(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111670195 B
(45)授权公告日 2024.08.13

(21)申请号 201980009873.X
(22)申请日 2019.01.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111670195 A
(43)申请公布日 2020.09.15
(30)优先权数据
62/622,480 2018.01.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/015029 2019.01.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/147867 EN 2019.08.01

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 L·A·普赛尔 J·维奥
W·奥尔森
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517
专利代理师 吴瑜 顾云峰

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
(56)对比文件
WO 2015051010 A1,2015.04.09
审查员 王雅倩

权利要求书3页 说明书35页
序列表14页 附图5页

(54)发明名称

针对流感血凝素的人抗体

(57)摘要

本发明提供结合流感血凝素(HA)蛋白的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含所述抗体的药物组合物和使用方法。本发明的抗体可用于抑制或中和流感病毒活性,从而提供治疗或预防人类流感感染的手段。在一些实施例中,本发明提供一种或多种结合流感HA的抗体防止病毒附着和/或进入宿主细胞的用途。本发明的抗体可以预防性或治疗性使用,并且可以单独或与一种或多种其他抗病毒剂或疫苗组合使用。

CN 111670195 B

1.一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,所述分离的重组抗体或其抗原结合片段特异性结合甲型流感第2组血凝素,

其中所述抗体或其抗原结合片段包含

(a)重链可变区,所述重链可变区包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,并且HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示;和

轻链可变区,所述轻链可变区包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示,并且LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示;或者

(b)重链可变区,所述重链可变区包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 22所示,并且HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 24所示;和

轻链可变区,所述轻链可变区包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO: 28所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 30所示,并且LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 32所示。

2.根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有以下特征中的两个或更多个:

(a)是完全人类单克隆抗体;

(b)结合甲型流感第2组血凝素,通过表面等离子体共振测量的解离常数小于10^{-8}M;

(c)表现出大于75分钟的解离半衰期;

(d)表现出中和H3N2或H7N9病毒株的甲型流感第2组病毒,IC50分别小于200 nM和500 nM;

(e)表现出流感病毒感染的细胞的补体介导的裂解,EC50小于150 nM;

(f)使用报告生物分析证明病毒感染的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC50小于0.9 nM;

(g)在人类外周血单核细胞(PBMC)存在下表现出病毒感染的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC50小于0.180 nM;

(h)在病毒攻击后24、48、72或96小时施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加;或

(i)在感染后96小时与奥司他韦组合施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中当在感染后第3天开始以7至15 mg/kg的单次静脉内剂量施用于流感病毒感染的哺乳动物时,保护所述哺乳动物免受所述感染的程度大于已接受奥司他韦经口施用的流感病毒感染的哺乳动物,其在感染后第3天开始以2 mg/kg的剂量每日施用两次,持续5天并且继续直到感染后第7天。

4. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中当在感染后96小时以15 mg/kg的单剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物时,所述哺乳动物的存活率为100%。

5. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中当以15 mg/kg的单剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物时,所述哺乳动物的存活率为100%。

6.根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中当施用于感染流感病毒的哺乳动物时,在感染后96小时与奥司他韦一起施用时,在所述哺乳动物中表现出累加

的保护作用。

7. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中当以范围介于7 mg/kg至15 mg/kg的单次静脉内剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物时,在与以2 mg/kg的剂量经口施用奥司他韦,每日两次,持续5天组合时,在所述哺乳动物中表现出累加的保护作用。

8. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,并且所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示。

9. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 18所示,并且所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 26所示。

10.根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体防止流感病毒附着和/或进入宿主细胞。

11.一种药物组合物,其包含根据权利要求1或2所述的结合流感血凝素的分离的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂。

12.一种分离的多核苷酸分子,其包含编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区的多核苷酸序列。

13.一种载体,其包含根据权利要求12所述的多核苷酸。

14.一种表达根据权利要求13所述的载体的细胞。

15.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段或包含所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物在制备用于预防、治疗或改善有需要的受试者的流感感染的至少一种症状的药物中的用途。

16.根据权利要求15所述的用途,其中所述至少一种症状选自由发热、咳嗽、身体疼痛、鼻漏、呼吸急促、肺炎和支气管炎组成的组。

17.根据权利要求15所述的用途,其中所述药物组合物预防性地施用于有需要的受试者。

18.根据权利要求17所述的用途,其中将所述药物组合物预防性地施用于选自由免疫功能不全的个体、65岁以上的老年人、医疗保健工作者和有病史或潜在医学病况的个人组成的组的受试者。

19.根据权利要求15所述的用途,其中所述药物组合物与第二治疗剂组合施用。

20.根据权利要求19所述的用途,其中所述第二治疗剂选自由抗病毒药物、抗炎药、与第1组或第2组流感血凝素特异性结合的不同抗体、流感疫苗、膳食补充剂和任何其他治疗流感感染的姑息疗法组成的组。

21.根据权利要求20所述的用途,其中所述第二治疗剂通过与所述抗体或其抗原结合片段不同的施用途径施用。

22.根据权利要求21所述的用途,其中所述第二治疗剂经口施用。

23.根据权利要求20所述的用途,其中所述抗病毒药物为奥司他韦。

24.根据权利要求23所述的用途,其中所述奥司他韦在所述抗体施用之前、同时或之后施用。

25.根据权利要求15所述的用途,其中所述药物组合物是皮下、静脉内、皮内、肌肉内、鼻内或经口施用。

针对流感血凝素的人抗体

技术领域

[0001] 本申请要求2018年1月26日提交的美国临时专利申请第62/622,480号的权益,所述临时专利申请以全文引用方式并入本文。

[0002] 本发明涉及特异性结合甲型流感第2组血凝素(HA)的人抗体及其抗原结合片段,包含这些抗体的组合物以及使用这些抗体的治疗和诊断方法。

[0003] 序列表

[0004] 序列表的正式副本以ASCII格式的序列表与说明书同时通过EFS-Web以电子方式提交,文件名为“10201WO01_SEQ_LIST.txt”,创建日期为2019年1月24日,大小为约21KB。该ASCII格式的文档中含有的序列表是说明书的一部分,并且以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0005] 流感是一种高度传染性疾病,其历史悠久,特征在于一波又一波的大流行、流行病、复发和爆发。尽管每年进行疫苗接种工作,但流感感染仍会导致大量发病和死亡。

[0006] 流感病毒由甲型、乙型和丙型三种类型组成。此外,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分为亚型,所述表面糖蛋白是病毒附着和进入宿主细胞所必需的。

[0007] 血凝素是一种三聚体糖蛋白,其含有两个结构域,即由受体结合位点组成的球状头部域(频繁发生抗原漂移)和茎区(在流感病毒的各种病毒株中较为保守)。HA蛋白以前体(HA0)形式合成,所述前体经过蛋白水解加工以产生两个亚基(HA1和HA2),其彼此缔合以形成茎/球状头部结构。HA1肽负责将病毒附着至细胞表面。HA2肽形成茎状结构,其介导病毒和细胞膜在内体中的融合,从而使核糖核蛋白复合物释放到细胞质中。

[0008] 目前,存在由其血凝素蛋白定义的十八种亚型(H1-H18)。18种HA可以分为两组。第1组由H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17和H18亚型组成,并且第2组包括H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型。

[0009] 由于称为抗原漂移的现象或HA或NA分子中产生新的不同表位的突变,可能产生相同亚型的新病毒株。因此,每年都必须针对预测出现的病毒生产新的疫苗,这个过程不仅成本高,而且效率极低。虽然技术进步提高了为疫苗组合物生产改良流感抗原的能力,但仍然需要提供额外的保护来源,以应对新出现的流感亚型和病毒株。

[0010] 虽然一般认为包含所关注抗原(例如HA和/或NA)的疫苗组合物在患者中产生广义中和抗体的想法是好的方法,但在某些患者群体中使用这种方法并不总是可取的。例如,在某些患者中,包含所关注抗原的疫苗组合物可能并不总是有效的,例如在老年患者、非常年轻的患者、免疫功能不全的患者等。在这些患者群体中,或在任何不能启动有效免疫应答的患者中,提供已经含有广泛中和抗体的组合物可能更有利,所述抗体可靶向第1组和/或第2组亚型内各种病毒株共同的表位。

[0011] 迄今为止,在鉴定这种广泛中和或抑制流感病毒的抗体方面取得的成功有限。Okuno等人用A/奥田/57(H2N2)流感免疫小鼠,并分离出一种命名为C179的抗体,所述抗体

与HA2的保守构象表位结合,并在体外和体内中和第1组H2、H1和H5亚型甲型流感病毒(Okuno等人(1993)J.Virol.67(5):2552-2558)。Throsby等人从人B细胞鉴定出对第1组亚型具有广泛活性的13种单克隆抗体(Throsby等人(2008),PLOS one 3(2):e3942)。Sui等人鉴定出一种人单克隆抗体(F10),其结合H5和其他第1组病毒(Sui等人,(2009),Nat.Struct.Mol.Biol.16(3):265-273)。Tharakaraman等人鉴定出一种广泛中和抗体,命名为VIS410,其在体外和体内都能有效中和第2组流感病毒株,包括H3N2和H7N9株(Tharakaraman,K,等人,(2015),Proc Natl Acad Science 112(35):10890-10895)。

[0012] 然而,在该领域数十年的研究之后,目前只有少量抗体正在临床试验中以评估其中和不同亚型流感病毒的能力(参见例如Crucell Holland((US2012/0276115、US2014/0065156、US8470327、US2014/0120113、EP2731967、US8691223、US2013/0243792、US2014/0065165、WO2008/028946和WO2010/130636);大阪大学(US2011/0319600、EP2380976、US2012/0058124、US2012/0058124)、Celltrion(US2013/0004505、EP2545074;WO2014/158001);范德堡大学(Vanderbilt University)(US2013/0289246)、SeaLane Biotechnologies(US2012/0128671)、Trellis Bioscience,Inc.(US2012/0020971EP2582721);Visterra,Inc.(US2013/0302349);Burnham Institute/Dana Farber(US2014/011982、EP2222701、WO2010/027818);Temasek(US8444986、US8574581、US8637644、US8637645、US8383121、US8540996、US8574830、US8540995);HUMABS生物科学/生物医学研究所(US8871207、US8685402、EP2313433);MedImmune(WO2015/051010);AIMM Therapeutics(WO2013/081463、EP12798020)和Genentech(US2014/0161822)正在开发的抗体,但仍没有上市的抗体能广泛中和或抑制甲型流感病毒感染或减弱该病毒各种亚型引起的疾病。因此,本领域仍需要鉴定中和甲型流感病毒的多种亚型的新抗体,其可用于预防或治疗流感病毒感染。

发明内容

[0013] 本发明提供结合甲型流感第2组血凝素(HA)的抗体和其抗原结合片段。本发明的抗体尤其可用于抑制或中和甲型流感第2组HA的活性。在一些实施例中,所述抗体可用于阻断流感病毒与宿主细胞的附着和/或用于防止流感病毒进入宿主细胞。在一些实施例中,所述抗体通过抑制病毒的细胞间传播而起作用。在某些实施例中,所述抗体可用于预防、治疗或改善受试者中流感病毒感染的至少一种症状。在某些实施例中,所述抗体可预防性或治疗性地施用于具有流感病毒感染或有感染流感病毒的风险的受试者。在某些实施例中,含有至少一种本发明抗体的组合物可以施用于疫苗对其是禁忌的或疫苗对其不太有效的受试者,例如老年患者、非常年轻的患者、可能对疫苗的任何一种或多种组分过敏的患者或可能对疫苗中的免疫原无应答的免疫功能不全的患者。在某些实施例中,含有至少一种本发明抗体的组合物可以在流感爆发期间施用于医务人员、住院患者或疗养院居住者或其他高危患者。在某些实施例中,含有至少一种本发明抗体的组合物可以在预测的年度疫苗无效的情况下,或在发生大流行且病毒株发生重大抗原漂移的情况下,作为一线治疗施用于患者。

[0014] 本发明的抗体可以是全长的(例如IgG1或IgG4抗体)或可以仅包含抗原结合部分(例如Fab、F(ab')$_2$或scFv片段),并且可以被修饰以影响功能性,例如增加在宿主中的持久

性或增加效应功能或消除残余的效应功能(Reddy等人,2000,J.Immunol.164:1925-1933)。在某些实施例中,所述抗体可以是双特异性的。

[0015] 在第一方面,本发明提供特异性结合甲型流感第2组血凝素(HA)的分离的重组单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0016] 在一个实施例中,本发明提供特异性结合甲型流感第2组HA的分离的重组抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有以下特征中的两个或更多个:

[0017] (a)是完全人类单克隆抗体;

[0018] (b)结合甲型流感第2组HA,通过表面等离子体共振测量的解离常数(K_D)小于10^{-8}M;

[0019] (c)表现出大于75分钟的解离半衰期(t1/2);

[0020] (d)表现出中和选自H3N2和H7N9病毒株的甲型流感第2组病毒,IC_{50}分别小于200nM和500nM;

[0021] (e)表现出流感病毒感染的细胞的补体介导的裂解,EC_{50}小于约150nM;

[0022] (f)使用报告生物分析证明病毒感染的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC_{50}小于约0.9nM;

[0023] (g)在人类外周血单核细胞(PBMC)存在下表现出病毒感染的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC_{50}小于约0.180nM;

[0024] (h)在病毒攻击后24、48、72或96小时施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加;

[0025] (i)在感染后96小时与奥司他韦(oseltamivir)组合施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加;或

[0026] (j)其中所述抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的重链可变区(HCVR)序列中的任一个中所含的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3);和表1中列出的轻链可变区(LCVR)序列中的任一个中所含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0027] 在某些实施例中,与在感染后第3天开始(并持续到感染后第7天)以约2mg/kg的剂量经口施用奥司他韦,每日施用两次,持续5天相比,当在感染后第3天开始以约7至15mg/kg的单次静脉内剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物时,本发明抗体表现出增强的保护作用。

[0028] 在一个相关实施例中,当皮下或静脉内施用时和/或当在感染前或在感染流感病毒后施用时,本发明抗体赋予感染流感病毒的哺乳动物增强的保护作用。

[0029] 在一个实施例中,当以约5mg/kg至约15mg/kg的单次皮下或静脉内剂量施用于受感染的哺乳动物时,与施用同种型(阴性)对照抗体的动物相比,本发明抗体表现出增强的保护作用。

[0030] 在一个实施例中,与以约2mg/kg的剂量经口施用奥司他韦,每日施用两次,持续5天相比,当以约7mg/kg至约15mg/kg的单次静脉内剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物时,本发明抗体表现出增强的保护作用。

[0031] 在一个实施例中,当在感染后24小时或更长时间以约15mg/kg的单次剂量投与时,本发明的抗体在感染流感病毒的哺乳动物中表现出约100%的存活率。

[0032] 在一个实施例中,当在感染后24、48、72或96小时以约15mg/kg的单次静脉内剂量

投与时,本发明的抗体在感染流感病毒的哺乳动物中表现出100%的存活率。

[0033] 在一个实施例中,当以约15mg/kg的单次静脉内剂量施用时,本发明抗体在感染流感病毒的哺乳动物中表现出约100%的存活率,相比之下,当以约2mg/kg的剂量一天两次经口施用5天时,用奥司他韦观察到的存活率为80%。

[0034] 在一个实施例中,当在感染后超过48小时与奥司他韦一起施用时,本发明抗体在感染流感病毒的哺乳动物中提供累加的保护作用。

[0035] 在一个实施例中,当在感染后72小时与奥司他韦一起施用时,本发明抗体在感染流感病毒的哺乳动物中提供累加的保护作用。

[0036] 在一个实施例中,当抗体以约7mg/kg至约15mg/kg的单次静脉内剂量施用于感染流感病毒的哺乳动物,并且奥司他韦以约2mg/kg的剂量每日经口施用两次,持续5天时,本发明抗体在与奥司他韦组合使用时提供累加的保护作用。

[0037] 在一个相关实施例中,本发明抗体在流感病毒感染后96小时与奥司他韦组合使用时提供累加的保护作用,其中所述抗体以约7mg/kg至约15mg/kg的单次静脉内剂量施用,并且奥司他韦以约2mg/kg的剂量每日经口施用两次,持续5天。

[0038] 在一个实施例中,本发明抗体可以静脉内、鼻内、皮下、皮内或肌肉内施用,奥司他韦可以经口施用。

[0039] 在一个实施例中,奥司他韦是在施用本发明抗体之前、同时或之后施用。

[0040] 在一个实施例中,抗体和/或奥司他韦可以单次剂量或以多次剂量施用。

[0041] 本发明的示例性抗甲型流感第2组HA抗体列于本文表1和2中。表1列出了示例性抗流感HA抗体的重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)、重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)的氨基酸序列标识符。表2列出了示例性抗流感HA抗体的HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列标识符。

[0042] 本发明提供包含HCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含选自表1中列出的HCVR氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0043] 在一个实施例中,本发明提供特异性结合甲型流感第2组HA的抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:2或18的氨基酸序列的HCVR。

[0044] 本发明还提供包含LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含选自表1中列出的LCVR氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0045] 在一个实施例中,本发明提供特异性结合甲型流感第2组HA的抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:10或26的氨基酸序列的LCVR。

[0046] 在一个实施例中,特异性结合甲型流感第2组HA的分离的抗体或抗原结合片段包含选自由SEQ ID NO:2/10或18/26组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0047] 在某些实施例中,HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由SEQ ID NO:2/10(例如H1H14611N2)或18/26(例如H1H14612N2)组成的组。

[0048] 在一个实施例中,分离的抗体或抗原结合片段包含:

[0049] (a)HCDR1结构域,其具有选自由SEQ ID NO:4或20组成的组的氨基酸序列;

[0050] (b)HCDR2结构域,其具有选自SEQ ID NO:6或22组成的组的氨基酸序列;

[0051] (c)HCDR3结构域,其具有选自SEQ ID NO:8或24组成的组的氨基酸序列;

[0052] (d)LCDR1结构域,其具有选自SEQ ID NO:12或28组成的组的氨基酸序列;

