(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697789 A
(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780006087.5

(22)申请日 2017.01.12

(30)优先权数据
62/278068 2016.01.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/013086 2017.01.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/123685 EN 2017.07.20

(71)申请人 免疫医疗有限责任公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 N.卡勒瓦德-勒莱 R.马洛里 G.罗比 S.任

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 梁谋 罗文锋

(51)Int.Cl.
A61K 39/145(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
C07K 14/11(2006.01)
C07K 16/08(2006.01)
C07K 16/10(2006.01)
C12N 15/44(2006.01)

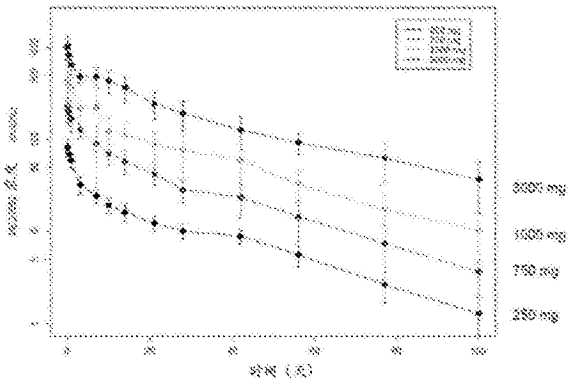
权利要求书3页 说明书36页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

治疗甲型流感的方法

(57)摘要

在此提供了用于治疗、减轻或预防患者的甲型流感病毒感染的方法，以及用于治疗、减轻或预防患者的甲型流感病毒感染的组合物和制品。



CN 108697789 A

1.一种治疗患者的甲型流感病毒感染的方法，该方法包括向该患者给予至少约200mg且至多约3500mg抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素。

2.一种减轻患者的甲型流感病毒感染的方法，该方法包括向该患者给予至少约200mg且至多约3500mg抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素。

3.一种预防患者的甲型流感病毒感染的方法，该方法包括向该患者给予至少约200mg且至多约3500mg抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中该抗甲型流感抗体或其片段以至少约250mg且至多约3000mg的剂量给予。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中该抗甲型流感抗体或其片段能够中和甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中给予包括胃肠外给予。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中给予包括静脉内给予。

8.根据权利要求7所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段作为单一剂量给予。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段在该患者暴露于甲型流感病毒、感染甲型流感病毒、表现出甲型流感病毒感染症状、或其组合之后给予。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段在该患者暴露于甲型流感病毒、感染甲型流感病毒、表现出甲型流感病毒感染症状、或其组合之前给予。

11.根据权利要求1-8中任一项所述的方法，其中将抗甲型流感抗体或其片段在暴露、感染、症状发作或其组合的30天内给予受试者。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列，以及如下VL，

该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75%一致性的氨基酸序列。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中抗甲型流感抗体包含MEDI8852。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中该抗体或其片段与一种或多种小分子抗病毒药物组合给予。

18.根据权利要求17所述的方法，其中该小分子抗病毒药物选自奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®)、金刚烷胺和金刚乙胺。

19.一种用于治疗患者的甲型流感病毒感染的组合物，该组合物包含能够与甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素结合的抗甲型流感抗体或其片段，该组合物被配制用于向患者给予至少约200mg且至多约3500mg的抗甲型流感抗体或其片段。

20.一种用于减轻患者的甲型流感病毒感染的组合物，该组合物包含能够与甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素结合的抗甲型流感抗体或其片段，该组合物被配制用于向患者给予至少约200mg且至多约3500mg的抗甲型流感抗体或其片段。

21.一种用于预防患者的甲型流感病毒感染的组合物，该组合物包含能够与甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素结合的抗甲型流感抗体或其片段，该组合物被配制用于向患者给予至少约200mg且至多约3500mg的抗甲型流感抗体或其片段。

22.根据权利要求19-21中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。

23.根据权利要求19-22中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75%一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75%一致的氨基酸序列。

24.根据权利要求19-23中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

25.根据权利要求19-24中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75%一致性的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75%一致性的氨基酸序列。

26.根据权利要求19-25中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所

示的氨基酸序列。

27.根据权利要求19-26中任一项所述的组合物，其中抗甲型流感抗体包含MEDI8852。

28.根据权利要求19-27中任一项所述的组合物，其中该组合物进一步包含药学上可接受的载体。

29.根据权利要求19-28中任一项所述的组合物，其中该组合物进一步包含一种或多种小分子抗病毒药物。

30.根据权利要求29所述的组合物，其中该小分子抗病毒药物选自奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®)、金刚烷胺和金刚乙胺。

31.一种包含容器和在该容器内的组合物的制品，其中该组合物包含能够与甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素结合的抗甲型流感抗体或其片段，以及向患者给予至少约200mg且至多约3500mg抗甲型流感抗体或其片段的说明。

32.根据权利要求31所述的制品，其中该标签或包装说明书包括以至少约200mg且至多约3500mg的剂量给予抗甲型流感抗体或其片段的说明。

33.根据权利要求31或32所述的制品，其中抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。

34.根据权利要求31-33中任一项所述的制品，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。

35.根据权利要求31-34中任一项所述的制品，其中抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

36.根据权利要求31-35中任一项所述的制品，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。

37.根据权利要求31-36中任一项所述的制品，其中抗甲型流感抗体或其片段包含如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

38.根据权利要求31-37中任一项所述的制品，其中抗甲型流感抗体包含MEDI8852。

39.根据权利要求31-38中任一项所述的制品，其进一步包含一种或多种小分子抗病毒药物。

40.根据权利要求39所述的制品，其中该小分子抗病毒药物选自奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®)、金刚烷胺和金刚乙胺。

41.根据权利要求31-40中任一项所述的制品，其中该组合物进一步包含药学上可接受的载体。

治疗甲型流感的方法

[0001] 对以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 将与本申请一起提交的序列表的内容通过引用以其全文结合在此。本申请通过引用并入作为文本文件与本申请一起提交的序列表，该文本文件为FLUA200P1_seq_listing，其创建于2015年1月12日并且具有5.21千字节的大小。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗、减轻或预防受试者的甲型流感病毒感染的方法、组合物和制品。

背景技术

[0004] 流感病毒引起每年的流感流行和偶然的大流行，这对全世界公共健康构成重大威胁。季节性流感感染与每年200,000-500,000例死亡相关，特别是在幼儿、免疫功能低下的患者和老年人中。死亡率典型地在具有大流行性流感爆发的季节期间进一步增加。仍然存在对用于预防和治疗流感感染(特别是在服务不足的人群中)的强效抗病毒疗法的显著未满足的医疗需求。

[0005] 存在三种类型的流感病毒(甲型、乙型和丙型)。甲型流感病毒可以感染各种各样的鸟类和哺乳动物，包括人、猪、鸡以及雪貂。甲型流感病毒可以基于编码表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的两个基因的抗原区中的等位基因变异而分类为亚型。HA是受体结合和膜融合糖蛋白，其介导病毒附着和进入靶细胞；HA是保护性体液免疫应答的主要靶标。HA蛋白是三聚体结构的并且包括单一多肽前体(HA0)的三个拷贝，该多肽前体在蛋白水解成熟时裂解成含有球状头部(HA1)和茎区(HA2)的pH依赖性、亚稳定的中间体。膜远侧“球状头部”构成HA1结构的大部分并且包含用于病毒进入的唾液酸结合口袋和主要抗原结构域。从HA2和一些HA1残基组装的膜近侧“茎”结构包含融合机器，其在晚期胞内体的低pH环境中经历构象变化以触发膜融合和渗透至细胞中。甲型流感亚型之间的序列同源性程度在HA1中(亚型之间34％-59％同源性)比在HA2区中(51％-80％同源性)低。由流感病毒感染引发的中和抗体通常靶向可变HA1球状头部以防止病毒受体结合且通常是病毒株特异性的。已经鉴定了几种广泛的交叉反应性单克隆抗体，其靶向HA的球状头部(Krause等人，(2011)J.Virol.[病毒学杂志]85；Whittle等人，(2011)PNAS[美国国家科学院院刊]108；Ekiert等人，(2012)Nature[自然]489；Lee等人，(2012)PNAS[美国国家科学院院刊]109)。相反，茎区的结构相对保守，并且最近已经鉴定出少量广泛中和抗体，其与HA茎结合以防止病毒进入的pH引发的融合步骤(Ekiert等人，(2009)Science[科学]324；Sui等人，(2009)Nat.Struct.Mol.Biol.[自然结构与分子生物学]16；Wrammert等人，(2011)J.Exp.Med.[实验医学杂志]208；Ekiert等人，(2011)Science[科学]333；Corti等人，(2010)J.Clin.Invest.[临床研究杂志]120；Throsby M.，(2008)PLoS One[公共科学图书馆期刊]3)。这些茎反应性中和抗体中的大多数对甲型流感组1病毒具有特异性或对组2病毒具有特异性。最近，分离了与组1病毒和组2病毒两者具有交叉反应性的茎结合抗体(Corti等人，

(2011)Science[科学]333(6044):850-856;Li等人,(2012)PNAS[美国国家科学院院刊]109:9047-9052;和Dreyfus等人,(2012)Science[科学]337(6100):1343-1348;Nakamura等人,(2013)Cell Host&Microbe[细胞宿主与微生物]14:93-103)。

[0006] 尽管在疫苗和小分子抗病毒治疗剂方面取得了进展,但仍然存在对处于高的发病率和死亡率风险的人群的流感的更有效治疗的未满足的医疗需求。在这些患者中,流感感染可以导致严重的并发症并为整个医疗系统带来重大负担。目前治疗流感的护理标准具有许多限制,包括由于延迟护理而导致老年人中有效性降低的可能性、抗药的可能性、和有限的治疗窗口。

[0007] MEDI8852(例如由SEQ ID NO:1-10表示)是强效的广泛中和IgG1κ单克隆抗体,其结合来自所有18种甲型流感病毒亚型的病毒中共享的高度保守的血凝素茎区,并且展示了季节性和流行性甲型流感亚型两者的覆盖。MEDI8852有效地中和了一大组病毒,包括季节性H1N1和H3N2病毒,以及具有导致流行病的可能性的甲型流感亚型例如H2、H4、H5、H6、H7、和H9。此外,已经表明,感染的细胞可以使用MEDI8852经由Fc效应子功能(即,抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、和补体依赖性细胞毒性(CDC))清除,并且MEDI8852通过抑制病毒融合、HA蛋白酶裂解(成熟)和细胞间传播来预防甲型流感病毒感染。

[0008] 迄今为止,MEDI8852的药理学测试受到限制。尽管药理学相关的动物物种模型被用于药代动力学和药效学研究,但是这些模型的药理学不同于MEDI8852在人中的药理学。因此,仍然需要用于估计在人中MEDI8852给予的起始剂量的方法,并且需要MEDI8852用于治疗人的甲型流感感染的有效但安全的剂量。

发明内容

[0009] 在此提供了用于治疗、减轻或预防患者的甲型流感病毒感染的方法、组合物和制品。

[0010] 在一个实施例中,提供了治疗、减轻或预防患者的甲型流感病毒感染的方法。在另一个实施例中,该方法包括向患者给予至少约200mg且至多约3,500mg的抗甲型流感抗体或其片段的步骤,该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素。

[0011] 在一个实施例中,患者是人。在一个实施例中,抗甲型流感抗体或其片段是胃肠外给予的。在更具体的实施例中,抗甲型流感抗体或其片段是静脉内给予的。在一个实施例中,抗甲型流感抗体或其片段以至少约1mg/min且至多约50mg/min、至少约5mg/min且至多约30mg/min、或至少约15mg/min且至多约25mg/min的速率给予。

[0012] 在一个实施例中,在患者暴露于甲型流感病毒、感染甲型流感病毒、表现出甲型流感病毒感染的症状或其组合之后给予抗甲型流感抗体或其片段。在另一个实施例中,在患者暴露于甲型流感病毒、感染甲型流感病毒、或表现出甲型流感病毒感染的症状之前给予抗甲型流感抗体或其片段。在一个实施例中,患者对甲型流感病毒呈血清阴性。在另一个实施例中,患者对甲型流感病毒呈血清阳性。在另一个实施例中,患者的血清状态是未知的。在一个实施例中,将抗甲型流感抗体或其片段在暴露、感染、症状发作或其组合的30天内给予受试者。

[0013] 在更具体的实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在另一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0014] 在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有如下氨基酸序列的VH，该氨基酸序列与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少75％的一致性。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有如下氨基酸序列的VL，该氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少75％的一致性。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有如下氨基酸序列的VH，该氨基酸序列与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少75％的一致性，以及具有如下氨基酸序列的VL，该氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少75％的一致性。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的VH。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的VL。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段包括具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的VH以及具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的VL。

[0015] 在更具体的实施例中，抗甲型流感抗体包括MEDI8852。

[0016] 在另一个实施例中，提供了用于治疗、减轻或预防患者的甲型流感病毒感染的组合物。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素，其中组合物被配制用于给予至少约200mg且至多约3,500mg的抗甲型流感抗体或其片段。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒血凝素并中和甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型，其中组合物被配制用于向患者给予至少约200mg且至多约3,500mg的抗甲型流感抗体或其片段。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。

[0017] 在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝

素，其中组合物被配制用于以至少约200mg且至多约3,500mg的量进行静脉内输注。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够结合并中和甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型，其中组合物被配制用于以至少约200mg且至多约3,500mg的量进行静脉内输注。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14和H15及其变体。

[0018] 在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够清除一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14、H15及其变体。在一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段能够经由包括ADCC、CDC或其组合在内的机制清除一种或多种甲型流感病毒组1亚型。

[0019] 在更具体的实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在另一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0020] 在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲

型流感抗体或其片段具有如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。在一个实施例中，组合物包括MEDI8852。在另一个实施例中，组合物包括MEDI8852和药学上可接受的载体。

[0021] 在另一个实施例中，提供了如下制品，该制品包括容器和在容器内的组合物，其中组合物包括能够与甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的甲型流感病毒血凝素结合的抗甲型流感抗体或其片段，以及标签或包装说明书，其具有向患者给予至少约200mg且至多约3,500mg抗甲型流感抗体或其片段的说明。在另一个实施例中，提供了如下制品，该制品包括容器和在容器内的组合物，其中组合物包括能够结合甲型流感病毒血凝素并中和甲型流感病毒的至少一种组1亚型和至少一种组2亚型的抗甲型流感抗体或其片段，以及标签或包装说明书，其具有向患者给予至少约200mg且至多约3,500mg抗甲型流感抗体或其片段的说明。

[0022] 在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段能够中和一种或多种选自以下的甲型流感病毒组1亚型：H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18及其变体；以及一种或多种选自以下的甲型流感病毒组2亚型：H3、H4、H7、H10、H14、H15及其变体。

[0023] 在更具体的实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在另一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有与选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的氨基酸序列至少75％一致的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有一个或多个重链CDR，这些重链CDR具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列，以及一个或多个轻链CDR，这些轻链CDR具有选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0024] 在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少

