



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107750253 B

(45) 授权公告日 2022.10.04

(21) 申请号 201680033270.X

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2016.04.08

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 梁谋 罗文锋

申请公布号 CN 107750253 A

(51) Int.CI.

C07K 16/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.03.02

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006.01)

62/144729 2015.04.08 US

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 31/16 (2006.01)

2017.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2016/026800 2016.04.08

WO 2014/078268 A2, 2014.05.22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2013/007770 A1, 2013.01.17

W02016/164835 EN 2016.10.13

CN 104011077 A, 2014.08.27

(73) 专利权人 达纳-法伯癌症研究所公司

WO 2013/011347 A1, 2013.01.24

地址 美国马萨诸塞州

蒋露芳等. 甲型流感病毒分类与通用流感疫

(72) 发明人 W.A. 马拉斯科

苗及广谱中和活性抗体的研究.《复旦学报(医学版)》.2011,第38卷(第06期),

审查员 刘珊

权利要求书1页 说明书42页

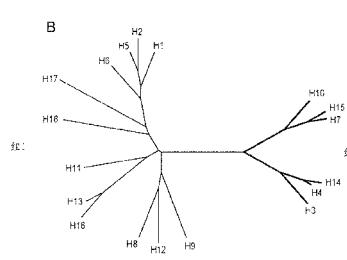
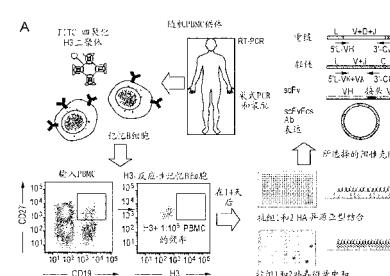
序列表12页 附图47页

(54) 发明名称

人源化流感单克隆抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了对于结合流感病毒的HA蛋白的茎结构域的重要的结构决定簇,及其用于基于这些决定簇生产高亲和力中和性流感病毒抗体的使用方法。本发明进一步提供了用于测定流感病毒疫苗的功效的工具。本发明进一步提供了可用于测定主体中流感病毒疫苗的功效或用于预测先前的免疫暴露或对疫苗或流感病毒感染的抗原应答性的分子标记。



1. 一种中和流感病毒的经分离的单克隆抗体,其包含:
 - a. 包含下述的重链:氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的CDR1;氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示的CDR3;和
 - b. 包含下述的轻链:氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的CDR1;氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的CDR2;和氨基酸序列如SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO:13所示的CDR3,
其中所述抗体结合流感病毒的HA的茎区,并且其中所述流感病毒是甲型流感病毒。
2. 一种经分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示的V_H和氨基酸序列如SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 6所示的V_L。
3. 根据权利要求1-2中任一项的抗体,其中所述抗体中和甲型流感病毒组I和组II。
4. 根据权利要求1-2中任一项的抗体,其中所述抗体结合当根据SEQ ID NO: 18编号时由HA2多肽的氨基酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、45、49和53限定的构象表位。
5. 根据权利要求1-2中任一项的抗体,其中所述抗体是单链Fv抗体、F_{ab}片段、F_{ab'}片段或F_(ab')₂片段。
6. 免疫缀合物,其包含与治疗剂连接的根据权利要求1-2中任一项的抗体。
7. 免疫缀合物,其包含与放射性标记连接的根据权利要求1-2中任一项的抗体。
8. 权利要求6的免疫缀合物,其中所述治疗剂是毒素、核酸、肽、碳水化合物、脂质或者其他有机或无机分子。
9. 一种细胞,其产生根据权利要求1-8中任一项的抗体。
10. 一种组合物,其包含权利要求1-8中任一项的抗体和载体。
11. 一种核酸分子,其包含如SEQ ID NO: 1、3和5所示的核酸序列,其中SEQ ID NO: 1的核酸序列编码重链可变区且SEQ ID NO: 3或5的核酸序列编码轻链可变区,其中由所述核酸序列编码的多肽构成抗体。
12. 一种核酸分子,其编码包含如SEQ ID NO: 2、4和6所示的氨基酸序列的多肽,其中SEQ ID NO: 2的氨基酸序列是重链可变区的氨基酸序列且SEQ ID NO: 4或6的氨基酸序列是轻链可变区的氨基酸序列,其中所述多肽构成抗体。
13. 一种多肽,其包含如SEQ ID NO: 2、4和6所示的氨基酸序列,其中SEQ ID NO: 2的氨基酸序列是重链可变区的氨基酸序列且SEQ ID NO: 4或6的氨基酸序列是轻链可变区的氨基酸序列,其中所述多肽构成抗体。
14. 一种载体,其包含权利要求11或12的核酸。
15. 一种细胞,其包含权利要求14的载体。
16. 权利要求10的组合物在制备用于一种预防或治疗由甲型流感病毒引起的疾病或病症的方法的药物中的用途,所述方法包括对处于患有所述疾病或病症的风险中的个人施用治疗有效量的权利要求10的组合物。
17. 权利要求10的组合物与抗病毒剂的组合在制备用于一种预防或治疗由甲型流感病毒引起的疾病或病症的方法的药物中的用途。
18. 权利要求8的免疫缀合物,其中所述核酸包括siRNA。
19. 权利要求8的免疫缀合物,其中所述肽包括细胞因子、多肽或拟肽。

人源化流感单克隆抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2015年4月8日提交的美国临时申请号62/144,729的优先权和权益，所述美国临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般地涉及流感中和抗体及其使用方法。

[0004] 政府利益

[0005] 本发明在[]授予的[]下由政府支持进行。美国政府在本发明中拥有一定的权利。

[0006] 发明背景

[0007] 流感大流行代表对人类健康最大的急性传染性威胁之一。疫苗接种仍然是预防季节性流感和大流行性流感及其并发症的主要手段。诱导针对流感病毒的多个亚型的宽免疫的“通用”流感疫苗已是医学研究中长期追求的目标。与HLA(sBnAb)的茎上的高度保守的疏水口袋结合的人类宽中和性“异源亚型(heterosubtypic)”抗体的近期发现已重新激起了开发这种疫苗的努力。然而，在季节性流感或H5N1疫苗的血清或商业静脉注射免疫球蛋白(IVIG)制备物中仅检测到非常低浓度的sBnAb。

[0008] 存在生产用于针对流感病毒的免疫疗法的单克隆抗体(mAb)和药物的持续努力。具体地，努力涉及开发中和所有各种流感毒株的治疗化合物。目前，仅少数mAb被报道能够实现这一目标。通过淘选噬菌体抗体文库和筛选来自接种疫苗的志愿者的B细胞来分离这些mAb。然而，宽中和性流感抗体的特征的更多了解可以用于将某些结构决定簇掺入更合理的设计方法中，用于发现和产生中和性流感抗体的宽实验对象组。

[0009] 因此，非常需要通过合理设计方法可以宽中和流感病毒的另外的单克隆抗体以及用于增加这些抗体的亲和性或功效的方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的特征在于经分离的重组产生的单克隆抗体，其中所述抗体具有下述特征：由IGHV3-30种系基因编码的重链可变区；结合血凝素(HA)蛋白的茎区中的表位；并且中1组和2组甲型流感病毒。

[0012] 在一个方面，单克隆抗体具有一个或多个下述特征：由IGLV1-44种系基因编码的轻链可变区；包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链CDR3；结合未切割的HA0；阻止HA0裂解；和/或结合当根据SEQ ID NO:18编号时的HA2多肽的氨基酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、49和53限定的构象表位。

[0013] 本发明的特征在于中和流感病毒的经分离的单克隆抗体，其包含：包括下述的重链：包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR3；以及包括下述的轻链：包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的CDR2；和包含SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR3。

[0014] 本发明的特征还在于经分离的单克隆抗体，其中所述抗体包含SEQ ID NO: 2的V_H

氨基酸序列和SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 6的V_L氨基酸序列;SEQ ID NO: 2的VH氨基酸序列和SEQ ID NO: 24的VL氨基酸序列;或SEQ ID NO: 22的VH氨基酸序列和SEQ ID NO: 4或6的VL氨基酸序列。

[0015] 抗体结合由HA2多肽的氨基酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、49和53限定的构象表位。

[0016] 在一个方面,抗体是单链Fv抗体、F_{ab}片段、F_{ab'}片段或F_(ab')₂片段。在另一个方面,抗体与治疗剂连接。例如,治疗剂是毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

[0017] 本发明的特点还在于包含本文公开的任何抗体和载体的组合物。

[0018] 本发明提供了包含选自SEQ ID NO: 1、3和5的核酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,本发明提供了编码包含选自SEQ ID NO: 2、4和6的氨基酸序列的多肽的核酸序列。在一个方面,本发明提供了包含选自SEQ ID NO: 2、4和6的氨基酸序列的多肽。

[0019] 本发明提供了包含选自SEQ ID NO: 1、2、3、4、5和6的核酸序列的载体。在一个方面,本发明提供了包括包含核酸序列1、2、3、4或6的载体的细胞。

[0020] 本发明进一步提供了产生本文公开的任何抗体的细胞。

[0021] 本发明进一步提供了通过对处于患有所述疾病或病症的风险中的个人施用治疗有效量的本文所述的任何单克隆抗体,用于治疗由流感病毒引起的疾病或病症的方法。任选地,该方法进一步包括施用抗病毒剂。

[0022] 本发明的其他特征和优点根据下述详细描述和权利要求将是显而易见,并且由下述详细描述和权利要求包含。

[0023] 附图简述

[0024] 图1A是描绘从人记忆B细胞储库中分离针对流感病毒的宽中和性Ab的示意图。还呈现了代表性的荧光标记细胞分选(FACS)数据。FACS数据指示从总PBMC中分离的H3反应性记忆B细胞的频率。图1B描绘了基于氨基酸序列的甲型流感病毒的18个HA亚型的系统发生树。组1亚型和组2亚型在示意图中指出。氨基酸距离比例尺表示0.1的距离。

[0025] 图2是一系列FACS图,其描绘了3I14与宽范围的组1和组2 HA的结合。用不同的HA表达质粒瞬时转染293T细胞,随后为用纯化的scFvFc抗体和APC标记的小鼠抗人Fc抗体染色。3I14(红线)、F10(组1-特异性,绿线)、CR8020(组2-特异性,蓝线)、FI6v3(组1和组2特异性,紫线)、CR9114(组1和组2特异性,橙线)和无关mAb Fm-6(抗SARS病毒,灰色填充直方图)通过流式细胞术进行分析。