[0053] (e)LCDR2结构域,其具有选自SEQ ID NO:14或30组成的组的氨基酸序列;和

[0054] (f)LCDR3结构域,其具有选自SEQ ID NO:16或32组成的组的氨基酸序列。

[0055] 在一个实施例中,特异性结合甲型流感第2组HA的分离的抗体或抗原结合片段包含(a)SEQ ID NO:4HCDR1;(b)SEQ ID NO:6的HCDR2;(c)SEQ ID NO:8的HCDR3;(d)SEQ ID NO:12的LCDR1;(e)SEQ ID NO:14的LCDR2和(f)SEQ ID NO:16的LCDR3。

[0056] 在一个实施例中,特异性结合甲型流感第2组HA的分离的抗体或抗原结合片段包含(a)SEQ ID NO:20的HCDR1;(b)SEQ ID NO:22的HCDR2;(c)SEQ ID NO:24的HCDR3;(d)SEQ ID NO:28的LCDR1;(e)SEQ ID NO:30的LCDR2和(f)SEQ ID NO:32的LCDR3。

[0057] 本发明还提供包含重链CDR1(HCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR1包含选自表1中列出的HCDR1氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0058] 本发明还提供包含重链CDR2(HCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR2包含选自表1中列出的HCDR2氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0059] 本发明还提供包含重链CDR3(HCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR3包含选自表1中列出的HCDR3氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0060] 本发明还提供包含轻链CDR1(HCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR1包含选自表1中列出的LCDR1氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0061] 本发明还提供包含轻链CDR2(HCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR2包含选自表1中列出的LCDR2氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0062] 本发明还提供包含轻链CDR3(HCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR3包含选自表1中列出的LCDR3氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0063] 本发明还提供包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对(HCDR3/LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述氨基酸序列对包含表1中列出的HCDR3氨基酸序列中的任一个与表1中列出的LCDR3氨基酸序列中的任一个的配对。根据某些实施例,本发明提供包含表1中列出的任何示例性抗甲型流感第2组HA抗体内所含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,HCDR3/LCDR3氨基酸序列对选自由SEQ ID NO:8/16(例如H1H14611N2)或24/32(例如H1H14612N2)组成的组。

[0064] 本发明还提供包含表1中列出的任何示例性抗甲型流感第2组HA抗体内所含的一组六个CDR(即HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组选自由SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16(例如H1H14611N2);或SEQ ID NO:20-22-24-28-30-32(例如H1H14612N2)组成的组。

[0065] 在一个相关实施例中,本发明提供抗体或其抗原结合片段,其包含如由表1中列出的任何示例性抗甲型流感第2组HA抗体定义的HCVR/LCVR氨基酸序列对内所含的一组六个CDR(即HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。举例而言,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其包含选自由SEQ ID NO:2/10(例如H1H14611N2)或SEQ ID NO:18/26(例如H1H14612N2)组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对内所含的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。用于鉴定HCVR和LCVR氨基酸序列中的CDR的方法和技术是本领域熟知的,并且可以用于鉴定本文公开的指定HCVR和/或LCVR氨基酸序列中的CDR。可以用于鉴定CDR的边界的示例性惯例包括例如Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般而言,Kabat定义基于序列差异,Chothia定义基于结构环区域的位置,AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷方案。参见例如,Kabat,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,"National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);和Martin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989)。公共数据库也可用于鉴定抗体中的CDR序列。

[0066] 本发明还提供与包含HCVR的CDR和LCVR的CDR的抗体或其抗原结合片段竞争特异性结合甲型流感第2组HA的抗体及其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。

[0067] 本发明还提供与包含HCVR的CDR和LCVR的CDR的参考抗体或其抗原结合片段交叉竞争结合甲型流感第2组HA或结合甲型流感第2组HA上的相同表位的抗体及其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。

[0068] 本发明还提供阻断甲型流感第2组HA附着于宿主细胞和/或进入宿主细胞的分离的抗体及其抗原结合片段。

[0069] 在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段是双特异性的,包含与甲型流感第2组HA中的第一表位的第一结合特异性和与另一抗原的第二结合特异性。

[0070] 在第二方面,本发明提供编码抗甲型流感第2组HA抗体或其部分的核酸分子。例如,本发明提供编码表2中列出的HCVR氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0071] 本发明还提供编码表1中列出的LCVR氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的LCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0072] 本发明还提供编码表1中列出的HCDR1氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCDR1核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0073] 本发明还提供编码表1中列出的HCDR2氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCDR2核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0074] 本发明还提供编码表1中列出的HCDR3氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCDR3核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0075] 本发明还提供编码表1中列出的LCDR1氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的LCDR1核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0076] 本发明还提供编码表1中列出的LCDR2氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的LCDR2核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0077] 本发明还提供编码表1中列出的LCDR3氨基酸序列中的任一个的核酸分子;在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的LCDR3核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。

[0078] 本发明还提供编码HCVR的核酸分子,其中所述HCVR包含一组三个CDR(即HCDR1-HCDR2-HCDR3),其中所述HCDR1-HCDR2-HCDR3氨基酸序列组如表1中列出的示例性抗流感HA抗体中的任一个所定义。

[0079] 本发明还提供编码LCVR的核酸分子,其中所述LCVR包含一组三个CDR(即LCDR1-LCDR2-LCDR3),其中所述LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组如表1中列出的示例性抗流感HA抗体中的任一个所定义。

[0080] 本发明还提供编码HCVR和LCVR二者的核酸分子,其中所述HCVR包含表1中列出的HCVR氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列,并且其中所述LCVR包含表1中列出的LCVR氨基酸序列中的任一个的氨基酸序列。在某些实施例中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列,以及选自表2中列出的LCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。在根据本发明的这一方面的某些实施例中,所述核酸分子编码HCVR和LCVR,其中所述HCVR和LCVR二者均衍生自表1中列出的相同的抗甲型流感第2组HA抗体。

[0081] 本发明提供编码表1中列出的重链氨基酸序列中任一个的核酸分子。本发明还提供编码表1中列出的轻链氨基酸序列中任一个的核酸分子。

[0082] 在一个相关方面,本发明提供重组表达载体,其能够表达包含抗甲型流感第2组HA抗体的重链或轻链可变区的多肽。例如,本发明包括重组表达载体,其包含上述核酸分子中的任一个,即编码表1所示的HCVR、LCVR和/或CDR序列中的任一个的核酸分子。本发明的范围内还包括已经引入此类载体的宿主细胞,以及通过在允许产生抗体或抗体片段的条件下培养宿主细胞并且回收这样产生的抗体和抗体片段来产生抗体或其部分的方法。

[0083] 在第三方面,本发明提供一种药物组合物,其包含治疗有效量的至少一种特异性

结合甲型流感第2组HA的重组单克隆抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。在一个相关方面,本发明的特征是一种组合物,其为抗甲型流感第2组HA抗体和第二治疗剂的组合。在一个实施例中,第二治疗剂是有利地与抗甲型流感第2组HA抗体结合的任何药剂。可有利地与抗甲型流感第2组HA抗体结合的示例性药剂包括但不限于其他结合和/或抑制流感HA活性的药剂(包括其他抗体或其抗原结合片段等)和/或不直接结合流感HA但仍然抑制病毒活性包括宿主细胞感染性的药剂。在某些实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含:(a)第一抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段;(b)第二抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体结合甲型流感第2组HA上的第一表位,所述第二抗体结合甲型流感第2组HA上的第二表位,其中所述第一和第二表位是不同的且不重叠的;以及(c)药学上可接受的载体或稀释剂。在某些实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含:(a)第一抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段;(b)第二抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体不与所述第二抗体交叉竞争结合甲型流感第2组HA;以及(c)药学上可接受的载体或稀释剂。在某些实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含:(a)第一抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段;(b)与不同流感抗原相互作用的第二抗流感抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体结合甲型流感第2组HA上的表位,所述第二抗体结合不同流感抗原上的表位;以及(c)药学上可接受的载体或稀释剂。在某些实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含:(a)第一抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段;(b)与不同的病毒(非流感)抗原相互作用的第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体结合甲型流感第2组HA上的表位,所述第二抗体结合不同的病毒(非流感)抗原上的表位;以及(c)药学上可接受的载体或稀释剂。涉及本发明的抗甲型流感第2组HA抗体的其他组合疗法和共同制剂在本文其他地方公开。

[0084] 在第四方面,本发明提供使用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体或抗体的抗原结合部分来治疗与甲型流感第2组HA相关的疾病或病症(例如受试者的病毒感染),或与病毒感染相关的至少一种症状的治疗方法,其中所述治疗方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的包含本发明的抗体或抗体的抗原结合片段的药物组合物。所治疗的病症是通过抑制流感HA活性而得到改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或病况。在某些实施例中,本发明提供预防、治疗或缓解甲型流感感染的至少一种症状的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的抗流感HA抗体或其抗原结合片段。

[0085] 在一些实施例中,本发明提供通过施用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体来缓解或减少受试者的至少一种流感感染症状的严重性、持续时间或发生频率的方法,其中至少一种症状选自由头痛、发热、疼痛、鼻漏(鼻塞)、寒战、疲劳、虚弱、喉咙痛、咳嗽、呼吸急促、呕吐、腹泻、肺炎、支气管炎和死亡组成的组。

[0086] 在某些实施例中,本发明提供降低受试者中病毒载量的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的本发明抗体或其片段,所述抗体或其片段结合甲型流感第2组HA并阻断流感病毒结合和/或进入宿主细胞。

[0087] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以预防性或治疗性地施用于具有流感感染、或处于具有流感感染的风险下、或倾向于出现流感感染的受试者。有风险的受试者包括但不限于免疫功能不全的人,例如因自身免疫性疾病而免疫功能不全的人,或那些接受免疫抑制疗法的人(例如器官移植后),或那些患有人类免疫缺陷综合征(HIV)或获得性免

疫缺陷综合征(AIDS)的人,某些形式的消耗或破坏白血球的贫血,那些接受放射或化疗的人或那些患有发炎性病症的人。其他处于感染流感风险下的受试者包括老年人(65岁以上)、2岁以下的儿童、医护人员,以及患有肺部感染、心脏病或糖尿病等潜在医学病况的人。此外,任何与感染个体有身体接触或身体紧密接近的人都会增加感染流感病毒的风险。此外,受试者因接近疾病爆发,例如受试者居住在人口稠密的城市,或非常接近于已确诊或怀疑感染流感病毒的受试者,或职业选择,例如医院员工、药物研究人员、前往感染区域旅行或频繁搭乘飞机,均有感染流感的风险。

[0088] 在某些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段与第二治疗剂组合施用于有需要的受试者。第二治疗剂可以选自由以下组成的组:抗炎药(如皮质类固醇和非类固醇抗炎药)、抗感染药、不同的流感HA抗体、不同的流感抗原抗体(例如神经氨酸酶)、抗病毒药物、减充血剂、抗组胺、流感疫苗、膳食补充剂如抗氧化剂和本领域已知可用于缓解流感感染的至少一种症状或降低患者的病毒载量的任何其他药物或疗法。在某些实施例中,如果发生与本发明的抗体或其抗原结合片段相关的任何可能的副作用,则第二治疗剂可以是有助于抵消或减少此类副作用的药剂。抗体或其片段可以皮下、静脉内、皮内、腹膜内、经口、鼻内、肌肉内或颅内施用。在一个实施例中,抗体可以作为单次静脉输注施用,以使受试者血清中的抗体浓度达到最大。抗体或其片段可以约0.01mg/kg受试者体重至约100mg/kg受试者体重的剂量施用。在某些实施例中,本发明的抗体可以包含在50mg至5000mg之间的一个或多个剂量施用。

[0089] 本发明还包括本发明的抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段用于治疗将受益于阻断流感HA结合和/或活性的疾病或病症的用途。本发明还包括本发明的抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段制造用于治疗将受益于阻断流感HA结合和/或活性的疾病或病症的药物的用途。

[0090] 通过参阅接下来的详细说明,其他实施例将变得显而易见。

附图说明

[0091] 图1A、1B、1C:显示单剂量的H1H14611N2和H1H14612N2在体外有效地中和第2组甲型流感病毒的三种不同的病毒株。1A:A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2);1B:A/菲律宾/01/1982(H3N2)和1C:A/上海/01/2013-PR8(H7N9)。

[0092] 图2:显示H1H14611N2和H1H14612N2介导A/爱知/02/1968-PR8-X31感染细胞的补体依赖性细胞毒性。

[0093] 图3:显示抗第2组HA抗体H1H14611N2和H1H14612N2在Fcγ RIIIA活化分析中的剂量反应曲线。

[0094] 图4:显示抗第2组HA抗体H1H14611N2和H1H14612N2在使用人类供体PBMC的ADCC分析中的剂量反应曲线。

[0095] 图5A、5B、5C:显示当在感染5X MLD_{50}的A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)后24(A)、48(B)或72(C)小时以15mg/kg的单剂量施用时,单剂量的抗第2组HA抗体H1H14611N2和H1H14612N2表现出针对致死性流感感染的完全保护。

[0096] 图6:显示抗第2组HA抗体H1H14611N2在感染后96小时与奥司他韦组合给药时,对治疗流感感染具有累加作用。

具体实施方式

[0097] 在描述本发明的方法前,应当理解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施例的目的,而无意进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0098] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可用于本发明的实践或检验,但现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均以全文引用的方式并入本文中。

[0099] 定义

[0100] 术语“流感血凝素”,也称为“流感HA”,是在流感病毒粒子表面上发现的一种三聚体糖蛋白,其介导病毒附着(通过HA1与α-2,3-或α-2,6-唾液酸结合)和进入(通过构象改变)宿主细胞。HA由两个结构域构成:含有受体结合位点的球状头部域(抗原突变频率高)和茎区(在流感病毒的各种病毒株中较为保守)。流感HA以前体(HA0)的形式合成,所述前体经过蛋白水解加工以产生两个亚基(HA1和HA2),其彼此缔合以形成茎/球状头部结构。病毒HA是病毒上变化最大的抗原(18个亚型可分为两组),但茎(HA2)在各组内高度保守。

[0101] 全长流感HA的氨基酸序列由GenBank中以登录号ACF41911.1提供的流感分离株H3N2A/威斯康星/67/X-161/2005(此处也显示为SEQ ID NO:33)或H7N7A/鸡/荷兰/01/2003,登录号AAR02640.1(此处也显示为SEQ ID NO:34)的氨基酸序列例示。术语“流感HA”还包括从不同流感分离株中分离的流感HA的蛋白质变体。术语“流感HA”还包括重组流感HA或其片段。所述术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人类Fc或信号序列偶联的流感HA或其片段。

[0102] 如本文所用,术语“流感感染”,也被表征为“流感”,指由流感病毒引起的严重的急性呼吸道疾病。所述术语包括呼吸道感染以及包括高烧、头痛、全身疼痛、疲劳和虚弱、在某些情况下极度疲惫、鼻塞、打喷嚏、喉咙痛、胸部不适、咳嗽、呼吸急促、支气管炎、肺炎和严重情况下死亡的症状。

[0103] 如本文所用,术语“抗体”意图指免疫球蛋白分子,其包含四条多肽链,两条重(H)链与两条轻(L)链通过二硫键互连(即,“完整抗体分子”);以及其多聚体(例如IgM),或其抗原结合片段。每条重链包含重链可变区(“HCVR”或“V_H”)和重链恒定区(包含域C_H1、C_H2和C_H3)。每条轻链包含轻链可变区(“LCVR”或“V_L”)和轻链恒定区(C_L)。所述V_H和V_L区可以进一步细分成被称作互补性决定区(CDR)的高变异性区域,其散布有被称作框架区(FR)的更保守的区域。每个V_H和V_L由从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的某些实施例中,抗体(或其抗原结合片段)的FR可以与人类生殖系序列相同,或可以被天然或人工修饰。可以根据两个或更多个CDR的并行分析来定义氨基酸共有序列。

[0104] 取代一个或多个CDR残基或省略一个或多个CDR也是可能的。抗体已在科学文献中描述,其中一个或两个CDR可以被分配用于结合。Padlan等人(1995FASEB J.9:133-139)基于公开的晶体结构分析了抗体其抗原之间的接触区,并且得出结论,仅约五分之一至三分之一的CDR残基实际接触抗原。Padlan还发现许多抗体,所述抗体中一个或两个CDR没有与抗原接触的氨基酸(另参见Vajdos等人2002J Mol Biol 320:415-428)。

[0105] 基于先前的研究,通过分子建模和/或凭经验可以从位于Chothia CDR外部的Kabat CDR区域鉴别出不接触抗原的CDR残基(例如CDRH2中的残基H60-H65通常是不需要的)。如果省略其CDR或残基,则其通常由氨基酸取代,所述氨基酸占据另一人类抗体序列或此类序列的共有序列中的对应位置。CDR内取代的位置和用于取代的氨基酸也可以凭经验选择。经验取代可以是保守或非保守性取代。

[0106] 本文所公开的完全人类抗流感HA单克隆抗体可以包含与对应生殖系序列相比,重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中的一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包括衍生自本文所公开的氨基酸序列中的任一个的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生出所述抗体的生殖系序列的对应残基,或另一人类生殖系序列的对应残基,或对应生殖系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为"生殖系突变")。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗体和抗原结合片段,其包含一个或多个个别生殖系突变或其组合。在某些实施例中,V_H和/或V_L域内的所有框架和/或CDR残基突变回存在于衍生出抗体的原始生殖系序列中的残基。在其他实施例中,仅某些残基突变回原始生殖系序列,例如,仅存在于FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内的突变残基,或者仅存在于CDR1、CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施例中,一个或多个框架和/或CDR残基突变为不同的生殖系序列(即,不同于最初衍生出抗体的生殖系序列的生殖系序列)的一个或多个相应的残基。此外,本发明的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个生殖系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定生殖系序列的对应残基,而不同于原始生殖系序列的某些其他残基得以保持或突变为不同生殖系序列中的相应残基。在得到含有一个或多个生殖系突变的抗体和抗原结合片段后,可以容易地测试所述抗体和抗原结合片段的一种或多种所需特性,如改善的结合特异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定)、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0107] 本发明还包括完全人类抗流感HA单克隆抗体,其包含本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个的变体,所述变体具有一个或多个保守性取代。举例来说,本发明包括抗流感HA抗体,其具有相对于本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等保守氨基酸取代的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列。