75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少75％一致性的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括抗甲型流感抗体或其片段，该抗甲型流感抗体或其片段具有如下VH，该VH具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，以及如下VL，该VL具有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

[0025] 在一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括MEDI8852。在另一个实施例中，制品包括如下组合物，该组合物包括MEDI8852和药学上可接受的载体。

附图说明

[0026] 图1是显示用MEDI8852以250mg、750mg、1,500mg和3,000mg IV处理的受试者的平均(+/-标准偏差)浓度分布的图。(n＝5-10/组/时间点)。

[0027] 图2是显示用750mg或3000mg MEDI8852处理的受试者群体(n＝1000名受试者/组)的模拟浓度的图。带代表90％置信区间。实线和虚线分别代表750mg和3000mg组的中值。

具体实施方式

[0028] 引言

[0029] 在此描述了与治疗、减轻和/或预防受试者的甲型流感病毒感染有关的方法、组合物、试剂盒和制品。

[0030] 术语

[0031] 在详细描述本发明之前，应当了解的是，本发明并不限于特定的组合物或方法步骤，因为这些组合物或方法步骤可以改变。必须注意的是，除非上下文中另外清楚地指出，否则如在本说明书及所附权利要求中所使用，单数形式“一种/一个(a/an)”和“该”包括复数指示物。

[0032] 术语“约”是指可能例如通过如下方式发生的数值量的变化：通过用于制备化合物、组合物、浓缩物或配制品的典型测量和处理程序；通过这些程序中的无意错误；通过用于实施这些方法的起始材料或成分的制造、来源或纯度的差异，以及类似的考虑。术语“约”还涵盖由于化合物、组合物、浓缩物或配制品的老化而与具体起始浓度或混合物不同的量，以及由于混合或处理化合物、组合物、浓缩物或配制品而与具体起始浓度或混合物不同的量。当利用术语“约”修饰时，在此随附的权利要求书包括这些量的等效量。

[0033] 除非另外定义，否则在此使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。例如，Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[生物医学和分子生物学简明词典]，Juo，Pei-Show(2002)第2版CRC

Press[CRC出版社];Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞和分子生物学词典],第3版(1999)Academic Press[学术出版社];以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[牛津生物化学和分子生物学词典],修订版(2000)Oxford University Press[牛津大学出版社]为技术人员提供了本发明中所使用的许多术语的通用词典。

[0034] 氨基酸可以在此通过它们的通常已知的三字母符号或通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来提及。同样,核苷酸可以通过它们的通常接受的单字母代码来提及。

[0035] 除非另有说明,否则抗体的可变结构域、互补决定区(CDR)和框架区(FR)中的氨基酸编号遵循如在以下文献中所示的Kabat定义:Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第5版Public Health Service,National Institutes of Health[美国国立卫生研究院,公共卫生事业部,],贝塞斯达,马里兰州。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入该FR或CDR中的较少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b、以及82c等)。可以通过抗体序列与"标准"Kabat编号序列在同源区的比对而对给定的抗体确定残基的Kabat编号。框架残基的最大比对常常需要在编号系统中的有待用于Fv区的"间隔"残基插入。另外,由于种间或等位基因差异,在任何给定的Kabat位点编号处的某些单独残基的身份在抗体链之间可以不同。

[0036] 定义

[0037] 术语"核酸"或"多核苷酸"涵盖对应于一系列核苷酸的单体单元的任何物理串,包括但不限于核苷酸的聚合物(包括DNA和RNA聚合物)和经修饰的寡核苷酸(例如具有不是溶液中生物RNA或DNA典型的碱基的寡核苷酸,如2'-O-甲基化寡核苷酸)。多核苷酸可以包括常规磷酸二酯键或非常规键(例如酰胺键,如在肽核酸(PNA)中所发现的)。核酸可以是单链的或双链的。除非另外指明,否则核酸序列涵盖除明确指示的序列之外的互补序列。

[0038] 术语"基因"广泛用于指代与生物学功能相关联的核酸。因此,基因包括编码序列和/或其表达所需的调节序列。术语"基因"适用于特异性基因组序列,以及由该基因组序列编码的cDNA或mRNA。基因还包括例如形成用于其他蛋白质的识别序列的非表达核酸序列。非表达调节序列包括调节蛋白(如转录因子)结合的"启动子"和"增强子",导致相邻或邻近序列的转录。例如,编码多肽的多核苷酸可以包括启动子和/或可操作地与一个或多个编码区相关联的其他转录或翻译控制元件。"可操作地相关联"是指基因产物的编码区按以下这种方式与一个或多个调节序列相关联,该方式使得该基因产物的表达处于这种或这些调节序列的影响或控制之下。"基因的表达"或"核酸的表达"是指如上下文指示的将DNA转录为RNA、将RNA翻译为多肽、或转录和翻译两者。

[0039] 如在此使用的,术语"编码区"是指包括可以翻译氨基酸的密码子的核酸的部分。虽然"终止密码子"(TAG、TGA、或TAA)不翻译为氨基酸,但其通常被认为是编码区的一部分。然而,侧翼序列(例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、和内含子)不被认为是编码区的一部分。载体可以包含单个编码区,或者可以包含两个或更多个编码区。另外,载体、多核苷酸、或核酸可以编码异源编码区,这些异源编码区融合或未融合至编码感兴趣的基因产

物(例如抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物)的核酸。异源编码区包括但不限于特化的元件或基序,如分泌信号肽或异源功能结构域。

[0040] 术语“载体”是指核酸可以借此在生物体、细胞或细胞组件之间传播和/或传递的手段。载体包括但不限于能够自主地复制或整合至宿主细胞的染色体中的质粒、病毒、噬菌体、前病毒、噬菌粒、转座子、和人工染色体。载体包括但不限于:不自主复制的裸RNA多核苷酸、裸DNA多核苷酸、在同一条链内包括DNA和RNA两者的多核苷酸、聚赖氨酸轭合的DNA或RNA、肽轭合的DNA或RNA、脂质体轭合的DNA。“表达载体”是能够促进并入其中的核酸的表达以及复制的载体如质粒。典型地,有待表达的核酸“可操作地连接”至启动子和/或增强子,并且经由启动子和/或增强子而经受转录调节控制。

[0041] 术语“宿主细胞”是指含有异源核酸(如载体),并支持核酸的复制和/或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞(如大肠杆菌)或真核细胞(如酵母)、昆虫、两栖动物、鸟类或哺乳动物细胞(包括人细胞,例如HEp-2细胞)以及Vero细胞。

[0042] 当提及异源或分离的核酸时,术语“引入”是指将核酸转移至真核或原核细胞,在该真核或原核细胞中该核酸可以并入细胞的基因组、转化成自主复制子或瞬时表达。术语包括这类方法如“感染”、“转染”、“转化”以及“转导”。可以使用各种方法将核酸引入宿主细胞,包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质介导的转染和脂质转染。

[0043] 术语“表达”是指在功能性基因产物的合成中使用来自基因的信息的过程。基因产物通常是蛋白质,但也可以是功能性RNA。可以通过在蛋白质水平上确定相应的rRNA、tRNA、mRNA、snRNA和/或基因产物的的存在来检测基因表达。

[0044] 术语“多肽”是指包括两个或更多个通过酰胺键(也称为肽键)线性地连接的氨基酸残基的分子,如肽或蛋白质。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何一条或多条链,并且不是指产物的具体长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指具有两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其他术语被包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个、或可与其互换使用。术语“多肽”还旨在指多肽在表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团来进行的衍生、蛋白水解裂解或通过非天然存在的氨基酸来进行的修饰。多肽可以来源于天然生物来源或通过重组技术来产生,并且不一定从指定的核酸序列翻译而来。它可以按任何方式(包括通过化学合成)来产生。多肽的氨基酸残基可以是天然的或非天然的,并且可以是未经取代的、未经修饰的、取代的或修饰的。根据上下文,“氨基酸序列”是氨基酸残基的聚合物,例如蛋白质或多肽,或表示氨基酸聚合物的字符串。

[0045] 如在此使用的,术语“抗体”是指包括通过多肽链的折叠形成的至少一个结合结构域的多肽或一组多肽,这些多肽链具有内表面形状和电荷分布与抗原的抗原决定簇的特征互补的三维结合空间。抗体典型地具有四聚体形式,具有两对多肽链,每对具有一条“轻”链和一条“重”链,其中每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点。典型地,每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链连接,然而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规律间隔的链间二硫桥。典型地,每条重链在一端具有可变结构域(VH),随后是多个恒定结构域(CH),并且每条轻链在一端具有可变结构域(VL)并且在其另一端具有恒定结构域(CL),其中轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。

[0046] 如在此使用的，术语“抗体”(antibody/antibodies)和“免疫球蛋白”涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、从至少两个不同表位结合片段形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、CDR-接合的、人抗体、人源化抗体、骆驼科(camelised)抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、单结构域抗体、Fab片段、Fab'片段、$F(ab')_2$片段、展现所希望的生物学活性的抗体片段(例如抗原结合部分)、二硫键连接的Fv(dsFv)、以及抗个体基因型(抗Id)抗体、细胞内抗体、以及任何上述的表位结合片段或衍生物。具体地说，抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的含有至少一个抗原结合位点的免疫活性片段。免疫球蛋白分子可以具有任何同种型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、亚同种型(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或同种异型(例如，Gm如G1m(f、z、a或x)、G2m(n)、G3m(g、b或c)、Am、Em、和Km(1、2或3))。抗体可以源自于任何哺乳动物物种，包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫和小鼠、或其他动物如禽(包括但不限于鸡)。抗体可以与异源多肽序列(例如标签)融合以促进纯化。

[0047] 抗体可以在Fc区中被修饰以便提供所希望的效应子功能或血清半衰期。如在下面几个部分中更详细地讨论的，在具有适当的Fc区的情况下，在细胞表面上结合的裸抗体可以通过如下方式诱导细胞毒性：经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)；通过在补体依赖性细胞毒性(CDC)中募集补体；或通过募集表达一个或多个效应子配体的非特异性细胞毒性细胞，这些效应子配体识别甲型流感病毒上结合的抗体并且随后在抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)中引起细胞的吞噬作用；或一些其他机制。可替代地，在期望消除或减少效应子功能(例如减少副作用或治疗并发症)的情况下，可以使用经修饰的Fc区，例如以便增加对FcRn的结合亲和力并增加血清半衰期。可替代地，Fc区可以与诸如PEG或白蛋白等部分轭合以增加血清半衰期。

[0048] 如在此使用的，术语“变体”是指借助在亲本抗体序列中添加、缺失和/或取代一个或多个氨基酸残基而在氨基酸序列上不同于“亲本”抗体氨基酸序列的抗体。变体抗体可以包括亲本抗体(包括例如MEDI8852)或在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列中的氨基酸残基的一个或多个取代、缺失(包括内部缺失)、添加(包括产生融合蛋白的添加)或保守取代。

[0049] 如在此使用的，术语“序列一致性百分比(%)”或“同源性”是指在比对序列并且(必要时)引入空位以获得最大的序列一致性百分比，并且不将任何保守取代视为序列一致性的部分之后，在候选序列中的氨基酸残基或核苷酸与参考序列(例如亲本抗体序列)中的氨基酸残基或核苷酸一致的百分比。序列的比对可以手动产生；或使用Smith和Waterman(1981)Ads App.Math.[应用数学进展]2,482中的同源性算法；Neddleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48,443的算法；Pearson和Lipman(1988)Proc.Natl Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85,2444的方法产生；或者使用基于这些算法的一种或多种计算机程序(在威斯康辛州麦迪逊市科学大道575号的遗传学计算机组的威斯康辛遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)产生。

[0050] 术语“保守氨基酸取代”是指第一氨基酸被第二氨基酸置换，该第二氨基酸具有与该第一氨基酸相似的化学和/或物理性质(例如，电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)。可以在

涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性、和/或两亲性的相似性的基础上做出保守氨基酸取代。例如，非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸；极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；并且带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。另外，甘氨酸和脯氨酸是能影响链取向的残基。非保守取代将必需将这些类别之一的成员与另一类别中的成员交换。此外，如果希望的话，非典型氨基酸或化学氨基酸类似物可以作为取代或添加而被引入抗体序列中。非典型氨基酸总体上包括但不限于普通氨基酸的D-异构体、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β-丙氨酸、氟代氨基酸、设计者(designer)氨基酸(例如β-甲基氨基酸、Cα-甲基氨基酸、Nα-甲基氨基酸、以及氨基酸类似物。

[0051] 可以通过在抗体的一个或多个可变区和/或框架区中引入一个或多个氨基酸改变(包括例如一个或多个取代、缺失和/或添加)来产生抗体变体。框架区残基的一种或多种改变可以导致抗体对抗原的结合亲和力的改进。当这些变化是针对人源化抗体(不同于CDR区，框架区可以来自不同的物种)做出时，尤其如此。可以被修饰的框架区残基的实例包括直接非共价结合抗原的那些(Amit等人，(1986)Science[科学]，233:747-753)；与CDR的构象相互作用/影响CDR的构象的那些(Chothia等人，(1987)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]，196:901-917)；和/或参与VL-VH界面的那些(美国专利号5,225,539和6,548,640)。在一个实施例中，可以改变从约一个至约五个框架残基。

[0052] 用于产生改变的抗体的一种有用程序被称为“丙氨酸扫描诱变”(Cunningham和Wells，(1989)Science[科学]，244:1081-1085)。在这种方法中，一个或多个高变区残基被一个或多个丙氨酸或聚丙氨酸残基置换，从而改变氨基酸与靶抗原的相互作用。然后，对于取代显示功能敏感度的那些高变区残基通过在(或针对)取代位点引入另外的或其他突变而被改善(refined)。因此，尽管用于引入氨基酸序列变异的位点被预先确定，本身突变的本性不需要预先确定。然后可以筛选这种方式产生的Ala突变体的生物活性。

[0053] 术语“特异性地结合”是指抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物与表位经由其抗原结合结构域结合比其与随机的、不相关的表位结合更容易。术语“特异性”在此用于对某种抗体或其片段结合至某种表位的相对亲和力进行定性。

[0054] 如在此使用的术语“表位”是指能够结合抗体结合结构域的蛋白质决定簇。表位通常包括如氨基酸或糖侧链的分子的化学活性表面基团，并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于：在变性溶剂存在下，与前者的结合丧失但与后者的结合不丧失。如在此使用的术语“非连续表位”是指在从蛋白质的一级序列中的至少两个分开的区域形成的蛋白质抗原上的构象表位。

[0055] 如在此使用的，术语“亲和力”是指单独的表位与免疫球蛋白分子的结合结构域的结合强度的度量。

[0056] 术语“分离的”是指生物材料(如核酸或蛋白质)，其基本上不含通常在其天然存在的环境中伴随或与其相互作用的组分。可替代地，分离的材料可以包括没有与其天然环境中的材料一起被发现的材料。例如，如果该材料处于其天然环境(例如细胞)中，该材料可能

已经被放置在该环境中发现的材料非天然的细胞位置处。例如，如果将天然存在的核酸通过非天然存在的方式引入该核酸非天然的基因组位点中，则其可以被认为是分离的。此类核酸也被称为“异源”核酸。