[0026] 图3是描绘与重组HA的3I14 IgG1(A)结合(K_d值)或scFvFc Ab(B)结合(K_d值)的一系列图,所述重组HA代表组1(红色)或组2(蓝色)亚型。

[0027] 图4是描绘组1(红色)或组2(蓝色)亚型的传染性病毒的3I14 IgG1中和(IC₅₀值)或3I14 scFvFc Ab中和(IC₅₀值)的一系列图。3I14由正方形表示;抗组1 mAb F10由三角形表示。通过将2-3次独立实验的中和滴度求平均值来测定用于IC50值的图。

[0028] 图5是描绘代表组1或组2亚型的假病毒的3I14 IgG1中和(A)(IC₅₀值)或3I14 scFvFc 中和(B)(IC₅₀值)的图。这些数据代表2-3次独立实验的平均中和滴度。在图5B中,使用抗组1 mAb F10 scFvFc作为参考。

[0029] 图6是描绘小鼠的存活率(A)的一系列图,所述小鼠暴露于流感病毒,并且腹膜内施用以下述浓度之一的纯化IgG:5、20或25 mg。图6B是描绘小鼠体重组中的变化的一系

列图,所述小鼠暴露于流感病毒,并且施用所示的具体抗体浓度。对于这些测定,在通过用H7N7-NL219、H7N9-AH13、H3N2-BR07或H5N1-VN04流感病毒(~10 LD50) i.n. 接种的致死性攻击之前24小时,用腹膜内给予的20/25或5 mg/kg剂量的纯化IgG处理5只小鼠的组。用bnAb 3I14(红色)和组1对照mAb F10(黑色)处理的小鼠的(a)存活率(%)和(b)体重变化(%)。

[0030] 图7是显示来自胰蛋白酶切割抑制测定的结果的凝胶,其中不使用抗体3I14或Fm-6(IgG1对照)。对于该测定,将0.4 μ g重组H3-组氨酸(H3-BR07)在2.5 μ g 3I14或Fm-6 IgG1的存在下温育,或在不存在抗体的情况下在含有100 μ g/mL Trypsin-ultra(New England Biolabs,USA)的pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中在37°C下温育。通过添加1% BSA在几个时间点抑制胰蛋白酶消化。样品在12%还原SDS-PAGE上运行,并且使用HisProbe-HRP Ab印迹。

[0031] 图8是描绘3I14 IgG1阻止在表面表达的H3-A268和H3-BR07上的低pH触发的构象重排的一系列示意图和图。通过3I14(实心条)和头部结合对照mAb E730(空心条)的FACS染色,检测表面表达H3的构象重排。结合表示为与未处理的HA(HA0)结合的百分比。对于这种抗体抑制测定,在将切割的HA暴露于pH 4.9之前,H3不用mAb预处理,用3I14或对照Ab,Fm-6 IgG1预处理。数据代表三次独立实验的平均值 + SD。

[0032] 图9A和9B证实3I14介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。图9A是描绘基于ADCC的测定结果的图。3I14和其他抗茎bnAb,FI6v3、CR9114、39.29、F10和CR8020在表达H3和H5的293T细胞中诱导ADCC。对于这些测定,在测定之前,将 1×10^4 /孔的表达H3或H5的293T细胞附着至平板,然后将培养基替换为低IgG血清测定缓冲液(具有0.5%低IgG FBS的RPMI 1640)。不同的bnAb以5、1、0.2和0.04 μ g ml⁻¹的浓度加入每个孔中。1小时后,将Jurkat效应细胞以 6.0×10^4 细胞/孔加入低IgG血清测定缓冲液中的测定平板中,并且温育6小时。收集上清液,并且使用Bio-GloTM 萤光素酶测定试剂盒(Promega)测量萤光素酶活性。图9B是描绘3I14和其他抗茎bnAb,FI6v3、CR9114、39.29、F10和CR8020在表达H3和H5的293T细胞中诱导的ADCC的一系列图。在测定之前,将 2×10^4 /孔的表达H3或H5的293T细胞附着至平板,然后将培养基替换为低IgG血清测定缓冲液(具有0.5%低IgG FBS的RPMI 1640)。不同的bnAb以10、5、2.5和1.25 μ g ml⁻¹的浓度加入每个孔中。1小时后,将PBMC以 1.2×10^5 细胞/孔加入低IgG血清测定缓冲液中的测定平板中,并且温育6小时。收集上清液,并且使用LDH细胞毒性测定试剂盒(Pierce)测量萤光素酶活性。数据代表平均值± S.E.M. 实验执行三次实验,具有类似结果。数据代表具有三个重复/组的一次独立实验。

[0033] 图10是描绘了3I14交叉竞争其他抗茎bnAb,FI6v3、CR9114、39.29、F10和CR8020与H3或H5的结合的一系列图。对于这些测定,将5 μ g/ml H3-BR07或H5-VN04蛋白固定到ELISA平板上,并且与浓度范围为80 nM至0.3 nM的3I14 Fab的2倍连续稀释物温育;这些与以5 nM的其他scFvFc Ab进一步混合。使用HRP缀合的抗人CH2抗体检测scFvFc Abs的结合。

[0034] 图11描绘了3I14和其他种系重链(A,C)或轻链区(B,D)的氨基酸序列比对。使用IMGT数据库测定相应的V、D和J序列,并且显示以用于比较。

[0035] 图12A和12B是描绘3I14模型与三种VH3-30 BnAb,39.29(来自4KVN)、FI6(来自3ZTJ)和Mab3.1(4PY8)的叠加的一系列示意图。描绘了蛋白质模型示意图,其显示了3I14抗体的重和轻链以及重CDR的相对定位。重链以绿色显示,并且轻链以灰色显示。图12中的重链CDR如下进行颜色编码:3I14 HCDR为蓝色,其他BnAb的HCDR1为红色,HCDR2为品红色,并

且HCDR3为青色。

[0036] bnAb以带状表示形式显示。在图12B中,重链为蓝色,并且轻链为青色。HCDR3是突出显示的,其中3I14为红色,FI6v3为品红色,39.29为黄色,并且MAb 3.1为绿色。

[0037] 图13A-D是描绘3I14建模和与H3/H5对接的一系列示意图。H3三聚体模型的茎上的3I14表位结构在图13A中描绘。图13B描绘了具有HA的IGVH3-30衍生的bnAb的复合物结构。HA上的表位残基以表面表示展示,而bnAb的CDR环显示为带状。HA单体的HA1为小麦色,HA2为橙红色,并且表位残基被标记为红色。关键残基L38和K39以黄色着色。bnAb的重链CDR为蓝色,并且轻链CDR为青色。3I14使用BioLuminate中的抗体建模模块进行同源性建模,并且该模型在与RosettaDock对接之前与H3/FI6v3复合物结构叠加。从蛋白质数据库下载其他三种IGHV3-30bnAbs,FI6v3、39.29和MAb3.1。图13C描绘了3I14中的D94与H3/H5的相互作用。H3以青色显示,其中K39以棒显示;H5以绿色显示,其中E39以棒显示;3I14在H3/3I14模型中以橙色显示,并且在H5/3I14模型中以黄色显示,其中D94显示为棒。图13D描绘了3I14轻链的G31与H3/3I14复合物模型中的H3的相互作用。H3的HA2结构域的螺旋A显示为以青色的带状;3I14的轻链显示为以橙色的带状;G31的主链原子以棒显示,并且H3 HA2的Q42和D46的侧链原子以棒显示;G31和H3之间的距离通过绿色虚线示出,并且以黑色标记。(PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99 rc6 Schrödinger, LLC)。

[0038] 图14描绘了H3/3I14和H5/3I14模型的序列比对(A)和结构叠加(B)。

[0039] 图15A-15F是描绘了3I14 WT和VLD94N IgG1变体与重组H5-VN04(A)和H3-PE09(B)结合的 K_d 结合值的图和表。绿色或蓝色曲线是从生物层干涉测量实验获得的实验迹线,并且红色曲线是与用于计算 K_d 值的数据的最佳整体拟合。关于结合曲线的亲和力测量(Kd值)在表4中报告。3I14 WT以1.15 nM的 K_d 值结合纯化的H5-VN04,而3I14 VLD94N突变体以0.19 nM的高10倍的亲和力结合H5-VN04。图15C-F是描绘3I14 scFvFc与重组Ha结合的一系列图。

[0040] 图16A-D是描绘与假型病毒H5N1-VN04和传染性病毒H3N2-BR07温育后,3I14WT和VLD94N突变体IgG1的中和值的一系列图。在图16C和16D中描绘的是,3I14(黑色)和VLD94N变体(红色)中和假型病毒H5N1-VN04(C)和H3N2-BR07病毒(D)。该数据代表2-3次独立实验的平均中和滴度。

[0041] 图17是描绘3I14 scFvFc Ab中和的流感病毒感染和HA假型萤光素酶报道病毒的一系列图。MAb 3I14(黑色)和抗组1 mAb F10(红色)中和传染性病毒和假型病毒的不同毒株。数据代表来自2-3次独立实验的平均中和滴度。

[0042] 图18是一系列流式细胞术图,其描绘了与经工程改造的3I14酵母-CDR文库与H5的结合相比较的3I14-WT酵母结合。对于增加与H5的结合的变体,使用酵母展示工程改造3I14酵母-CDR文库。

[0043] 图19是描绘3I14 scFvFc Ab与重组H3-PE09的全长或HA1结合的图。

[0044] 图20是描绘3I14 IgG1变体与重组H1、H3和H5的结合的一系列图。蓝色曲线是从生物层干涉测试实验获得的实验迹线,并且红色曲线是用于计算表7中呈现 K_d 的数据的最佳全局拟合。

[0045] 发明详述

[0046] 甲型流感是负义的单链RNA病毒,具有编码10种蛋白质的8区段基因组。它属于正粘病毒科,其包括如由核衣壳和基质蛋白的抗原性限定的甲、乙和丙型流感病毒属。一般

地,甲型流感病毒与人中更严重的疾病有关。甲型流感病毒通过两种表面蛋白进一步分成亚型:将病毒体附着于宿主细胞用于细胞进入的血凝素(HA),以及通过切割附着于子代病毒或细胞表面的宿主唾液酸来促进子代病毒传播的神经氨酸酶(NA)。

