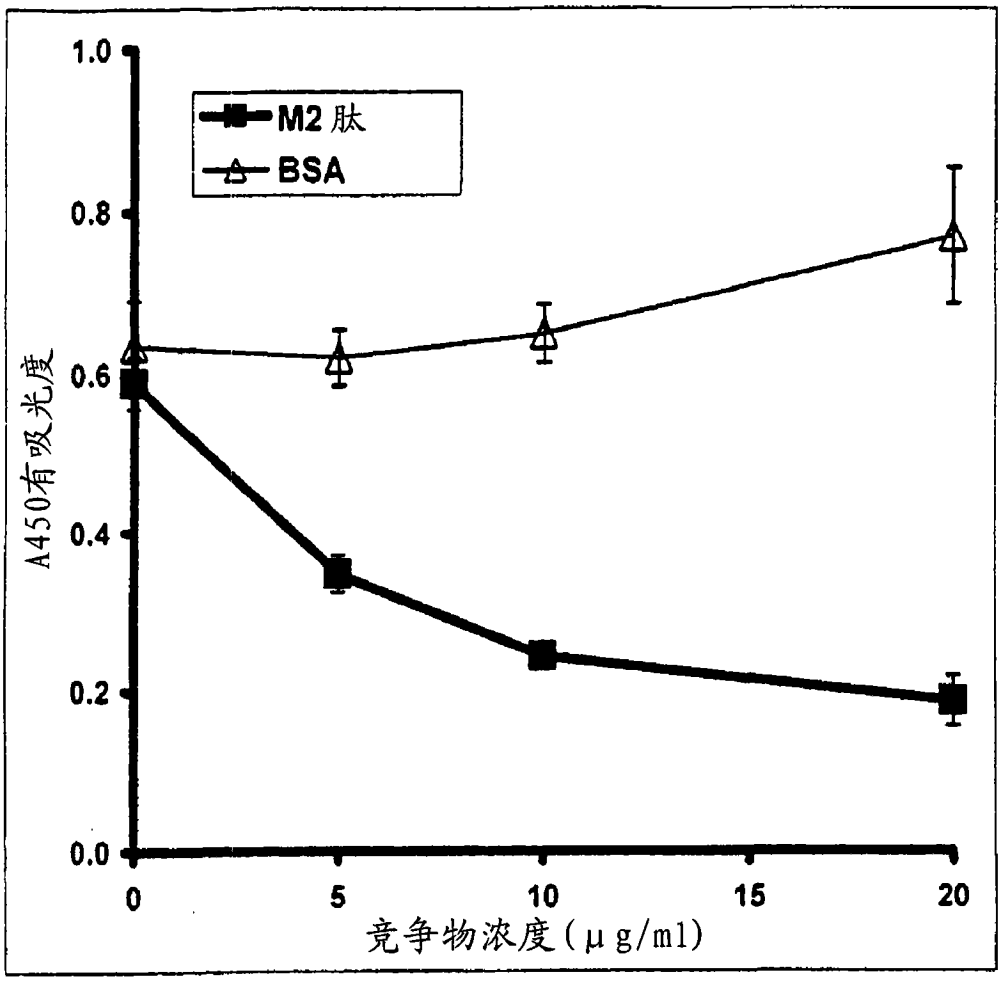


图 1

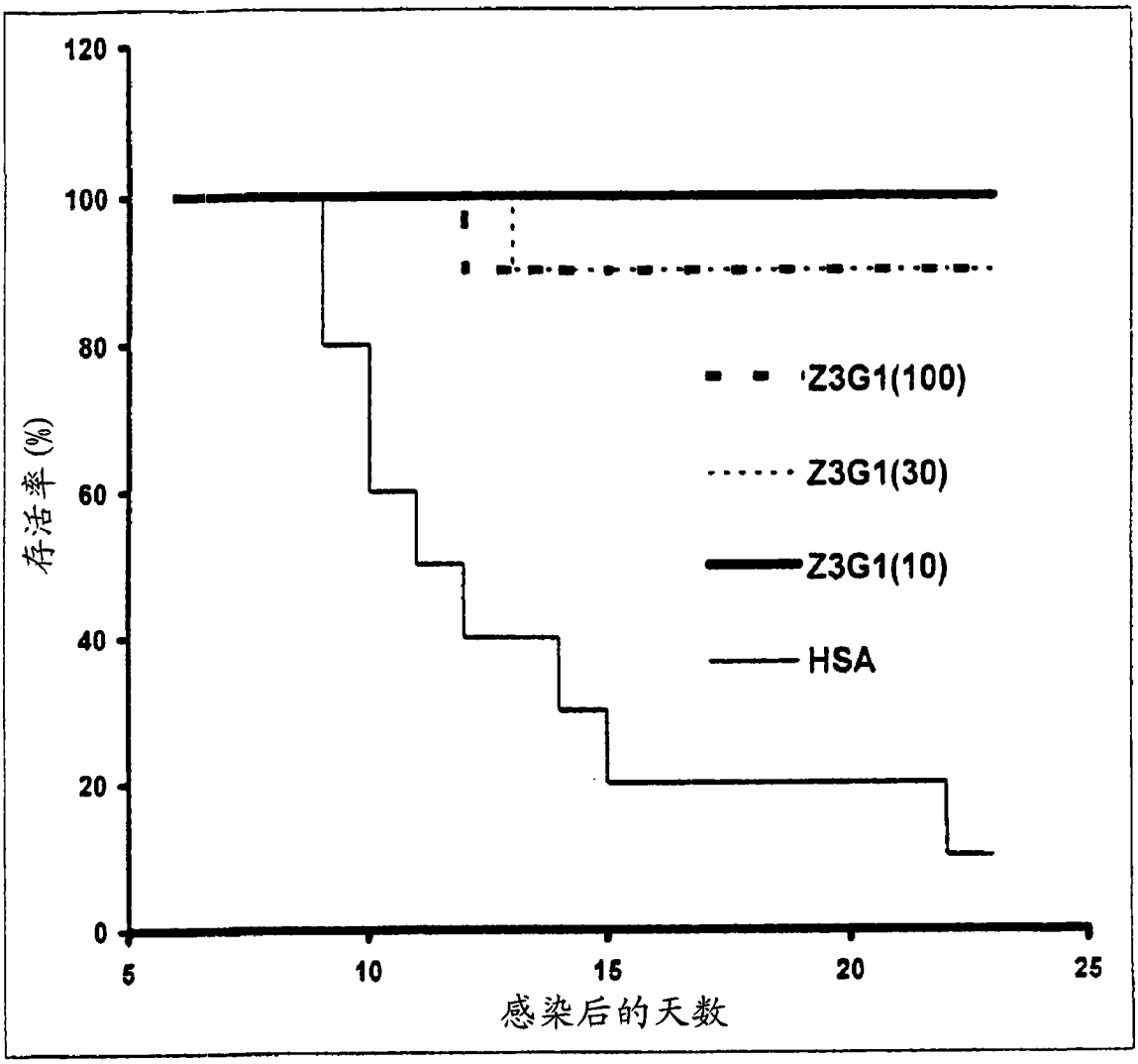

120
100
80
60
40
20
0
存活率 (%)
5
10
15
20
25
感染后的天数
Z3G1(100)
Z3G1(30)
Z3G1(10)
HSA