[0057] 术语“重组”是指已经通过人为干预人工地或合成地改变的材料。可以在其自然环境或状态内或从其中除去的材料上进行改变。例如，“重组核酸”可以是指通过重组核酸(例如在克隆、DNA改组或其他程序过程中，或通过化学或其他诱变)制成的核酸；并且“重组多肽”或“重组蛋白质”可以是指通过重组核酸的表达产生的多肽或蛋白质。

[0058] 如在此使用的，术语“工程化”包括通过合成手段(包括例如重组技术、体外肽合成、肽的酶促或化学偶联或其组合)来操纵核酸或多肽分子。

[0059] 如在此使用的，术语“有效量”或“治疗有效量”是指对于给定条件和给予方案实现所希望的临床结果所需或足够的治疗组合物的量，例如足以达到能够预防、减轻和/或治疗受试者的流感感染的化合物浓度的量。此类量和浓度可以由本领域技术人员确定并且典型地由医师根据有关情况确定，这些有关情况包括但不限于待治疗的病症、选择的给予途径、给予的实际化合物、个体患者的年龄、体重和反应、以及患者症状的严重程度。

[0060] 如在此使用的，术语“治疗性组合物”是指具有治疗用途的化合物或组合物，并且包括但不限于生物化合物(如抗体、蛋白质和核酸)、以及化学合成的小的有机分子化合物。

[0061] 如在此使用的，术语“药物组合物”是指包括治疗有效量的治疗剂连同药学上可接受的载体(以及如果需要，一种或多种稀释剂或赋形剂)的组合物。如在此使用的，术语“药学上可接受的”意指其由联邦政府或州政府的监管机构批准或在美国药典、欧洲药典或其他普遍认可的药典中列出用于哺乳动物并且更具体地用于人。

[0062] 如在此使用的，术语“治疗(treatment或treating)”是指治疗性治疗和防病性或预防性措施两者，其中目的是稳定、预防、缓解或减轻一种或多种流感感染症状，或者延缓、预防或抑制流感感染进展。治疗还可以是指清除或减少受试者中的感染原(如甲型流感病毒)，“治疗”还可以意指与如果不接受治疗时期望的生存期相比延长的生存期。治疗不一定意味着感染完全治愈。

[0063] 如在此使用的，术语“受试者”或“患者”是指脊索动物亚门的任何成员，包括但不限于人和其他灵长类动物，包括非人灵长类动物(如黑猩猩和其他猿和猴类)；农场动物(如牛、绵羊、猪、山羊和马)；驯养的哺乳动物(如狗和猫)；实验室动物，包括啮齿类(如小鼠、大鼠和豚鼠)；禽，包括驯养的、野生的和狩猎的禽(如鸡、火鸡和其他鹑鸡类禽、鸭、和鹅)。术语“哺乳动物”和“动物”被包括在该定义中。旨在覆盖成年和新生的哺乳动物两者。

[0064] 如在此使用的，术语“中和”是指抗体或其抗原结合片段结合感染原(如甲型流感病毒)且降低该感染原的生物活性(例如，毒力)的能力。在一个实施例中，抗体或其片段免疫特异性地结合甲型流感病毒的至少一个特定表位或抗原决定簇。在更具体的实施例中，抗体或其片段免疫特异性地结合甲型流感病毒HA茎蛋白的至少一个特定表位或抗原决定簇。

[0065] 在病毒的生命周期过程中的不同点，抗体能够中和感染原(如甲型流感病毒)的活性。例如，抗体可以通过干扰病毒与一种或多种细胞表面受体的相互作用来干扰该病毒附着至靶细胞。可替代地，抗体可以例如通过干扰经由受体介导的内吞作用进行的病毒内化来干扰该病毒与其受体的一种或多种附着后相互作用。

[0066] 抗甲型流感抗体

[0067] 在此描述了包括免疫特异性地结合甲型流感病毒的抗体或其片段的方法、组合物和制品。在一个实施例中，抗体或其片段免疫特异性地结合至少一种对甲型流感病毒特异的表位。在更具体的实施例中，抗体或其片段免疫特异性地结合在甲型流感病毒HA茎蛋白上的表位。在一个实施例中，如在此所述，抗体或其抗原结合片段能够结合和/或中和甲型流感病毒的一种或多种组1亚型和一种或多种组2亚型。在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段结合在至少H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、H18或所有甲型流感HA亚型之中保守的表位。在另一个实施例中，抗体或其抗原结合片段结合在选自H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13和H16的一种或多种、或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种甲型流感病毒组1亚型以及选自H3、H4、H7、H10、H14和H15的一种或多种、或至少1、2、3、4、5或6种组2亚型之中保守的表位。

[0068] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段以在约0.01ug/ml与约5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.1ug/ml之间、或小于约5ug/ml、1ug/ml、0.5ug/ml、0.1ug/ml或0.05ug/ml的EC_{50}结合至少H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17或H18或所有甲型流感亚型。在另一个实施例中，抗体或其抗原结合片段以在约0.01ug/ml与约5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.1ug/ml之间、或小于约5ug/ml、1ug/ml、0.5ug/ml、0.1ug/ml或0.05ug/ml的EC_{50}结合选自H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13和H16的一种或多种、或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种甲型流感病毒组1亚型以及选自H3、H4、H7、H10、H14和H15的一种或多种、或至少1、2、3、4、5或6种组2亚型。在一个实施例中，抗体以在约0.01ug/ml与约5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.1ug/ml之间、或小于约5ug/ml、1ug/ml、0.5ug/ml、0.1ug/ml、或0.05ug/ml的EC_{50}结合一种或多种具有引起流行病的可能性的甲型流感亚型，如H2、H4、H5、H6、H7和H9。在一个实施例中，抗体以在约0.01ug/ml与约5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.5ug/ml之间、或在约0.01ug/ml与约0.1ug/ml之间、或小于约5ug/ml、1ug/ml、0.5ug/ml、0.1ug/ml或0.05ug/ml的EC_{50}结合季节性H1N1和H3N2病毒。

[0069] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段识别位于HA2的茎区中的表位。在更具体的实施例中，抗体或抗原结合片段结合在HA2的保守茎区中的构象表位。在一个实施例中，表位包括一个或多个选自HA2的茎区中的位置18、19、42、45(位置根据如在Weiss等人，(1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]212,737-761中所描述的H3编号系统进行编号)的氨基酸作为接触残基。在更具体的实施例中，表位包括一个或多个选自HA2的茎区中的18、19、42和45的氨基酸作为接触残基。在另外的实施例中，表位包括HA2的茎区中的氨基酸18、19、42和45作为接触残基。在又另外的实施例中，表位包括HA2的茎区中的氨基酸18、19和42作为接触残基。

[0070] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段通过抑制在病毒膜与内体膜之间的HA介导的融合所需的pH诱导的构象变化来中和甲型流感的活性。在另一个实施例中，抗体或其抗原结合片段通过抑制将HA0蛋白进行蛋白酶切割成HA1和HA2亚基，由此干扰融合肽的可接近性来中和甲型流感的活性。在另一个实施例中，抗体或其抗原结合片段抑制甲型流感病毒的细胞到细胞的传播。

[0071] 在其他实施例中，抗体或抗原结合片段可以通过清除病毒来降低甲型流感病毒感染的活性。在一个实施例中，抗体或抗原结合片段可以经由一种或多种Fc效应子功能(包括例如ADCC、ADCP和CDC)清除病毒。

[0072] 在一个实施例中，特异性地结合甲型流感病毒的抗体描述于2013年10月2日提交的美国临时申请号61/885,808和2014年5月23日提交的美国临时申请号62/002,414、以及2014年10月1日提交的PCT申请号PCT/US2014/058652中。这些披露中的每一个通过引用以其全文特此结合在此。

[0073] MEDI8852

[0074] 在一个实施例中，抗甲型流感抗体包括MEDI8852，其是结合流感HA蛋白的保守茎区并且能够结合和/或中和一大组流感病毒的人IgG1κ单克隆抗体(mAb)。

[0075] 在一个实施例中，抗体包括与MEDI8852的VH和/或VL序列中的至少一个具有给定百分比一致性的VH和/或VL。在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH氨基酸序列。在另一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VH氨基酸序列。在另一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL氨基酸序列。在另一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或具有100%一致性的VL氨基酸序列。在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL氨基酸序列。在另一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或具有100%一致性的VL氨基酸序列。

[0076] 互补决定区(CDR)

[0077] 尽管可变结构域(VH和VL)包括抗原结合区；可变性不是均匀地分布于抗体的可变结构域的。它被集中在轻链(VL或VK)和重链(VH)可变结构域两者中的称为互补决定区(CDR)的区段中。这些可变结构域的更高保守性的部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含由三个CDR连接的四个FR，这四个FR大体上采用β-片层构型，这三个CDR形成连接β-片层结构的环并且在一些情况下形成β-片层结构的一部分。每条链中的CDR由FR紧密靠近地保持在一起，与来自另一条链的CDR促成了抗体的抗原结合位点的形成。重链的三个CDR被定名为HCDR1、HCDR2和HCDR3，并且轻链的三个CDR被定名为LCDR1、LCDR2和LCDR3。使用Kabat编号系统，HCDR1在大约氨基酸31处(即，在第一个半胱氨酸残基之后大约9个残基处)开始，包括大约5-7个氨基酸，并且在下一个酪氨酸残基处结束。HCDR2在HCDR1结束之后的第十五个残基处开始，包括大约16-19个氨基酸，并且在下一个精氨酸或赖氨酸残基处结束。HCDR3从HCDR2结束之后大约第三十三个氨基酸残基处开始；包括3-25个氨基酸；并且在序列W-G-X-G处结束，其中X是任何氨基酸。LCDR1从大约残基24处(即，在半胱氨酸残基之后)开始；包括大约10-17个残基；并且在下一个酪氨酸残基处结束。LCDR2在LCDR1结束之后大约第十六个残基处开始，并且包括大约7个残基。LCDR3在LCDR2结束之后大约第

三十三个残基处开始;包括大约7-11个残基并且在序列F-G-X-G处结束,其中X是任何氨基酸。CDR在抗体与抗体之间相当不同,并且根据定义将不会表现出与Kabat共有序列的同源性。

[0078] 在一个实施例中,抗甲型流感抗体包括一个或多个重链CDR,这些重链CDR与选自HCDR1(SEQ ID NO:3)、HCDR2(SEQ ID NO:4)和HCDR3(SEQ ID NO:5)的重链CDR具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性。在另一个实施例中,抗甲型流感抗体包括一个或多个轻链CDR,这些轻链CDR与选自LCDR1(SEQ ID NO:8)、LCDR1(SEQ ID NO:9)和LCDR1(SEQ ID NO:10)的轻链CDR具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性。在一个实施例中,抗甲型流感抗体包括一个或多个重链CDR,这些重链CDR与选自HCDR1(SEQ ID NO:3)、HCDR2(SEQ ID NO:4)和HCDR3(SEQ ID NO:5)的重链CDR具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性,以及一个或多个轻链CDR,这些轻链CDR与选自LCDR1(SEQ ID NO:8)、LCDR1(SEQ ID NO:9)和LCDR1(SEQ ID NO:10)的轻链CDR具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性。

[0079] 框架区

[0080] 重链和轻链的可变结构域各自包含四个框架区(FR1、FR2、FR3、FR4),这些框架区是可变结构域的更高保守性的部分。重链的四个FR被定名为FR-H1、FR-H2、FR-H3、和FR-H4,并且轻链的四个FR被定名为FR-L1、FR-L2、FR-L3、和FR-L4。使用Kabat编号系统,FR-H1开始于位置1并且在大致氨基酸30处结束,FR-H2大致是从氨基酸36至49,FR-H3大致是从氨基酸66至94,并且FR-H4大致是氨基酸103至113。FR-L1开始于氨基酸1并且在大致氨基酸23处结束,FR-L2大致是从氨基酸35至49,FR-L3大致是从氨基酸57至88,并且FR-L4大致是从氨基酸98至107。在某些实施例中,框架区可以含有根据Kabat编号系统的取代,例如在FR-L1中106A处的插入。

[0081] 除了天然存在的取代之外,还可以在抗体中引入一个或多个改变(例如,FR残基的一个或多个取代)以改善或优化抗体对甲型流感病毒的结合亲和力。待修饰的框架区残基的实例包括直接非共价结合抗原的那些(Amit等人,(1986)Science[科学],233:747-753);与CDR的构象相互作用/影响CDR的构象的那些(Chothia等人,(1987)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917);和/或参与VL-VH界面的那些(美国专利号5,225,539)。

[0082] 尽管CDR区中的突变可以改善亲和力和功能,但是框架区中的突变可能增加免疫原性的风险。可以通过将框架突变回复到种系来减少这种风险,而不会对抗体活性产生不利影响。在一个实施例中,出于“种系化(germlining)”的目的,FR可以包括一个或多个氨基酸变化。在种系化中,将所选择的抗体重链和轻链的氨基酸序列与种系重链和轻链氨基酸序列进行比较,并且将与种系构型不同的所选择的VL和/或VH链的某些框架残基“回复突变”为种系构型,这样使得框架氨基酸序列改变回与种系框架氨基酸序列相同。框架残基的这种“回复突变”或“种系化”可以通过用于引入特定突变的标准分子生物学方法来完成,这些标准分子生物学方法包括但不限于定点诱变和PCR介导的诱变。

[0083] 核苷酸序列

[0084] 在另一个实施例中,提供了对应于氨基酸序列和编码在此所述的抗体的核苷酸序

列。因此，提供了编码VH和VL区(包括在此所述的抗体的CDR和FR)的多核苷酸序列以及用于它们在细胞中有效表达的表达载体。

[0085] 在一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH氨基酸序列。在另一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VH氨基酸序列。在一个实施例中，多核苷酸具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%的一致性的核酸序列。在另一个实施例中，多核苷酸具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性的核酸序列。

[0086] 在另一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL氨基酸序列。在另一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或具有100%一致性的VL氨基酸序列。在一个实施例中，多核苷酸具有与SEQ ID NO:6的核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%的一致性的核酸序列。在另一个实施例中，多核苷酸具有与SEQ ID NO:6的核酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性的核酸序列。

[0087] 在一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性的VL氨基酸序列。在另一个实施例中，多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的VH氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的VH氨基酸序列，以及与SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或具有100%一致性的VL氨基酸序列。

[0088] 本发明还涵盖在严格或较低严格杂交条件(例如，如在此所定义)下与编码在此所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0089] 严格杂交条件包括但不限于：在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中、在约45℃下与过滤器结合的DNA杂交，随后在约50℃-65℃下在0.2X SSC/0.1%SDS中洗涤一次或多次；高严格条件如在6X SSC中、在约45℃下与过滤器结合的DNA杂交，随后在约65℃下在0.1X SSC/0.2%SDS中洗涤一次或多次；或者本领域的技术人员已知的任何其他严格杂交条件(参见例如，Ausubel,F.M.等人编辑，(1989)Current Protocols in Molecular Biology[当代分子生物学实验指南]，第1卷，Green Publishing Associates,Inc.[格林出版协会公司]和John Wiley and Sons,Inc.[约翰威利父子出版公司]，纽约，第6.3.1至6.3.6页和第2.10.3页)。