[0047] 存在16种HA亚型和9种NA亚型,其通过HA和NA的各种组合构成甲型流感病毒的所有亚型。16种HA和9种NA病毒亚型的所有组合都在水禽中发现。在数百种禽甲型流感病毒毒株中,仅有四种已知引起人感染:H5N1、H7N3、H7N7和H9N2。一般而言,由这些病毒的人感染已导致轻微的症状以及极少的严重疾病:只有一个由H7N7引起肺炎的致命案例。然而,例外是高致病性H5N1病毒,对于其在人中不存在自然免疫。RNA聚合酶的失真和宿主免疫的选择性压力可以导致突变的积累和这些蛋白质的表面抗原性中的变化。这种抗原性变化被称为抗原漂移。另外,由于其分段基因组,如果两种不同亚型的甲型流感病毒感染同一细胞,则可能发生基因区段的改组。例如,如果人H3N2病毒和禽H5N1病毒共感染人或哺乳动物物种的其他成员,则这种事件可以产生新型H5N2。这种新型病毒然后可以有效地从人传播到人,因为大部分基因区段来自人类病毒。这种遗传重配将导致主要的抗原变化,即所谓的抗原转变,这意味着全球人口中的大多数不具有针对重配病毒的任何中和抗体。这种情况加上流感H5N1肺炎的高死亡率是公共卫生领域最可怕的情况之一。

[0048] 流感病毒血凝素(HA)是流感病毒的最可变抗原,并且负责病毒进入细胞内。它被合成为三聚体前体多肽HA0,其经翻译后切割为通过单一二硫键连接的两个多肽HA1和HA2。HA的HA1链负责病毒附着到细胞表面。HA2介导病毒和细胞膜在内体中的融合,允许核糖核蛋白复合物释放到细胞质内。与HA1相反,HA2分子代表HA的相对保守部分。第二种免疫原性流感蛋白是神经氨酸酶(NA)。这种四聚体糖蛋白负责从生产细胞上的表面唾液酸释放病毒体,并且还可以在促进对气道中的靶细胞接近中具有作用。尽管针对NA的中和抗体在动物和人中都是保护性的,但关于其作用机制的数据很少。关于N1神经氨酸酶的晶体结构的近期报道证实与其活性位点相邻的腔的存在,所述腔可以用于开发新的抗流感药物,包括抗体。鉴于对用于H5N1病毒的奥司他韦(Tamiflu)和扎那米韦(Relenza)的耐药性出现的报道,这一发现是特别重要的。

[0049] 在二十多年前,H3亚型的HA分子通过对抗原漂移变体和逃逸突变体的HA测序进行表征,并且将抗原表位映射到分子的三维结构上。自那以后,将禽致病性病毒H1、H2和H5上的抗原位点映射到H3的三维结构上。在1997年中国香港人中的H5N1感染爆发和1999年从人病例中分离H9N2病毒后,两种蛋白质的X射线结构得到分辨。然而,用于分辨结构的1997年猪分离株(A/Duck/Singapore/3/97)和更近期分离的高致病性毒株的抗原漂移是显著的。实际上,在猪分离株(A/Duck/Singapore/3/97)和HPAI H5N1毒株(A/Vietnam1203/04)之间存在28个微小的变化和两个潜在的重大变化。

[0050] 来自2004-2005年爆发的H5 HA基因的系统发生分析已显示了HA基因的两个不同谱系,称为进化枝1和2。HPAI H5N1毒株(A/Vietnam1203/04)是进化枝1的成员。这些进化枝各自中的病毒分布在亚洲的非重叠地理区域中。来自中南半岛的H5N1病毒在进化枝1内紧密聚簇,而从几个周边国家分离的H5N1与进化枝1分离株不同,并且属于更趋异的进化枝2。进化枝1病毒从越南、泰国和柬埔寨的人和鸟中分离出,但仅从老挝和马来西亚的鸟中分离出。进化枝2病毒在从中国、印度尼西亚、日本和韩国的鸟中专一地分离的病毒中发现。最近期的流行病学研究分析了从印度尼西亚和越南各地的家禽中分离出的82种H5N1病毒,以及

来自越南南部的11种人分离株连同公共数据库中可获得的序列数据,以解决与病毒引入、流行和进化有关的问题³⁶。系统发生分析显示,来自印度尼西亚的所有病毒构成了H5N1基因型Z病毒的独特子谱系,暗示这一爆发可能源于在过去两年期间经由在全国各地蔓延的单一引入。印度尼西亚持续的病毒活动归于经由国内的家禽移动的传播,而不是通过鸟类迁移的重复引入。在印度尼西亚和越南内,H5N1病毒已随着时间过去进化成在每个国家内的地理上不同的组。

[0051] 近来,来自A/Vietnam1203/4的HA的结构得到分辨。其氨基酸序列与来自进化枝1和2病毒的HPAI 2004和2005分离株的HA基因的比较鉴定了主要在受体结合结构域周围聚簇的13个抗原变异位置,而其余部分在退化的酯酶结构域内。抗原变异区域已在H1和H3血清型中得到鉴定。对于H1,这些位点被命名为Sa、Sb、Ca和Cb,而对于H3,位点被命名为A、B、C和D。H5HA的逃逸突变体可以聚簇成三个表位;位点1:重叠H3的抗原位点A和H²的Ca2的暴露环(HA1 140-145);位点2:对应于H3血清型中的抗原位点B的HA1残基156和157;和3)HA1 129-133,其局限于H1 HA和H9血清型中的Sa位点。在通过Smith的近期研究中,在氨基酸水平上的阳性选择的检测指示HA蛋白中的8个残基处于阳性选择下。这些残基包括在抗原位点A和E中的5个(位置83、86、138、140和141);涉及受体结合的两个(位置129和175);并且位置156是关于在受体结合位点附近的潜在N联糖基化的位点。结果进一步揭示,HA中的三个残基(Val 86、Ser 129和Thr 156)在人分离株中比在鸡或鸭分离株中更频繁地观察到,并且可能代表H5N1基因型Z对人的早期适应。来自这些研究的另一个重要发现是印度尼西亚和越南子谱系之间的系统发生差异也反映在这两组病毒之间的抗原交叉反应性中的显著差异。具体地,来自印度尼西亚的病毒与针对A/Vietnam1203/04的雪貂抗血清不反应,并且来自越南的代表性病毒与针对印度尼西亚病毒IDN/5/06和Dk/IDN/MS/04的雪貂抗血清不反应。这些发现与使用免疫人血清以及人1997和2003年H5N1病毒的较早期研究一致:这些毒株不仅是系统发生不同的而且是抗原性不同的。因此,自然变异以及逃逸突变体暗示,病毒的持续进化应该影响关于哪个毒株应该用于被动和主动免疫接种的决定。

[0052] scFv和单克隆抗体的鉴定和表征

[0053] 高亲和力、交叉亚型、宽中和性人抗HA mAb已得到鉴定。使用四聚化H3(A/Brisbane/10/2007)血凝素(HA)三聚体从人PBMC中分离抗原特异性记忆B细胞。将H3反应性单一记忆B细胞分选到平板内并且在体外受刺激。在14天后,超过40%的分选B细胞在上清液中产生平均200 ng/ml IgG。通过MSD或高度敏感的中和测定测量来自扩增的B细胞的上清液的异源亚型结合特异性和中和活性。通过单细胞RT-PCR回收来自选择性克隆的抗体基因。

[0054] 通过筛选来自7名个体的2688个记忆B克隆,11%可克隆的记忆B细胞与H3血凝素反应。其中H3/H7、H3/H7/H1和H3/H7/H1/乙型流感异源亚型结合群体分别为16%、6.9%和0.35%。鉴定了新的宽中和性Ab,3I14。3I14被表征并且显示具有针对组1和组2 甲型流感病毒两者的交叉反应性结合和中和活性。这与其他已知的抗流感抗体如F10、CR6261、Mab 3.1和CR8020形成对比,所述抗体中和组1或组2 甲型流感病毒。仅抗流感抗体FI6v3、CR9114、39.39、MAb 1.12和CT149能够中和来自组1和组2两者的人甲型流感病毒。与从人浆细胞、成浆细胞和CD138⁺ HA特异性分泌抗体分泌细胞的培养物中分离的FI6v3、CR9114、39.39、MAb 1.12和CT149相比,本发明的抗体,例如3I14,从记忆B细胞中分离。响应于病毒再感染和疫

苗接种,长寿命的浆细胞产生中和抗体,特别是回忆原始病毒,而记忆B细胞通过重新进入生发中心产生对变体病毒特异性的高亲和力中和抗体。此外,记忆B细胞的体细胞突变可以通过抗体发散和选择的反复循环而在老年个体中累积。因此,记忆B细胞具有比长寿命的浆细胞更宽的抗原特异性储库。对于长期、宽有效的疫苗发展记忆B细胞的稳定群体并且引发有效的bnAb反应视为必需的。相应地,本发明的抗体具有比其他已知的抗流感抗体更大的治疗效用。

[0055] 本发明的抗体结合跨越组2(H3、H4、H7、H14和H15)和组1(H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12和H16)甲型流感两者的血清型的表面表达的HA。特别地,本发明抗体的结合亲和力(K_d)在约1pM至1 μ M之间、在约1pM至1nM之间或在约1nM至1 μ M之间。例如,抗体具有针对组1(H1、H5和H9)和组2(H3、H4、H7和H17)在约1pM至1 μ M之间的结合亲和力。优选地,与组1(H1、H5和H9)和组2(H3、H4、H7和H17)的结合亲和力 K_d 为约0.01nM至10nM。在一些实施方案中,对于组2 甲型流感病毒,抗体具有针对组2 HA(H3、H4、H7和H14)在约1pM至1 μ M之间的结合亲和力。优选地,对组2 HA(H3、H4、H7和H14)的结合亲和力 K_d 为1nM。

[0056] 具体地,3I14以范围为0.01 nM至10 nM的解离常数(K_d)结合属于组2(H3、H4、H7和H14)和组1(H1、H5和H9)的不同亚型的纯化HA蛋白,并且以高亲和力(平均 $K_d < 0.1$ nM)结合所有测试的组2 HA(H3、H4、H7和H14)。另外,3I14以高亲和力结合组1 H1亚型(H1-CA09、H1-SI06和H1-PR8),而它对于其他组1亚型(H5-VN04、H5-IN05和H9-HK99)的亲和力较低(分别为平均 $K_d = 1.02$ 、 1.05 和 5.23 nM)。与H5流感病毒亚型的这种较低的结合亲和力与先前描述的其他宽中和抗体如FI6v3和39.29不同。