[0108] 如本文所用,术语"人抗体"意图包括具有源自人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人mAb可以包括未由人生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性突变或体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR,特别是CDR3中。然而,如本文所用,术语"人抗体"并不意在包括已将源自另一哺乳动物物种(例如,小鼠)的生殖系的CDR序列移植到人FR序列上的mAb。所述术语包括在非人类哺乳动物中或在非人类哺乳动物的细胞中以重组方式产生的抗体。所述术语不意图包括从人类受试者中分离或在人类受试者中产生的抗体。

[0109] 如本文所用,术语"重组"是指通过本领域称为重组DNA技术的技术或方法创建、表达、分离或获得本发明的抗体或其抗原结合片段,所述技术或方法包括例如DNA剪接和转基

因表达。所述术语是指在非人哺乳动物(包括转基因非人哺乳动物,例如转基因小鼠),或细胞(例如CHO细胞)表达系统中表达的抗体,或从重组组合人抗体库中分离的抗体。

[0110] 术语"特异性结合"或"特异性结合到"等意指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对较稳定的复合物。特异性结合的特征可在于至少约1×10^{-8}M或更低的平衡解离常数(,更小的K_D指示更紧密的结合)。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域众所周知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。如本文所述,已经通过Octet®HTX生物传感器上的实时无标记生物层干涉量度分析法鉴定了与流感HA特异性结合的抗体。此外,与流感HA中的一个域和一个或多个附加抗原结合的多特异性抗体或与流感HA的两个不同区域结合的双特异性抗体仍然被认为是如本文所用的"特异性结合"的抗体。

[0111] 术语"高亲和力"抗体是指那些与流感HA的结合亲和力(以K_D表示)为至少10^{-8}M;优选10^{-9}M;更优选10^{-10}M,甚至更优选10^{-11}M,甚至更优选10^{-12}M的mAb,如通过实时无标记生物层干涉量度分析法,例如Octet®HTX生物传感器,或通过表面等离子体共振,例如BIACORE™,或通过溶液亲和力ELISA测量。

[0112] 术语"缓慢解离速率"、"Koff"或"kd"是指抗体以$1\times10^{-3}s^{-1}$或更小,优选$1\times10^{-4}s^{-1}$或更小的速率常数从流感HA解离,如通过实时无标记生物层干涉量度分析法,例如Octet®HTX生物传感器,或通过表面等离子体共振,例如BIACORE™测定。

[0113] 如本文所用,术语抗体的"抗原结合部分"、抗体的"抗原结合片段"等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成性或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的"抗原结合片段"或"抗体片段"是指保留结合流感HA的能力的抗体的一个或多个片段。

[0114] 在特定实施例中,本发明的抗体或抗体片段可以与如配体的部分或治疗性部分("免疫缀合物"),如抗病毒药物、第二抗流感抗体,或任何其他可用于治疗由流感病毒引起的感染的治疗性部分缀合。

[0115] 如本文所用,"分离的抗体"意图指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(Ab)的抗体(例如,特异性结合流感HA的分离的抗体或其片段基本上不含特异性结合除流感HA以外的抗原的Ab。

[0116] 如本文所用,"阻断抗体"或"中和抗体"(或"中和流感HA活性的抗体"或"拮抗剂抗体")意图指与流感HA结合导致抑制流感HA的至少一种生物活性的抗体。例如,本发明的抗体可以防止或阻止流感附着于或进入宿主细胞。另外,"中和抗体"是能够中和,即防止、抑制、降低、阻碍或干扰病原体在宿主中启动和/或持续感染的能力的抗体。术语"中和抗体"和"中和的抗体"在本文中可互换使用。这些抗体可以单独或组合使用,作为预防剂或治疗剂在适当的配制后与其他抗病毒剂一起使用,或与活性接种疫苗结合使用,或作为诊断工具使用。

[0117] 术语"表面等离子体共振"是指一种光学现象,其允许通过例如使用BIACORE™系统(瑞典乌普萨拉(Uppsala,Sweden)和新泽西州皮斯卡塔威(Piscataway,N.J.)的Pharmacia Biosensor AB)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化分析实时生物分子相互作用。

[0118] 生物层干涉量度法是一种用于测量生物分子相互作用的无标记技术。它是分析从两个表面反射的白光的干扰图案的光学分析技术:在生物传感器尖端上的固定蛋白层和内

部参考层。与生物传感器尖端结合的分子数量的任何变化都会引起可实时测量的干扰图案的偏移(Abdiche,Y.N.等人,Analytical Biochemistry,(2008),377(2),209-217)。在本发明的某些实施例中,使用“基于实时生物层干涉仪的生物传感器(Octet HTX分析)”来评估某些抗流感HA抗体的结合特征。

[0119] 如本文所用,术语“K_D”意图指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0120] 术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定子,称为互补位。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同抗体可以结合到抗原上的不同区域并且可以具有不同的生物效应。术语“表位”还指B细胞和/或T细胞起反应的抗原上的位点。其还指抗体所结合的抗原区域。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位一般是结构性表位的子集并且具有直接促成相互作用的亲和力的那些残基。表位还可以是构形性的,即,由非线性氨基酸构成。在某些实施例中,表位可以包括作为分子的化学活性表面基团的决定子,所述基团例如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基,并且在某些实施例中,可以具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。

[0121] 如本文所用,术语“交叉竞争”是指抗体或其抗原结合片段结合抗原,并抑制或阻断另一抗体或其抗原结合片段的结合。所述术语还包括两个抗体之间在两个方向上的竞争,即第一抗体结合并阻断第二抗体的结合,反之亦然。在某些实施例中,第一抗体和第二抗体可以结合同一表位。或者,第一抗体和第二抗体可以结合不同但重叠的表位,使得其中一个的结合抑制或阻断第二抗体的结合,例如,通过位阻。抗体之间的交叉竞争可以通过本领域已知的方法来测量,例如通过实时无标记生物层干涉量度分析法。为了确定测试抗体是否与本发明的参考抗甲型流感第2组抗体交叉竞争,允许参考抗体在饱和条件下与流感病毒HA或肽结合。接着,评估测试抗体与流感病毒HA结合的能力。如果在与参考抗流感病毒HA抗体饱和结合后,测试抗体能够与流感病毒HA结合,则可以断定测试抗体与参考抗流感病毒HA抗体结合不同的表位。另一方面,如果在与参考抗流感病毒HA抗体饱和结合后,测试抗体不能与流感病毒HA结合,则测试抗体可能结合至与本发明的参考抗流感病毒HA抗体所结合的表位相同的表位。

[0122] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”指示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过下文所论述的任何众所周知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或GAP所测量,至少约90%,并且更优选地至少约95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可以编码与参考核酸分子所编码的多肽具有相同或基本相似的氨基酸序列的多肽。

[0123] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上相似”意指两个肽序列使用默认空位权重,如通过程序GAP或BESTFIT最佳地对准时共有至少90%序列同一性,甚至更优选地至少95%、98%或99%序列同一性。优选地,不同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸置换”是氨基酸残基被含有具有相似的化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基置换的氨基酸置换。通常,保守氨基酸置换基本上不会改变蛋白质的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守性取代而彼此不同的情况下,可以上调相似性百分比或程度以校正取代的保守性质。用于进行这种调整的手段是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,其以引用的方式并入

本文中。具有相似化学特性的侧链的氨基酸组的实例包括1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及(7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替换是在Gonnet等人(1992)Science 256:1443 45中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化,所述文献以引用的方式并入本文中。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何改变。

[0124] 典型地使用序列分析软件测量多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用关于指定到包括保守氨基酸取代的各种取代、缺失和其他修饰的相似性量度来匹配相似序列。例如,GCG软件含有如GAP和BESTFIT的程序,其可以在默认参数下使用以确定密切相关的多肽之间,如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG 6.1版。多肽序列也可以使用默认或推荐参数,使用FASTA进行比较;FASTA是GCG 6.1版中的程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)前述)。当将本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一种优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人.(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402,其各自以引用方式并入本文。

[0125] 短语“治疗有效量”意指产生施用其所希望达成的作用的量。确切量将取决于治疗目的,并且可由本领域的技术人员使用已知技术确定(参见例如Lloyd(1999)The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)。

[0126] 如本文所用,术语“受试者”是指需要缓解、预防和/或治疗疾病或病症如病毒感染的动物,优选哺乳动物,更优选人类。受试者可能具有流感感染或倾向于出现流感病毒感染。“倾向于出现流感病毒感染”的受试者或“可能处于感染流感病毒的高风险”的受试者是那些由于自身免疫性疾病而免疫系统受损的受试者、那些接受免疫抑制疗法的人(例如,器官移植后)、那些患有人类免疫缺陷综合症(HIV)或获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的人、某些形式的消耗或破坏白血球的贫血、那些接受放射或化疗的人或那些患有发炎性病症的人。此外,年幼或年老的受试者的风险也会增加。任何与感染个体有身体接触或身体紧密接近的人都会增加感染流感病毒的风险。此外,受试者因接近疾病爆发,例如受试者居住在人口稠密的城市,或非常接近于已确诊或怀疑感染流感病毒的受试者,或职业选择,例如医院员工、药物研究人员、前往感染区域旅行或频繁搭乘飞机,均有感染流感的风险。

[0127] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指由于向有需要的受试者施用治疗剂如本发明的抗体而减少或缓解流感感染的至少一种症状或适应症的严重性。所述术语包括抑制疾病的进展或感染的恶化。所述术语还包括疾病的积极预后,即在施用治疗剂如本发明的抗体后,受试者可以没有感染或病毒滴度降低或没有病毒滴度。治疗剂可以治疗剂量施用于受试者。

[0128] 术语“预防(prevent/preventing/prevention)”是指在施用本发明的抗体后抑制

流感感染的表现或流感感染的任何症状或适应症。所述术语包括预防暴露于病毒或有流感感染风险的受试者的感染扩散。

[0129] 如本文所用,“保护作用”可以通过本领域已知的任何标准程序来证明,以确定药剂如抗病毒剂或抗体如本发明的抗流感HA抗体是否能证明以下任何一种或多种:例如,暴露于感染物后存活率的增加、病毒载量的降低或与感染物相关的至少一种症状的改善。

[0130] 如本文所用,术语“抗病毒药物”是指用于治疗、预防或改善受试者的病毒感染的任何抗感染药物或疗法。术语“抗病毒药物”包括但不限于TAMIFLU®(奥司他韦)、RELENZA®(扎那米韦)、利巴韦林或干扰素α2b。在本发明中,待治疗的感染由流感病毒引起。

[0131] 一般说明

[0132] 流感是由正粘病毒科的RNA病毒(流感病毒)引起的一种感染性疾病。流感病毒基于核心蛋白分为甲、乙、丙三个属,并进一步分为由病毒包膜糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)确定的亚型。甲型流感病毒感染一系列哺乳动物和禽类物种,而乙型和丙型感染主要限于人类。只有甲型和乙型才会引起任何关注的人类疾病。

[0133] 流感病毒的高突变率和频繁的基因重配导致了HA和NA抗原的巨大变化。引起小变化(“抗原漂移”)的少量点突变相对频繁地发生。抗原漂移使病毒逃避免疫识别,导致流感在大流行的年份反复爆发。HA抗原的主要变化(“抗原漂移”)是由不同甲型流感亚型的遗传物质重配引起。抗原漂移导致新的大流行病毒株是罕见的事件,通过动物和人类亚型之间的重配而发生,例如在共同感染的猪身上。

[0134] 对甲型流感病毒的中和抗体反应通常对给定的病毒亚型具有特异性。存在18种甲型流感亚型,由其血凝素(“HA”)蛋白定义。18种HA(H1-H18)可以分为两组。第1组由H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17和H18亚型组成,并且第2组包括H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型。由于这些原因,非常希望有一种诱导能够中和所有甲型流感病毒亚型以及其年度变体的广义中和抗体的疫苗。此外,广泛中和的异亚型抗体可以作为预防或治疗甲型流感感染的药物来施用。

[0135] HA是以同源三聚体前体多肽HA0形式合成的。每个单体可以独立地在翻译后裂解形成通过单个二硫键连接的两个多肽HA1和HA2。较大的N端片段(HAL 320-330个氨基酸)形成膜侧球状域,其含有受体结合位点和病毒中和抗体所识别的大多数决定簇。HA的HA1多肽负责将病毒附着于细胞表面。较小的C端部分(HA2,约180个氨基酸)形成茎状结构,将球状域锚定于细胞或病毒膜。HA2多肽介导病毒和细胞膜在内体中的融合,从而使核糖核蛋白复合物释放到细胞质中。

[0136] 在鉴定中和一种以上甲型流感病毒亚型的抗体方面只取得了有限的成功。此外,迄今为止所鉴定的抗体的中和气息狭窄,并且其效力较低。Okuno等人用流感病毒A/奥田/57(H2N2)免疫小鼠,并分离出一种单克隆抗体(C179),所述抗体与HA2中的保守构象表位结合,在动物模型中体外和体内中和第1组H2、H1和H5亚型甲型流感病毒((Okuno等人,J.Virol.67:2552-8,1993)。

[0137] 尽管经过数十年的研究,但还没有广泛中和或抑制甲型流感病毒感染或减弱甲型流感病毒引起的疾病的上市抗体。因此,需要鉴定中和甲型流感病毒多种亚型,并且可以用作预防或治疗甲型流感感染的药物的新抗体。

[0138] 用于预防或治疗感染性疾病的被动免疫疗法已经使用了一个多世纪,通常采用含有高滴度中和抗体的康复人血清的形式(Good等人1991;Cancer 68:1415-1421)。如今,多种纯化的单克隆抗体目前在临床前和临床开发中用作抗微生物剂(Marasco等人.2007;Nature Biotechnology 25:1421-1434)。

[0139] 本发明人已在本文中描述了特异性结合流感血凝素并调节流感病毒与宿主细胞的相互作用的完全人类抗体及其抗原结合片段。抗甲型流感第2组HA抗体可以高亲和力结合流感病毒HA。在某些实施例中,本发明的抗体是阻断抗体,其中所述抗体可以结合流感HA并阻断病毒附着和/或进入宿主细胞。在一些实施例中,本发明的阻断抗体可以阻断流感病毒与细胞的结合,因此可以抑制或中和宿主细胞的病毒感染性。在一些实施例中,阻断抗体可用于治疗患有流感病毒感染的受试者。当向有需要的受试者施用时,所述抗体可以减少受试者中的病毒如流感的感染。它们可用于降低受试者的病毒载量。它们可单独使用或作为辅助疗法与本领域中已知的其他治疗部分或模式一起用于治疗病毒感染。在某些实施例中,这些抗体可以结合病毒HA的茎区中的表位。此外,所鉴定的抗体可以预防性地(在感染前)用于保护哺乳动物免受感染,或者可以治疗性地(在感染建立后)用于改善先前建立的感染,或改善与感染相关的至少一种症状。

[0140] 两种示例性甲型流感第2组HA的全长氨基酸序列在GenBank中以登录号ACF41911.1(来自A/威斯康星/67/X-161/2005(H3N2),还参见SEQ ID NO:33)和登录号AAR02640.1(来自A/鸡/荷兰/01/2003(H7N7)(还参见SEQ ID NO:34)显示。

[0141] 在某些实施例中,本发明的抗体是从用初级免疫原如全长流感HA或用重组形式的流感HA或其片段免疫,然后用二级免疫原,或用流感HA的免疫原活性片段免疫的小鼠获得。在某些实施例中,抗体是从用流感疫苗组合物免疫,随后用一种或多种重组生产的HA肽进行加强免疫的小鼠获得的。

[0142] 在某些实施例中,小鼠用A/香港/08/1968(H3N2)免疫,随后用A/香港/05/1972-PR8-X36(H3N2)免疫,接着再次用A/香港/08/1968(H3N2)免疫。所有小鼠均用编码来自A/威斯康星/67/X-161/2005(H3N2)和A/鸡/荷兰/01/2003(H7N7)的HA的DNA的1:1混合物加强免疫。

[0143] 免疫原可以是流感HA的生物活性和/或免疫原性片段或编码其活性片段的DNA。所述片段可以源自HA蛋白的茎区。(参见Sui等人,Nature Struct.and Mol.Biol.2009年2月22日在线发表;第1-9页)。

[0144] 肽可以经过修饰以包括添加或取代某些残基,从而用于进行标记或达到与载体分子如KLH缀合的目的。例如,可以在肽的N端或C端添加半胱氨酸,或可以添加接头序列,以制备与例如KLH缀合的肽以进行免疫。

[0145] 本发明的某些抗甲型流感第2组HA抗体能够结合并中和流感HA的活性,如由体外或体内分析所确定。本发明的抗体结合并中和甲型流感第2组HA的活性,从而使病毒附着和/或进入宿主细胞,继而引起病毒感染的能力,可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法,包括如本文所述的结合分析或活性分析来测量。

[0146] 用于测量结合活性的非限制性、示例性体外分析在本文实例3中加以说明。在实例3中,使用Biacore仪器通过表面等离子体共振测定抗甲型流感第2组HA抗体对甲型流感第2组HA的结合亲和力和解离常数。在实例4中,使用中和分析来确定不同的第2组流感病毒株

的感染性。在实例5中,显示某些抗体介导补体依赖性细胞毒性(CDC),或在实例6中,显示某些抗体在体外介导病毒感染的细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。实例7表明,本发明的某些抗体能够在体内中和甲型流感感染。

[0147] 特异性针对甲型流感第2组HA的抗体可以不含额外的标记或部分,或者它们可以含有N端或C端标记或部分。在一个实施例中,所述标记或部分是生物素。在结合分析中,标记(如果有的话)的位置可以确定肽相对于肽所结合的表面的取向。例如,如果表面涂覆有抗生物素蛋白,则含有N端生物素的肽将被定向,使得肽的C端部分将在表面远侧。在一个实施例中,标记可以是放射性核素、荧光染料或MRI可检测的标记。在某些实施例中,此类标记的抗体可用于包括成像分析在内的诊断分析中。