[0090] 基本上一致的序列包括多态性序列(即，群体中的替代性序列或等位基因)。等位基因差异可以小到一个碱基对。基本上一致的序列还可以包括诱变序列，包括含有沉默突变的序列。突变可以包括一个或多个残基改变、一个或多个残基的缺失、或一个或多个另外的残基的插入。

[0091] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸以及确定多核苷酸的核苷酸序列。例如，如果抗体的核苷酸序列是已知的，则编码抗体的多核苷酸可以由化学合成的寡核苷

酸组装(参见例如,Kutmeier等人,(1994)BioTechniques[生物技术]17:242)。简言之,合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,将其退火,连接,并且然后通过PCR进行扩增。

[0092] 编码抗体的多核苷酸还可以从来自适合来源的核酸产生。如果含有编码具体抗体的核酸的克隆是不可获得的,但是抗体分子的序列是已知的,则编码该免疫球蛋白的核酸可以化学合成,或者通过使用合成引物(这些合成引物与序列的3'和5'端可杂交)的PCR扩增或通过使用对特定的基因序列具有特异性的寡核苷酸探针从cDNA文库鉴定编码抗体的cDNA克隆来进行克隆而从合适的来源(如抗体cDNA文库,或从表达抗体的任何组织或细胞(如被选择以表达抗体的杂交瘤细胞)产生的cDNA文库,或从它们分离的核酸(例如,polyA+RNA))获得。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0093] 一旦确定抗体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列,可以使用本领域已知的方法(包括但不限于重组DNA技术、定点诱变、和PCR)来操纵抗体的核苷酸序列,从而产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如产生氨基酸取代、缺失、和/或插入。(参见例如,在Sambrook等人,(1990),Molecular Cloning,A Laboratory Manual[分子克隆实验室手册],第2版,Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室出版社],Cold Spring Harbor[冷泉港],纽约以及Ausubel等人编辑,(1998)Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],John Wiley&Sons,NY[约翰威利父子出版公司],纽约)。

[0094] 结合特征

[0095] 如上文所述,抗甲型流感抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合甲型流感病毒的至少一个特定表位或抗原决定簇。在更具体的实施例中,抗甲型流感抗体或其抗原结合片段专有地或相对于其他多肽优先地结合甲型流感病毒HA茎蛋白、肽、亚基、片段、部分或其任何组合的至少一个特定表位或抗原决定簇。

[0096] 可以进行结合测定以确定抗体的结合特征,这些结合测定包括但不限于直接结合测定或竞争结合测定。在一个实施例中,可以使用标准ELISA或流式细胞术测定来检测结合。在直接结合测定中,测试候选抗体与其同源抗原的结合。在竞争结合测定中,评估候选抗体与已知抗体或结合甲型流感病毒HA茎的其他化合物竞争的能力。一般来说,允许抗体与能够被检测的甲型流感病毒HA茎结合的任何方法都可以用于检测和测量抗体的结合特征。

[0097] 确定抗原与抗体之间结合的亲和力常数和特异性可以帮助确定使用抗体或其片段的预防、治疗、诊断或研究方法的功效。"结合亲和力"通常是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如在此使用的,"结合亲和力"是指反映结合对成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由平衡解离常数(Kd)表示,计算为比率k_{off}/k_{on}。(参见,Chen等人,(1999)J.Mol Biol[分子生物学杂志]293:865-881)。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,然而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长结合。适合于确定抗体的结合特征的方法和试剂是本领域已知的和/或是可商购的(参见例如,美国专利号6,849,425;6,632,926;6,294,391;6,143,574)。此外,被设计用于此类动力学分析的设备和软件是可商购的(例如Biacore® A100和Biacore®2000仪器;Biacore国际公司(Biacore International AB),乌普萨拉

(Uppsala)，瑞典)。

[0098] 在一个实施例中，本发明的抗体(包括其结合片段或变体)还可以在它们对甲型流感病毒的结合亲和力方面进行描述或说明。典型地，具有高亲和力的抗体具有小于10^{-7}M的Kd。在一个实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的解离常数或Kd小于或等于5×10^{-7}M、10^{-7}M、5×10^{-8}M、10^{-8}M、5×10^{-9}M、10^{-9}M、5×10^{-10}M、10^{-10}M、5×10^{-11}M、10^{-11}M、5×10^{-12}M、10^{-12}M、5×10^{-13}M、10^{-13}M、5×10^{-14}M、10^{-14}M、5×10^{-15}M或10^{-15}M。在更具体的实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的解离常数或Kd小于或等于5×10^{-10}M、10^{-10}M、5×10^{-11}M、10^{-11}M、5×10^{-12}M或10^{-12}M。本发明涵盖结合甲型流感病毒的解离常数或Kd在任何单独列举值之间的范围内的抗体。

[0099] 在另一个实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的解离速率(k_{off})小于或等于$5\times10^{-2}sec^{-1}$、$10^{-2}sec^{-1}$、$5\times10^{-3}sec^{-1}$、或$10^{-3}sec^{-1}$、$5\times10^{-4}sec^{-1}$、$10^{-4}sec^{-1}$、$5\times10^{-5}sec^{-1}$、或$10^{-5}sec^{-1}$、$5\times10^{-6}sec^{-1}$、$10^{-6}sec^{-1}$、$5\times10^{-7}sec^{-1}$或$10^{-7}sec^{-1}$。在更具体的实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的解离速率(k_{off})小于或等于$5\times10^{-4}sec^{-1}$、$10^{-4}sec^{-1}$、$5\times10^{-5}sec^{-1}$、或$10^{-5}sec^{-1}$、$5\times10^{-6}sec^{-1}$、$10^{-6}sec^{-1}$、$5\times10^{-7}sec^{-1}$、或$10^{-7}sec^{-1}$。本发明还涵盖结合甲型流感病毒的解离速率(k_{off})在任何单独列举值之间的范围内的抗体。

[0100] 在另一个实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的缔合速率(k_{on})大于或等于$10^{3}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{3}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{6}M^{-1}$sec-1、$5\times10^{6}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{7}M^{-1}$sec-1、或$5\times10^{7}M^{-1}sec^{-1}$。在更具体的实施例中，抗体或其结合片段结合甲型流感病毒或其片段或变体的缔合速率(k_{on})大于或等于$10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{6}M^{-1}$sec-1、$5\times10^{6}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{7}M^{-1}sec^{-1}$或$5\times10^{7}M^{-1}sec^{-1}$。本发明涵盖结合甲型流感病毒的缔合速率($k_{on}$)在任何单独列举值之间的范围内的抗体。

[0101] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合甲型流感病毒HA茎并且能够中和甲型流感病毒感染。可以使用本领域已知的方法进行中和测定。术语“50％抑制浓度”(缩写为“IC_{50}”)代表甲型流感病毒中和50％所需的抑制剂(例如，抗体)的浓度。本领域的普通技术人员将了解，更低的IC_{50}值对应于更有效的抑制剂。

[0102] 在一个实施例中，根据本发明的抗体或其抗原结合片段在微量中和测定中具有表示为50％抑制浓度(IC_{50}ug/ml)的在从约0.01ug/ml至约50ug/ml范围内、或在从约0.01ug/ml至约5ug/ml的抗体的范围内、或在从约0.01ug/ml至约0.1ug/ml的抗体的范围内的用于中和甲型流感病毒的中和效力。

[0103] 在某些实施例中，在此所述的抗体可以诱导细胞死亡。“诱导细胞死亡”的抗体是引起有活力的细胞变成无活力的抗体。在一个实施例中，在此所述的抗体或其片段可以经由ADCC、CDC和/或ADCP诱导细胞死亡。测量ADCC、CDC和ADCP的测定是已知的。

[0104] 在一个实施例中，抗体或其片段经由细胞凋亡诱导细胞死亡。“诱导细胞凋亡”的抗体或其片段是诱导程序性细胞死亡的抗体或其片段，如通过膜联蛋白V的结合、DNA的片段化、细胞收缩、内质网的扩张、细胞破碎和/或膜囊泡(称为凋亡小体)的形成确定的。多种方法可用于评估与细胞凋亡相关联的细胞事件。例如，磷脂酰丝氨酸(PS)易位可以通过膜联蛋白结合来测量；DNA片段化可以通过DNA梯度来评估；并且可以通过亚二倍体细胞的任何增加来评估核/染色质凝聚以及DNA片段化。

[0105] 抗体的产生

[0106] 以下描述了用于产生如在此所述的抗体及其片段的技术。

[0107] 单克隆抗体

[0108] 单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术来制备，包括使用杂交瘤(Kohler等人，(1975)Nature[自然]，256:495;Harlow等人，(1988)Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册](Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社]，第2版);Hammerling等人，(1981)在:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas[单克隆抗体与T细胞杂交瘤]563-681(Elsevier[爱思唯尔公司]，纽约))、重组和噬菌体展示技术、或其组合。如在此使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质或分离的抗体的群体中获得的抗体，其中构成该群体的个别抗体除了可能少量存在的可能的天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，并且针对单一抗原位点。此外，与多克隆抗体制剂(其包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)形成对比，每种单克隆抗体针对抗原上的相同决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的有利之处在于它们可以在不被其他抗体污染的情况下合成。修饰词“单克隆”不应被理解为需要通过任何特定的方法来产生抗体。以下是用于产生单克隆抗体的代表性方法的描述(不是旨在为限制性的)，并且这些方法可以用来产生例如单克隆哺乳动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体、双抗体(diabody)、疫苗体(vaccibody)、线性抗体和多特异性抗体。

[0109] 杂交瘤技术

[0110] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法在本领域是常规的并且是众所周知的。在杂交瘤方法中，使小鼠或其他适当的宿主动物(如仓鼠)免疫以引发淋巴细胞，这些淋巴细胞产生或能够产生抗体，这些抗体将特异性地结合用于免疫的抗原。可替代地，淋巴细胞可以在体外进行免疫。在免疫之后，分离淋巴细胞，并且然后使用合适的融合剂或融合配偶体(如聚乙二醇)与骨髓瘤细胞系融合从而形成杂交瘤细胞(Goding，(1986)Monoclonal Antibodies:Principles and Practice[单克隆抗体:原理与实践]，第59-103页(Academic Press[学术出版社]))。在某些实施例中，所选择的骨髓瘤细胞是有效融合、支持由所选择的抗体产生细胞的稳定高水平抗体产生、并且对针对未融合的亲代细胞而选择的选择性培养基敏感的那些骨髓瘤细胞。在一方面，骨髓瘤细胞系是鼠类骨髓瘤系，如来源于从美国加利福尼亚州圣地亚哥市的索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center,San Diego,California,USA)可获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的、以及从美国马里兰州罗克维尔市的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Rockville,Maryland,USA)可获得的SP-2和衍生物(例如X63-Ag8-653细胞)的那些。还描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor，(1984)J.Immunol.[免疫学杂志]，133:3001;以及Brodeur等人，(1987)Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications[单克隆抗体产生技术与应用]，第51-63页(Marcel Dekker,Inc.[马塞尔德克尔公司]，纽约])。

[0111] 一旦产生具有所希望的特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞被鉴定出，就可以通过有限稀释程序而将这些克隆进行亚克隆并且通过标准方法使其生长。用于这一目的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外，杂交瘤细胞可以在动物中体内生长为腹水瘤，例如通过将细胞腹膜内(i.p.)注射至小鼠中。

[0112] 将由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规抗体纯化程序(包括但不限于,亲和色谱(例如使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖凝胶)或离子交换色谱、亲和标签、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、和渗析)从培养基、腹水液、或血清中分离。

[0113] 重组DNA技术

[0114] 使用重组DNA技术产生和筛选特异性抗体的方法在本领域是常规的并且是众所周知的。编码单克隆抗体或其片段的DNA可以使用常规程序容易地分离和/或测序。一旦分离,可以将DNA置于表达载体中,然后可以将这些表达载体转染到宿主细胞(例如,大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或不另外产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞)中,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。

[0115] 抗体或其变体的重组表达通常需要构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。因此,在此提供了可复制的载体,这些载体包括可操作地连接至启动子的编码抗体分子、抗体重链或轻链、抗体的重链或轻链可变结构域或其部分、或者重链或轻链CDR的核苷酸序列。此类载体可以包括编码抗体分子恒定区的核苷酸序列,并且可以将抗体可变结构域克隆到这种载体中,以用于表达整个重链、整个轻链、或整个重链和轻链两者。

[0116] 一旦通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞中,可以通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。因此,在此提供了宿主细胞,这些宿主细胞含有可操作地连接至异源启动子的编码在此所述的抗体或其片段、或其重链或轻链、或其部分、或单链抗体的多核苷酸。在某些用于表达双链抗体的实施例中,可以将编码重链和轻链两者的载体在宿主细胞中共表达,用于表达整个免疫球蛋白分子。

[0117] 可用作宿主用于表达重组抗体的哺乳动物细胞系在本领域是众所周知的,并且包括许多可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、人上皮肾293细胞、以及多种其他细胞系。不同的宿主细胞具有针对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以便确保所表达的抗体或其部分的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机器的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NSO(不内源性地产生任何功能性免疫球蛋白链的鼠类骨髓瘤细胞系)、SP20、CRL7030以及HsS78Bst细胞。通过使人淋巴细胞永生化而产生的人细胞系可以用来重组产生单克隆抗体。人细胞系PER.C6.(库赛尔公司(Crucell),荷兰)可以用于重组产生单克隆抗体。

[0118] 可以用作表达重组抗体的宿主的另外的细胞系包括但不限于昆虫细胞(例如Sf21/Sf9,粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)Bti-Tn5b1-4)或酵母细胞(例如酿酒酵母(S.cerevisiae)、毕赤酵母属(Pichia)、US 7326681;等)、植物细胞;以及鸡细胞。

[0119] 在某些实施例中,在此所述的抗体及其片段可以在细胞系中稳定表达。稳定表达可以用于重组蛋白的长期、高产量生产。可以用适当工程化的载体转化宿主细胞,该载体包括表达控制元件(包括但不限于,启动子、增强子、转录终止子、和聚腺苷酸化位点)、和选择性标记基因。在引入外源DNA后,可以允许细胞在富集培养基中生长1-2天,并且然后更换为选择性培养基。在重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许将质粒稳定整合进其染色体中的细胞生长并且形成病灶,进而可以将其克隆并且扩增成细胞系。用于以高

产量产生稳定细胞系的方法在本领域是众所周知的，并且试剂通常是可商购的。

[0120] 在某些实施例中，在此所述的抗体及其片段在细胞系中瞬时表达。瞬时转染是这样一种方法：在该方法中引入细胞的核酸不会整合至该细胞的基因组或染色体DNA中。事实上该核酸在细胞中被维持为染色体外元件，例如作为附加体。附加体的核酸的转录过程不受影响，并且产生由附加体的核酸编码的蛋白质。