[0057] 本发明的抗体中和甲型流感病毒。“中和(neutralize)”或“中和(neutralization)”意指通过抗体与病毒颗粒的结合引起病毒感染性中的减少,因此阻断病毒的复制循环中在病毒编码的转录或合成之前的步骤。抗体可以通过各种机制中和病毒,例如,抗体可以通过干扰病毒体与受体结合、阻断摄取到细胞内、阻止内体中的基因组脱壳、或者可以促使病毒颗粒聚集、或裂解来中和病毒。

[0058] 本发明的抗体中和跨越组2和组1 甲型流感病毒两者的血清型。本发明的抗体具有在约0.001至5 μ g/mL⁻¹之间、在约0.001至4 μ g/mL⁻¹之间、或在约0.001至3 μ g/mL⁻¹之间的半最大抑制浓度(IC50)。优选地,抗体具有在约0.03至2 μ g/mL之间、或在约0.03至1.0 μ g/mL⁻¹之间的IC50。甚至更优选地,抗体具有在约0.001至0.5 μ g/mL⁻¹之间、在约0.001至0.05 μ g/mL⁻¹之间、或在约0.001至0.03 μ g/mL⁻¹之间的IC50。甚至更优选地,抗体具有在约0.01至0.5 μ g/mL⁻¹之间、在约0.1至0.5 μ g/mL⁻¹之间、以及在约0.2至0.5 μ g/mL⁻¹的IC50。优选地,抗体具有在约0.05至0.008 μ g/mL⁻¹之间、以及在约0.04至0.008 μ g/mL⁻¹的IC50。最优选地,抗体具有在约0.03至1.08 μ g/mL⁻¹之间、在约0.007至0.027 μ g mL⁻¹之间、在约0.225至0.413 μ g mL⁻¹之间、以及在约0.040至0.008 μ g mL⁻¹的IC50。

[0059] 具体地,本发明的抗体中和组2病毒(例如H3、H7、A/Wisconsin/67/05(HA,NA) x A/Puerto Rico/8/34和A/Aichi/2/68(HA,NA) x A/Puerto Rico/8/34和H7N9-AH13)。本发明的抗体还中和假病毒H7N1-FPN和H7N1-NL219毒株。另外,本发明的抗体中和组1 H1毒株(H1-CA09和H1-PR8)以及假病毒H5-VN04和H5-HK97。

[0060] 本发明的抗体具有在体内针对组1和组2 甲型流感病毒两者的预防功效。本发明的抗体提供了针对病毒感染的50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的预防性保护。具体地,本

发明的抗体完全保护免受H7N7-NL219或H7N9-AH13攻击,针对H3N2-BR07攻击的80%保护和针对H5N1-VN04攻击的60%保护。

[0061] 本发明的抗体阻止未成熟的HA0的切割。如果HA0蛋白不被切割以形成HA1和HA2,则不能发生病毒-宿主膜融合。因此,具有未切割HA的流感病毒并非感染性的。因此,本发明的抗体可用于阻断流感感染,并且可以与其他抗病毒剂如Tamiflu组合使用。

[0062] 重要的是,本发明的抗体结合未切割的HA前体(HA0)蛋白,以及两种成熟形式HA1蛋白和HA2蛋白。

[0063] 另外,本发明的抗体阻止低pH触发的HA构象重排。

[0064] 抗体介导Fc依赖性病毒清除。在一些实施方案中,抗体增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。可替代地,抗体参与Fc依赖性免疫介导的机制用于体内保护。

[0065] 本发明的抗体的可变重链由IGHV3-30种系基因编码。抗体的可变轻链由IGLV1-44种系基因编码。IGHV3-30抗体使用HCDR3以形成促成HA结合的疏水核心。抗体具有重排的重链,以便产生长的互补决定区3(HCDR3)。长HCDR3的长度可以在约12至30个氨基酸之间(例如12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30)。在一个优选实施方案中,长HCDR 3长度为约23个氨基酸。在一些实施方案中,长HCDR3使用在VH和IGHJ4*02连接处由大的N-添加侧接的IGHD3-22*01 DH区段。

[0066] 抗体具有在可变重链和/或可变轻链中的体细胞突变。可变重链中的体细胞突变数目可以在约2至30之间(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30)。在一些实施方案中,可变重链中的体细胞突变数目为约15。可变轻链中的体细胞突变数目可以在约2至15之间(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)。在一些实施方案中,体细胞突变的数目为约7。

[0067] 表位作图和竞争测定揭示了位于HA茎中的高度保守的表位。例如,本发明的抗体结合(当根据SEQ ID NO: 18编号时)由HA2的氨基酸残基18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、46、49和53限定的构象表位。可替代地,本发明的抗体结合(当根据SEQ ID NO: 18编号时)由HA2的氨基酸残基18、19、20、21、38、39、41、42、45、46、47、48、49和50限定的构象表位。任选地,所述抗体结合HA1。

[0068] 保守的表位残基序列由肽残基限定。

[0069] 结构-碱基抗体工程改造已被用于优化3I14,以改善其针对其他温和亚型HA毒株的效力。3I14的这种高亲和力变体在本文中称为3I14V_LD94N,并且在3I14VV中的氨基酸位置9处由天冬氨酸(D)至天冬酰胺(N)氨基酸取代产生。

[0070] VLD94L取代允许或增加抗体与H5的结合。与野生型3I14相比,与H5的结合亲和力中的增加是约5至15倍。关于3I14V_LD94N针对H5-VN04的Kd约小于0.2 nM。

[0071] 另外的基于结构的工程改造可以增加与H5的结合亲和力。具体地,增加与H5的结合亲和力通过用另一个氨基酸取代在LCDR1中的残基31处的甘氨酸(G)来实现。例如,在残基31处的甘氨酸(G)可以被丝氨酸(S)取代。

[0072] 根据本发明的中和流感病毒抗体的核酸和氨基酸序列在下文提供:

[0073]

表 1A. 抗体 3I14 可变区核酸序列**3I14 的 V_H 链 (SEQ ID NO:1)**

CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
 GCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACATGGCATGCACGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
 CTGGAGTGGTGGCAATTATATCATTGATGGAAGTAAAAAATATTATGCAAACCTCGTGAAAGGGC
 CGATCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTCTCTGCAAATGAAACAGCCTGGGACCT
 GAGGACACGGCTCTATATTACTGTGCGAAACTGCCCTCCCCGTATTACTTTGATAGTCGGTTCGTG
 TGGGTGCGCCGCCAGCGCATTCACTTCTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTCTCTTC

3I14 的 V_L 链 (SEQ ID NO:3)

AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGC
 TCTGGAAGCAGCTCCACATCGGAGGTAATACTGTACACTGGTTCAGCAGCTCCAGGAACGGCC
 CCCAAACTCCTCATCTATACTAATAGTCTGGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
 AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC
 TGTGCAGCATGGATGACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

表 1B. 抗体 3I14 可变区氨基酸序列**3I14 的 V_H 链 (SEQ ID NO: 2)**

QVQLLESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISFDGSKKYY
ANSVKGRSTISRDNSKNTLSLQMNSLGPEDTALYYCAKLPSPYYFDSRFVWVAASAFHFW
GQGILVTVSS

3I14 的 V_L 链 (SEQ ID NO: 4)

NFMLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGGNTVHWFFQQLPGTAPKLLIYTNSLRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGQVFGGGTKLTVL

表 1C. 抗体 3I14V_LD94N 可变区核酸序列**3I14V_LD94N 的 V_L 链 (SEQ ID NO: 5)**

AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGAGAGGGTCACCATCTCTTGC
TCTGGAAGCAGCTCAAACATCGGAGGTAATACTGTACACTGGTTCAGCAGCTCCAGGAACGGCC
CCCAAACCTCTCATCTATACTAATAGTCTGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC
TGTGCAGCAGGGATACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

表 1C. 抗体 3I14V_LD94N 可变区氨基酸序列**3I14V_LD94N 的 V_L 链 (SEQ ID NO: 6)**

[0074]

NFMLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGGNTVHWFFQQLPGTAPKLLIYTNSLRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDNLNGQVFGGGTKLTVL

表 8: IGHV3-03*18 和 IGLV1-44*01 的核酸序列**IGHV3-30*18—核酸序列—SEQ ID NO: 21**

CATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGCTCTTTAAGAGGGTGATTCACTGGAGAAATAGAGA
GACTGAGTGTGAGTGAACATGAGTGAAGAAAAACTGGATTGTGTGGCATTCTGATAACGGTGTCC
CTGTTTGAGGTGTCAGTGTCAAGGTGCAAGCTGGGGAGGTCTGGGGAGGGTCCAGCCTGGGAGG
TCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGTCCGCCAG
GCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATCATATGATGAAAGTAATAAAACTATGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC
CTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAAGAACAGTGAAGGGAAAGTCATTGTGCGCCC
AGACACAAACCTCCCTGCAGGAACGCTGGGGAAATCAGCGCAGGGGGCGCTCAGGAGCCACTGATC
AGAGTCAGCCCTAGAGGCAGGTGCAAGATGGAGGCTGTTCCCTGTCAAGGATGTGGGACTTTGTCTTCTC
TGACAGTCCCCAAGGAACCTCTAAATTAGAAAATCTGCTTAACAAATGTCTTCTATGCATATGA
GGACCTTTCTCCCTAGCACAAATGCAGATTGACGCTGACACGGATGAAAATCCTCAACCATG

IGHV3-30*18—氨基酸序列—SEQ ID NO: 22

VI SYDGSNKYYADSVKGRLTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFGPKRPTGDYFDYWGQ

IGLV1-44*01—核酸序列—SEQ ID NO: 23

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGAGAGGGTCACCATCTCTGTTCT
GGAAGCAGCTCAAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACCGAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAA
CTCCCTCATCTATACTGAAATAATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTGGCTCCAAGTCTGGC
ACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCACTGG
GATGACAGCCTGAATGGTCC