[0148] 抗体的抗原结合片段

[0149] 除非另外具体指示,否则如本文所用,术语"抗体"应理解为涵盖包含两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的抗体分子(即,"完整抗体分子")以及其抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的"抗原结合部分"、抗体的"抗原结合片段"等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成性或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的"抗原结合片段"或"抗体片段"是指保留特异性结合甲型流感第2组HA的能力的抗体的一个或多个片段。抗体片段可以包括Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、dAb片段、含有CDR的片段或分离的CDR。在某些实施例中,术语"抗原结合片段"是指多特异性抗原结合分子的多肽片段。可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变域和(任选地)恒定域的DNA的重组基因工程技术,例如,从完整抗体分子衍生抗体的抗原结合片段。这种DNA是已知的和/或可从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)容易地获得,或者可以是合成的。可以对所述DNA进行测序并且通过化学方式或通过使用分子生物学技术来操纵所述DNA,例如以将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域布置成合适的构型,或者引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0150] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i)Fab片段;(ii)F(ab′)2片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;和(vii)由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽),或约束性FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用,其他经工程化的分子(诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双体、三体、四体、微体、纳米体(例如,单价纳米体、二价纳米体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域)也被涵盖在表述"抗原结合片段"内。

[0151] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变域可以具有任何尺寸或氨基酸组成并且一般包含邻近一个或多个框架序列或与一个或多个框架序列同框的至少一个CDR。在具与V_L域相关的V_H域的抗原结合片段中,V_H域和V_L域可以任何合适的布置方式彼此相对定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可以含有单体V_H或V_L域。

[0152] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以含有与至少一个恒定域共价连接的至少一个可变域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变域和恒定域的非限制性示例性构型包括:(i)V_H-C_H1;(ii)V_H-C_H2;(iii)V_H-C_H3;(iv)V_H-C_H1-C_H2;(v)V_H-C_H1-C_H2-C_H3;

(vi)V_H-C_H2-C_H3;(vii)V_H-C_L;(viii)V_L-C_H1;(ix)V_L-C_H2;(x)V_L-C_H3;(xi)V_L-C_H1-C_H2;(xii)V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii)V_L-C_H2-C_H3;和(xiv)V_L-C_L。在可变域和恒定域的任何配置中,包括上文所列的任何示例性配置,可变域和恒定域可以彼此直接连接或可以由完整或部分的铰链区或接头区连接。铰链区可以由在单一多肽分子中相邻可变域和/或恒定域之间产生柔性或半柔性键联的至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包含具有上文所列的可变域和恒定域构型中的任一个的彼此和/或与一个或多个单体V_H或V_L域(例如,通过二硫键)呈非共价缔合的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0153] 如同完整抗体分子,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段将通常包含至少两个不同的可变域,其中每个可变域能够特异性地结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。任何多特异性抗体形式,包括本文所公开的示例性双特异性抗体形式,都可以使用本领域可用的常规技术调适以用于本发明抗体的抗原结合片段的情形。

[0154] 人抗体的制备

[0155] 用于在转基因小鼠中产生人类抗体的方法是本领域中已知的。在本发明的背景下,任何此类已知方法都可用于制造特异性结合甲型流感第2组HA的人抗体。包含下列任何一种的免疫原可用于产生针对甲型流感第2组HA的抗体。在某些实施例中,本发明的抗体是从用全长的天然甲型流感第2组HA(参见例如GenBank登录号ACF41911.1,或AAR02640.1),或用减毒或灭活的病毒,或用编码所述蛋白或其片段的DNA免疫的小鼠获得。或者,甲型流感第2组HA蛋白或其片段可以用标准生化技术生产,并进行修饰后用作免疫原。在一个实施例中,免疫原可以是重组生产的甲型流感第2组HA蛋白或其片段。在本发明的某些实施例中,免疫原可以是流感病毒疫苗。在某些实施例中,可以施用一次或多次加强注射。在某些实施例中,加强注射可以包含一种或多种流感病毒株,或源自这些病毒株的血凝素,例如,A/香港/08/1968(H3N2),然后是A/香港/05/1972-PR8-X36(H3N2),然后再次用A/香港/08/1968(H3N2)。所有小鼠均用编码来自A/威斯康星/67/X-161/2005(H3N2)和A/鸡/荷兰/01/2003(H7N7)的HA的DNA的1:1混合物加强免疫。在某些实施例中,加强注射剂可以含有1:1的流感病毒株混合物,或1:1的源自病毒株的血凝素混合物,或编码HA的DNA。在某些实施例中,免疫原可以是在大肠杆菌或任何其他真核细胞或哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或流感病毒本身中表达的重组流感HA肽。

[0156] 使用VELOCIMMUNE®技术(参见例如US 6,596,541,再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals),VELOCIMMUNE®)或用于产生单克隆抗体的任何其他已知方法,最初分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的针对甲型流感第2组HA的高亲和力嵌合抗体。VELOCIMMUNE®技术涉及产生转基因小鼠,所述转基因小鼠具有包含可操作地连接至内源性小鼠恒定区基因座的人类重链和轻链可变区的基因组,使得所述小鼠响应于抗原刺激产生包含人类可变区和小鼠恒定区的抗体。分离出编码抗体重链和轻链可变区的DNA并且将其可操作地连接至编码人类重链和轻链恒定区的DNA。接着,在能够表达完全人类抗体的细胞中表达所述DNA。

[0157] 一般来说,利用所关注抗原攻击VELOCIMMUNE®小鼠,并且从表达抗体的小鼠回收淋巴细胞(如B细胞)。淋巴细胞可以与骨髓瘤细胞系融合以制备无限增殖杂交瘤

细胞系,并且对此类杂交瘤细胞系进行筛选和选择以鉴别出产生对所关注抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。可以将编码重链和轻链可变区的DNA分离并且连接到重链和轻链的期望同型恒定区。这种抗体蛋白可以在细胞(如CHO细胞)中产生。或者,可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离出编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变域的DNA。

[0158] 首先,分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下文实验章节中,针对期望特征,包括亲和力、选择性、表位等,表征并且选择抗体。小鼠恒定区被所需人类恒定区替换以产生本发明的完全人类抗体,例如野生型或经过修饰的IgG1或IgG4。虽然所选的恒定区可以根据特定用途而变化,但是高亲和力抗原结合和靶标特异性特征留在可变区中。

[0159] 生物等效物

[0160] 本发明的抗甲型流感第2组HA抗体和抗体片段涵盖氨基酸序列与所描述的抗体的氨基酸序列不同,但保留结合流感HA的能力的蛋白质。当与亲本序列相比时,此类变体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸的添加、缺失或置换,但是表现出基本上相当于所描述的抗体的生物学活性。同样,本发明的编码抗体的DNA序列涵盖当与所公开的序列相比较时包含一个或多个核苷酸添加、缺失或取代,但编码与本发明的抗体或抗体片段基本上生物等效的抗体或抗体片段的序列。

[0161] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是当在类似实验条件下以单次剂量或多次剂量施用相同摩尔剂量时,吸收速率和程度不显示显著差异的药物等效物或药物替代物,则将其视为生物等效的。如果某些抗体在吸收程度上是等效的,但是在吸收速率上不是等效的,则它们将被视为等效物或药物替代物,但是因为吸收速率的这种差异是有意的并且反映在标记中,所以可以被视为生物等效物,这些抗体对于例如在长期使用中达到有效体内药物浓度不是必需的,并且被认为对于所研究的特定药品不具有临床意义。

[0162] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度或效力无临床上有意义的差异,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0163] 在一个实施例中,如果与不进行参考产品和生物产品之间的切换的连续疗法相比,患者可以进行这种切换一次或多次,而没有预期的不良反应风险的增加,包括免疫原性的临床上显著的变化、或减少的有效性,则两种抗原结合蛋白是生物等效物。

[0164] 在一个实施例中,如果两种抗原结合蛋白都通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制来发挥作用,以达到此类机制是已知的程度,则它们是生物等效物。

[0165] 生物等效性可以由体内和/或体外方法证明。生物等效性度量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随时间推移的血液、血浆、血清或其他生物流体中的抗体或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关联并且可以合理地预测人体内生物利用率数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随时间推移的抗体(或其靶标)的适当急性药理作用;以及(d)建立抗体的安全性、功效、或者生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0166] 本发明的抗体的生物等效变体可以通过例如进行残基或序列的各种取代,或使生物活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建。举例来说,可以缺失不是生物活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其他情况下,生物等效抗体可以包括包含氨基酸变化的抗体变体,这些变化改

变抗体的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0167] 包含Fc变体的抗流感HA抗体

[0168] 根据本发明的某些实施例,提供抗甲型流感第2组HA抗体,其包含具有一个或多个突变的Fc域,所述突变例如在酸性pH下与中性pH相比增强或减少抗体与FcRn受体的结合。例如,本发明包括在Fc域的C_H2或C_H3区中包含突变的抗流感HA抗体,其中所述突变增加了Fc域在酸性环境中(例如,在pH值范围为约5.5至约6.0的内体中)对FcRn的亲和力。当施用于动物时,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434处的修饰(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308处的修饰(例如,308F、V308F)以及位置434处的修饰。在一个实施例中,修饰包含428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如,308F或308P)。在又一实施例中,修饰包含265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0169] 例如,本发明包括抗甲型流感第2组HA抗体,其包含具有一对或多对或一组或多组选自以下组成的组的突变的Fc域:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);257I和311I(例如,P257I和Q311I);257I和434H(例如,P257I和N434H);376V和434H(例如,D376V和N434H);307A、380A和434A(例如,T307A、E380A和N434A);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。在本发明的范围内设想了本文公开的抗体可变域内的前述Fc域突变和其他突变的所有可能的组合。

[0170] 本发明还包括包含嵌合重链恒定(C_H)区的抗甲型流感第2组HA抗体,其中所述嵌合C_H区包含来源于多于一种免疫球蛋白同种型的C_H区的区段。举例来说,本发明的抗体可以包含嵌合C_H区,所述区包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H2域的部分或全部,其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H3域的部分或全部组合。根据某些实施例,本发明的抗体包含具有嵌合铰链区的嵌合C_H区。举例来说,嵌合铰链可以包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号,位置216到227的氨基酸残基),其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号,位置228到236的氨基酸残基)组合。根据某些实施例,嵌合铰链区包含来源于人类IgG1或人类IgG4上铰链的氨基酸残基,和来源于人类IgG2下铰链的氨基酸残基。包含如本文所描述的嵌合C_H区的抗体可以在某些实施例中展现修饰的Fc效应功能,而不会不利地影响抗体的治疗或药物动力学特性。(参见例如2013年2月1日提交的美国临时申请第61/759,578号,其公开内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0171] 抗体的生物特征

[0172] 一般来说,本发明的抗体通过与甲型流感第2组HA结合而起作用。例如,本发明包括(例如在25℃或37℃下)以小于10nM的K_D结合甲型流感第2组HA的抗体和抗体的抗原结合片段,如通过Biacore仪器中的表面等离子体共振,或通过基于实时生物层干涉仪的生物传感器(Octet HTX分析)所测量。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段以小于约5nM、小于

约2nM、小于约1nM、小于约500pM、小于250pM或小于100pM的K_D结合甲型流感第2组HA,如例如使用如本文所述的分析格式或基本上相似的分析通过表面等离子体共振所测量。

[0173] 本发明还包括结合甲型流感第2组HA的抗体及其抗原结合片段,如例如使用如本文所定义的分析格式或基本上相似的分析,在37℃下通过表面等离子体共振所测量,解离半衰期(t1/2)大于约75分钟。在某些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段结合流感HA的t大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟或大于约1000分钟,如例如使用如本文所定义的分析格式(例如Mab捕获或抗原捕获格式)或基本上相似的分析,在25℃下通过表面等离子体共振所测量。

[0174] 本发明还包括中和流感病毒对其宿主细胞的感染性的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,所述抗体在如实例4中所示的微量中和分析或基本上相似的分析中,表现出针对各种代表性第2组流感病毒A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2);A/菲律宾/01/1982(H3N2)和A/上海/01/2013-PR8(H7N9)的中和效力,IC_{50}范围介于约5.7nM至约405nM。

[0175] 本发明还包括介导感染细胞的补体依赖性细胞毒性的抗体或其抗原结合片段,其EC_{50}为140nM,最大裂解为78.3%(参见实例5)。在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段介导感染细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),如报告分析和使用外周血单核细胞(PBMC)裂解HA装饰的细胞的能力所示。在报告分析中,EC_{50}对于H1H14611N2为0.8714Nm,对于H1H14612N2为0.6882Nm。在PBMC型分析中,EC_{50}对于H1H14611N2为0.1463Nm,对于H1H14612N2为0.1762Nm。(参见实例6)。

[0176] 本发明还包括抗甲型流感第2组HA抗体,其在体内表现出增强保护作用或强效中和甲型流感感染。某些抗体在治疗性施用时(感染后;参见实例7)显示出强效中和。在一个实施例中,在治疗性施用时,在感染后96小时以7mg/kg或15mg/kg施用的H1H14611N2的一次剂量导致小鼠的存活率(分别)为80%和100%。当某些示例性抗体(H1H14611N2和H1H14612N2)在感染后24、48或72小时以15mg/kg的单剂量施用时,也观察到100%的存活率。在一个实施例中,当与抗病毒药物奥司他韦组合时,H1H14611N2在流感感染的哺乳动物中表现出累加的保护作用。

[0177] 在一个实施例中,本发明提供特异性结合甲型流感第2组HA的分离的重组抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有以下特征中的两个或更多个:(a)是完全人类单克隆抗体;(b)如通过表面等离子体共振所测量,与甲型流感第2组HA结合的解离常数(K_D)小于10^{-8}M;(c)表现出大于75分钟的解离半衰期(t1/2);

[0178] (d)表现出对选自H3N2和H7N9病毒株的甲型流感第2组病毒的中和作用,IC_{50}分别小于200nM和500nM;(e)表现出流感病毒感染的细胞的补体介导的裂解,EC_{50}小于约150nM;(f)使用报告生物分析证明感染病毒的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC_{50}小于约0.9nM;(g)在人类外周血单核细胞(PBMC)存在下表现出感染病毒的靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,EC_{50}小于约0.180nM;(h)当在病毒攻击后24、48、72或96小时施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加;(i)当在感染后96小时与奥司他韦组合施用时,表现出感染流感的动物的存活率增加;或(j)其中所述抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的重链可变区(HCVR)序列中的任一个内所含的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3);和表1中列出的轻链可变区(LCVR)序列中的任一个内所含的三个轻链CDR(LCDR1、

LCDR2和LCDR3)。

[0179] 本发明的抗体可以具有前述生物特征中的两个或更多个,或其任何组合。通过对包括本文工作实例在内的本公开的回顾,本发明的抗体的其他生物特征将对本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0180] 表位作图和相关技术

[0181] 本发明包括抗甲型流感第2组HA抗体,其与甲型流感第2组HA分子的一个或多个域内发现的一个或多个氨基酸相互作用。抗体所结合的表位可以由位于流感HA分子内的3个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)氨基酸的单个连续序列组成(例如域中的线性表位)。或者,所述表位可以由位于甲型流感第2组HA分子内的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成(例如构象表位)。

[0182] 本领域普通技术人员已知的各种技术可用于确定抗体是否在多肽或蛋白质内"与一个或多个氨基酸相互作用"。示例性技术包括例如常规交叉阻断分析,如Antibodies,Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)中所描述的分析。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke(2004)Methods Mol.Biol.248:443-63)、肽裂解分析结晶学研究和NMR分析。此外,可以采用如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法(Tomer(2000)Prot.Sci.9:487-496)。可以用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。大体上,氢/氘交换法涉及所关注的蛋白质的氘标记,然后是抗体与氘标记的蛋白质的结合。接下来,将蛋白质/抗体复合物转移到水中,受抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子以比不属于界面的氨基酸内的可交换质子更慢的速度进行氘氢反交换。因此,形成蛋白质/抗体界面的一部分的氨基酸可能保留氘,因此与不包括在界面中的氨基酸相比表现出相对较高的质量。在抗体解离后,对靶蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析,从而揭示氘标记的残基,这些残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。参见例如,Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267:252-259;Engen和Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A。

[0183] 术语"表位"是指B细胞和/或T细胞起反应的抗原上的位点。B细胞表位可以由邻接氨基酸、或者通过蛋白质的三级折叠并置的非邻接氨基酸形成。由邻接氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括处于独特的空间构象中的至少3个,且更通常为至少5个或8-10个氨基酸。

[0184] 修饰辅助概况分析(MAP),也称为基于抗原结构的抗体概况分析(ASAP),是一种根据每个抗体与化学或酶修饰的抗原表面的结合概况的相似性,对针对同一抗原的大量单克隆抗体(mAb)进行分类的方法(参见US 2004/0101920,专门以全文引用的方式并入本文中)。每个类别可以反映与另一个类别所代表的表位明显不同或部分重叠的独特表位。该技术允许快速过滤基因相同的抗体,从而可以使表征集中在基因不同的抗体。当应用于杂交瘤筛选时,MAP可以促进鉴定产生具有所需特征的mAb的稀有杂交瘤克隆。MAP可用于将本发明的抗体分类为结合不同表位的抗体组。

[0185] 在某些实施例中,甲型流感病毒第2组HA抗体或其抗原结合片段与流感HA中例举的任何一个或多个区域内的表位或其片段结合,所述表位是天然形成的,或重组产生的。

[0186] 本发明包括与相同表位或所述表位的一部分结合的抗甲型流感第2组HA抗体。同样,本发明还包括与本文所述的任何特定示例性抗体竞争性地结合甲型流感第2组HA或其