图 2

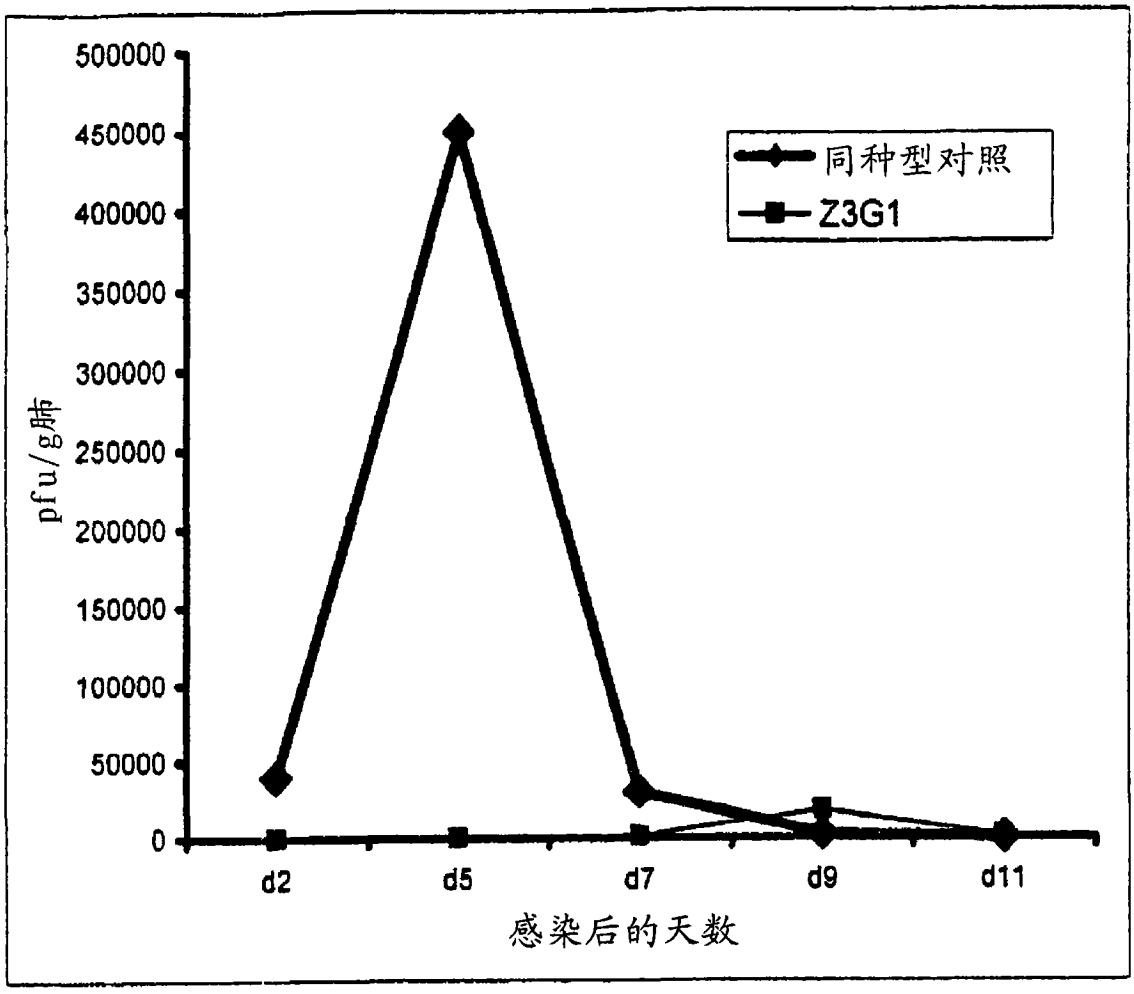

500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
pfu/g肺
同种型对照
Z3G1
d2
d5
d7
d9
d11
感染后的天数