IGLV1-44*01—核酸序列—SEQ ID NO: 24

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG

[0075] 3I14 和 3I14V_LD94N 中和流感抗体的重链和轻链互补决定区的氨基酸序列显示于下表 2 中。

表 2

[0076]	HCDR1	GFTFSNYG	(SEQ ID NO:7)
	HCDR2	ISFDGSKK	(SEQ ID NO:8)
	HCDR3	CAKLPSPYYFDSRFVWVA ASAFHFW	(SEQ ID NO:9)
	LCDR1	SSNIGGNT	(SEQ ID NO:10)
	LCDR2	TNS	(SEQ ID NO:11)
	LCDR3	CAAWDDSLNGQVF	(SEQ ID NO:12)
	3I14V ₁ D94N LCDR3	CAAWDNSLNGQVF	(SEQ ID NO:13)
	3I14 G31X LCDR1	SSNIGX ¹ NT	(SEQ ID NO:14)

[0077] ¹ X可以是除甘氨酸外的任何氨基酸。优选地, X是丝氨酸。

表 9: 血凝素核酸和氨基酸序列

[0078]	A/Japan/305/1957(H2N2)—HA1 氨基酸序列—SEQ ID NO: 15	
	DQICIGYHANNSTEKVDTNLERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELG DCSIAGWLLNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEELKHLSS SVKHFEVKILPKDRWTQHTTGGSRACAVSGNPSFFRNMVWLTKEGSDYP VAKGSYNNTSGEQMLIIGVHHPIDETEQRTLYQNVGTYVSVGTSTLNKRST PEIATRPKVNGQGGRMEEFSWTLLMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGI MKTEGTLENCETKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGL RNVPQIES	
	A/Japan/305/1957(H2N2)—HA1 核酸序列—SEQ ID NO: 16	
	GACCAGATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGATGGTCGA CACAAATTCTAGAGCGGAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTG AGAAGACCCATAACGGAAAGTTATGCAAACCTAAACCGAATCCCTCCACTT GAACTAGGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAAATCCAGAATG TGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGCCTATATAATGGAGAAAGAAA ACCCGAGAGACGGTTGTGTTATCCAGGCAGCTCAATGATTATGAAGAA TTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTGAGAAAGTAAAGATTCT GCCCAAAGATAGATGGACACAGCATAACAACACTGGAGGTTACGGGCCT GCGCGGTGTCTGGTAATCCATCATTCTCAGGAACATGGCTGGCTGACAA AGAAAGGATCAGATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGC GGAGAACAAATGCTAATAATTGGGGGGTGCACCATCCAAATGATGAGAC AGAACAAAGAACATTGTACCAAGAATGTGGAACCTATGTTCCGTAGGCA CATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCCCAGAAATAGCAACAAGGCTAA AGTGAATGGACAAGGAGGGTAGAATGGAATTCTCTTGGACCCCTTGGATA TGTGGACACCATAAATTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAAGAG TATGGATTCAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAAGGGATCATGAAAACAGA AGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAAACTCCTTGGGAGCAA TAAATACAACATTGCCTTTCACAAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGT GCCCAAATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGCTTAGCAACAGGACTAAGG AATGTTCCCCAGATTGAATCAAG	
	A/Japan/305/1957(H2N2)—HA2 氨基酸序列—SEQ ID NO: 17	

GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSGYAADKESTQKAFDGIN
KVNSVIEKMNTQFEAVGKEFGNLERRLNKRMEDEGFLDVWTYNAELLVL
MENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMS
VKNGTYDYPKYEEESKLNRNEIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAGSLSLAIMM
AGISFWMCSNGSLQCRCI

A/Japan/305/1957(H2N2)—HA2 核酸序列—SEQ ID NO: 18

GATTGTTGGGGCAATAGCTGGTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATG
GTTGATGGTTGGTATGGATACCACATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTA
TGCAGCAGACAAAGAACATCCACTAAAAGGCATTGATGGAATACCAACA
AGGTAATTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTGAAGCTGTTGGG
AAAGAATTCACTAGAAGAGACTGGAGAACTTGAACAAAAAGA
TGGAAAGACGGGTTCTAGATGTGAGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTC
TGATGGAAAATGAGAGGACACTGACTTCATGATTCTAATGTCAGAAAT
CTGTATGATAAAAGTCAGAATGCAGTTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGG
AAATGGATGTTGAATTATACAAATGTGATGATGAATGCATGAATAG
TGTGAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAAC
TAAATAGAAATGAAATCAAAGGGTAAATTGAGCAGCATGGGGTTAT
CAAATCCTGCCATTATGCTACAGTAGCAGGTTCTGTCACTGGCAATC
ATGATGGCTGGATCTCTTCTGGATGTGCTCCAACGGGCTCTGCAGTGC
AGGATCTGCATATGA

A/Japan/305/1957(H2N2)—完全 HA 氨基酸序列—SEQ ID NO: 19

MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEMVDTILERNVTVTHAKDILEKTHNG
KLCKLNGIPPLELGDCSIAGWLLNPECDRLLSVPWEWSYIMEKENPRDGLCYP
GSFNDYEELKHLSSVKHFEKVILPKDRWTQHTTGGSRACAVSGNPSFFR
NMVWLTKKGSDYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVG
TYVSVGTSTLNKRSTPEIATRLKVNGQGGRMEFSWTLDMWDTINFESTGNLI
APEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENSETKCQTPLGAINTLPLFHNHPLTIGEC
PKYVKSEKLVLATGLRNPVQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHS
NDQGSGYAADKESTQKAFDGINKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLEN
LNKKMEDGFLDVWTYNAELLVMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDN
VKELGNGCFEFYHKCDDECMSVKTGTYDYPKYEEESKLNRNEIKGVKLSS
MGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRCI

A/Japan/305/1957(H2N2)—完全 HA 核酸序列—SEQ ID NO: 20

ATGGCCATCATTATCTCATTCTCCTGTTACAGCAGTGAGAGAGGGGACCAAG
ATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGATGGTCGACACAAT
TCTAGAGCGGAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGA
CCCATAACGGAAAGTTATGCAAACAAACCGGAATCCCTCACTTGAACTA
GGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTGGAAATCCAGAATGTGATAG
GCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGCTCTATATAATGGAGAAAGAAAACCGA
GAGACGGTTGTGTTATCCAGGCAGCTCAATGATTATGAAGAATTGAAA
CATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTGAGAAAGTAAAGATTCTGCCAA
AGATAGATGGACACAGCATAACAACACTGGAGGTTACGGGCTCGCG
GTGTCTGTAATCCATCATTCTCAGGAACATGGCTGGCTGACAAAGAA
AGGATCAGATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAG
AACAAATGCTAATAATTGGGGGTGCACCATCCAAATGATGAGACAGAA
CAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGAAACCTATGTTCCGTAGGCACATC
AACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGAAATAGCAACAAGGCTTAAAGTG
AATGGACAAGGAGGTAGAATGGAATTCTCTGGACCCCTTGGATATGTG
GGACACCATAAATTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAAGAGTATG
GATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGG

[0079]

[0080]

```

AACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAAACTCCTTGGGAGCAATAA
ATACAAACATTGCCTTTACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCC
CCAAATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAAT
GTTCCCCAGATTGAATCAAGAGGGATTGTTGGGCAATAGCTGGTTTATA
GAAGGAGGATGGCAAGGAATGTTGATGGTGTGGATGGATACCATCACAG
CAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAG
GCATTTGATGGAATACCAACAAGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAA
CACCCAATTGAAAGCTGTTGGGAAAGAATTCACTGAACTTAGAGAGAAGAC
TGGAGAACTTGAACAAAAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTGTGGACA
TACAATGCTGAGCTCTAGTTCTGATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTT
CATGATTCTAATGTCAAGAACATCTGTATGATAAAGTCAGAACATGCAGTTGAG
AGACAAACGTCAAAGAAACTAGGAAATGGATGTTTGAATTATCACAAAT
GTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAAAACCGGGACGTATGATTATCCC
AAAGTATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAA
AATTGAGCAGCATGGGGTTTATCAAATCCTGCCATTATGCTACAGTAG
CAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGATGGCTGGATCTCTTCTGGATGT
GCTCCAACGGGCTCTGCAGTCAGGATCTGCATATGA

```

[0081] 如本文使用的,术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即含有特异性结合(与之免疫反应)抗原的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与之免疫反应”意指抗体与所需抗原的一种或多种抗原决定簇反应,并且不与其他多肽反应。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb(结构域抗体)、单链F_{ab}、F_{ab'} 和F_(ab')₂ 片段、scFv 和F_{ab} 表达文库。

[0082] 单链Fv(“scFv”)多肽分子是共价连接的V_H : :V_L异二聚体,其可以从包括通过肽编码接头连接的V_H和V_L编码基因的基因融合体表达。(参见Huston等人(1988) Proc Nat Acad Sci USA 85 (16) :5879-5883)。已描述了许多方法来辨别用于将天然聚集但化学分开的来自抗体V区的轻和重多肽链转换成scFv分子的化学结构,所述scFv分子折叠成基本上类似于抗原结合位点的结构的三维结构。参见例如美国专利号5,091,513;5,132,405;和4,946,778。

[0083] 非常大型的首次用于实验的人scFv文库已经并且可以创建,以提供针对多种靶分子的重排抗体基因的大量来源。可以从具有传染病的个体构建较小的文库,以便分离疾病特异性抗体。(参见Barbas等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992); Zebedee等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992))。

[0084] 一般而言,从人获得的抗体分子涉及类别IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种,其通过分子中存在的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有亚类,如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄及其他。此外,在人中,轻链可以是κ链或λ链。优选地,抗体为IgG₁或IgG₄。

[0085] 抗体是嵌合抗体。嵌合抗体通过将成熟抗体重链与种系轻链(mHgL)配对,或通过将种系重链(gHmL)与成熟轻链配对来产生。与野生型(WT)抗体相比,嵌合抗体具有增加的结合亲和力(Kd)。例如,mHgL和gHmL嵌合变体对某些病毒(例如H1-CA09)的结合亲和力可以具有约小于0.001nM的结合亲和力。可替代地,mHgL和gHmL嵌合变体的结合亲和力(Kd)小于在WT抗体中发现的(例如对于病毒H5-VN04和H3-PE09)。任选地,mHLL和gHmL嵌合变体的结合亲和力与WT抗体的结合亲和力大致相同。

[0086] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合位点由重(“H”)和轻(“L”)链的N末端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。被称为“高变