[0121] 稳定或瞬时转染的细胞系被维持在本领域众所周知的用于表达和产生单克隆抗体的细胞培养基和条件中。在某些实施例中，哺乳动物细胞培养基是基于可商购的培养基配制品，包括例如DMEM或Ham's F12。在其他实施例中，将细胞培养基进行改良以便支持细胞生长和生物蛋白表达两者的增长。如在此使用的，术语“细胞培养基”、“培养基”和“培养基配制品”是指在多细胞生物体或组织以外的人工体外环境中用于细胞的维持、生长、增殖、或扩增的营养液。可以将细胞培养基改良以用于特定的细胞培养用途，包括例如，被配制来促进细胞生长的细胞培养生长培养基，或被配制来促进重组蛋白产生的细胞培养生产培养基。术语营养素、成分、以及组分(component)在此可互换地使用，是指组成细胞培养基的组分(constituent)。

[0122] 在一个实施例中，使用补料分批法维持细胞系。如在此使用的，“补料分批法”是指在首先用基础培养基孵育之后，用另外的营养素供应给补料分批细胞培养物的方法。例如，补料分批法可以包括在给定的时期内根据所确定的补料时间表添加补充培养基。因此，“补料分批细胞培养”是指这样一种细胞培养：其中最初将细胞(典型地为哺乳动物细胞)和培养基供应至培养容器，并且在培养期间，连续地或以不连续递增方式将另外的培养营养素馈送至培养物，有或没有在培养终止之前的定期的细胞和/或产物的收获。

[0123] 合适的细胞培养基以及其中含有的营养素对本领域技术人员而言是已知的。在一个实施例中，细胞培养基包括基础培养基以及产生改良的基础培养基的至少一种水解产物，例如基于大豆的水解产物、基于酵母的水解产物、或这两种类型的水解产物的组合。在另一个实施例中，另外的营养素可以仅包括基础培养基如浓缩的基础培养基，或者可以仅使用的水解产物或浓缩的水解产物。合适的基础培养基包括但不限于达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM)、DME/F12、最低必需培养基(MEM)、伊格尔基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、α-最低必需培养基(α-MEM)、格拉斯哥最低必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium,G-MEM)、PF CHO(参见例如，CHO无蛋白质培养基(西格玛公司(Sigma))或用于无蛋白质的CHO细胞的EX-CELL™325 PF CHO无血清培养基(SAFC生物科学公司(SAFC Bioscience)))、以及伊斯科夫改良的达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。基础培养基的其他实例包括BME基础培养基(Gibco公司-英杰公司(Invitrogen)；还参见Eagle,H(1965)Proc.Soc.Exp.Biol.Med.[实验生物学与医学学会会报]89,36)；达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(DMEM,粉末)(Gibco公司-英杰公司(#31600)；还参见Dulbecco和Freeman(1959)Virology[病毒学]8:396;Smith等人,(1960)Virology[病毒学]12:185,Tissue Culture Standards Committee[组织培养标准委员会],In Vitro[体外]6:2,93)；CMRL 1066培养基(Gibco公司-英杰公司(#11530)；还参见Parker等人,(1957)Special Publications[特别出版物],N.Y.Academy of Sciences[纽约科学院],5:303)。

[0124] 基础培养基可以是无血清的，意指该培养基不含血清(例如，胎牛血清(FBS)、马血清、山羊血清、或本领域的技术人员已知的任何其他动物源的血清)，或没有动物蛋白的培养基或化学上限定的培养基。

[0125] 可以改良基础培养基以便去除在标准基础培养基中发现的某些非营养组分，如各种无机和有机缓冲剂、一种或多种表面活性剂、以及氯化钠。此类组分从基础细胞培养基的去除允许剩余营养组分的浓度增加，并且可以改进总体的细胞生长和蛋白质表达。另外，可以根据细胞培养条件的要求，将省去的组分添加回至含有改良的基础细胞培养基的细胞培养基中。在某些实施例中，细胞培养基含有改良的基础细胞培养基和至少一种以下的营养素：铁源、重组生长因子、缓冲剂、表面活性剂、渗透压调节剂、能量源和非动物水解产物。另外，改良的基础细胞培养基可以任选地含有氨基酸、维生素、或氨基酸和维生素两者的组合。在另一个实施例中，改良的基础培养基进一步含有谷氨酰胺(例如L-谷氨酰胺)和/或甲氨蝶呤。

[0126] 可以使用本领域已知的补料分批、分批、灌注或连续补料生物反应器方法在生物反应器中大量地进行抗体生产。大规模生物反应器具有至少1000升的容量，例如，约1,000至100,000升的容量。小规模生物反应器通常是指在不大于大致100升的体积容量中的细胞培养，并且范围可以是从约1升至约100升。可替代地，一次性生物反应器(SUB)可以用于大规模或小规模培养。

[0127] 温度、pH、搅拌、曝气以及接种密度将取决于所使用的宿主细胞和有待表达的重组蛋白而变化。例如，重组蛋白细胞培养可以被维持在30℃与45℃之间的温度下。可以在培养过程期间监测培养基的pH，这样使得pH停留在所希望的水平，该所希望的水平对于某些宿主细胞来说可以是在6.0至8.0的pH范围内。

[0128] 噬菌体展示技术

[0129] 单克隆抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体文库中分离，这些抗体噬菌体文库使用以下文献中描述的技术产生：McCafferty等人，(1990)Nature[自然]，348:552-554；Clackson等人，(1991)Nature[自然]，352:624-628以及Marks等人，(1991)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]，222:581-597。使用此类方法，可以通过筛选使用从源自人淋巴细胞的mRNA制备的人VL和VH cDNA制备的重组组合抗体文库(例如，scFv噬菌体展示文库)分离抗体。用于制备和筛选此类文库的方法在本领域是已知的。

[0130] 在噬菌体展示方法中，将功能抗体结构域展示在噬菌体颗粒的表面上，这些颗粒携带对其进行编码的多核苷酸序列。在具体的实施例中，噬菌体可以用于展示从谱系或组合抗体文库(例如，人或鼠类)表达的抗原结合结构域。表达结合感兴趣的抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以使用标记的抗原或结合或捕获于固体表面或珠粒上的抗原来选择或鉴定。这些方法中使用的噬菌体典型地是丝状噬菌体，该噬菌体包括从具有Fab、Fv的噬菌体表达的fd和M13结合结合结构域或重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白的二硫化物稳定的Fv抗体结构域。

[0131] 在噬菌体选择之后，可以将来自噬菌体的抗体编码区分离并且用于产生全抗体(包括人抗体、人源化抗体)或任何其他所希望的抗原结合片段，并且在任何所希望的宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、和细菌)中表达。

[0132] 抗体纯化和分离

[0133] 一旦通过重组或杂交瘤表达产生了抗体分子，可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法，例如通过色谱法(包括但不限于离子交换色谱、亲和色谱特别是蛋白A或蛋白G亲和色谱、和尺寸分级柱色谱)；离心；差别溶解度；或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术来将其纯化。此外，抗体或其片段可以融合至异源多肽序列(在此称为“标签”)以促进纯化。

[0134] 在使用重组技术时，抗体可以细胞内、在周质间隙中产生，或直接分泌至培养基中。如果抗体是在细胞内产生，那么作为第一步，例如通过离心或超滤去除作为宿主细胞或溶解片段的颗粒碎片。Carter等人，(1992)Bio/Technology[生物/技术]，10:163-167描述了用于分离分泌到大肠杆菌的周质间隙中的抗体的程序。在抗体分泌到培养基中的情况下，通常首先使用可商购的蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)对来自此类表达系统的上清液进行浓缩。蛋白酶抑制剂如PMSF可以被包括在任何前述步骤中以便抑制蛋白水解，并且抗生素可以被包括来防止外来污染物的生长。

[0135] 从细胞制备的抗体组合物可以单独使用例如羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、离子交换色谱、凝胶电泳、渗析和/或亲和色谱或与其他纯化步骤组合来纯化。

[0136] 人抗体

[0137] 人抗体可以使用本领域众所周知的方法来产生。人抗体避免了与具有鼠类或大鼠可变区和/或恒定区的抗体相关的一些问题，这些可变区和/或恒定区可能导致抗体或其片段的快速清除或针对该抗体或其片段的免疫应答的产生。

[0138] 可以通过体外方法获得人抗体。适合的实例包括但不限于噬菌体展示(米迪缪尼公司(MedImmune，以前为CAT)、莫弗西斯生物公司(Morphosys)、Dyax公司、博适公司(Biosite)/梅达瑞克斯公司(Medarex)、逍马公司(Xoma)、Symphogen公司、亚力兄公司(Alexion，以前为Proliferon)、Affimed公司)、核糖体展示(米迪缪尼公司，以前为CAT))、酵母展示等。可以使用噬菌体展示技术从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱系体外产生人抗体和抗体片段。根据这项技术，抗体V结构域基因是以框内方式克隆至丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中，并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝，所以基于抗体的功能特性的选择还导致编码展现那些特性的抗体的基因的选择。因而，噬菌体模拟B细胞的一些特性。可以构建来自未免疫人供体的V基因谱系，并且可以按照由Marks等人，(1991)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]222:581-597，或Griffith等人，(1993)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12:725-734描述的技术而基本上分离针对各种抗原(包括自身抗原)的抗体。还可以通过体外活化的B细胞产生人抗体(参见，美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0139] 抗体片段

[0140] 在某些实施例中，本发明的抗体包括抗体片段或包含此类片段的抗体。典型地，抗体片段包括全长抗体的一部分，典型地是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$和Fv片段、双抗体、线性抗体和单链抗体分子。在一个实施例中，抗体片段包括抗原结合片段。

[0141] 在传统上，抗体片段是使用本领域众所周知的技术经由完整抗体的蛋白水解消化而获得的。然而，还可以通过重组宿主细胞直接产生抗体片段。Fab、Fv和scFv抗体片段全部都可以在大肠杆菌中表达并且从其分泌，因而允许容易地生产大量的这些片段。在一个实

施例中，可以从抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地，还可以直接从大肠杆菌中回收Fab'-SH片段并且将其化学偶联以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人，(1992)Bio/Technology[生物/技术]，10:163-167)。根据另一种方法，可以从重组宿主细胞培养物直接分离$F(ab')_2$片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练的从业人员将是清楚的。在其他实施例中，抗体是单链Fv片段(scFv)。

[0142] 抗体片段还可以包括结构域抗体，例如，含有抗体的小功能结合单位的抗体，这些小功能结合单位对应于人抗体和线性抗体的重链(VH)或轻链(VL)的可变区，这些可变区包括形成一对抗原结合区的一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)。(参见，Zapata等人，(1995)Protein Eng.[蛋白质工程]，8(10):1057-1062)。

[0143] 变体Fc区

[0144] Fc区中的变体可以增强或减弱抗体的效应子功能，并且可以改变抗体的药代动力学特性，例如半衰期。因此，在某些实施例中，抗体包括改变的Fc区(在此也称为“变体Fc区”)，其中已在Fc区中进行一个或多个改变以便改变抗体的功能特性和/或药代动力学特性。此类改变可以导致Clq结合和CDC的减少或增加，或者FcγR结合(对于IgG)和ADCC或ADCP的减少或增加。本发明涵盖在此所述的具有变体Fc区的抗体，其中已经进行改变以便微调效应子功能，增强或减少、或提供所希望的效应子功能。包括变体Fc区的抗体在这里也称为“Fc变体抗体”。如在此使用的，天然是指未修饰的亲本序列，并且包括天然Fc区的抗体在此称为“天然Fc抗体”。Fc变体抗体可以通过本领域技术人员众所周知的方法产生。非限制性实例包括分离抗体编码区(例如，从杂交瘤)以及在Fc区中进行一个或多个所希望的取代。可替代地，抗体的抗原结合部分或可变区可以被亚克隆到编码变体Fc区的载体中。在一个实施例中，与天然Fc区相比，变体Fc区表现出相似的诱导效应子功能的水平。在另一个实施例中，与天然Fc相比，变体Fc区表现出更高的效应子功能诱导。用于测量效应子功能的方法在本领域是众所周知的。

[0145] Fc区的修饰包括但不限于氨基酸取代、氨基酸添加、氨基酸缺失和对Fc氨基酸的翻译后修饰(例如糖基化)的改变，并且可以用于微调效应子功能。

[0146] Fc区包括排除第一恒定区免疫球蛋白结构域的抗体恒定区。因此，Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域，以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域、以及这些结构域的N-末端的柔性铰链。对于IgA和IgM，Fc可以包括J链。对于IgG，Fc包括免疫球蛋白结构域Cgamma2和Cgamma3(Cγ2和Cγ3)以及Cgamma1(Cγ1)与Cgamma2(Cγ2)之间的铰链。尽管Fc区的界限可以改变，人IgG重链Fc区通常被定义为在其羧基末端包括残基C226或P230，其中编号根据如Kabat中所示的EU索引进行。Fc可以是指分离中的这个区域或在抗体、抗体片段、或Fc融合蛋白背景下的这个区域。已在多个不同Fc位置处观察到多态性，包括但不限于如由EU索引编号的位置270、272、312、315、356、以及358，并且因此所呈现的序列与现有技术序列之间可能存在略微的差异。

[0147] 在一个实施例中，与天然Fc抗体相比，Fc变体抗体表现出对一种或多种Fc受体的改变的结合亲和力，这些Fc受体包括但不限于FcRn、FcγRI(CD64)(包括同种型FcγRIA、FcγRIB、和FcγRIC)；FcγRII(CD32，包括同种型FcγRIIA、FcγRIIB、和FcγRIIC)；和FcγRIII(CD16，包括同种型FcγRIIIA和FcγRIIIB)。

[0148] 抗体效应子功能包括ADCC，其是一种细胞毒性形式，在该细胞毒性形式中与存在

于某些细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、以及巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)结合的分泌的Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合携带抗原的靶细胞并且随后用细胞毒素杀伤这些细胞。针对细胞表面的特异性高亲和力IgG抗体"武装"细胞毒性细胞并且是这种杀伤所需要的。细胞的溶解是细胞外的,要求直接的细胞与细胞接触,并且不涉及补体。

[0149] 另一种抗体效应子功能是CDC,其是指通过补体系统进行细胞破坏的生物化学事件。补体系统是在正常血浆中发现的一种蛋白质复合系统,该系统与抗体组合以消灭病原菌以及其他外源细胞。

[0150] 术语抗体效应子功能涵盖的仍然另一种过程是ADCP,其是指细胞介导的反应,在该反应中表达一种或多种效应配体的非特异性细胞毒性细胞识别细胞上的结合抗体并且随后引起该细胞的吞噬作用。

[0151] 在某些实施例中,包括Fc变体的抗体相对于包括天然Fc区的抗体具有增强的细胞毒性或吞噬作用活性(例如,ADCC、CDC和ADCP)。

[0152] 在某些实施例中,Fc变体抗体展现出相较于天然Fc抗体降低的ADCC活性。在某些实施例中,Fc变体抗体不具有可检测的ADCC活性。在具体实施例中,ADCC活性的降低和/或消除可以归因于Fc变体抗体对Fc配体和/或受体展现出的亲和力降低。