片段的抗甲型流感第2组HA抗体。例如,本发明包括抗甲型流感第2组HA抗体,其与从表1中所述的那些抗体中获得的一种或多种抗体交叉竞争结合甲型流感第2组HA。

[0187] 通过使用本领域已知的常规方法,人们可以容易地确定抗体是否与参考抗甲型流感第2组HA抗体结合相同的表位,或与参考抗甲型流感第2组HA抗体竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明的参考抗甲型流感第2组HA抗体结合到相同的表位,允许参考抗体在饱和条件下与甲型流感第2组HA或肽结合。接着,评估测试抗体与甲型流感第2组HA分子结合的能力。如果在与参考抗甲型流感第2组HA抗体饱和结合后,测试抗体能够与甲型流感第2组HA结合,则可以断定测试抗体与参考抗甲型流感第2组HA抗体结合不同的表位。另一方面,如果在与参考抗甲型流感第2组HA抗体饱和结合后,测试抗体不能与甲型流感第2组HA结合,则测试抗体可能结合至与本发明的参考抗甲型流感第2组HA抗体所结合的表位相同的表位。

[0188] 为了确定抗体是否与参考抗甲型流感第2组HA抗体竞争性结合,上述结合方法以两种取向进行:在第一种取向中,使参考抗体在饱和条件下与甲型流感第2组HA结合,然后评估测试抗体与甲型流感第2组HA分子的结合。在第二种取向中,使测试抗体在饱和条件下与甲型流感第2组HA分子结合,然后评估参考抗体与甲型流感第2组HA分子的结合。如果在两种取向中,只有第一(饱和)抗体能够与甲型流感第2组HA分子结合,则得出结论,测试抗体和参考抗体竞争结合甲型流感第2组HA。如本领域的普通技术人员所理解,与参考抗体竞争结合的抗体不一定结合与参考抗体相同的表位,但可以通过结合重叠或相邻的表位来在空间上阻断参考抗体的结合。

[0189] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则两种抗体与相同或重叠的表位结合。即,如在竞争性结合分析中所测量,1、5、10、20或100倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合至少50%,但优选75%、90%或甚至99%(参见例如Junghans等人,Cancer Res.1990 50:1495-1502)。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0190] 然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗体结合的缺乏事实上是否是由于结合至与参考抗体相同的表位,或者空间阻断(或另一个现象)是否是造成所观察的结合缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或者本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合分析来进行这类实验。

[0191] 免疫缀合物

[0192] 本发明涵盖与治疗性部分如类毒素或抗病毒药物缀合的人抗甲型流感第2组HA单克隆抗体(“免疫缀合物”),以治疗流感病毒感染。如本文所用,术语“免疫缀合物”是指与放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物连接的抗体。抗体可以在沿分子的任何位置与放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告部分、酶、肽或治疗剂连接,只要它能够结合其靶标。免疫缀合物的实例包括抗体药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在一个实施例中,药剂可以是针对流感HA的第二种不同抗体。在某些实施例中,抗体可以与特异性针对病毒感染的细胞的药剂缀合。可与抗流感HA抗体缀合的治疗部分的类型并将考虑待治疗的病况和要实现的所需治疗效果。用于形成免疫缀合物的合

适药剂的实例是本领域已知的;参见例如WO 05/103081。

[0193] 多特异性抗体

[0194] 本发明的抗体可以是单特异性、双特异性或多特异性的。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对一种以上靶多肽具有特异性的抗原结合域。参见例如,Tutt等人.,1991,J.Immunol.147:60-69;Kufer等人.,2004,Trends Biotechnol.22:238-244。

[0195] 本发明的任何多特异性抗原结合分子或其变体可以使用标准分子生物学技术(例如,重组DNA和蛋白质表达技术)构建,如本领域的普通技术人员将知晓。

[0196] 在一些实施例中,甲型流感第2组HA特异性抗体以双特异性形式生成("双特异性"),其中与甲型流感第2组HA的不同域结合的可变区连接在一起,以在单个结合分子内赋予双域特异性。适当设计的双特异性可以通过增加特异性和结合亲合力来提高甲型流感第2组HA蛋白的整体抑制功效。对个别域具有特异性的可变区(例如,N端域的区段),或可以与一个域内的不同区结合的可变区配对在一个结构支架上,所述结构支架允许每个区同时与单独的表位结合,或与一个域内的不同区结合。在双特异性的一个实例中,来自对一个域具有特异性的结合物的重链可变区(V_H)与来自一系列对第二个域具有特异性的结合物的轻链可变区(V_L)重新组合,以确定可以与原始V_H配对而不破坏该V_H的原始特异性的非同源V_L搭配物。以这种方式,单个V_L区段(例如V_L1)可以与两个不同的V_H域(例如V_H1和V_H2)组合,以产生由两个结合"臂"(V_H1-V_L1和V_H2-V_L1)构成的双特异性。使用单个V_L区段降低了系统的复杂性,从而简化了用于生成双特异性的克隆、表达和纯化过程并提高了效率(参见例如USSN13/022759和US2010/0331527)。

[0197] 或者,可以使用本文所述的技术或本领域技术人员已知的其他技术,以双特异性形式制备结合多于一个域和第二靶标的抗体,例如但不限于第二不同的抗甲型流感第2组HA抗体。与不同区结合的抗体可变区可以与结合到例如流感病毒上的相关位点的可变区连接在一起,以在单个结合分子内赋予双抗原特异性。适当设计的这种性质的双特异性具有双重功能。对细胞外域具有特异性的可变区与对细胞外域之外具有特异性的可变区组合,并配对在一个结构支架上,使每个可变区能够与单独的抗原结合。

[0198] 可在本发明的情形中使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig)C_H3域和第二Ig C_H3域,其中所述第一和第二Ig C_H3域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白质A的结合。在一个实施例中,第一Ig C_H3域结合蛋白质A,而第二Ig C_H3域含有减少或消除蛋白质A结合的突变,如H95R修饰(按照IMGT外显子编号;按照EU编号的H435R)。第二C_H3还可以包含Y96F修饰(按照IMGT;按照EU的Y436F)。在第二C_H3内可能发现的其他修饰包括:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(按照IMGT;按照EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;按照EU的N384S、K392N和V422I);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(按照IMGT;按照EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。上述双特异性抗体形式的变化涵盖在本发明的范围内。

[0199] 可以在本发明的情形中使用的其他示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv或双体双特异性形式、IgG-scFv融合物、双可变域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、钮入孔、共同

轻链(例如,具有钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)body、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG和Mab^{2}双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献)。双特异性抗体也可以使用肽/核酸缀合来构建,例如,其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来生成位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后自组装成具有确定组成、价数和几何形状的多聚体复合物。(参见例如,Kazane等人.,J.Am.Chem.Soc.[Epub:2012年12月4日])。

[0200] 治疗性施用和配制物

[0201] 本发明提供治疗组合物,其包含本发明的抗甲型流感第2组HA抗体或其抗原结合片段。根据本发明的治疗组合物将与合适的载体、赋形剂和其他药剂一起施用,所述药剂掺入制配制物中,以提供改进的转移、递送、耐受性等。众多的适当配制物可见于所有医药化学家已知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,PA)。这些配制物包括例如散剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子脂质)的囊泡(如LIPOFECTIN™)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶及含有卡波蜡的半固体混合物。还参见Powell等人"Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0202] 抗体剂量可视待施用的受试者的年龄和体格、目标疾病、状况、施用途径等而变化。当本发明的抗体用于治疗成年患者的疾病或病症或用于预防这种疾病时,通常以约0.1至约60mg/kg体重,更优选约5至约60,约10至约50,或约20至约50mg/kg体重的单剂量施用本发明的抗体是有利的。根据病况的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可以至少约0.1mg至约5000mg、约1至约2000mg、约5至约1000mg、或约10至约500mg、至约100mg或至约50mg的初始剂量施用。在某些实施例中,初始剂量之后可以施用抗体或其抗原结合片段的第二或多个后续剂量,其量可以大致等于或小于初始剂量的量,其中后续剂量间隔至少1天至3天;至少一周,至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0203] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如Wu等人(1987)J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、透皮、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外以及口服途径。所述组合物可以通过任何便利的途径,例如通过输注或快速注射、通过经上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收施用,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身性或局部的。药物组合物也可以在囊泡,尤其脂质体中递送(参见例如Langer(1990)Science 249:1527-1533)。

[0204] 本文还考虑使用纳米颗粒来递送本发明的抗体。抗体缀合的纳米颗粒可以用于治疗和诊断应用。抗体缀合的纳米颗粒以及制备和使用方法由Arruebo,M.等人,2009("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications",J.Nanomat.2009卷,文章编号439389,24页,doi:10.1155/2009/439389)详细描述,其以引入的方式并入本文中。可以开发纳米颗粒并与药物组合物中所含的抗体缀合,以靶向病毒感染的细胞。用于药物递送的纳米颗粒也已在例如US 8257740或US 8246995中描述,每个专利都全文并入本文。

[0205] 在某些情形下,药物组合物可以在控制释放系统中递送。在一个实施例中,可以使用泵。在另一实施例中,可以使用聚合材料。在又一个实施例中,可以将控制释放系统放入组合物的目标附近,由此仅需要一部分全身剂量。

[0206] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内、颅内、腹膜内和肌肉内注射、滴液输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法制备。举例来说,可注射制剂可以例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂等的等渗溶液,其可与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂,如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选地填充于适当安瓿中。

[0207] 本发明的药物组合物可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送。此外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔式递送装置可重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有药物组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有药物组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有药物组合物的新筒。随后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有药物组合物。一旦排空储集器中的药物组合物,就丢弃整个装置。

[0208] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(英国伍德斯托克(Woodstock,UK)的Owen Mumford,Inc.)、DISETRONIC™笔(瑞士布格多夫(Burghdorf,Switzerland)的Disetronic Medical Systems)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN70/30™笔(印第安纳州印第安纳波利斯(Indianapolis,IN)的Eli Lilly and Co.)、NOVOPEN™I、II和III(丹麦哥本哈根(Copenhagen,Denmark)的Novo Nordisk)、NOVOPEN JUNIOR™(丹麦哥本哈根的Novo Nordisk)、BD™笔(新泽西州富兰克林湖(Franklin Lakes,NJ)的Becton Dickinson)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(德国法兰克福(Frankfurt,Germany)的sanofi-aventis)等。应用于皮下递送本发明的药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(Sanofi-Aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州千橡树市(Thousand Oaks,CA)的Amgen)、PENLET™(德国斯图加特(Stuttgart,Germany)的Haselmeier)、EPIPEN(Dey,L.P.)以及HUMIRA™笔(伊利诺伊州阿博特帕克(Abbott Park IL)的Abbott Labs)等。

[0209] 有利地,用于上述口服或不经肠使用的药物组合物制备成适合于符合活性成分剂量的单位剂量的剂型。这类呈单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液(安瓿)、栓剂等。在单位剂量中,每个剂型所含的抗体量一般为约5至约5000mg;特别是在注射剂形式中,优选的是,抗体的含量为约5至约500mg,其他剂型为约10至约250mg。

[0210] 抗体的治疗用途

[0211] 本发明的抗体可用于治疗和/或预防与流感病毒感染相关的疾病或病症或病况和/或用于改善与此类疾病、病症或病况相关的至少一种症状。

[0212] 在某些实施例中,本发明的抗体可用于治疗罹患流感病毒引起的严重和急性呼吸

道感染的受试者。在一些实施例中,本发明的抗体可用于降低病毒滴度或减少宿主中的病毒载量。在一个实施例中,可以将本发明的抗体或其抗原结合片段以治疗剂量施用于流感病毒感染的患者。

[0213] 本发明的一种或多种抗体可以用于缓解或预防或减轻疾病或病症的一种或多种症状或病况的严重性。所述抗体可以用于改善或降低流感病毒感染的至少一种症状的严重性,所述症状包括但不限于发烧、咳嗽、咽喉痛、头痛、身体疼痛、疲劳、极度疲惫、呼吸急促、支气管炎、肺炎和死亡。

[0214] 本文还考虑将本发明的一种或多种抗体预防性地用于处于出现流感病毒感染风险下的受试者,如免疫功能不全的个体、老年人(65岁以上)、2岁以下的儿童、医疗工作者、与患有流感病毒感染的患者近距离的家庭成员以及有病史的患者(例如,增加肺部感染、心脏病或糖尿病的风险)。

[0215] 在本发明的另一个实施例中,本发明抗体用于制备治疗罹患流感病毒感染的患者的药物组合物。在本发明的另一个实施例中,本发明抗体作为辅助疗法与本领域的技术人员已知可用于治疗或改善流感病毒感染的任何其他药剂或任何其他疗法一起使用。

[0216] 组合疗法

[0217] 组合疗法可以包括本发明的抗甲型流感第2组HA抗体和任何可有利地与本发明的抗体或本发明抗体的生物活性片段组合的额外治疗剂。本发明的抗体可以与一种或多种用于治疗流感病毒的药物或制剂(例如抗病毒剂)协同组合。

[0218] 例如,示例性抗病毒剂包括例如疫苗、神经氨酸酶抑制剂或核苷类似物。可与本发明的抗体组合使用的其他示例性抗病毒剂可以包括例如齐多夫定(zidovudine)、更昔洛韦(gangcyclovir)、阿糖腺苷(vidarabine)、碘苷(idoxuridine)、曲氟尿苷(trifluridine)、膦甲酸(foscarnet)、阿昔洛韦(acyclovir)、利巴韦林(ribavirin)、金刚烷胺(amantadine)、雷曼替丁(remantidine)、沙奎那韦(saquinavir)、茚地那韦(indinavir)、利托那韦(ritonavir)、α-干扰素和其他干扰素、神经氨酸酶抑制剂(例如扎那米韦(RELENZA®)、奥司他韦(TAMIFLU®)、拉尼米韦(laninamivir)、帕拉米韦(peramivir))或金刚乙胺(rimantadine)。

[0219] 其他示例性抗病毒药物包括但不限于HA抑制剂、唾液酸抑制剂和M2离子通道抑制剂。在一个实施例中,M2离子通道抑制剂是金刚烷胺或金刚乙胺。

[0220] 在一些实施例中,本发明的抗体可以与第二治疗剂组合,以降低流感病毒感染患者的病毒载量,或改善感染的一种或多种症状。

[0221] 本发明的抗体可以与抗炎药(例如皮质类固醇和非类固醇抗炎药)、减充血剂、抗组胺、抗感染药物、流感病毒的不同抗体、抗病毒药物、流感病毒疫苗如FLUMIST®或FLUVIRIN®、膳食补充剂如抗氧化剂或任何其他姑息疗法组合使用以治疗流感病毒感染。

[0222] 在某些实施例中,第二治疗剂是另一种流感抗体。在某些实施例中,第二治疗剂是流感血凝素的另一种抗体。在某些实施例中,第二治疗剂是不同流感蛋白如神经氨酸酶或基质蛋白2(M2e蛋白)的四聚体胞外域的另一种抗体。在某些实施例中,第二治疗剂是不同蛋白质如宿主跨膜蛋白酶丝胺酸2(TMPRSS2)的抗体。第二抗体可以特异性针对来自不同亚型或病毒株的一种或多种不同流感病毒蛋白。本文考虑使用对流感病毒具有广泛中和或抑

制活性的抗体组合(“混合液”)。在一些实施例中,可以将非竞争性抗体组合并施用于有需要的受试者,以降低流感病毒由于选择压力而快速变异逃避的能力。在一些实施例中,包含所述组合的抗体与HA蛋白上不同的非重叠表位结合。包含所述组合的抗体可以阻止病毒附着宿主细胞和/或进入宿主细胞和/或与宿主细胞融合。抗体可与选自包括H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型在内的任何一种或多种第2组甲型流感亚型的血凝素相互作用,并且当单独使用或与上述任何一种或多种药剂组合使用时,可以中和包括但不限于以下的任何一种或多种第2组流感亚型:H3N2、H7N9。

[0223] 本文还设想使用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体的组合,其中所述组合包含一种或多种不交叉竞争的抗体;在一些实施例中,所述组合包括具有广泛中和活性的第一抗体与具有针对窄谱分离株的活性且与第一抗体不交叉竞争的第二抗体。

[0224] 如本文所用,术语“与……组合”是指可在施用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体之前、同时或之后施用额外的治疗活性组分。术语“与……组合”还包括连续或同时施用抗流感HA抗体和第二治疗剂。

[0225] 在施用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体之前,可以向受试者施用额外的治疗活性组分。例如,如果第一组分是在施用第二组分之前1周、之前72小时、之前60小时、之前48小时、之前36小时、之前24小时、之前12小时、之前6小时、之前5小时、之前4小时、之前3小时、之前2小时、之前1小时、之前30分钟、之前15分钟、之前10分钟、之前5分钟或之前不到1分钟施用,则可以认为第一组分是在第二组分“之前”施用。在其他实施例中,在施用本发明的抗甲型流感第2组HA抗体之后,可以向受试者施用额外的治疗活性组分。例如,如果第一组分是在施用第二组分之后1分钟、之后5分钟、之后10分钟、之后15分钟、之后30分钟、之后1小时、之后2小时、之后3小时、之后4小时、之后5小时、之后6小时、之后12小时、之后24小时、之后36小时、之后48小时、之后60小时、之后72小时施用,则可以认为第一组分是在第二组分“之后”施用。在其他实施例中,额外的治疗活性组分可以与本发明的抗甲型流感第2组HA抗体的施用同时施用于受试者。出于本发明的目的,“同时”施用包括例如以单一剂型向受试者施用或以单独的剂型在彼此约30分钟或更短时间内向受试者施用抗甲型流感第2组HA抗体和额外的治疗活性组分。如果以单独的剂型施用,则每个剂型可以通过相同的途径施用(例如,抗甲型流感第2组HA抗体和额外的治疗活性组分都可以静脉内施用等);或者,每个剂型可以通过不同的途径施用(例如,抗甲型流感第2组HA抗体可以静脉内施用,而额外的治疗活性组分可以口服施用)。在任何情况下,出于本公开的目的,以单一剂型、以相同途径的单独剂型或以不同途径的单独剂型施用所述组分都被认为是“同时施用”。出于本公开的目的,在施用额外的治疗活性组分“之前”、“同时”或“之后”(这些术语如上文所定义)施用抗甲型流感第2组HA抗体被视为施用抗甲型流感第2组HA抗体与额外的治疗活性组分的“组合”。