区”的重链和轻链的V区内的三个高度趋异的区段被插入称为“构架区”或“FR”的更保守的侧翼段之间。因此，术语“FR”指在免疫球蛋白中的高变区之间天然存在和相邻的氨基酸序列。在抗体分子中，轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此设置，以形成抗原结合表面。抗原结合表面与所结合抗原的三维表面互补，并且重链和轻链各自的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。

[0087] 如本文使用的，术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白、scFv或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面分组例如氨基酸或糖侧链组成，并且通常具有特异性三维结构特征以及特异性电荷特征。例如，可以针对多肽的N末端或C末端肽产生抗体。

[0088] 如本文使用的，术语“免疫结合”和“免疫结合特性”指在免疫球蛋白分子和免疫球蛋白对于其特异性的抗原之间发生的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以依据相互作用的解离常数(K_d)来表示，其中较小的 K_d 代表较大的亲和力。可以使用本领域众所周知的方法来定量所选多肽的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率，其中这些速率取决于复合配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等影响速率的几何参数。因此，“结合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})两者均可以通过计算结合和解离的浓度和实际速率来测定。(参见Nature 361:186-87 (1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率使得能够取消与亲和力无关的所有参数，并且等于解离常数 K_d 。(一般参见Davies等人(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。当如通过测定例如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定测量的，平衡结合常数(K_d)为1μM，优选100 nM，更优选10 nM，且最优选100 pM至约1 pM时，本发明的抗体被说成特异性结合流感表位。

[0089] 本发明的流感蛋白(例如HA或神经氨酸酶)或其衍生物、片段、类似物、同系物或直向同源物可以用作抗体生成中的免疫原，所述抗体免疫特异性地结合这些蛋白质组分。

[0090] 本领域技术人员将认识到，无需过度实验，通过确定前者是否阻止后者结合流感病毒的HA蛋白，能够测定人单克隆抗体是否具有与本发明的人单克隆抗体相同的特异性。如果如通过本发明的人单克隆抗体的结合中的降低所示，待测试的人单克隆抗体与本发明的人单克隆抗体竞争，则可能两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。

[0091] 测定人单克隆抗体是否具有本发明的人单克隆抗体的特异性的另一种方法是将本发明的人单克隆抗体与流感HA蛋白预温育(它通常与之反应)，然后添加待测试的人单克隆抗体，以测定待测试的人单克隆抗体在其结合HA蛋白的能力方面是否被抑制。如果待测试的人单克隆抗体被抑制，则在所有可能的情况下，它具有与本发明的单克隆抗体相同或功能上等价的表位特异性。通过利用流感病毒并且测定测试单克隆抗体是否能够中和流感病毒，也可以进行本发明的人单克隆抗体的筛选。

[0092] 本领域已知的各种程序可以用于产生针对本发明的蛋白质或者其衍生物、片段、类似物同系物或直向同源物的多克隆或单克隆抗体。(参见例如引入本文作为参考的Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E和Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

[0093] 可以通过众所周知的技术来纯化抗体，例如使用蛋白A或蛋白G的亲和层析，其主要提供免疫血清的IgG级分。随后或可替代地，其为免疫球蛋白靶的特异性抗原或其表位可

以被固定在柱上,以通过免疫亲和层析纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化例如由D.Wilkinson(由The Scientist, Inc., Philadelphia PA出版的The Scientist,第14卷,第8期(2000年4月17日),第25-28页)讨论。

[0094] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”或“MAb”或“单克隆抗体组合物”指仅含有一个分子种类的抗体分子的抗体分子群体,所述抗体分子由独特的轻链基因产物和独特的重链基因产物组成。特别地,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在群体的所有分子中都是相同的。MAb含有能够与抗原的特异性表位免疫反应的抗原结合位点,其特征在于对于其独特的结合亲和力。

[0095] 单克隆抗体可以使用杂交瘤方法,例如由Kohler和Milstein,Nature, 256:495(1975)描述的那些进行制备。在杂交瘤方法中,通常用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其他适当的宿主动物,以引发产生或能产生特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。可替代地,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0096] 免疫剂通常包括蛋白质抗原、其片段或其融合蛋白。一般地,如果需要人起源的细胞,则使用外周血淋巴细胞,或者如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 第59-103页)。永生化细胞系通常是经转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类动物、牛和人起源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,其优选含有抑制未融合的永生化细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),所述物质阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0097] 优选的永生化细胞系是这样的,其有效融合,通过所选择的抗体产生细胞支持抗体的稳定高水平表达,并且对培养基如HAT培养基敏感。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,其可以得自例如Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California和美国典型培养物中心,Manassas, Virginia。还描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63页)。

[0098] 然后可以在杂交瘤细胞在其中培养的培养基中测定针对抗原的单克隆抗体的存在。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定,例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA),来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。这些技术和测定是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson和Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) 的Scatchard分析来测定。此外,在单克隆抗体的治疗应用中,重要的是鉴定对于靶抗原具有高度特异性和高结合亲和力的抗体。

[0099] 在鉴定所需的杂交瘤细胞后,将克隆通过有限稀释程序亚克隆并且通过标准方法生长。(参见Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 第59-103页)。用于此目的的合适培养基包括例如达尔贝科改良伊格尔培养基和RPMI 1640培养基。可替代地,杂交瘤细胞可以在哺乳动物中作为腹水在体内生长。

[0100] 通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,可以从培养基或腹水中分离或纯化由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0101] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法,例如美国专利号4,816,567中所述的那些进行制备。可以使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针),容易地分离和测序编码本发明的单克隆抗体的DNA。本发明的杂交瘤细胞充当这种DNA的优选来源。一旦分离,就可以将DNA置于表达载体内,然后将其转染到宿主细胞如猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞(其否则不产生免疫球蛋白)内,以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代代替同源鼠序列(参见美国专利号4,816,567;Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)),或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接到免疫球蛋白编码序列,也可以修饰DNA。这种非免疫球蛋白多肽可以取代本发明的抗体的恒定结构域,或者可以取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以制备嵌合二价抗体。

[0102] 完全人抗体是其中轻链和重链两者的全部序列(包括CDR)来自人基因的抗体分子。这些抗体在本文中称为“人抗体”或“完全人抗体”。人单克隆抗体可以通过使用下述进行制备:三源杂交瘤技术;人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor等人,1983 *Immunol Today* 4: 72);和EBV杂交瘤技术,以产生人单克隆抗体(参见Cole等人,1985年,于: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc.,第77-96页)。可以利用人单克隆抗体,并且可以通过使用人杂交瘤(参见Cote等人,1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030),或通过在体外用EB病毒转化人B细胞(参见Cole等人,1985年,于: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc.,第77-96页)来产生。

[0103] 另外,还可以使用另外的技术包括噬菌体展示文库来生产人抗体。(参见Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991);Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。类似地,人抗体可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物内进行制备,所述转基因动物例如其中内源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活的小鼠。在攻击后,观察到人抗体产生,其在所有方面都非常类似在人中可见的那种,包括基因重排、组装和抗体储库。该方法例如在下述中描述:美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016以及Marks等人, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992);Lonberg等人, *Nature* 368 856-859 (1994);Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994);Fishwild等人, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996);Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996);以及Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)。

[0104] 可以使用转基因非人动物另外产生人抗体,所述转基因非人动物这样进行修饰,以便响应通过抗原的攻击产生完全人抗体而不是动物的内源性抗体。(参见PCT公开W094/02602)。在非人宿主中编码重链和轻链免疫球蛋白链的内源基因已丧失能力,并且将编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性基因座插入宿主的基因组内。例如,使用含有必要的人DNA区段的酵母人工染色体掺入人基因。提供所有所需修饰的动物然后通过将中间转基因动物(其含有少于修饰的完全互补物)杂交育种作为后代获得。这种非人动物的优选实施方案是小鼠,并且称为XenomouseTM,如PCT公开W0 96/33735和W0 96/34096中公开的。该动物产生分泌完全人免疫球蛋白的B细胞。抗体可以在用目的免疫原免疫接种后,作为例如多克隆抗

体的制备物直接得自动物,或可替代地得自衍生自动物的永生化B细胞,例如产生单克隆抗体的杂交瘤。另外,编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因可以被回收且表达,以直接获得抗体,或可以进一步修饰以获得抗体类似物,例如单链Fv (scFv) 分子。

[0105] 在美国专利5,939,598中公开了生产以小鼠作为例示的非人宿主的方法的实例,所述非人宿主缺少内源性免疫球蛋白重链的表达。它可以通过包括下述的方法获得:从胚胎干细胞中的至少一个内源性重链基因座中缺失J区段基因,以阻止基因座的重排并且阻止重排的免疫球蛋白重链基因座的转录物形成,所述缺失通过含有编码可选择标记物的基因的靶向载体来实现;并且从胚胎干细胞产生转基因小鼠,其体细胞和生殖细胞含有编码可选择标记物的基因。

[0106] 在美国专利5,916,771中公开了用于生产目标抗体例如人抗体的一种方法。该方法包括将含有编码重链的核苷酸序列的表达载体引入培养中的一种哺乳动物宿主细胞内,将含有编码轻链的核苷酸序列的表达载体引入另一种哺乳动物宿主细胞内,并且将两种细胞融合以形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

[0107] 在关于该程序的进一步改进中,用于鉴定免疫原上的临床相关表位的方法,以及用于选择以高亲和力免疫特异性结合相关表位的抗体的相关方法公开于PCT公开W0 99/53049中。

[0108] 抗体可以由含有编码上述单链抗体的DNA区段的载体表达。

[0109] 这些可以包括载体、脂质体、裸露DNA、佐剂辅助的DNA、基因枪、导管等。载体包括例如WO 93/64701中所述的化学缀合物,其具有靶向部分(例如针对细胞表面受体的配体)和核酸结合部分(例如聚赖氨酸),病毒载体(例如DNA或RNA病毒载体),例如PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) 中所述的融合蛋白,其是含有靶部分(例如对于靶细胞特异性的抗体)和核酸结合部分(例如鱼精蛋白)的融合蛋白,质粒,噬菌体等。载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。

[0110] 优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼鼠白血病病毒。DNA病毒载体是优选的。这些载体包括痘载体例如正痘或禽痘载体,疱疹病毒载体例如单纯疱疹I病毒(HSV)载体(参见Geller, A. I. 等人, J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F. 等人,于DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. 等人, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I. 等人, Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990),腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等人, Science, 259:988 (1993); Davidson等人, Nat. Genet 3:219 (1993); Yang等人, J. Virol. 69:2004 (1995) 和腺相关病毒载体(参见Kaplitt, M. G. 等人, Nat. Genet. 8:148 (1994))。