[0153] 在替代实施例中,Fc变体抗体展现出相较于天然Fc抗体增加的ADCC活性。在具体实施例中,增加的ADCC活性可以归因于Fc变体抗体对Fc配体和/或受体展现出的亲和力增加。

[0154] 在一个实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体具有增强的与Fc受体FcγRIIIA的结合并且具有增强的ADCC活性。

[0155] 在某些实施例中,细胞毒性由CDC介导,并且Fc变体抗体相对于天然Fc抗体具有增强的或降低的CDC活性。在一个实施例中,在此所述的抗体展现出相较于天然Fc抗体增加的CDC活性。在具体实施例中,CDC活性的增加可以归因于Fc变体抗体对C1q展现出的亲和力增加。抗体可以借助COMPLEGENT®技术(协和发酵麒麟有限公司(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd))表现出与天然Fc抗体相比增加的CDC活性,该COMPLEGENT®技术增强抗体的主要作用机制之一,CDC。使用被称为同种型嵌合现象的方法,在该方法中IgG3(抗体的同种型)的多个部分被引入IgG1(治疗性抗体的标准同种型)的相应区中,COMPLEGENT®技术使CDC活性显著增强从而超过IgG1或IgG3的CDC活性,同时保留IgG1的所希望的特征,如ADCC、PK曲线和蛋白A结合。此外,该技术可以与POTELLIGENT®技术一起使用,从而产生具有增强的ADCC和CDC活性的更优异的治疗性Mab(ACCRETAMAB®)。

[0156] 在另一个实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体可能具有增强的ADCC活性和增强的血清半衰期。在一个实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体可能表现出增强的CDC活性和增强的血清半衰期。在另一个实施例中,相对于天然Fc抗体,Fc变体抗体可能具有增强的ADCC活性、增强的CDC活性和增强的血清半衰期。

[0157] 可以通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来增加包括Fc区的蛋白质的血清半衰期。如在此使用的,术语"抗体半衰期"意指抗体的药代动力学特性,它是抗体分子在它们给予之后的平均存活时间的量度。抗体半衰期可以表示为从患者的身体或其特定区室消除50%已知量的免疫球蛋白所需的时间,例如,如在血清中(即循环半衰期)或在其他组织中测量

的。从一个免疫球蛋白或一类免疫球蛋白到另一个免疫球蛋白或另一类免疫球蛋白，半衰期可能不同。通常，抗体半衰期的增加导致循环中所给予抗体的平均停留时间(MRT)的增加。

[0158] 半衰期的增加允许减少给予患者的药物量以及减少给予频率。为了增加抗体的血清半衰期，可以将补救受体结合表位掺入抗体或其片段中。如在此使用的，术语“补救受体结合表位”是指引起IgG分子的体内血清半衰期的增加的IgG分子(例如，IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4)的Fc区的表位。

[0159] 可替代地，具有增加的半衰期的抗体可以通过修饰被鉴定为涉及Fc与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基而产生。另外，可以利用本领域广泛使用的技术通过与PEG或白蛋白轭合来增加在此所述的抗体的半衰期。

[0160] 在一个实施例中，本发明提供了Fc变体，其中Fc区包括在一个或多个选自以下位置处的修饰(例如，氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失)：221、225、228、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、250、251、252、254、255、256、257、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、308、313、316、318、320、322、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、428、433、434、435、436、440、和443，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。任选地，Fc区可以包括本领域技术人员已知的在另外的和/或替代位置处的修饰。

[0161] 在具体的实施例中，本发明提供了Fc变体，其中Fc区包括至少一个选自以下的取代：221K、221Y、225E、225K、225W、228P、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235E、235F、236E、237L、237M、237P、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L 243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、250E、250Q、251F、252L、252Y、254S、254T、255L、256E、256F、256M、257C、257M、257N、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265A、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、296G、297S、297D、297E、298A、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、308F、313F、316D、318A、318S、320A、320S、322A、322S、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、326A、326D、326E、326G、326M、326V、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、333A、333D、333G、333Q、333S、333V、334A、334E、334H、334L、334M、334Q、334V、334Y、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、428L、428F、433K、433L、434A、424F、434W、434Y、436H、440Y和443W，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。任选地，Fc区可以包括本领域技术人员已知的另外的和/或替代氨基酸取代。

[0162] 在具体的实施例中，本发明提供了Fc变体抗体，其中Fc区包括在一个或个选自以下位置处的至少一个修饰(例如，氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失)：228、234、235和

331，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。在一个实施例中，修饰是选自以下的至少一个取代：228P、234F、235E、235F、235Y和331S，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。

[0163] 在另一个具体的实施例中，本发明提供了Fc变体抗体，其中Fc区是IgG4Fc区并且包括在一个或多个选自以下位置处的至少一个修饰：228和235，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。在仍另一个具体的实施例中，Fc区是IgG4Fc区，并且非天然存在的氨基酸选自228P、235E和235Y，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。

[0164] 在另一个具体的实施例中，本发明提供了Fc变体，其中Fc区包括在一个或多个选自以下位置处的至少一个非天然存在的氨基酸：239、330和332，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。在一个实施例中，修饰是选自239D、330L、330Y、和332E的至少一个取代，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。

[0165] 在具体的实施例中，本发明提供了Fc变体抗体，其中Fc区包括在一个或多个选自以下位置处的至少一个非天然存在的氨基酸252、254和256，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。在一个实施例中，修饰是选自252Y、254T和256E的至少一个取代，如由Kabat中所示的EU索引进行编号。在一个实施例中，修饰包括三个取代252Y、254T和256E，如由Kabat中所示的EU索引进行编号(称为“YTE”)。

[0166] 在某些实施例中，由IgG抗体引发的效应子功能取决于连接至蛋白质的Fc区的碳水化合物部分(Claudia Ferrara等人，(2006)Biotechnology and Bioengineering[生物技术与生物工程]93:851-861)。因而，可以对Fc区的糖基化进行修饰以增强或降低效应子功能。因此，在一个实施例中，抗体的Fc区包括氨基酸残基的改变的糖基化。在另一个实施例中，氨基酸残基的改变的糖基化导致效应子功能降低。在另一个实施例中，氨基酸残基的改变的糖基化导致效应子功能增强。在一些实施例中，Fc区具有减少的岩藻糖基化。在另一个实施例中，Fc区是未岩藻糖基化的。

[0167] 将唾液酸添加至IgG分子上的寡糖可以增强它们的抗炎症活性和改变它们的细胞毒性(Keneko等人，Science[科学](2006)313:670-673；Scallon等人，(2007)Mol.Immunol.[分子免疫学]44(7):1524-34)。具体地，具有增加的唾液酸化的IgG分子具有抗炎特性，然而具有减少的唾液酸化的IgG分子具有增加的免疫刺激特性(例如，增加ADCC活性)。因此，可以针对具体的治疗应用对抗体进行修饰以具有适当的唾液酸化特征。在一个实施例中，与天然Fc区相比，抗体的Fc区包括改变的唾液酸化特征。在一个实施例中，与天然Fc区相比，抗体的Fc区包括增加的唾液酸化特征。在另一个实施例中，与天然Fc区相比，抗体的Fc区包括减少的唾液酸化特征。Fc结构域的其他修饰和/或取代和/或添加和/或缺失将易于对本领域技术人员显而易见。

[0168] 糖基化

[0169] 在一个实施例中，对本发明抗体的可变区中的糖基化模式进行修改以改变抗体对抗原的亲和力。在一个实施例中，抗体是未糖基化的(即，抗体缺乏糖基化)。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变在抗体序列之内的一个或多个糖基化位点来完成。例如，可以进行一个或多个氨基酸取代，导致一个或多个可变区框架糖基化位点的消除，由此消除在那个位点的糖基化。这种未糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。此外，未糖基化的抗体可以在缺乏必要的糖基化机器的细菌细胞中产生。

[0170] 抗体轭合物

[0171] 在另一个实施例中，抗甲型流感抗体或其片段与部分共价附接，并且可以被称为抗体轭合物。适合于与抗体附接的部分包括但不限于蛋白质、肽、药物、标记和细胞毒素，并且可以与抗体或其片段轭合以改变或微调抗体或其片段的一种或多种特征(例如生化的、结合的和/或功能的)。用于形成轭合物、作出氨基酸和/或多肽改变以及翻译后修饰的方法在本领域是众所周知的。

[0172] 在一个实施例中，附接的物质是治疗剂、可检测的标记(在此还称为报告分子)或固体载体。用于附接至抗体的合适的物质包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、多糖、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、半抗原、药物、激素、脂质、脂质组装体、合成聚合物、聚合物微粒、生物细胞、病毒、荧光团、生色团、染料、毒素、半抗原、酶、抗体、抗体片段、放射性同位素、固体基质、半固体基质及其组合。

[0173] 在某些实施例中，抗体与固体支撑物轭合。抗体可以轭合至固体支撑物作为筛选和/或纯化和/或制造过程的一部分。可替代地，抗体可以轭合至固体支撑物作为诊断方法或组合物的一部分。合适的固体支撑物典型地基本上不溶于液相。许多固体支撑物是可获得的并且对于本领域技术人员而言是已知的，并且包括固体和半固体基质，例如气凝胶和水凝胶、树脂、珠粒、生物芯片(包括薄膜包被的生物芯片)、微流体芯片、硅芯片、多孔板(也称为微量滴定板或微孔板)、膜、导电性和非导电性金属、玻璃(包括显微镜载玻片)和磁性载体。固体支撑物的更具体的实例包括硅胶、聚合物膜、颗粒、衍生的塑料薄膜、玻璃珠粒、棉布、塑料珠粒、氧化铝凝胶、多糖(例如琼脂糖凝胶)、聚(丙烯酸酯)、聚苯乙烯、聚(丙烯酰胺)、多元醇、琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、淀粉、FICOLL、肝素、糖原、支链淀粉、甘露聚糖、菊糖、硝化纤维、重氮纤维素、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯(包括聚(乙二醇))、尼龙、乳胶珠粒、磁性珠粒、顺磁性珠粒、超顺磁珠粒、和淀粉。

[0174] 在一些实施例中，固体支撑物可以包括用于附接抗体的反应性官能团，包括但不限于羟基、羧基、氨基、巯基、醛、卤素、硝基、氰基、酰胺基、脲、碳酸酯、氨基甲酸酯、异氰酸酯、砜、磺酸酯、磺酰胺、和亚砜。

[0175] 合适的固相支撑物可以根据期望的最终用途和对于各种合成方案的适合性进行选择。例如，在需要形成酰胺键以使抗体附接至固体支撑物的情况下，可以采用一般可用于肽合成的树脂，例如聚苯乙烯(例如，获自巴亨公司(Bachem Inc.)、半岛实验室(Peninsula Laboratories)等的PAM树脂)、POLYHIPE™树脂(获自阿米诺技术公司(Aminotech)，加拿大)、聚酰胺树脂(获自半岛实验室)、接枝有聚乙二醇的聚苯乙烯树脂(TentaGel™，拉普聚合物公司(Rapp Polymere)，图宾根(Tubingen)，德国)、聚二甲基-丙烯酰胺树脂(可获自米利根公司/生物搜索公司(Milligen/Biosearch)，加利福尼亚州)或PEGA珠粒(获自聚合物实验室(Polymer Laboratories))。

[0176] 在某些实施例中，将抗体或其片段轭合至标记用于诊断或其他测定，在该诊断或其他测定中可以检测抗体和/或其关联的配体。标记包括但不限于发色团、荧光团、荧光蛋白、磷光性染料、串联染料(tandem dye)、颗粒、半抗原、酶以及放射性同位素。

[0177] 在某些实施例中，将抗体轭合至荧光团，包括但不限于芘、蒽、萘、吖啶、芴、吲哚或苯并吲哚、噁唑或苯并噁唑、噻唑或苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD)、花菁、羰花菁、喹诺酮(carbostyryl)、卟啉、水杨酸酯、邻氨基苯甲酸酯、萘、苉、吡啶、喹啉、硼杂聚氮杂引达省(borapolyazaindacene)、呫吨、噁嗪、苯并噁嗪、卡巴嗪、芴酮、

香豆素、苯并呋喃、苯并芴酮及其衍生物。如在此使用的，噁嗪包括试卤灵、氨基噁嗪酮、二氨基噁嗪及其苯并取代的类似物。

[0178] 在具体的实施例中，荧光团包括呫吨(对甲氨基酚(rhodol)、罗丹明、荧光素及其衍生物)、香豆素、花菁、芘、噁嗪和硼杂聚氮杂引达省。在其他实施例中，此类荧光团是磺化的呫吨、氟化的呫吨、磺化的香豆素、氟化的香豆素以及磺化的花菁。还包括以下列商品名出售且通常已知为以下的染料：ALEXAFLUOR®、DyLight、CY®Dyes、BODIPY®、OREGONGREEN®、PACIFIC BLUE™、IRDYE®、FAM、FITC、以及ROX™。

[0179] 附接至抗体的荧光团的选择将确定被轭合的抗体的吸收和荧光发射特性。可以用于抗体和抗体结合配体的荧光团标记的物理特性包括但不限于光谱特性(吸收、发射和斯托克斯位移)、荧光强度、使用期、偏振和光漂白速率或其组合。所有这些物理特性可以用于将一个荧光团与另一个荧光团区分开，并且从而允许多元分析。在某些实施例中，荧光团在大于480nm的波长下具有最大吸收。在其他实施例中，荧光团在处于或接近488nm至514nm(特别适合用于由氩离子激光激发源的输出激发)或在接近546nm(特别适合用于由水银弧光灯激发)下吸收。在其他实施例中，荧光团可以针对组织或完整生物体应用在NIR(近红外区域)中发射。荧光标记的其他所希望的特性可以包括细胞渗透性和低毒性，例如，如果将在细胞或生物体(例如，活体动物)中执行抗体的标记。

[0180] 在某些实施例中，酶是标记并且轭合至在此所述的抗体。因为可以获得可检测的信号的放大，从而得到提高的测定灵敏度，所以酶是合乎需要的标记。酶自身不产生可检测的响应，但是当它被适当的底物接触时，起到分解底物的作用，这样使得被转化的底物产生荧光、比色或发光信号。因为标记试剂上的一种酶可以导致多个底物被转化成可检测的信号，所以酶将可检测的信号放大。选择酶底物以产生优选的可测量的产物，例如，比色、荧光或化学发光。此类底物在本领域中广泛使用且是本领域的技术人员众所周知的。

[0181] 在一个实施例中，比色或荧光底物和酶组合使用氧化还原酶如辣根过氧化物酶和底物如3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)，这产生有区别的颜色(分别为棕色和红色)。产生可检测的产物的其他比色氧化还原酶底物包括但不限于：2,2-联氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、邻联茴香胺、5-氨基水杨酸、4-氯-1-萘酚。荧光底物包括但不限于，高香草酸或4-羟基-3-甲氧基苯乙酸；还原的吩噁嗪和还原的苯并噻嗪，包括Amplex®Red试剂及其变体；以及还原的二氢呫吨，包括二氢荧光素；以及二氢罗丹明，包括二氢罗丹明123。作为酪胺的过氧化物酶底物表示一类独特的过氧化物酶底物，因为它们在酶作用之前可以固有地可检测，但在被描述为酪胺信号放大(TSA)的过程中通过过氧化物酶的作用“被固定在适当位置”。这些底物广泛地用于标记样品(这些样品是细胞、组织或阵列)中的抗原以用于其随后通过显微术、流式细胞术、光学扫描和荧光测定法进行的检测。