图 3

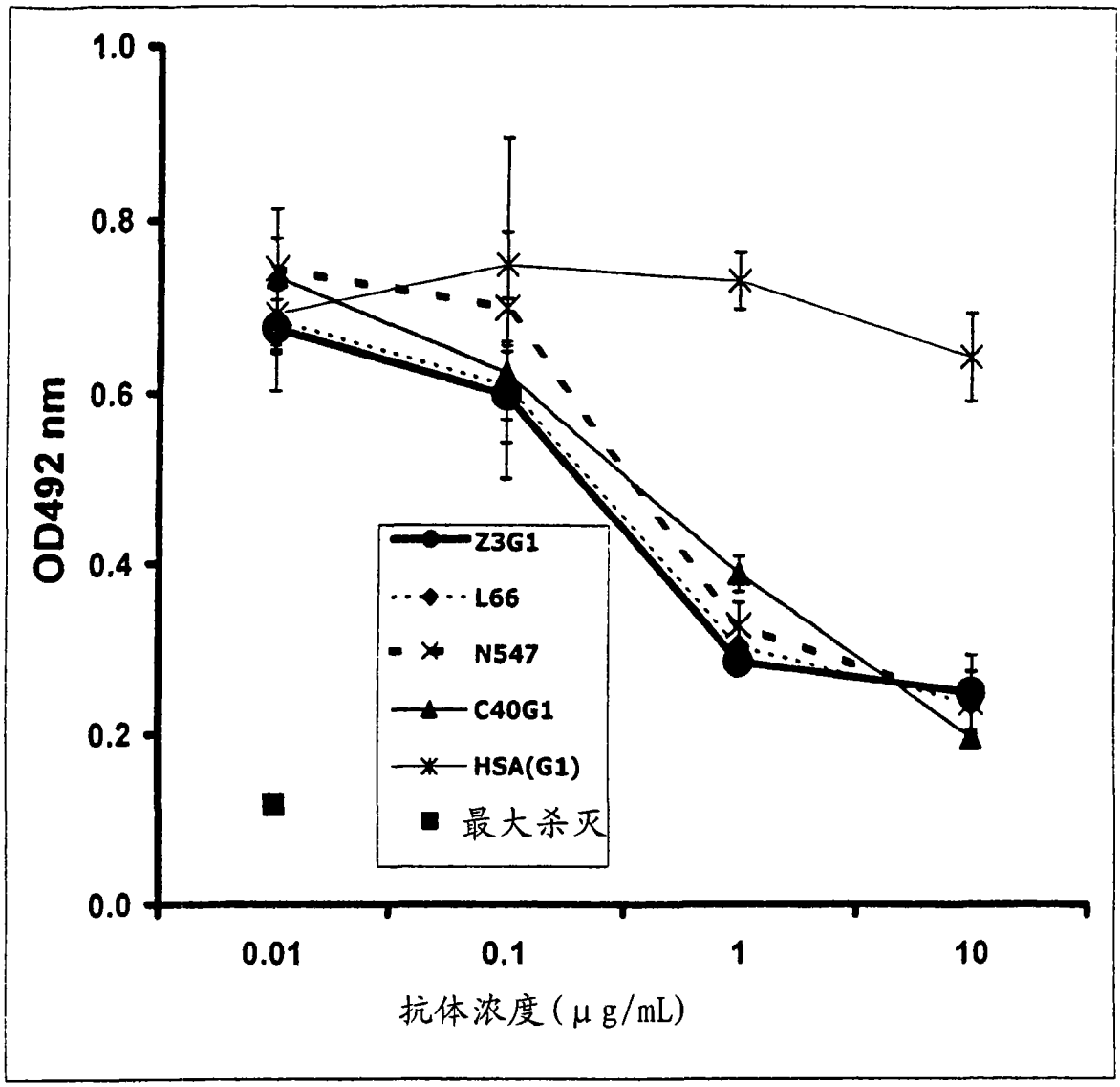

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD492 nm
Z3G1
L66
N547
C40G1
HSA(G1)
最大杀灭
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)