[0111] 痘病毒载体将基因引入细胞的细胞质内。禽痘病毒载体仅导致核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体优先用于将核酸引入神经细胞内。腺病毒载体导致比腺相关病毒(约4个月)更短期的表达(约2个月),其依次又短于HSV载体。所选择的特定载体将取决于靶细胞和待治疗的状况。引入可以通过标准技术,例如感染、转染、转导或转化。基因转移模式的实例包括例如裸露DNA、CaPO₄沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂转染、细胞显微注射和病毒载体。

[0112] 该载体可用于靶向基本上任何所需的靶细胞。例如,立体定位注射可以用于将载

体(例如腺病毒、HSV)导向所需位置。另外,可以通过使用微型泵输液系统(如SynchroMed Infusion System)的脑室内(icv)输注来递送颗粒。称为对流的基于总体流动的方法也已证明有效地将大分子递送到大脑的延伸区域,并且可以用于将载体递送至靶细胞。(参见Bobo等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994);Morrison等人,Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994))。可以使用的其他方法包括导管、静脉内、肠胃外、腹膜内和皮下注射、以及经口或其他已知的施用途径。

[0113] 这些载体可以用于表达可以以各种方式使用的大量抗体。例如,检测样品中流感病毒的存在。抗体也可用于尝试结合且破坏流感病毒细胞膜融合。

[0114] 技术可以适于生产对本发明的抗原性蛋白质特异性的单链抗体(参见例如美国专利号4,946,778)。另外,方法可以适于构建 F_{ab} 表达文库(参见例如Huse等人,1989 Science 246: 1275-1281),以允许快速和有效鉴定对于蛋白质或其衍生物、片段、类似物或同系物具有所需特异性的单克隆 F_{ab} 片段。可以通过本领域已知的技术产生含有蛋白质抗原的独特型的抗体片段,包括但不限于:(i)通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 $F_{(ab')2}$ 片段;(ii)通过 $F_{(ab')2}$ 片段的二硫桥产生的 F_{ab} 片段;(iii)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子生成的 F_{ab} 片段和(iv) F_v 片段。

[0115] 异源缀合抗体也在本发明的范围内。异源缀合抗体由两种共价连接的抗体组成。例如,这样的抗体已提议将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(参见美国专利号4,676,980)和用于治疗HIV感染(参见WO 91/30060;WO 92/200373;EP 03089)。预期抗体可以使用合成蛋白质化学中的已知方法,包括涉及交联剂的那些在体外进行制备。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇酯(iminothiolate)和甲基4-巯基丁酰亚胺酯(methyl-4-mercaptopbutyrimidate),以及例如在美国专利4,676,980中公开的那些。

[0116] 可能期望就效应子功能而言修饰本发明的抗体,以便增强例如抗体在治疗流感中的有效性。例如,可以将半胱氨酸残基引入Fc区内,从而允许在该区域中的链间二硫键形成。因此生成的同二聚抗体可以具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。(参见Caron等人,J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992)和Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992))。可替代地,抗体可以被工程改造成具有双重Fc区,因此因而可以增强补体裂解和ADCC功能。(参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989))。

[0117] 本发明还涉及包含与细胞毒素剂例如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合的抗体的免疫缀合物。

[0118] 可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒素A链、蒴莲素A链、 α -八叠球菌、油桐蛋白质、石竹素蛋白质、美洲商陆蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、皂树抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯。各种放射性核素可用于生产放射性缀合抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0119] 抗体和细胞毒素剂的缀合物使用各种双功能蛋白偶联剂进行制备,所述双功能蛋白偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚胺基硫烷(IT)、酰亚

胺酯的双功能衍生物(例如二甲基己二酸HCl)、活性酯(例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮基衍生物(例如双(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science, 238: 1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于放射性核素与抗体的缀合的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0120] 本领域普通技术人员将认识到,可以将大量各种可能的部分偶联至本发明的所得抗体或其他分子。(参见例如"Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse和R. E. Lewis, Jr(编辑),Carger Press, New York, (1989),其全部内容引入本文作为参考)。

[0121] 偶联可以通过结合两个分子的任何化学反应来实现,只要抗体和另一部分保留其各自的活性。该连接可以包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、嵌入、配位结合和络合。然而,优选的结合是共价结合。共价结合可以通过现有侧链的直接缩合或通过掺入外部桥接分子来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白质分子(例如本发明的抗体)与其他分子偶联。例如,代表性偶联剂可以包括有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和己二胺。该列表不预期是详尽的本领域已知的各个类别的偶联剂,而是更常见的偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen等人, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 和Vitetta等人, Science 238:1098 (1987))。

[0122] 优选的接头在文献中描述。(参见例如Ramakrishnan, S.等人,Cancer Res. 44: 201-208 (1984),描述了MBS(M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用。还参见美国专利号5,030,719,描述了通过寡肽接头与抗体偶联的卤代乙酰肼衍生物的使用。特别优选的接头包括:(i)EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳二亚胺盐酸盐;(ii)SMPT(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基(pridyl)-二硫代)-甲苯(Pierce Chem. Co., Cat. (21558G));(iii)SPDP(琥珀酰亚胺基-6 [3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem. Co., Cat #21651G);(iv)磺基-LC-SPDP(磺基琥珀酰亚胺基6 [3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺]己酸酯(Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G);和(v)与EDC缀合的磺基-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺:Pierce Chem. Co., Cat. #24510)。

[0123] 上述接头含有具有不同属性的组分,因此导致具有不同理化特性的缀合物。例如,烷基羧酸酯的磺基-NHS酯比芳族羧酸酯的磺基-NOS酯更稳定。含有NHS-酯的接头比磺基-NHS酯更难溶解。此外,接头SMPT含有空间位阻的二硫键,并且可以形成具有增加的稳定性的缀合物。一般而言,二硫键比其他键更不稳定,因为二硫键在体外被切割,导致较少的缀合物可用。特别地,磺基-NHS可以增强碳二亚胺偶联的稳定性。当与磺基-NHS结合使用时,碳二亚胺偶联(如EDC)形成比单独的碳二亚胺偶联反应更耐水解的酯。

[0124] 本文公开的抗体也可以配制为免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法进行制备,所述方法例如Epstein等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 以及美国专利号4,485,045和4,544,545中描述的。具有增强的循环时间的脂质体公开于美国专利号5,013,556中。

[0125] 特别有用的脂质体可以通过使用脂质组合物的反相蒸发表生成,所述脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。脂质体通过限定孔径的过滤器挤出,以得到具有所需直径的脂质体。本发明抗体的Fab'片段可以经由二硫化物交换反应与脂质体缀合,如Martin等人,J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)中所述。

[0126] 针对流感病毒的抗体的用途

[0127] 用于筛选具有所需特异性的抗体的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)和本领域已知的其他免疫介导的技术。

[0128] 针对流感病毒蛋白例如HA(或其片段)的抗体可以在本领域已知的与流感病毒蛋白的定位和/或定量有关的方法中使用(例如用于测量适当的生理样品中的流感病毒蛋白的水平,用于诊断方法,用于使蛋白质成像等等)。在给定的实施方案中,含有抗体衍生的抗原结合结构域,对于流感病毒蛋白或其衍生物、片段、类似物或同系物特异性的抗体用作药理学活性化合物(下文称为“治疗剂”)。

[0129] 本发明的对于流感病毒蛋白特异性的抗体可以用于通过标准技术(例如免疫亲和性、层析或免疫沉淀)分离流感病毒多肽。针对流感病毒蛋白(或其片段)的抗体可以在诊断上用于监测组织中的蛋白质水平,作为临床测试程序的部分,例如,以测定给定治疗方案的功效。通过将抗体与可检测物质偶联(即,物理连接)可以促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲核素/生物素、以及抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白质;并且合适的放射性材料的实例包括¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S或³H。

[0130] 本发明的抗体包括多克隆、单克隆、人源化和完全人抗体可以用作治疗剂。这些试剂一般用于治疗或预防主体中的流感病毒相关疾病或病理(例如禽流感)。向主体施用抗体制备物,优选对于其靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体制剂,并且一般由于其与靶的结合而具有效果。抗体的施用可以消除或抑制或干扰病毒内化到细胞内。在这种情况下,抗体与靶结合并且掩蔽天然存在的配体的结合位点,从而阻断病毒与细胞膜的融合,抑制病毒的内化。

[0131] 治疗有效量的本发明的抗体一般涉及实现治疗目标所需的量。如上所述,这可能是抗体与其靶抗原之间的结合相互作用,其在某些情况下干扰靶的功能。此外,施用所需的量取决于抗体对于其特异性抗原的结合亲和力,并且还取决于在其下所施用的抗体从它施用于其的其他主体的自由体积中耗尽的速率。作为非限制性实例,关于本发明的抗体或抗体片段的治疗有效给药的通常范围可以是约0.1 mg/kg体重至约50 mg/kg体重。常见的给药频率范围可以是例如每天两次到每周一次。

[0132] 本发明的特异性结合流感病毒蛋白或其片段的抗体以及通过本文公开的筛选测定鉴定的其他分子的抗体,可以以药物组合物的形式施用用于治疗流感病毒相关病症。制备此类组合物所涉及的原则和考虑因素以及组分选择中的指导例如在下述中提供:Remington: The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R. Gennaro等人,编辑)Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995;Drug Absorption Enhancement: Concepts,

Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 和 Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第4卷), 1991, M. Dekker, New York.