[0226] 本发明包括药物组合物,其中本发明的抗甲型流感第2组HA抗体与如本文别处所述的一种或多种额外的治疗活性组分共配制。

[0227] 施用方案

[0228] 根据某些实施例,可以向有需要的受试者施用单剂量的本发明的抗甲型流感第2组HA抗体(或包含抗甲型流感第2组HA抗体和本文提及的任何额外治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据本发明的某些实施例,可以在限定的时程中向受试者施用多个剂量的抗甲

型流感第2组HA抗体(或包含抗甲型流感第2组HA抗体和本文提及的任何额外治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据本发明这一方面的方法包含向受试者依次施用多个剂量的本发明的抗甲型流感第2组HA抗体。如本文所用,“依次施用”是指在不同的时间点,例如在由预定时间间隔(例如,小时、天、周或月)分隔的不同日子,向受试者施用每一剂量的抗甲型流感第2组HA抗体。本发明包括方法,其包含依次向患者施用单次初始剂量的抗甲型流感第2组HA抗体,随后施用一次或多次二级剂量的抗甲型流感第2组HA抗体,以及任选地随后施用一次或多次三级剂量的抗甲型流感第2组HA抗体。

[0229] 术语“初始剂量”、“二级剂量”和“三级剂量”是指本发明的抗甲型流感第2组HA抗体的施用时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“二级剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;“三级剂量”是在二级剂量之后施用的剂量。初始剂量、二级剂量和三级剂量都可以含有相同量的抗流感HA抗体,但一般在施用频率方面可以彼此不同。然而,在某些实施例中,在治疗过程中,初始、二级和/或三级剂量中所含的抗甲型流感第2组HA抗体的量彼此不同(例如,酌情向上或向下调整)。在某些实施例中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量作为“负荷剂量”,随后以较低频率施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0230] 在本发明的某些示例性实施例中,每个二级和/或三级剂量在紧接前一剂量之后1至48小时(例如,1、1 1/2、2、2 1/2、3、3 1/2、4、4 1/2、5、5 1/2、6、6 1/2、7、7 1/2、8、8 1/2、9、9 1/2、10、10 1/2、11、11 1/2、12、12 1/2、13、13 1/2、14、14 1/2、15、15 1/2、16、16 1/2、17、17 1/2、18、18 1/2、19、19 1/2、20、20 1/2、21、21 1/2、22、22 1/2、23、23 1/2、24、24 1/2、25、25 1/2、26、26 1/2或更多)施用。如本文所用,短语“紧接前一剂量”是指在多次施用的顺序中,抗甲型流感第2组HA抗体的剂量在顺序中紧接着的下一剂量施用之前施用于患者,没有中间剂量。

[0231] 根据本发明这一方面的方法可包含向患者施用任意数量的二级和/或三级剂量的抗甲型流感第2组HA抗体。例如,在某些实施例中,仅向患者施用单次二级剂量。在其他实施例中,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)二级剂量。同样,在某些实施例中,仅向患者施用单次三级剂量。在其他实施例中,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)三级剂量。

[0232] 在本发明的某些实施例中,在治疗方案的过程中,向患者施用二级和/或三级剂量的频率可以变化。在治疗过程中,医生也可以根据临床检查后个别患者的需要来调整施用频率。

[0233] 抗体的诊断用途

[0234] 本发明的抗甲型流感第2组HA抗体可用于检测和/或测量样品中的甲型流感第2组HA,例如用于诊断目的。一些实施例考虑将本发明的一种或多种抗体用于检测疾病或病症如病毒感染的分析中。甲型流感第2组HA的示例性诊断分析可包含例如,使从患者获得的样品与本发明的抗甲型流感第2组HA抗体接触,其中所述抗甲型流感第2组HA抗体用可检测标记或报告分子标记或用作捕获配体,以从患者样品中选择性地分离甲型流感第2组HA。或者,未标记的抗甲型流感第2组HA抗体可以与本身被可检测标记的二级抗体组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明(rhodamine);或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣

根过氧化物酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的甲型流感第2组HA的具体示例性分析包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。

[0235] 根据本发明,可用于甲型流感第2组HA诊断分析的样品包括可从患者获得的任何组织或液体样品,其在正常或病理条件下含有可检测数量的甲型流感第2组HA或其片段。一般来说,从健康患者(例如,未患与流感相关的疾病的患者)获得的特定样品中的甲型流感第2组HA的水平将被测量,以初步建立甲型流感第2组HA的基线或标准水平。然后,可将该甲型流感第2组HA基线水平与从疑似患有甲型流感第2组HA相关病况或与该病况相关的症状的个体所获得的样本中测得的甲型流感第2组HA水平进行比较。

[0236] 特异性针对甲型流感第2组HA的抗体可以不含额外的标记或部分,或者它们可以含有N端或C端标记或部分。在一个实施例中,所述标记或部分是生物素。在结合分析中,标记(如果有的话)的位置可以确定肽相对于肽所结合的表面的取向。例如,如果表面涂覆有抗生物素蛋白,则含有N端生物素的肽将被定向,使得肽的C端部分将在表面远侧。

[0237] 实例

[0238] 提供以下实例是为了向本领域的普通技术人员提供完整公开内容和描述如何制备和使用本发明的方法和组合物,而非旨在限制发明人所认为的其发明的范围。已努力确保有关所用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑某些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是按摄氏度计,室温为约25℃并且压力是大气压或接近大气压。

[0239] 实例1:针对甲型流感第2组血凝素(HA)的人抗体的生成

[0240] 在包含编码人类免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的VELOCIMMUNE®小鼠体内产生针对甲型流感第2组HA的人抗体。小鼠用A/香港/08/1968(H3N2)免疫,随后用A/香港/05/1972-PR8-X36(H3N2)免疫,接着再次用A/香港/08/1968(H3N2)免疫。所有小鼠均用编码来自A/威斯康星/67/X-161/2005(H3N2)和A/鸡/荷兰/01/2003(H7N7)的HA的DNA的1:1混合物加强免疫。通过甲型流感第2组HA特异性免疫分析监测抗体免疫应答。当达成所需免疫应答时,收获脾细胞并且与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并且形成杂交瘤细胞系。筛选和选择杂交瘤细胞系以鉴定产生甲型流感第2组HA特异性抗体的细胞系。使用这种技术以及上述各种免疫原,获得了数种嵌合抗体(即,具有人可变域和小鼠恒定域的抗体)。

[0241] 抗甲型流感第2组HA抗体也直接从抗原阳性的小鼠B细胞中分离出来,而没有与骨髓瘤细胞融合,如美国专利7582298中所述,所述专利特别以全文引用的方式并入本文中。使用这种方法,获得了数种完全人类抗流感HA抗体(即,具有人可变域和人恒定域的抗体)。

[0242] 本文所述的两种示例性抗体被命名为H1H14611N2和H1H14612N2。

[0243] 根据本实例的方法产生的示例性抗体的生物特性详细地描述于以下阐述的实例中。

[0244] 实例2:重链和轻链可变区胺基酸和核苷酸序列

[0245] 表1示出了本发明所选的抗甲型流感第2组HA抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。表2示出了相应的核酸序列标识符。

[0246] 表1:氨基酸序列标识符

[0247]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14611N2	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H14612N2	18	20	22	24	26	28	30	32

[0248] 表2:核酸序列标识符

[0249]

	SEQ ID NO:							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14611N2	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H14612N2	17	19	21	23	25	27	29	31

[0250] 抗体在本文中通常根据以下命名法提及:Fc前缀(例如“H1H”、“H2M”等),后面是数字标识符(例如“14611”、“14612”等,如表1或2中所示),后面是“P”、“P2”、“N”、N2或“B”后缀。因此,根据此命名法,抗体在本文中可以被称为例如“H1H14611N2”、“H1H14612N2”等。本文使用的抗体名称上的H1H或H2M前缀表示抗体的特定Fc区同种型。例如,“H1M”抗体具有小鼠IgG1 Fc,而“H2M”抗体具有小鼠IgG2 Fc(a或b同种型)(所有可变区都是完全人类的,如抗体名称中的第一个“H”所表示)。如本领域的普通技术人员所理解,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG1 Fc的抗体可以转化为具有人IgG4的抗体,等等),但在任何情况下,可变域(包括CDR)——由表1和表2中所示的数字标识符表示的可变域将保持不变,并且无论Fc域的性质如何,预计与抗原的结合特性是相同或基本上相似的。

[0251] 实例3:单克隆抗甲型流感第2组HA抗体的结合亲和力和动力学常数

[0252] 使用抗原捕获格式,通过表面等离子体共振测定人单克隆抗甲型流感第2组HA抗体的结合亲和力和动力学常数。在Biacore仪器上进行测量。在这种格式中,Biacore高密度传感器表面通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体的胺偶合而衍生化,以捕获表达有人Fc恒定区的抗甲型流感第2组HA抗体。使用标准方法监测所有HA蛋白与每个捕获的mAb的缔合。本实验中利用的折叠蛋白是从BEI Resources或Influenza Reagent Resource(IRR)获得的,如下表3所示。结合解离、平衡常数(K_D)和解离半衰期(t1/2)由动力学速率常数计算为:

[0253] $$K_D\ (M) = \frac{ka}{kd}, \text{和} t½\ (min) = \frac{\ln(2)}{60 \times kd}$$

[0254] 表3中汇总了37℃下HA蛋白与表面结合的抗HA抗体的结合动力学参数。

[0255] 表3:H1H14611N2与HA Folan蛋白质在37℃下结合的结合亲和力和动力学参数。

[0256]

	第1组												第2组			
	A/布里斯班/59/2007(H1) BEI Resources(NR-28607)		A/加利福尼亚/04/2009(H1) BEI Resources(NR-15749)		A/波多黎各/08/1934(H1) BEI Resources(NR-19240)		A/越南/1203/2004(H5) IRR(FR-39)		A/印度尼西亚/05/2005(H5) IRR(FR-59)		A/土耳其/威斯康星/01/1966(H9) BEI Resources(NR-43782)		A/广岛/52/2005(H3) IRR(FR-63)		A/上海/01/2013(H7) BEI Resources(NR-44365)	
	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$	K_D	$t_{1/2}$
mAb	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min	mol/l	min
H1H14611N2(第2组特异性)	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	8.22E-09	86	IC§	IC
缓冲液	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0257] IC§:不确定的 NB:非结合

[0258] 结果

[0259] H1H14611N2以高亲和力结合第2组H3 HA(表3)。A/广岛/52/2005的平衡解离常数(K_D值)在低nM范围内(H3N2;K_D=8.22E^{-09})。H1H14611N2不与第1组病毒株结合。

[0260] 实例4:H1H14611N2和H1H14612N2有效中和广泛范围的第2组甲型流感病毒

[0261] 选择示例性单克隆抗体(mAb)H1H14611N2和H1H14612N2进行体外微量中和分析,使用两种不同的形式来评价抗体的广度和效力。

[0262] 细胞活力微量中和分析

[0263] 在微量中和分析中测试单克隆抗体以评估广度和效力。简而言之,将马丁达比犬肾(Madin-Darby canine kidney,MDCK)细胞以6.0×10^{3}个细胞/孔铺板于96孔板中。仅将病毒稀释剂添加到背景对照孔。将细胞在37℃、5%CO_2下培育4至5小时。单克隆抗体在病毒稀释液中以4倍终浓度稀释。抗体以1:3稀释,一式两份。将病毒在冰上解冻,并稀释到适当的预定浓度。将稀释后的病毒加入到稀释后的mAb中。将mAb-病毒混合物立即转移到MDCK细胞,并在37℃和5%CO_2下培育72小时。还包括病毒对照和未感染的细胞对照孔。在第4天,将板以1200RPM离心3分钟。使用100μL CelTiter-Glo底物裂解细胞,并使用发光(Victor X3,珀金埃尔默(PerkinElmer))测量ATP释放。相对于未感染的对照确定活力百分比。使用非线性4PL回归分析活力值以确定IC_{50}值(GraphPad Prism)。

[0264] HA微量中和分析

[0265] 简而言之,将马丁达比犬肾(MDCK)细胞铺板且培育过夜,以实现次日80-100%汇合。将单克隆抗体在病毒感染培养基(VIM)中稀释至50μg/mL,并以1:2稀释,一式三份或一式四份。将H5N1 A/越南/1203/2004或H1N1 A/加利福尼亚/07/2009在VIM中稀释,加入稀释后的抗体并培育1小时。然后将样品转移到MDCK并培育48小时。培育后,将50μL上清液转移到新的96孔板中。向上清液中添加稀释后的火鸡或马红细胞,并在室温下培育30或60分钟。血凝滴度记录为完全抑制血凝的最后稀释度的倒数。

[0266] 结果

[0267] 结果表明,在微量中和分析中,H1H14611N2和H1H14612N2中和许多不同的第2组甲型流感病毒分离株。H1H14611N2和H1H14612N2在中和三种不同的流感病毒株(A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)、A/菲律宾/01/1982(H3N2)和A/上海/01/2013-PR8(H7N9))方面的IC_{50}(nM)显示在表4中,并且包括A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)、A/菲律宾/02/1982(H3N2)和A/上海/01/2013(H7N9)的病毒株的剂量-反应曲线也分别在图1A、B和C中示出(H1H14611N2显示为三角形;H1H14612N2显示为倒三角形;不相关的hIgG1显示为菱形)。使用血凝读数对流感病毒株A/维多利亚/316/2011(H3N2)进行额外的中和研究的结果显示在表5中。表5中显示的是没有检测到RBC血凝的mAb的最低浓度(nM)。这些研究中还包括阴性hIgG1对照。

[0268] 表4:抗第2组HA mAb对数种流感病毒株的中和活性的汇总(IC_{50}nM)

[0269]

mAb	A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)	A/菲律宾/01/1982(H3N2)	A/上海/01/2013-PR8(H7N9)
H1H14611N2	7.830	68.37	404.7
H1H14612N2	5.700	37.60	>6666
不相关/阴性 hIgG1 对照	>833	>3333	>6666

[0270] 数据来自至少三个显示类似结果的研究之一。

[0271] 表5:抗第2组HA mAb对流感病毒株A/维多利亚/316/2011(H3N2)的中和活性的汇总

[0272]

mAb	浓度(nM)
H1H14611N2	41.7
H1H14612N2	166.7

[0273] 实例5.H1H14611N2和H1H14612N2通过补体依赖性细胞毒性(CDC)介导对感染第2组HA病毒的细胞的杀伤

[0274] 选择示例性单克隆抗体(mAb)H1H14611N2和H1H14612N2进行体外补体依赖性细胞毒性(CDC)分析。简而言之,在分析前30小时,用A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)感染马丁达比犬肾(MDCK)细胞,感染复数(MOI)为3。将靶细胞与指定浓度的指定mAb组合。正常人血清补体(NHSC)以最终浓度(15%)的三倍在CDC分析培养基中制备。使用CytoTox-Glo(普洛麦格(Promega))测量细胞毒性百分比。洗涤剂裂解和血清背景对照用于确定最大和背景裂解值。图2中显示的是H1H14611N2(三角形)、H1H14612N2(倒三角形)以及不相关的hIgG1(菱形)作为对照。特异性裂解百分比计算为((通过mAb+NHSC的裂解)-(仅通过NHSC的裂解))/((洗涤剂最大裂解)-(仅通过NHSC的裂解))×100。

[0275] 结果

[0276] 当用A/爱知/02/1968-PR8-X31(H3N2)感染的MDCK在补体保留的人血清存在下在CDC分析中测试时,H1H14611N2和H1H14612N2显示出特异性裂解病毒感染细胞的能力的剂量依赖性增加。图2中示出了三个中的一个代表性CDC分析的结果。在本实验中还使用了不相关/阴性hIgG1对照。H1H14611N2和H1H14612N2有效地介导细胞溶解,最大溶解率分别为78.3%和86.3%,EC_{50}分别为140nM和126nM。

[0277] 实例6:H1H14611N2和H1H14612N2通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)有效杀灭第2组表达HA的细胞

[0278] 选择示例性单克隆抗体H1H14611N2和H1H14612N2用于测试其在两个抗体依赖性细胞介导的细胞毒性分析中特异性裂解HA装饰的细胞的能力。

[0279] A.Fcγ RIIIA活化分析

[0280] 最初使用ADCC-Glo报告生物分析(普洛麦格)与A/威斯康星/67/200(H3N2)过表达的3T3细胞进行Fcγ RIIIA活化分析,以测试H1H14611N2和H1H14612N2抗体特异性裂解HA装饰的细胞的能力。将靶细胞与指定浓度的指定mAb组合。然后将靶细胞和效应细胞以5:1的E:T比组合。图3中显示的是使用H1H14611N2(三角形)、H1H14612N2(倒三角形)以及不相关的hIgG1(菱形)作为对照的这一分析的结果。

[0281] B.使用人类供体外周血单核细胞(PBMC)的ADCC分析

[0282] 然后,使用人类供体PBMC在ADCC分析中测试两种示例性抗第2组HA抗体H1H14611N2和H1H14612N2。从人类供体血沉棕黄层中分离出PBMC,并在使用前用IL-2(5ng/mL)刺激10至12小时。将A/威斯康星/67/2005(H3N2)过表达的3T3靶细胞与指定浓度的指定mAb组合。然后将靶细胞和效应细胞以30:1的E:T比组合。使用CytoTox-Glo(普洛麦格)测量细胞毒性百分比。图4中显示的是使用H1H14611N2(圆形)、H1H14612N2(倒三角形)以及不相关的hIgG1(菱形)作为对照的这一分析的结果。

[0283] 结果

[0284] H1H14611N2和H1H14612N2在两种ADCC分析中显示出特异性裂解HA装饰的细胞的能力的剂量依赖性增加。

[0285] H1H14611N2和H1H14612N2在A/威斯康星/67/2005(H3N2)过表达的3T3细胞的ADCC-Glo报告生物分析(普洛麦格)中,显示出Fcγ RIIIA活化的剂量依赖性增加(图3)。EC_{50}对于H1H14611N2为0.8714nM,并且对于H1H14612N2为0.6882nM。