图 4

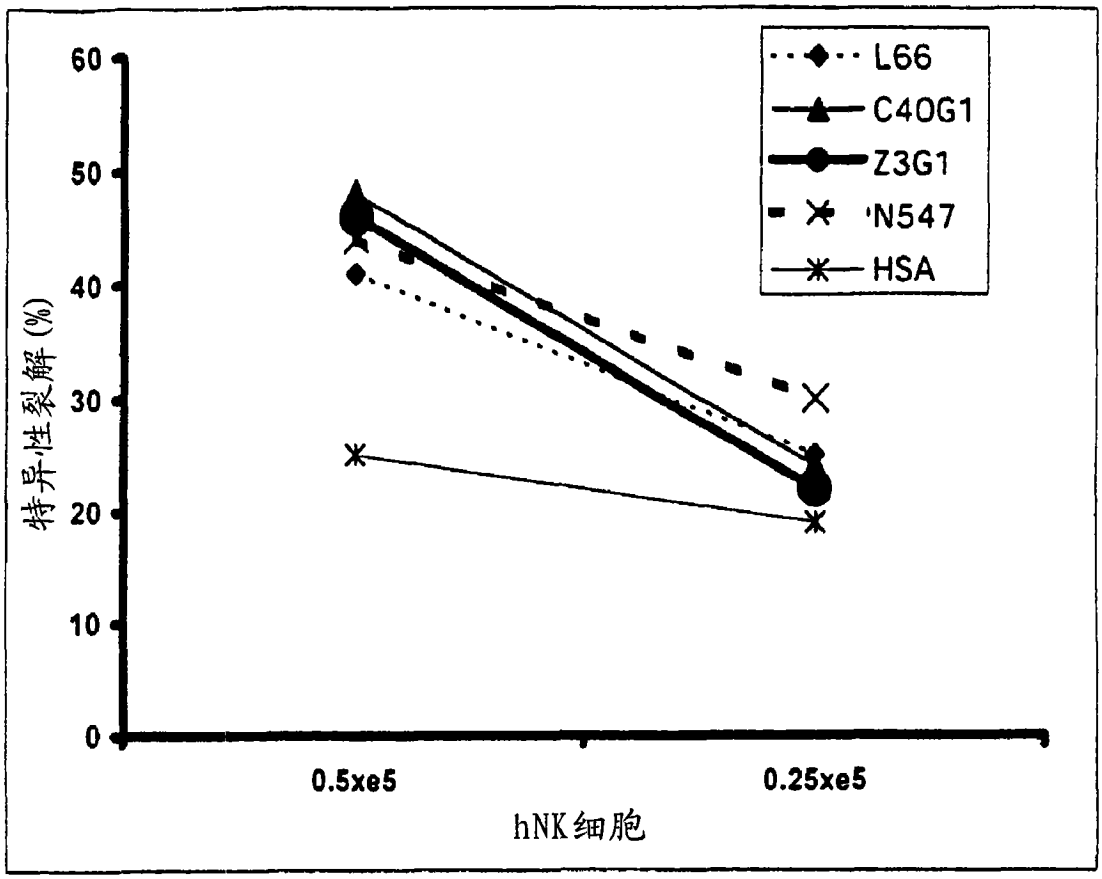

60
50
40
30
20
10
0
特异性裂解(%)
0.5xe5
0.25xe5
hNK细胞
L66
C40G1
Z3G1
'N547
HSA

图 5

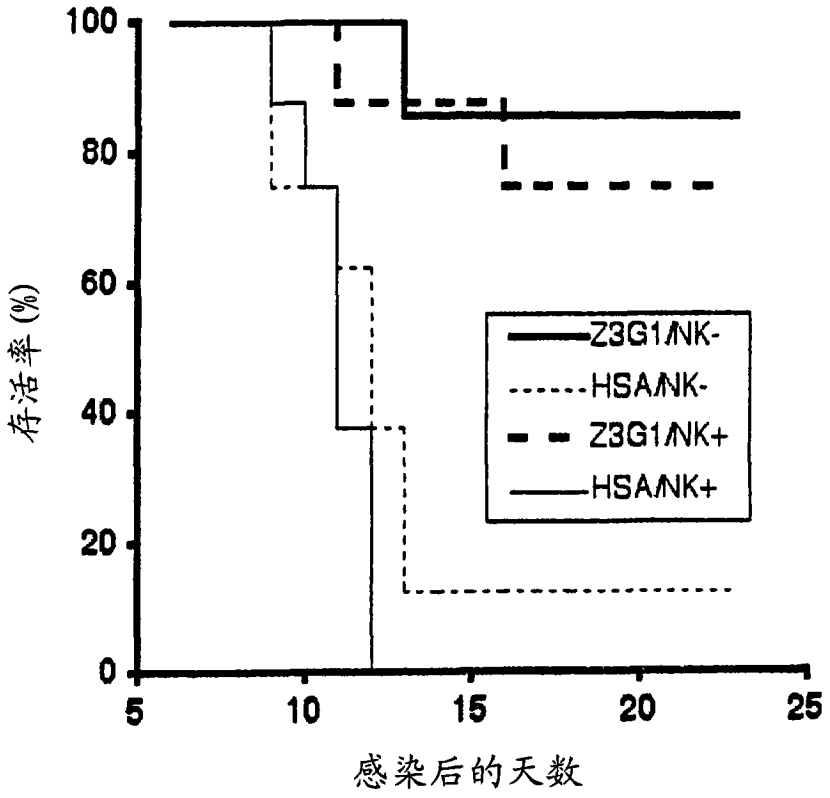