[0182] 在另一个实施例中，比色(并且在一些情况下荧光)底物和酶组合使用磷酸酶(如酸性磷酸酶、碱性磷酸酶或这样的磷酸酶的重组形式)与比色底物(如5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯(BCIP)、6-氯-3-吲哚基磷酸酯、5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯、对硝基苯基磷酸酯、或邻硝基苯基磷酸酯)或与荧光底物(如4-甲基伞形酮基磷酸酯、6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素基磷酸酯、荧光素二磷酸酯、3-邻甲基荧光素磷酸酯、试卤灵磷酸酯、9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基吖啶-2-酮-7-基)磷酸酯(DDAO磷酸酯)或ELF 97、ELF 39或相关磷酸酯)的组合。

[0183] 糖苷酶，具体地说β-半乳糖苷酶、β-葡糖醛酸糖苷酶和β-葡糖苷酶是另外适合的酶。适当的比色底物包括但不限于，5-溴-4-氯-3-吲哚基β-D-吡喃半乳糖苷(X-gal)和类似的吲哚基半乳糖苷、葡糖苷和葡糖苷酸、邻硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、以及对硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷。在一个实施例中，荧光底物包括试卤灵β-D-吡喃半乳糖苷、荧光素二半乳糖苷(FDG)、荧光素二葡糖苷酸以及它们的结构变体4-甲基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷、羧基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷、以及氟化香豆素β-D-吡喃半乳糖苷。

[0184] 另外的酶包括但不限于，水解酶如胆碱酯酶和肽酶、氧化酶如葡萄糖氧化酶和细胞色素氧化酶、以及还原酶，对于这些酶适合的底物是已知的。

[0185] 酶及其产生化学发光的适当的底物优选用于一些测定。这些包括但不限于天然和重组形式的荧光素酶和水母发光蛋白。磷酸酶、糖苷酶和氧化酶的产生化学发光的底物(如含有稳定的二氧杂环丁烷、鲁米诺、异鲁米诺以及吖啶酯的那些)也是有用的。

[0186] 在另一个实施例中，半抗原如生物素可以被用作标记。生物素是有用的，这是因为它可以在酶系统中起作用以进一步放大可检测的信号并且它可以充当有待在亲和色谱中使用用于分离目的标签。出于检测目的，使用对生物素具有亲和力的酶轭合物，如抗生物素蛋白-HRP。随后添加过氧化物酶底物以产生可检测的信号。

[0187] 半抗原还包括激素、天然存在和合成的药物、污染物、过敏原、影响分子、生长因子、趋化因子、细胞因子、淋巴因子、氨基酸、肽、化学中间体、核苷酸等。

[0188] 在某些实施例中，荧光蛋白可以轭合至抗体作为标记。荧光蛋白的实例包括绿色荧光蛋白(GFP)和藻胆蛋白及其衍生物。荧光蛋白(尤其是藻胆蛋白)对于产生被标记上标记试剂的串联染料尤其有用。出于获得较大的斯托克斯位移的目的，这些串联染料包括荧光蛋白和荧光团，其中发射光谱从荧光蛋白的吸收光谱的波长发生更远的位移。对于检测样品中的较低量的抗原来说这是特别有利的，其中发射的荧光被最大限度地优化，换言之很少至没有发射光被荧光蛋白重吸收。为了实现这一点，荧光蛋白和荧光团充当能量转移对，其中荧光蛋白在荧光团所吸收的波长下发射，并且荧光团随后在远离仅存在荧光蛋白的情况下所能够获得的波长的波长下发射。可替代地，荧光团充当能量供体，并且荧光蛋白是能量受体。

[0189] 医学治疗和用途

[0190] 在此所述的抗甲型流感抗体及其结合片段和变体可以用于治疗、减轻、预防和/或用于检测、诊断和/或预后甲型流感病毒感染。

[0191] 诊断方法可以包括使抗体或抗体片段与样品相接触。此类样品可以是从例如鼻腔通道、鼻窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑或皮肤取的组织样品。检测、诊断和/或预后方法还可以包括检测抗原/抗体复合物。

[0192] 在一个实施例中，本发明提供了通过向受试者给予有效量的抗体或其抗原结合片段或包含该抗体或其抗原结合片段的药物组合物来治疗该受试者的方法。在一个实施例中，该方法减轻受试者的甲型流感病毒感染。在另一个实施例中，该方法预防受试者的甲型流感病毒感染、降低受试者的甲型流感病毒感染的风险或延迟受试者的甲型流感病毒感染。在一个实施例中，受试者是哺乳动物。在更具体的实施例中，受试者是人。在一个实施例中，受试者包括但不限于，特别处于甲型流感病毒感染的风险或易患甲型流感病毒感染的受试者，例如，免疫功能低下的受试者。

[0193] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合片段是基本上纯化的(即，基本上不含限制其作用或产生不希望的副作用的物质)。在一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段在暴露后给予，或在受试者已经暴露于甲型流感病毒或感染上甲型流感病毒之后给予。在另一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段在暴露前给予，或给予尚未暴露于甲型流感病毒或尚未感染上甲型流感病毒的受试者。在一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段给予对一种或多种甲型流感亚型呈血清阴性的受试者。在另一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段给予对一种或多种甲型流感亚型呈血清阳性的受试者。在另一个实施例中，患者的血清状态是未知的。在一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段在暴露、感染或症状发作的1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天内给予受试者。在另一个实施例中，可以将抗体或其抗原结合片段在暴露、感染或症状发作后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、15天、20天、25天、30天或其间的任何天数之后给予受试者。

[0194] 治疗可以是单剂量方案或多剂量方案，并且抗体或其抗原结合片段可以用于被动免疫。

[0195] 在一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段给予受试者而不给予另一种抗病毒药物。在另一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段与一种或多种抗病毒药物组合给予受试者。在一个实施例中，将抗体或其抗原结合片段与一种或多种小分子抗病毒药物组合给予受试者。小分子抗病毒药物包括神经氨酸酶抑制剂，如奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®)；以及金刚烷，如金刚烷胺和金刚乙胺。

[0196] 在另一个实施例中，本发明提供了用作用于预防或治疗甲型流感病毒感染的药物的组合物。在一个实施例中，组合物包括如在此所述的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中，组合物包括如在此所述的抗体或其抗原结合片段作为唯一的抗病毒药物。在另一个实施例中，组合物包括如在此所述的抗体或其抗原结合片段与一种或多种另外的抗病毒药物的组合。

[0197] 本发明还提供了制备药物组合物的方法，该方法包括将单克隆抗体与一种或多种药学上可接受的载体掺混的步骤，其中抗体是单克隆抗体。

[0198] 本发明还提供了药物组合物。此类组合物包括治疗有效量的抗体或其抗原结合片段、以及药学上可接受的载体。如在此使用的术语“药学上可接受的”意指由联邦政府或州政府的监管机构批准的或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的，用于在动物体内并且更具体地在人体内使用。术语“载体”是指与治疗剂一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。在一个实施例中，药物组合物含有治疗有效量的抗体或其抗原结合片段(例如，以纯的形式)连同合适量的载体以便提供适当给予患者的形式。配制品应该符合给予模式。

[0199] 给药和给予

[0200] 如在此使用的，术语“剂量”是指在指定时间或以指定间隔获取的特定量的抗体治疗剂。如在此使用的，术语“给药”是指给予组合物(例如包括在此所述的抗体或抗体片段的药物组合物)以实现治疗目的。

[0201] “给药方案”是指剂量和给予该剂量的时间间隔。在一个实施例中，给药方案是治疗周期的一部分。如在此使用的，术语“治疗周期”是指给予抗体的时期接着一个不给予抗体的时期，其中后续周期的开始以重新开始给予抗体为特征，这样使得治疗周期允许在抗体给予的几天之间的休息时期。治疗周期可以在天数上有所不同，例如15天、16天、17天、18

天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。

[0202] 在一个实施例中，在多于一天内给予抗体。例如，抗体可以每天给予一次持续一天，或者在连续两天或更多天每天给予一次，例如，抗体可以每天给予一次持续1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一个实施例中，每天给予相同剂量的抗体。在另一个实施例中，在一天或多天内给予不同剂量的抗体。例如，相对于前一天接受的剂量，患者可以在给予当天接受更高剂量的抗体。可替代地，相对于前一天接受的剂量，患者可以在给予当天接受更低剂量的抗体。在另一个实施例中，抗体的给予可以发生在一个或多个治疗周期中。在一个实施例中，相同的给药方案可以在随后的治疗周期中重复，即在第一治疗周期完成之后重复。

[0203] 在一个实施例中，将至少约200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1,000mg、1,250mg、1,500mg、1,750mg、2,000mg、2,250mg、2,500mg、2,750mg、3,000mg、3,250mg或3,500mg的抗甲型流感抗体或其抗原结合片段给予患者。

[0204] 在一个实施例中，将至多200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1,000mg、1,250mg、1,500mg、1,750mg、2,000mg、2,250mg、2,500mg、2,750mg、3,000mg、3,250mg或3,500mg的抗甲型流感抗体或其抗原结合片段给予患者。

[0205] 在另一个实施例中，将约200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1,000mg、1,250mg、1,500mg、1,750mg、2,000mg、2,250mg、2,500mg、2,750mg、3,000mg、3,250mg或3,500mg的抗甲型流感抗体或其抗原结合片段给予患者。

[0206] 在另一个实施例中，将200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1,000mg、1,250mg、1,500mg、1,750mg、2,000mg、2,250mg、2,500mg、2,750mg、3,000mg、3,250mg或3,500mg的抗甲型流感抗体或其抗原结合片段给予患者。

[0207] 在一个实施例中，在此提供的剂量用于给予具有平均体重和其他相关生物学特征的成年人。在另一个实施例中，剂量用于给予不具有平均体重和其他相关生物学特征的成年人(包括例如肥胖或儿科患者)，其中调整剂量以补偿诸如体重或其他相关生物学特性等事物。在另一个实施例中，在此提供的剂量用于给予婴儿或儿童，其中调整剂量以补偿诸如体重和其他相关生物学特征等事物。

[0208] 抗体可以通过任何方便的途径给予，并且可以与其他生物活性剂一起给予，例如与一种或多种抗病毒药物例如奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®))和金刚烷(例如金刚烷胺和金刚乙胺)组合给予。

[0209] 给予可以是全身性的或局部的，并且可以按单剂量或多剂量给予。

[0210] 各种递送系统是已知的并且可以用于给予抗甲型流感抗体。给予方法包括但不限

于胃肠外给予，包括皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下给予；硬膜外和黏膜途径，包括例如鼻内、吸入和口服途径。在更具体的实施例中，抗体是胃肠外给予的，例如是肌内、静脉内或皮下给予的。

[0211] 在一个实施例中，抗体是静脉内给予的。在更具体的实施例中，抗体是使用静脉内(IV)输注泵给予的。在一个实施例中，抗体以至少约1mg/min、5mg/min、10mg/min、15mg/min或20mg/min、25mg/min、30mg/min、35mg/min、40mg/min、45mg/min或50mg/min的输注速率静脉内给予。在另一个实施例中，输注速率为约10mg/min、15mg/min或20mg/min、25mg/min、30mg/min、40mg/min、或50mg/min。在一个实施例中，抗体通过IV输注经一段时间给予，例如经至少约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时、以及至多约3小时、4小时、5小时或6小时。在另一个实施例中，抗体通过IV输注经一段时间给予，例如约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时。

[0212] 试剂盒和制品

[0213] 在另一个实施例中，提供了含有可用于治疗和/或预防甲型流感病毒感染的材料的制品。在一个实施例中，制品包括容器和在该容器上或与该容器关联的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶和注射器，并且可以由各种材料(包括例如玻璃或塑料)形成。在一个实施例中，容器容纳有效治疗和/或预防甲型流感病毒感染的组合物。在一个实施例中，组合物包括如在此所述的抗甲型流感抗体或其片段。

[0214] 在一个实施例中，制品包括标签或包装说明书，该标签或包装说明书指示组合物用于治疗和/或预防甲型流感病毒感染。在一个实施例中，标签或包装说明书指示抗体或抗原结合片段可以在暴露后或在受试者已经暴露于甲型流感病毒或感染上甲型流感病毒之后给予。在另一个实施例中，标签或包装说明书指示抗体或其抗原结合片段可以在暴露前给予，或给予尚未暴露于甲型流感病毒或尚未感染上甲型流感病毒的受试者。在一个实施例中，标签或包装说明书指示抗体或其抗原结合片段可以给予对一种或多种甲型流感亚型呈血清阴性的受试者。在另一个实施例中，标签或包装说明书指示抗体或其抗原结合片段可以给予对一种或多种甲型流感亚型呈血清阳性的受试者。在另一个实施例中，将组合物给予血清状态未知的患者。在一个实施例中，标签或包装说明书指示抗体或其抗原结合片段可以在暴露、感染或症状发作的1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天内给予受试者。在另一个实施例中，可以将抗体或其抗原结合片段在暴露、感染或症状发作后1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、15天、20天、25天、30天或其间的任何天数之后给予受试者。

[0215] 在一个实施例中，除了抗甲型流感抗体或片段之外，制品还包括一种或多种小分子抗病毒药物，包括但不限于神经氨酸酶抑制剂(如奥司他韦(TAMIFLU®)、扎那米韦(RELENZA®))和金刚烷(如金刚烷胺和金刚乙胺)。

[0216] 如在本发明中所述的抗体及其片段还可以被包括在用于诊断甲型流感病毒感染的试剂盒中或在用于监测疫苗免疫原性的试剂盒中。

[0217] 实例

[0218] 实例1

[0219] 在健康成年人中在双盲、单剂量、安慰剂对照的、剂量递增研究中评估MEDI8852的安全性和药代动力学。

[0220] A.受试者

[0221] 使用以下纳入标准评估40名受试者:健康男性或女性,年龄在18至65岁,体重在45kg至110kg,收缩血压(BP)小于140mm Hg,舒张血压小于90mm Hg。

[0222] B.剂量

[0223] 将40名受试者随机分组到群组,跨4个固定剂量群组在第1天(给药的第一天)接受MEDI8852或安慰剂的单次IV剂量。MEDI8852以50mg/mL的浓度作为无菌液体药物产品提供,并且储存在2℃至8℃(36°F至46°F)下。在给予之前,在IV袋中将MEDI8852稀释在0.9%(w/v)盐水中并且以IV输注给予。安慰剂/稀释剂是0.9%(w/v)注射用盐水。使用IV输注泵通过低蛋白结合0.2μm或0.22μm过滤器以20mg/min的恒定输注速率给予IV输注。