[0286] 使用直接PBMC介导的感染细胞和过表达细胞的细胞毒性来证实ADCC活性。使用人类供体PBMC、H1H14611N2和H1H14612N2介导的对A/威斯康星/67/2005(H3N2)过表达的3T3细胞的ADCC(图4)。EC_{50}对于H1H14611N2为0.1463nM,并且对于H1H14612N2为0.1762nM。

[0287] 所有使用供体PBMC的实验都使用30:1的效应物与靶标(E:T)比,而报告生物分析使用5:1的E:T。

[0288] 实例7:所选第2组特异性甲型流感血凝素单克隆抗体有效治疗致死性流感病毒体内感染

[0289] 对于治疗或预防人类流感病毒感染的改进的标准护理疗法有大量的需求没有得到满足。目前,只有两类药物可用:金刚烷胺类和神经氨酸酶抑制剂(NAI)。金刚烷胺类(金刚烷胺和金刚乙胺)与抗药性病毒株的迅速出现有关,不再推荐用于治疗流感。奥司他韦(Tamiflu®)等NAI是治疗和预防流感的前线药物,但其功效窗口受到限制:在治疗环境中,如果在症状出现的48小时内施用抗病毒药物,已显示NAI将发热和疾病症状的持续时间缩短约一天,但如果在48小时后施用,则几乎没有临床证据表明其疗效。

[0290] 为了评估H1H14611N2和H1H14612N2治疗重症流感的体内疗效,进行了如下目标的实验:

[0291] 研究1:评估单剂量H1H14611N2和H1H14612N2的疗效。

[0292] 研究2:确定H1H14611N2与奥司他韦组合施用的疗效。

[0293] 这些研究中使用的病毒株是小鼠适应性A/爱知/02/1968-X31(H3N2)甲型流感病毒第2组分离株。所有实验均在6周龄野生型(BALB/c)雌性小鼠中进行。用5×MLD_{50}(10,000PFU)的A/爱知/02/1968-X31(H3N2)攻击小鼠。在治疗模型中,在第0天对小鼠进行鼻内攻击(IN),并在感染后(p.i.)的某一天给予固定IV剂量的mAb。根据制造商的说明书重新悬浮奥司他韦,小鼠每12小时(即每天两次,BID)通过经口管饲给药,持续5天,在第4天施用第一剂量。将小鼠称重并且每天观察直至p.i.第14天,并且当它们丧失其起始重量的20%时处死。结果以存活百分比报告。

[0294] 在第一个实验中,我们比较了单剂量H1H14611N2(15mg/kg;三角形)或H1H14612N2(15mg/kg;倒三角形)在感染5×MLD_{50}的A/爱知/02/1968-X31(H3N2)后24、48或72小时启动的疗效,以在这些时间点评估鼠模型中的效果。所有在感染后24小时接受15mg/kg同种型对照的小鼠在第7天死亡(在图5A中仅以灰色实线显示);相反,在感染后24(图5A)、48(图5B)或甚至72(图5C)小时给药时,所有接受单剂量(15mg/kg)的H1H14611N2或H1H14612N2的小鼠均存活。

[0295] 在第二个实验中,小鼠在感染5×MLD_{50}的A/爱知/02/1968-X31(H3N2)后的96小时接受单次亚有效剂量7mg/kg(正方形,虚线)或15mg/kg的H1H14611N2(圆形,虚线)、对照IgG(三角形)、2mg/kg BID奥司他韦5天(菱形,实线)或单剂量7(正方形,实线)或15mg/kg H1H14611N2(圆形,实线)和奥司他韦的组合5天(参见图6)。单剂量15mg/kg和7mg/kg的

H1H14611N2分别可使100％和80％的小鼠存活,仅用2mg/kg奥司他韦治疗的小鼠80％存活。将H1H14611N2与奥司他韦组合,在两个H1H14611N2剂量组(15mg/kg或7mg/kg)中,存活率均提高到100％,表明组合可使较低剂量的H1H14611N2达到强大的治疗效果(图6)。

[0296] 综上所述,H1H14611N2和H1H14612N2在治疗感染历史性流感病毒株的小鼠时表现出强大的疗效,此外,H1H14611N2与奥司他韦组合施用时表现出累加疗效。

[0001] 序列表

[0002] <110> 瑞泽恩制药公司

[0003] L·A·普赛尔

[0004] J·维奥

[0005] W·奥尔森

[0006] <120> 针对流感血凝素的人抗体

[0007] <130> 10201WO01

[0008] <140> TBD

[0009] <141> 2019-01-24

[0010] <150> 62/622,480

[0011] <151> 2018-01-26

[0012] <160> 34

[0013] <170> PatentIn version 3.5

[0014] <210> 1

[0015] <211> 360

[0016] <212> DNA

[0017] <213> 人工序列

[0018] <220>

[0019] <223> 合成

[0020] <400> 1

[0021] gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cgggggggtc cctgagactc 60

[0022] tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt ggttttagca tgaactgggt ccgccaggtt 120

[0023] ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtacta gtggtaatta catgtactac 180

[0024] gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcattctct 240

[0025] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac tcggctatat attactgtgc gagagggggg 300

[0026] gggtataact ggaacctctt tgactactgg ggccagggtt ccctggtcac cgtctcctca 360

[0027] <210> 2

[0028] <211> 120

[0029] <212> PRT

[0030] <213> 人工序列

[0031] <220>

[0032] <223> 合成

[0033] <400> 2

[0034] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

[0035] 1 5 10 15

[0036] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe

[0037] 20 25 30

[0038] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0039] 35 40 45

[0040] Ser Ser Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0041] 50 55 60

[0042] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Phe Ser

[0043] 65 70 75 80

[0044] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

[0045] 85 90 95

[0046] Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[0047] 100 105 110

[0048] Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

[0049] 115 120

[0050] <210> 3

[0051] <211> 24

[0052] <212> DNA

[0053] <213> 人工序列

[0054] <220>

[0055] <223> 合成

[0056] <400> 3

[0057] ggattcacct tcagtggttt tagc 24

[0058] <210> 4

[0059] <211> 8

[0060] <212> PRT

[0061] <213> 人工序列

[0062] <220>

[0063] <223> 合成

[0064] <400> 4

[0065] Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe Ser

[0066] 1 5

[0067] <210> 5

[0068] <211> 24

[0069] <212> DNA

[0070] <213> 人工序列

[0071] <220>

[0072] <223> 合成

[0073] <400> 5

[0074] attagtacta gtggtaatta catg 24

[0075] <210> 6

[0076] <211> 8

[0077] <212> PRT

[0078] <213> 人工序列

[0079] <220>

[0080] <223> 合成

[0081] <400> 6

[0082] Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met

[0083] 1 5

[0084] <210> 7

[0085] <211> 39

[0086] <212> DNA

[0087] <213> 人工序列

[0088] <220>

[0089] <223> 合成

[0090] <400> 7

[0091] gcgagagggg gggggtataa ctggaacctc tttgactac 39

[0092] <210> 8

[0093] <211> 13

[0094] <212> PRT

[0095] <213> 人工序列

[0096] <220>

[0097] <223> 合成

[0098] <400> 8

[0099] Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr

[0100] 1 5 10

[0101] <210> 9

[0102] <211> 324

[0103] <212> DNA

[0104] <213> 人工序列

[0105] <220>

[0106] <223> 合成

[0107] <400> 9

[0108] gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

[0109] ctctcctgca gggccagtca gagtcttaac agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

[0110] cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

[0111] gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240

[0112] tctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag caatatggta actccccgct cactttcggc 300

[0113] ggagggacca aggtggagat caaa 324

[0114] <210> 10

[0115] <211> 108

[0116] <212> PRT

[0117] <213> 人工序列

[0118] <220>

[0119] <223> 合成

[0120] <400> 10

[0121] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0122] 1 5 10 15

[0123] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asn Ser Asn

[0124] 20 25 30

[0125] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

[0126] 35 40 45

[0127] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0128] 50 55 60

[0129] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu

[0130] 65 70 75 80

[0131] Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro

[0132] 85 90 95

[0133] Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0134] 100 105

[0135] <210> 11

[0136] <211> 21

[0137] <212> DNA

[0138] <213> 人工序列

[0139] <220>

[0140] <223> 合成

[0141] <400> 11

[0142] cagagtctta acagcaacta c 21

[0143] <210> 12

[0144] <211> 7

[0145] <212> PRT

[0146] <213> 人工序列

[0147] <220>

[0148] <223> 合成

[0149] <400> 12

[0150] Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr

[0151] 1 5

[0152] <210> 13

[0153] <211> 9

[0154] <212> DNA

[0155] <213> 人工序列

[0156] <220>

[0157] <223> 合成

[0158] <400> 13

[0159] ggtgcatcc 9

[0160] <210> 14

[0161] <211> 3

[0162] <212> PRT

[0163] <213> 人工序列

[0164] <220>

[0165] <223> 合成

[0166] <400> 14

[0167] Gly Ala Ser

[0168] 1

[0169] <210> 15

[0170] <211> 27

[0171] <212> DNA

[0172] <213> 人工序列

[0173] <220>

[0174] <223> 合成

[0175] <400> 15

[0176] cagcaatatg gtaactcccc gctcact 27

[0177] <210> 16

[0178] <211> 9

[0179] <212> PRT

[0180] <213> 人工序列

[0181] <220>

[0182] <223> 合成

[0183] <400> 16

[0184] Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr

[0185] 1 5

[0186] <210> 17

[0187] <211> 360

[0188] <212> DNA

[0189] <213> 人工序列

[0190] <220>

[0191] <223> 合成

[0192] <400> 17

[0193] gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cgggggggtc cctgagactc 60

[0194] tcctgtgcag cctctggatt cagtttcagt ggttttagca tgaactgggt ccgccaggct 120

[0195] ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtacta gtggtaatta catgtactac 180

[0196] gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcattctct 240

[0197] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac tcggctatat attactgtgc gagaggggg 300

[0198] gggtataact ggaacctctt tgactactgg ggccagggtt ccctggtcac cgtctcctca 360

[0199] <210> 18

[0200] <211> 120

[0201] <212> PRT

[0202] <213> 人工序列

[0203] <220>

[0204] <223> 合成

[0205] <400> 18

[0206] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

[0207] 1 5 10 15

[0208] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Phe

[0209] 20 25 30

[0210] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0211] 35 40 45

[0212] Ser Ser Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0213] 50 55 60

[0214] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Phe Ser

[0215] 65 70 75 80

[0216] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

[0217] 85 90 95

[0218] Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[0219] 100 105 110

[0220] Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

[0221] 115 120

[0222] <210> 19

[0223] <211> 24

[0224] <212> DNA

[0225] <213> 人工序列

[0226] <220>

[0227] <223> 合成

[0228] <400> 19

[0229] ggattcagtt tcagtggttt tagc 24

[0230] <210> 20

[0231] <211> 8

[0232] <212> PRT

[0233] <213> 人工序列

[0234] <220>

[0235] <223> 合成

[0236] <400> 20

[0237] Gly Phe Ser Phe Ser Gly Phe Ser

[0238] 1 5

[0239] <210> 21

[0240] <211> 24

[0241] <212> DNA

[0242] <213> 人工序列

[0243] <220>

[0244] <223> 合成

[0245] <400> 21

[0246] attagtacta gtggtaatta catg 24

[0247] <210> 22

[0248] <211> 8

[0249] <212> PRT

[0250] <213> 人工序列

[0251] <220>

[0252] <223> 合成

[0253] <400> 22

[0254] Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met

[0255] 1 5

[0256] <210> 23

[0257] <211> 39

[0258] <212> DNA

[0259] <213> 人工序列

[0260] <220>

[0261] <223> 合成

[0262] <400> 23

[0263] gcgagagggg gggggtataa ctggaacctc tttgactac 39

[0264] <210> 24

[0265] <211> 13

[0266] <212> PRT

[0267] <213> 人工序列

[0268] <220>

[0269] <223> 合成

[0270] <400> 24

[0271] Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr

[0272] 1 5 10

[0273] <210> 25

[0274] <211> 324

[0275] <212> DNA

[0276] <213> 人工序列

[0277] <220>

[0278] <223> 合成

[0279] <400> 25

[0280] gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

[0281] ctctcctgca gggccagtca gagtcttaac agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

[0282] cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

[0283] gacaggttca gtggcagtgg gtctggggca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

[0284] tctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caatatggta actccccgct cactttcggc 300

[0285] ggagggacca aggtggagat caaa 324

[0286] <210> 26

[0287] <211> 108

[0288] <212> PRT

[0289] <213> 人工序列

[0290] <220>

[0291] <223> 合成

[0292] <400> 26

[0293] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0294] 1 5 10 15

[0295] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asn Ser Asn

[0296] 20 25 30

[0297] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

[0298] 35 40 45

[0299] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0300] 50 55 60

[0301] Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

[0302] 65 70 75 80

[0303] Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro

[0304] 85 90 95

[0305] Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0306] 100 105

[0307] <210> 27

[0308] <211> 21

[0309] <212> DNA

[0310] <213> 人工序列

[0311] <220>

[0312] <223> 合成

[0313] <400> 27

[0314] cagagtctta acagcaacta c 21

[0315] <210> 28

[0316] <211> 7

[0317] <212> PRT

[0318] <213> 人工序列

[0319] <220>

[0320] <223> 合成

[0321] <400> 28

[0322] Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr

[0323] 1 5

[0324] <210> 29

[0325] <211> 9

[0326] <212> DNA

[0327] <213> 人工序列

[0328] <220>

[0329] <223> 合成

[0330] <400> 29

[0331] ggtgcatcc 9

[0332] <210> 30

[0333] <211> 3

[0334] <212> PRT

[0335] <213> 人工序列

[0336] <220>

[0337] <223> 合成

[0338] <400> 30

[0339] Gly Ala Ser

[0340] 1

[0341] <210> 31

[0342] <211> 27

[0343] <212> DNA

[0344] <213> 人工序列

[0345] <220>

[0346] <223> 合成

[0347] <400> 31

[0348] cagcaatatg gtaactcccc gctcact 27

[0349] <210> 32

[0350] <211> 9

[0351] <212> PRT

[0352] <213> 人工序列

[0353] <220>

[0354] <223> 合成

[0355] <400> 32

[0356] Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr

[0357] 1 5

[0358] <210> 33

[0359] <211> 566

[0360] <212> PRT

[0361] <213> 人工序列

[0362] <220>

[0363] <223> A/威斯康星/67/X-161/2005 (H3N2)登录号:ACF41911.1 aa1-16:

[0364] 信号肽 aa17-566:成熟蛋白

[0365] <400> 33

[0366] Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala

[0367] 1 5 10 15

[0368] Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly

[0369] 20 25 30

[0370] His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp

[0371] 35 40 45

[0372] Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr

[0373] 50 55 60

[0374] Gly Gly Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys

[0375] 65 70 75 80

[0376] Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln

[0377] 85 90 95

[0378] Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn

[0379] 100 105 110

[0380] Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val

[0381] 115 120 125

[0382] Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asp Glu Ser Phe Asn Trp Thr

[0383] 130 135 140

[0384] Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ser Cys Lys Arg Arg Ser Asn

[0385] 145 150 155 160

[0386] Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Gln Leu Lys Phe Lys

[0387] 165 170 175

[0388] Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys

[0389] 180 185 190

[0390] Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Asn Asp Gln Ile
[0391] 195 200 205
[0392] Phe Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg
[0393] 210 215 220
[0394] Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Ile Arg
[0395] 225 230 235 240
[0396] Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
[0397] 245 250 255
[0398] Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
[0399] 260 265 270
[0400] Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
[0401] 275 280 285
[0402] Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
[0403] 290 295 300
[0404] Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala
[0405] 305 310 315 320
[0406] Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
[0407] 325 330 335
[0408] Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
[0409] 340 345 350
[0410] Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
[0411] 355 360 365
[0412] Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
[0413] 370 375 380
[0414] Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
[0415] 385 390 395 400
[0416] Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
[0417] 405 410 415
[0418] Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
[0419] 420 425 430
[0420] Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
[0421] 435 440 445
[0422] Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
[0423] 450 455 460
[0424] Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
[0425] 465 470 475 480
[0426] Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
[0427] 485 490 495
[0428] Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu

[0429] 500 505 510

[0430] Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys

[0431] 515 520 525

[0432] Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys

[0433] 530 535 540

[0434] Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile

[0435] 545 550 555 560

[0436] Arg Cys Asn Ile Cys Ile

[0437] 565

[0438] <210> 34

[0439] <211> 549

[0440] <212> PRT

[0441] <213> 人工序列

[0442] <220>

[0443] <223> A/鸡/荷兰/01/2003 (H7N7)登录号AAR02640.1 aa1-18:信号肽

[0444] aa19-538:成熟蛋白

[0445] <400> 34

[0446] Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ser Ile Pro Thr

[0447] 1 5 10 15

[0448] Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr

[0449] 20 25 30

[0450] Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr

[0451] 35 40 45

[0452] Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys

[0453] 50 55 60

[0454] Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly

[0455] 65 70 75 80

[0456] Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile

[0457] 85 90 95

[0458] Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn

[0459] 100 105 110

[0460] Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys

[0461] 115 120 125

[0462] Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr

[0463] 130 135 140

[0464] Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp

[0465] 145 150 155 160

[0466] Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser

[0467] 165 170 175

[0468] Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His
[0469] 180 185 190
[0470] His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
[0471] 195 200 205
[0472] Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro
[0473] 210 215 220
[0474] Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
[0475] 225 230 235 240
[0476] Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe
[0477] 245 250 255
[0478] Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
[0479] 260 265 270
[0480] Ser Met Gly Ile Gln Ser Glu Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
[0481] 275 280 285
[0482] Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
[0483] 290 295 300
[0484] Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
[0485] 305 310 315 320
[0486] Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
[0487] 325 330 335
[0488] Lys Arg Arg Arg Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
[0489] 340 345 350
[0490] Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln
[0491] 355 360 365
[0492] Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser
[0493] 370 375 380
[0494] Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr
[0495] 385 390 395 400
[0496] Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Arg
[0497] 405 410 415
[0498] Gln Ile Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val
[0499] 420 425 430
[0500] Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr
[0501] 435 440 445
[0502] Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys
[0503] 450 455 460
[0504] Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu
[0505] 465 470 475 480
[0506] Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn

[0507] 485 490 495

[0508] Thr Tyr Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Gln Asn Arg Ile

[0509] 500 505 510

[0510] Gln Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu

[0511] 515 520 525

[0512] Trp Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ala His His His His His His

[0513] 530 535 540

[0514] His His His His Tyr

[0515] 545

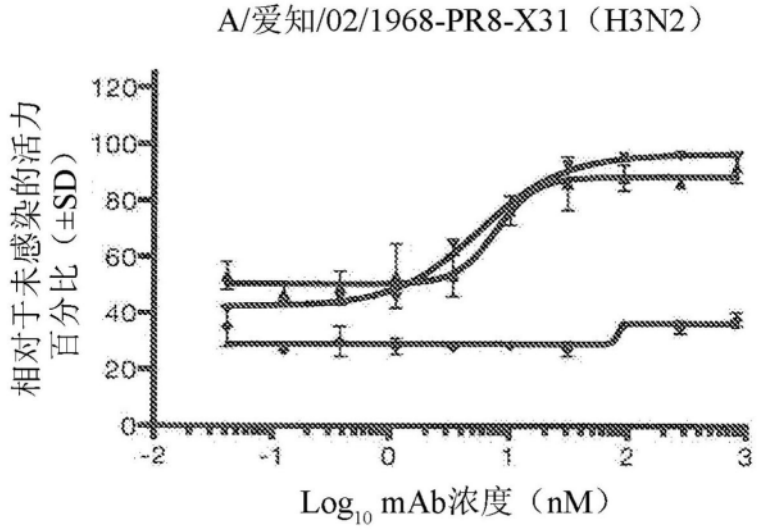

A/爱知/02/1968-PR8-X31（H3N2）
相对于未感染的活力
百分比（±SD）
120
100
80
60
40
20
0
-2
-1
0
1
2
3
Log10 mAb浓度（nM）

图1A

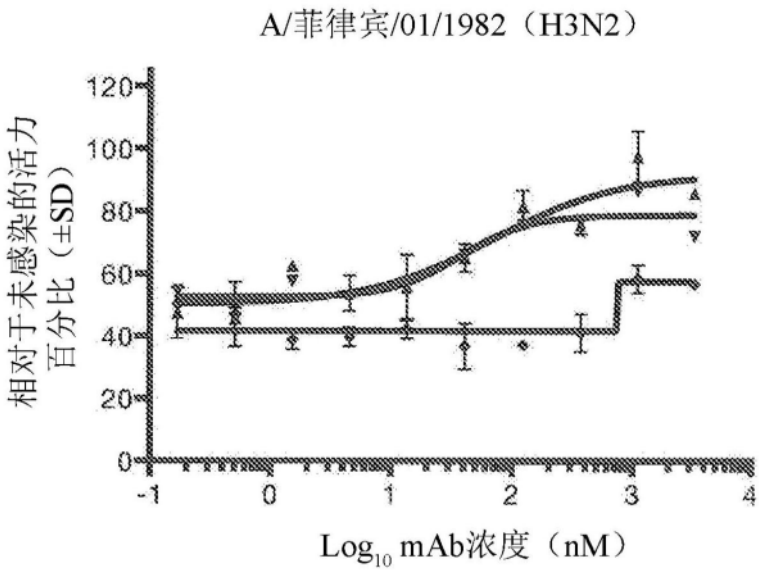

A/菲律宾/01/1982（H3N2）
相对于未感染的活力
百分比（±SD）
120
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4
Log10 mAb浓度（nM）

图1B

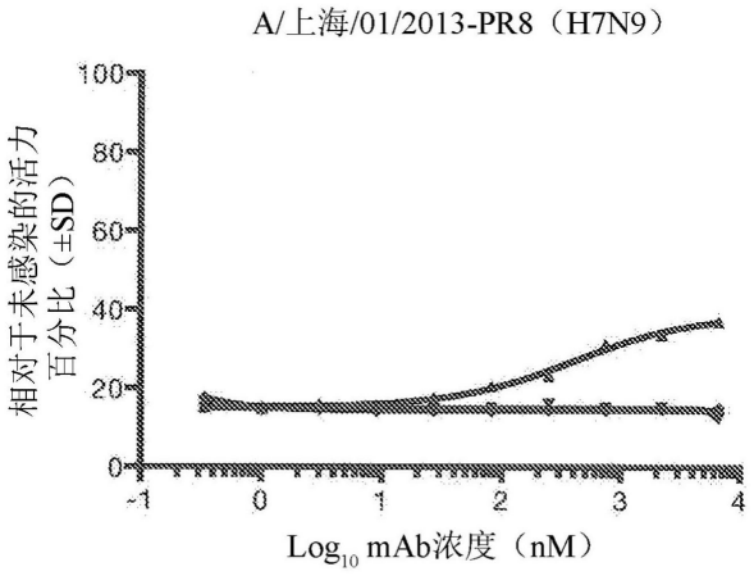

A/上海/01/2013-PR8（H7N9）
相对于未感染的活力
百分比（±SD）
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4
Log10 mAb浓度（nM）

图1C

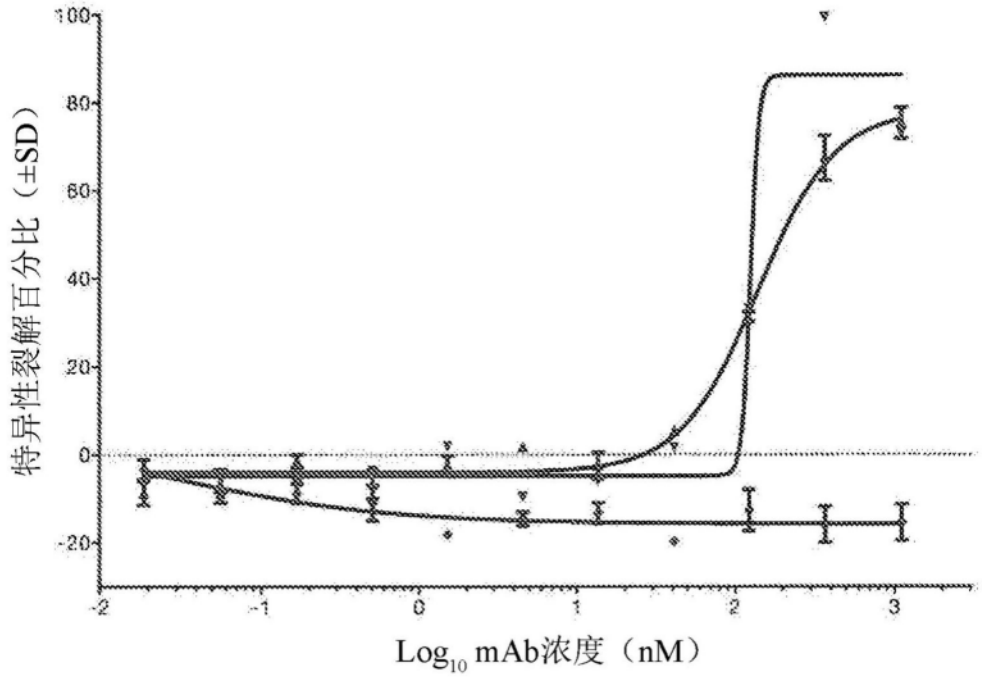

特异性裂解百分比（±SD）
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
Log10 mAb浓度（nM）

图2

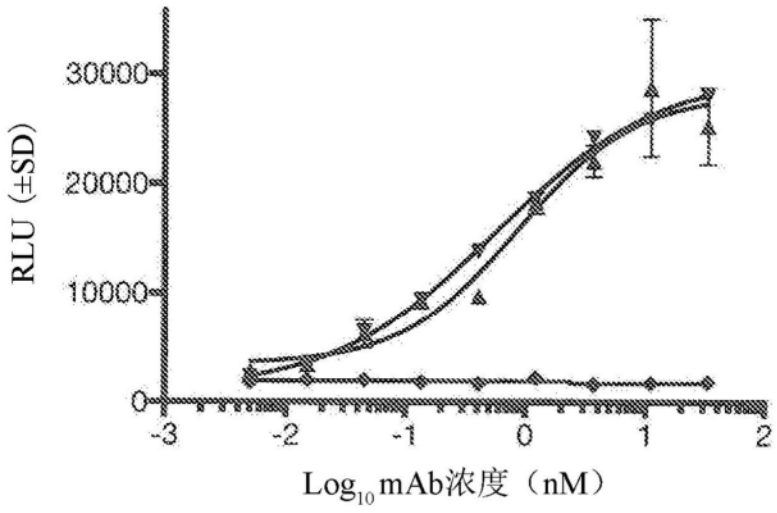

RLU (±SD)
30000
20000
10000
0
-3
-2
-1
0
1
2
Log10 mAb浓度（nM）

图3

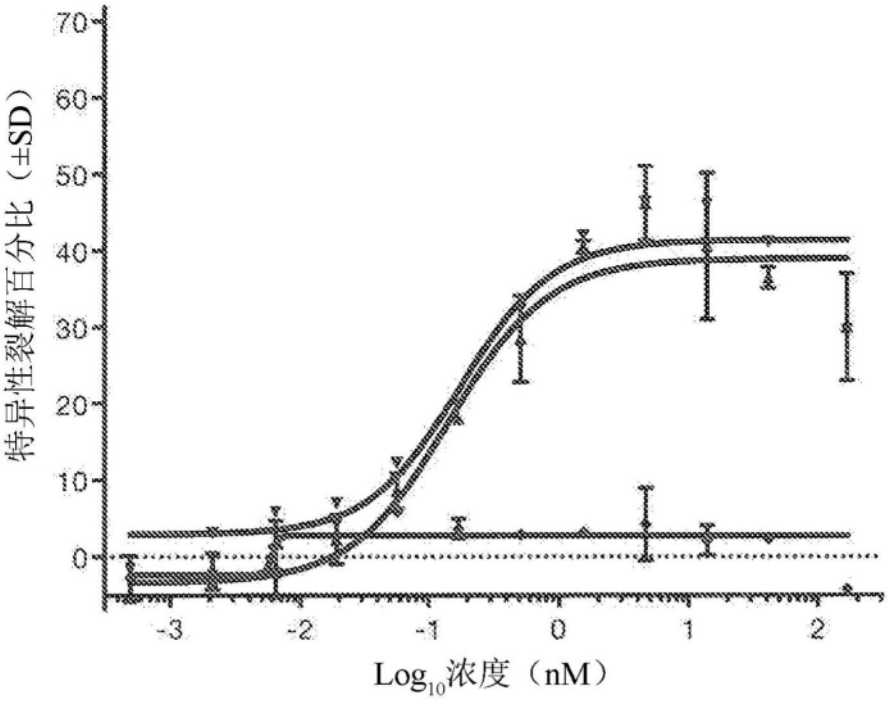

特异性裂解百分比（±SD）
70
60
50
40
30
20
10
0
-3
-2
-1
0
1
2
Log10浓度（nM）

图4

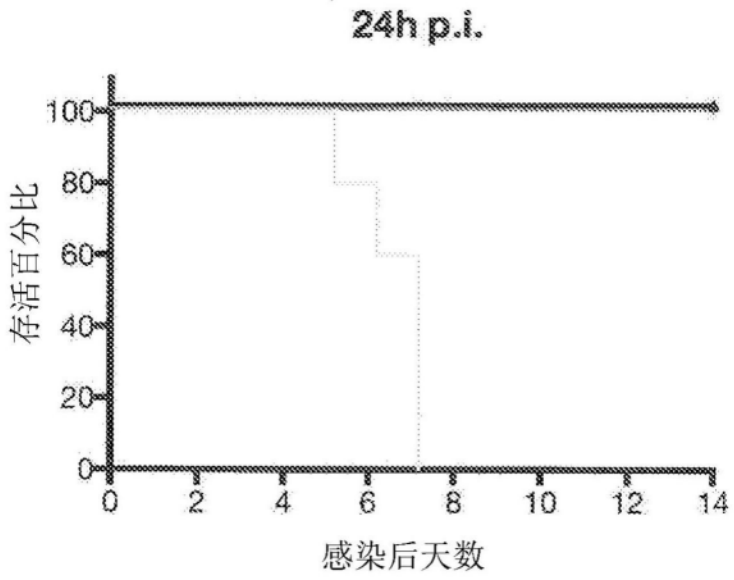

24h p.i.
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后天数

图5A

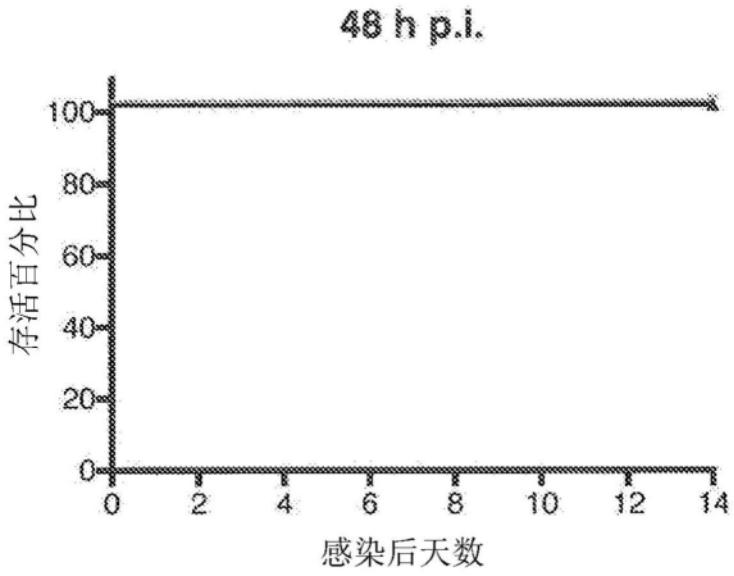

48 h p.i.
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后天数

图5B

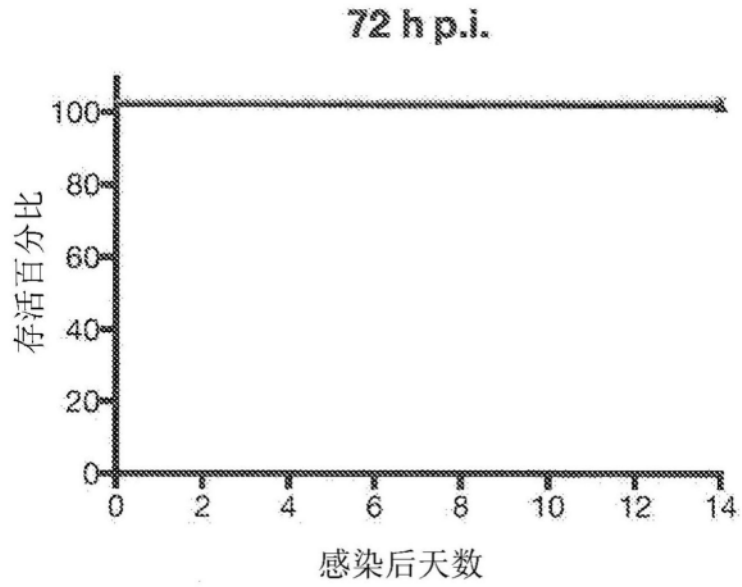

72 h p.i.
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后天数

图5C

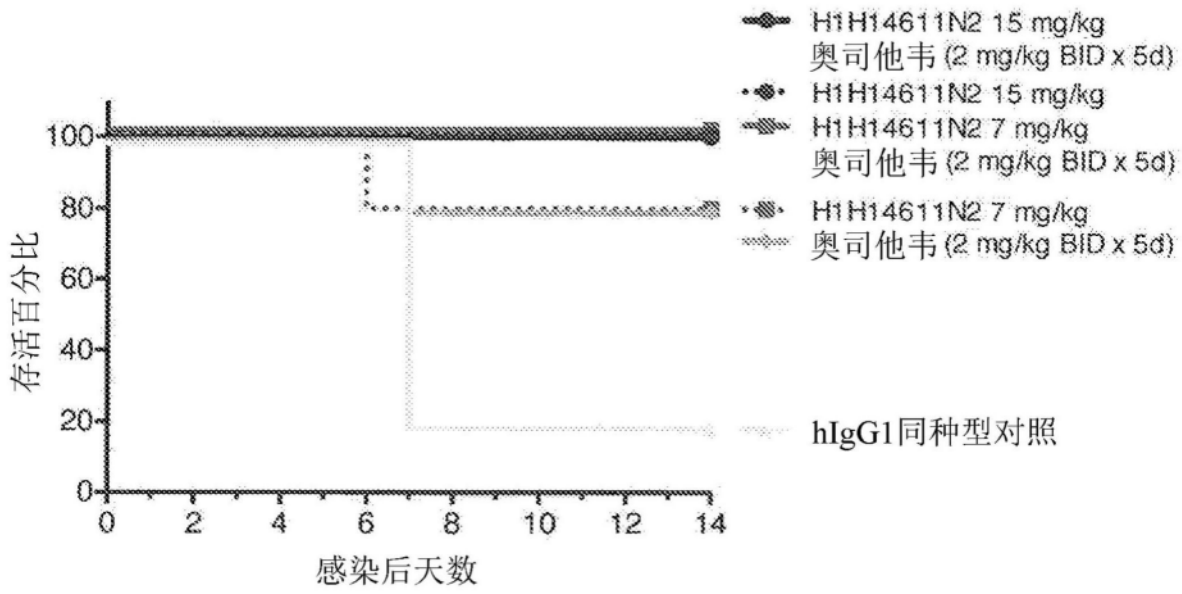

H1H14611N2 15 mg/kg
奥司他韦 (2 mg/kg BID x 5d)
H1H14611N2 15 mg/kg
H1H14611N2 7 mg/kg
奥司他韦 (2 mg/kg BID x 5d)
H1H14611N2 7 mg/kg
奥司他韦 (2 mg/kg BID x 5d)
hIgG1同种型对照
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后天数

图6