图 6Z3G1 抗体在 NK 细胞消除的条件下保护小鼠免受致死剂量的 A/HK/1/68 攻击

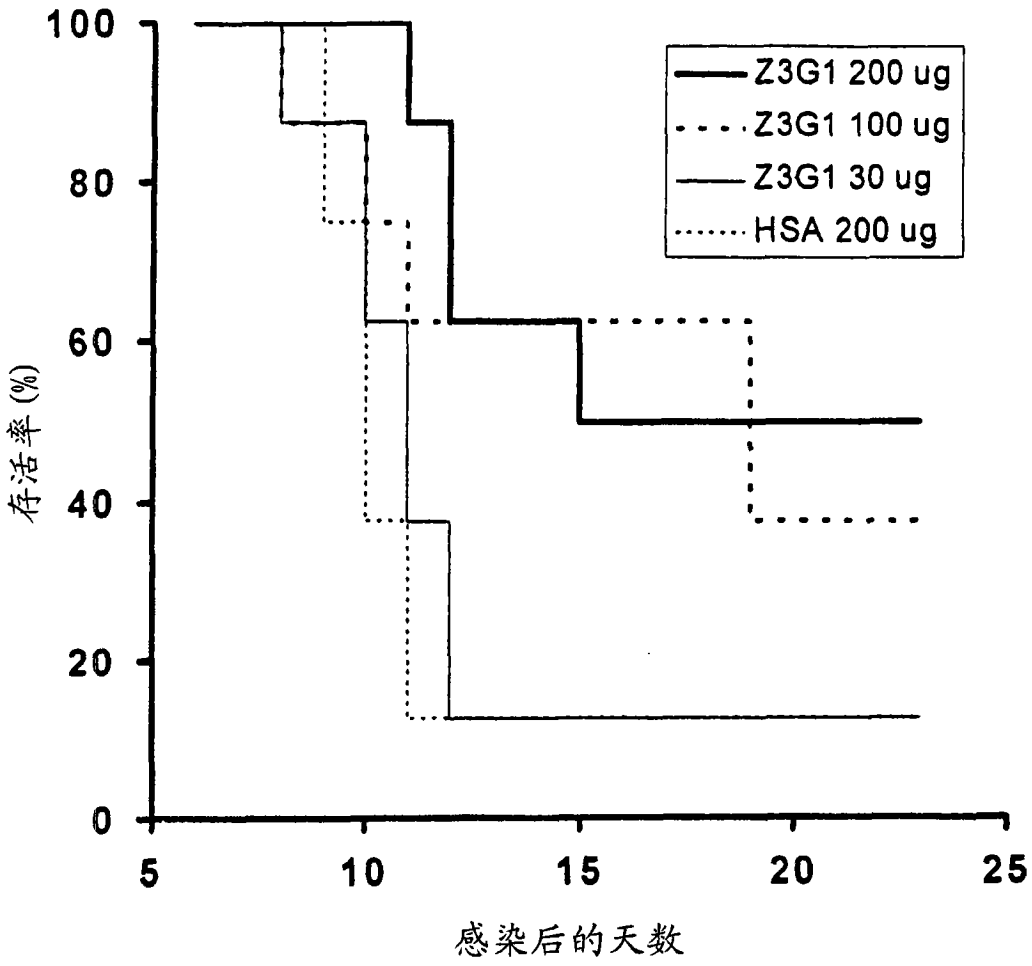


图 7Z3G1 抗体以治疗方案保护小鼠免受致死剂量的 A/HK/1/68 攻击