[0224] 40名受试者随机分组到以下4个群组:

[0225] • 群组1:250mg MEDI8852(n=6)或安慰剂(n=2)作为单次IV输注

[0226] • 群组2:750mg MEDI8852(n=10)或安慰剂(n=2)作为单次IV输注

[0227] • 群组3:1,500mg MEDI8852(n=10)或安慰剂(n=2)作为单次IV输注

[0228] • 群组4:3,000mg MEDI8852(n=6)或安慰剂(n=2)作为单次IV输注

[0229] C.药代动力学

[0230] 收集血液样品以使用经验证的夹心酶联免疫吸附测定方法评估MEDI8852的药代动力学(PK)。在预先指定的时间点取血液样品。

[0231] 在图1中所示的平均值±标准偏差图显示MEDI8852浓度曲线通常表现出初始快速下降,接着是缓慢下降。

[0232] 使用Phenix WinNonlin(法赛特公司(Pharsight Corporation),圣路易斯,密苏里州)进行非区室分析(NCA)以评估以下PK参数:最大血清浓度(C_{max})、达到最大血清浓度的时间(T_{max})、半衰期($t_{1/2}$)、从时间0到t的浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})、从时间0到无穷大的浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-inf})、在稳定状态的体积(V_{ss})、分布体积(V_z)和清除率(CL)。在表1中所示的结果表明单次IV剂量后的半衰期为大约19.4至22.6天。另外,剂量组之间的半衰期、清除率(CL)和在稳定状态的分布体积(Vss)的一致性PK值表明MEDI8852PK是剂量线性的。

代理人案号：FLUA-200-WO-PCT

[0233]

表1

剂量	参数	$t_{1/2}$	C_{max}	AUC_{last}	AUC_{∞}	T_{max}*	CL_z	V_{ss}
(mg)		(天)	(μg/mL)	(μg* 天/mL)	(μg* 天/mL)	(天)	(mL/天)	(mL)
250	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值 (SD)	22.6 (4.0)	85.2 (16.6)	953 (150)	1000 (167)	0.04	257 (42)	7690 (1670)
750	N	10	10	10	10	10	10	10
	平均值 (SD)	19.4 (4.6)	235 (56.7)	2850 (762)	2990 (794)	0	269 (79.7)	6510 (986)
1,500	N	10	10	10	10	10	10	10
	平均值 (SD)	20.9 (4.4)	497 (171)	5860 (2640)	6360 (2870)	0.04	318 (277)	8150 (6380)
3,000	N	6	6	6	6	6	6	6
	平均值 (SD)	21.7 (6.6)	1110 (307)	16600 (5320)	17200 (6110)	0	200 (111)	5260 (741)

C_{max} = 观察到的最大浓度；
AUC_{last} = 从时间0到无穷大的曲线下面积；
CL = 全身清除率；
N = 数目；
SD = 标准偏差。
* 报告了Tmax的中值。
AUC_{∞} = 从时间0到无穷大的浓度-时间曲线下面积；
$t_{1/2}$ = 末端消除半衰期；
V_{ss} = 给予后稳定状态的分布体积；

[0234] D.群体建模与模拟

[0235] 使用NONMEM(版本7.2)(可从爱尔兰都柏林的ICON开发解决方案公司(ICON Development Solutions)商购获得)进行群体分析。使用具有一阶消除的二区室模型来描

述数据。然后使用NONMEM群体模型来模拟MEDI8852群体PK(图2)。结果显示在750mg组与3,000mg组之间有良好的浓度分离。

[0236] E.抗药抗体

[0237] 使用电化学发光溶液相桥接免疫测定法在第15(±1)天、第29(±2)天和第101(±5)天收集血液样品以评估在血清中对MEDI8852的抗药抗体(ADA)应答。所有的ADA结果均为阴性(即,未发现抗药抗体)。

[0238] 实例2

[0239] 使用MEDI8852的1b/2a期临床研究如下进行。以750mg或3000mg的剂量通过IV给予向患有甲型流感病毒感染的门诊患者个体给予MEDI8852。一些个体还在MEDI8852给予之前、之时或之后给予奥司他韦,这是当前的护理标准。感染可以用阳性快速抗原测试来确认,或用培养、PCR或抗原测试在研究站点确认。治疗方案显示在下表2中。

[0240] 表2治疗方案

[0241]

群组	受试者数	治疗方案
1	40	75 mg 奥司他韦 PO BID 持续 5 天,750 mg MEDI8852 作为单次 IV 输注
2	40	75 mg 奥司他韦 PO BID 持续 5 天, 3,000 mg MEDI8852 作为单次 IV 输注
3	40	75 mg 奥司他韦 PO BID 持续 5 天以及安慰剂作为单次 IV 输注
4	40	3,000 mg MEDI8852 作为单次 IV 输注

[0242] 通常,考虑了抗体的一次给药方案,尽管可以给予后续剂量。

[0243] 可以每天两次直到第10天使用4分量表(0,不存在;1,轻度;2,中度;3,重度)针对7种流感症状(咳嗽、鼻塞、咽喉痛、疲劳、头痛、肌痛和发热),以及每天直到第10天使用11点视觉模拟量表(0,不能进行正常活动;10,完全能够进行正常活动)评估MEDI8852的功效。

[0244] 可以使用描述性统计来总结流感症状的持续时间和严重程度以及恢复进行常规活动的能力的时间。流感症状的缓解时间可以通过卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)曲线来总结。

[0245] MEDI8852+奥司他韦的安全性特征与单独的奥司他韦相似,并且MEDI8852+奥司他韦的缓解时间比单独的奥司他韦更快。

[0246] 实例3

[0247] 使用MEDI8852的2b期临床研究如下进行。向患有甲型流感病毒感染的住院个体静脉内给予MEDI8852,剂量为250mg、750mg、1500mg或3000mg。感染可以用阳性快速抗原测试来确认,或用培养、PCR或抗原测试在研究站点确认。一些个体可以在MEDI8852给予之前、之时或之后给予奥司他韦,这是当前的护理标准。给予方案应当遵循当地处方信息,并且可以包括口服(PO)75mg奥司他韦一天两次(BID)持续5天。一些受试者可以接受剂量高达150mg PO BID的奥司他韦持续长达10天,并且其他受试者也可以接受吸入扎那米韦。通常,考虑了抗体的一次给药方案,尽管可以给予后续剂量。

[0248] 安全性特征与奥司他韦类似，并且其功效优于单独的奥司他韦。功效可以通过呼吸功能正常化的时间(主要终点)和通过其他次要终点进行评估。

[0249] 通过引用并入

[0250] 在此引用的所有参考文献，包括专利、专利申请、论文、教科书等以及其中引用的参考文献(如同它们还未曾引用过的程度)通过引用以其全文结合在此。

[0251] 序列信息

[0252] SEQ ID NO:1(VH核苷酸序列)

[0253]

caggtccagctgcagcagagcggccccggactggtcaagccttcacagacactgagcctgacatgcgccattagcgg
agatagcgtgagctcctacaatgccgtgtggaactggatcaggcagtctccaagtcgaggactggagtggctgggac
gaacatactatagatccgggtggtacaatgactatgctgaatcagtgaaaagccgaattactatcaaccccgatacc
tccaagaatcagttctctctgcagctgaacagtgtgacccctgaggacacagccgtgtactactgcgccagaagcgg
ccatatcaccgtctttggcgtcaatgtggatgctttcgatatgtgggggcaggggactatggtcaccgtgtcaagc

[0254] SEQ ID NO:2(VH氨基酸序列)

[0255] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKS
RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMVTVSS

[0256] SEQ ID NO:3 HCDR1 SYNAVWN

[0257] SEQ ID NO:4 HCDR2 RTYYRSGWYNDYAESVKS

[0258] SEQ ID NO:5 HCDR3 SGHITVFGVNVDAFDM

[0259] SEQ ID NO:6(VL核苷酸序列)

[0260]

gatattcagatgacccagagcccttccagcctgtccgcttcagtgggggatcgagtgaccattacctgccgaaccag
ccagagcctgagctcctacacgcactggtatcagcagaagcccggcaaagcccctaagctgctgatctacgccgctt
ctagtcgggggtccggagtgccaagccggttctccggatctgggagtggaaccgactttaccctgacaatttcaagc
ctgcagcccgaggatttcgctacatactactgtcagcagagcagaactttcgggcagggcactaaggtggagatcaa
a

[0261] SEQ ID NO:7(VL氨基酸序列)

[0262] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKVEIK

[0263] SEQ ID NO:8 LCDR1 RTSQSLSSYTH

[0264] SEQ ID NO:9 LCDR2 AASSRGS

[0265] SEQ ID NO:10 LCDR3 QQSRT

<110> 米迪缪尼有限责任公司(MedImmune, LLC)
Kallewaard-LeLay, Nicole
Mallory, Rabum
Robbie, Gabriel
Ren, Song
<120> 治疗甲型流感的方法<130> FLUA-200P1
<140> 待指定
<141> 同此
<160> 10
<170> PatentIn版本3.5
<210> 1
<211> 384
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 1
caggtccagc tgcagcagag cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60
acatgcgcca ttagcggaga tagcgtgagc tcctacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120
cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc cgggtggtac 180
aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240
cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300
agaagcggcc atatcaccgt ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggcag 360
gggactatgg tcaccgtgtc aagc 384
<210> 2
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多肽
<400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110
Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 3
Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn
1 5
<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 4
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser
<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 5
Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10 15
<210> 6
<211> 309

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 6

gatattcaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60
attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc gggggtccgg agtgccaagc 180
cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240
gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaaggtg 300
gagatcaaa 309

<210> 7
<211> 103
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的多肽
<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 8

Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 9
Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 10
Gln Gln Ser Arg Thr
1 5

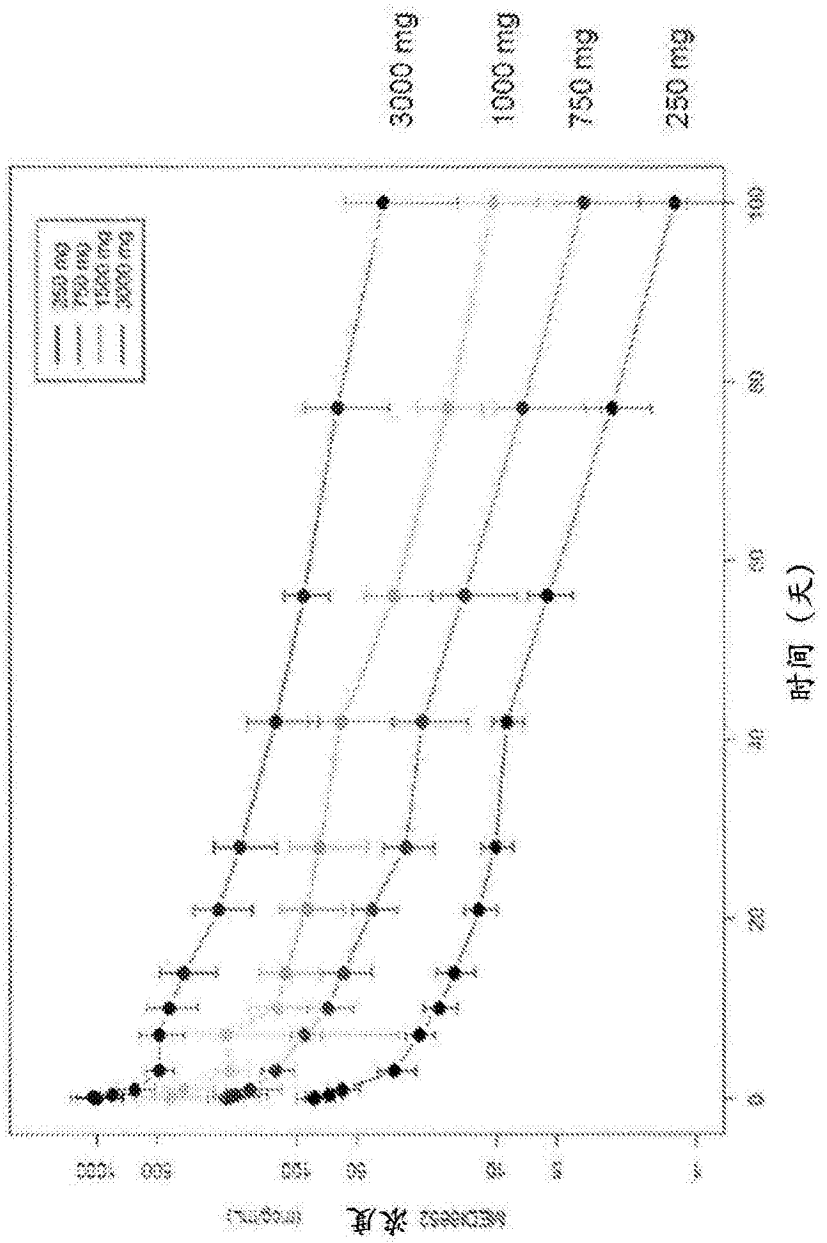


图1

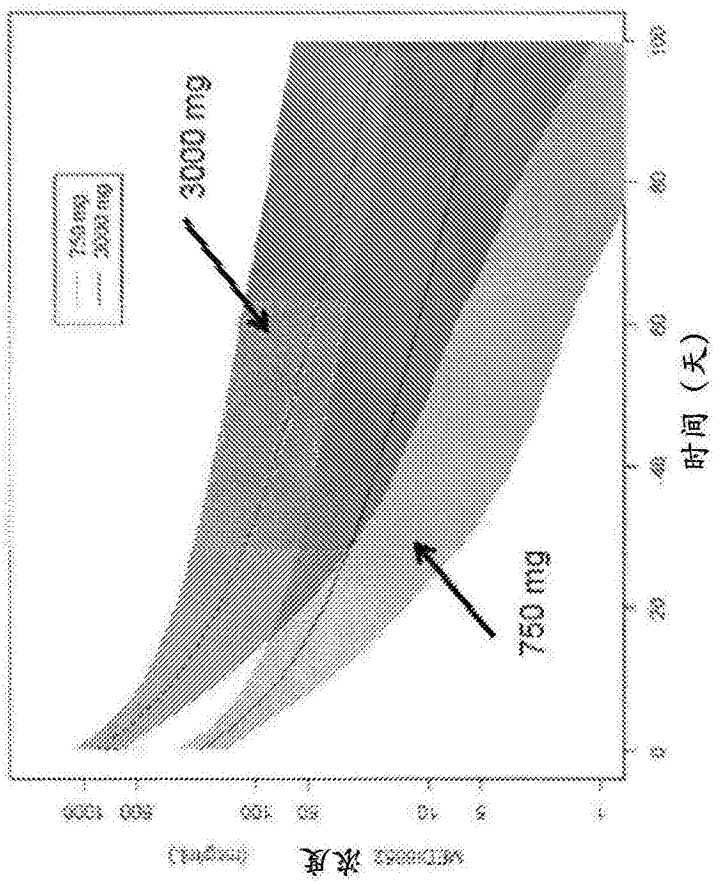


图2