[0133] 当使用抗体片段时, 优选特异性结合靶蛋白的结合结构域的最小抑制片段。例如, 基于抗体的可变区序列, 可以设计保留结合靶蛋白序列的能力的肽分子。这些肽可以通过重组DNA技术化学合成和/或产生。(参见例如 Marasco 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993))。该制剂还可以包含对于待治疗的特定适应症必需的多于一种活性化合物, 优选不会不利地影响彼此的具有互补活性的那些。可替代地或另外, 组合物可以包含增强其功能的试剂, 例如细胞毒素剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。这些分子适当地以对于预期目的有效的量组合存在。

[0134] 还可以将活性成分包埋在微胶囊、胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗滴乳状液中, 所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备, 例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。

[0135] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这通过经由无菌过滤膜的过滤容易地实现。

[0136] 可以制备持续释放制备物。持续释放制备物的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质, 所述基质为成形制品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)和聚-D-(-)-羟基丁酸。虽然聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得分子释放能够超过100天, 但某些水凝胶释放蛋白质的时间段较短。

[0137] 根据本发明的抗体可以用作用于检测样品中流感病毒(或其蛋白质或蛋白质片段)的存在的试剂。优选地, 抗体含有可检测标记物。抗体可以是多克隆的, 或更优选地, 单克隆的。可以使用完整抗体或其片段(例如 F_{ab} 、scFv或 $F_{(ab)2}$)。关于探针或抗体, 术语“标记的”预期涵盖通过将可检测物质与探针或抗体偶联(即物理连接)的探针或抗体的直接标记, 以及通过与直接标记的另一种试剂的反应性的探针或抗体的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗, 和用生物素末端标记DNA探针, 使得它可以用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样品”预期包括从主体分离的组织、细胞和生物流体, 以及存在于主体内的组织、细胞和流体。因此, 在术语“生物样品”的使用中包括的是血液和血液的级分或组分, 包括血清、血浆或淋巴。即, 本发明的检测方法可以用于在体外和在体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如, 用于检测分析物mRNA的体外技术包括RNA杂交和原位杂交。用于检测分析物蛋白质的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括DNA杂交。用于进行免疫测定的程序例如在下述中描述: “ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, 第42卷, J. R. Crowther(编辑) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis和T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; 以及 “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985。此外, 用于检测分析物蛋白

质的体内技术包括将标记的抗分析物蛋白质抗体引入主体内。例如，抗体可以用放射性标记物进行标记，所述放射性标记物在主体中的存在和定位可以通过标准成像技术进行检测。

[0138] 药物组合物

[0139] 本发明的抗体或试剂(在本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同系物可以掺入适于施用的药物组合物内。这样的组合物通常包含抗体或试剂和药学可接受的载体。如本文使用的，术语“药学可接受的载体”预期包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。合适的载体在最新版本的Remington's Pharmaceutical Sciences(本领域的标准参考文本)中描述，其引入本文作为参考。这种载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介物如不挥发性油。这种介质和试剂用于药物活性物质的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则考虑其在组合物中的使用。补充的活性化合物也可以掺入组合物内。

[0140] 本发明的药物组合物被配制为与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即，局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可以包括下述组分：无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节张力的试剂例如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱如盐酸或氢氧化钠进行调节。肠胃外制备物可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0141] 适合于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(当水溶性时)或分散体和用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备物的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、CremophorEL((BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，组合物都必须是无菌的，并且应该流动至存在容易注射性的程度。它在制造和贮存的条件下必须是稳定的，并且必须针对微生物如细菌和真菌的污染作用进行防腐。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。适当的流动性可以通过下述得到维持：例如通过使用包衣例如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需粒子大小和通过使用表面活性剂。微生物作用的预防可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等。在许多情况下，优选在组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来实现，所述试剂例如单硬脂酸铝和明胶。

[0142] 无菌可注射溶液可以通过下述进行制备：根据需要，将所需量的活性化合物与上文列举的成分之一或组合掺入适当的溶剂中，随后为过滤灭菌。一般地，通过将活性化合物掺入无菌媒介物内进行制备，所述无菌媒介物含有碱性分散介质和来自上文列举那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其从先前无菌的过滤溶液得到活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0143] 经口组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压

制成片剂。为了经口治疗施用的目的,活性化合物可以与赋形剂混合,并且以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。经口组合物也可以使用流体载体制备用于用作漱口剂,其中流体载体中的化合物被经口应用并且漱口且吐出或吞咽。药学相容的结合剂和/或佐剂材料可以包括作为组合物的部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等等可以含有下述成分或类似性质的化合物中的任一种:粘合剂如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖,崩解剂如藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味料。

[0144] 对于通过吸入施用,化合物以气溶胶喷雾的形式从增压容器或分配器或喷雾器中递送,所述增压容器或分配器含有合适的推进剂,例如气体如二氧化碳。

[0145] 全身施用也可以通过经粘膜或经皮手段。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用对于待渗透的屏障适当的渗透剂。这种渗透剂是本领域一般已知的,并且对于经粘膜施用,包括例如洗涤剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用,将活性化合物配制如本领域一般已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0146] 化合物还可以以栓剂(例如使用常规栓剂基质如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂的形式制备用于直肠递送。

[0147] 在一个实施方案中,用载体制备活性化合物,所述载体将保护化合物免于从体内快速消除,例如控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这些制剂的方法对于本领域技术人员是显而易见的。这些材料也可以从Alza Corporation 和Nova Pharmaceuticals, Inc商购获得。脂质体悬浮液(包括具有针对病毒抗原的单克隆抗体的靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法进行制备,例如如美国专利4,522,811中所述。

[0148] 尤其有利的是以剂量单位形式配制经口或肠胃外组合物,以便于施用和剂量的均匀性。如本文使用的,剂量单位形式指适合作为用于待治疗主体的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,其被计算为产生与所需药物载体相关的所需疗效。本发明的剂量单位形式的规格由下述指定并且直接取决于下述:活性化合物的独特特征和待实现的具体疗效,以及将这种活性化合物配制用于治疗个体的领域中固有的局限性。

[0149] 药物组合物可以连同施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0150] 筛选方法

[0151] 本发明提供了用于鉴定调节剂,即候选或测试化合物或试剂(例如肽、拟肽、小分子或其他药物)的方法(本文也称为“筛选测定”),所述调节剂调节或以其他方式干扰流感病毒与细胞膜的融合。还提供的是鉴定可用于治疗流感感染的化合物的方法。本发明还涵盖了使用本文所述的筛选测定鉴定的化合物。

[0152] 例如,本发明提供了用于筛选候选或测试化合物的测定,所述候选或测试化合物调节流感病毒和细胞膜之间的相互作用。本发明的测试化合物可以使用本领域已知的组合文库方法中的众多方法中的任一种获得,所述方法包括:生物文库;空间可寻址的平行固相或溶液相文库;需要去卷积的合成文库方法;“一珠一化合物”文库方法;以及使用亲和层析选择的合成文库方法。生物文库方法仅限于肽文库,而其他四种方法适用于化合物的肽、非

肽寡聚体或小分子文库。(参见例如,Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145)。

[0153] 如本文使用的,“小分子”意指具有小于约5 kD,且最优先小于约4 kD的分子量的组合物。小分子可以是例如核酸、肽、多肽、拟肽、碳水化合物、脂质或者其他有机或无机分子。化学和/或生物混合物例如真菌、细菌或藻类提取物的文库是本领域已知的,并且可以用本发明的任何测定进行筛选。

[0154] 用于合成分子文库的方法的实例可以在本领域中找到,例如:DeWitt等人,1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909;Erb等人,1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422;Zuckermann等人,1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678;Cho等人,1993. *Science* 261: 1303;Carrell等人,1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059;Carell等人,1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061;and Gallop等人,1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233。

[0155] 化合物的文库可以存在于溶液中(参见例如Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421)、或在珠上(参见Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84)、在芯片上(参见Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556)、细菌(参见美国专利号5,223,409)、孢子(参见美国专利5,233,409)、质粒(参见Cull等人,1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869)或在噬菌体上(参见Scott和Smith, 1990. *Science* 249: 386-390;Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406;Cwirla等人,1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378-6382;Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310;和美国专利号5,233,409)。

[0156] 在一个实施方案中,将候选化合物引入抗体-抗原复合物中,并且测定候选化合物是否破坏抗体-抗原复合物,其中该复合物的破坏指示候选化合物调节流感病毒与细胞膜之间的相互作用。

[0157] 在另一个实施方案中,提供了至少一种HA蛋白,其暴露于至少一种中和性单克隆抗体。检测抗体-抗原复合物的形成,并且将一种或多种候选化合物引入复合物中。如果在引入一种或多种候选化合物之后,抗体-抗原复合物被破坏,则候选化合物可用于治疗流感病毒有关的疾病或病症,例如禽流感。例如,至少一种流感病毒蛋白可以作为流感病毒分子提供。

[0158] 测定测试化合物干扰或破坏抗体-抗原复合物的能力可以例如通过下述来实现:将测试化合物与放射性同位素或酶促标记物偶联,使得测试化合物与抗原或其生物学活性部分的结合可以通过检测复合物中的标记化合物来测定。例如,测试化合物可以直接或间接地用¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³H进行标记,并且通过射电的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。可替代地,测试化合物可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或萤光素酶进行酶促标记,并且通过测定适当底物转换为产物来检测酶促标记物。

[0159] 在一个实施方案中,测定包括使抗体-抗原复合物与测试化合物接触,并且测定测试化合物与抗原相互作用或以其他方式破坏现有抗体-抗原复合物的能力。在该实施方案中,测定测试化合物与抗原相互作用和/或破坏抗体-抗原复合物的能力包括与抗体相比,测定测试化合物优先结合抗原或其生物学活性部分的能力。

[0160] 在另一个实施方案中,测定包括使抗体-抗原复合物与测试化合物接触,并且测定测试化合物调节抗体-抗原复合物的能力。测定测试化合物调节抗体-抗原复合物的能力可以例如通过在测试化合物存在下,测定抗原结合抗体或与抗体相互作用的能力来实现。

[0161] 本领域技术人员将认识到,在本文公开的任何筛选方法中,抗体可以是流感病毒中和抗体。另外,抗原可以是HA蛋白或其一部分。在本文所述的任何测定中,候选化合物干扰本发明的单克隆抗体与HA蛋白之间的结合的能力指示候选化合物能够干扰或调节流感病毒和细胞膜的融合。此外,因为HA蛋白与细胞的结合负责流感病毒进入细胞内,所以候选化合物也可用于治疗流感病毒相关的疾病或病症,例如禽流感。

[0162] 本文公开的筛选方法可以作为基于细胞的测定或作为无细胞测定来执行。本发明的无细胞测定顺应HA蛋白及其片段的可溶形式或膜结合形式两者的使用。在包含HA蛋白的膜结合形式的无细胞测定的情况下,可能期望利用增溶剂,使得蛋白质的膜结合形式维持在溶液中。这种增溶剂的实例包括非离子洗涤剂,例如n-辛基葡萄糖苷、n-十二烷基葡萄糖苷、n-十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、Triton[®] X-100、Triton[®] X-114、Thesit[®]、异十三烷基聚(乙二醇醚)_n、N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙烷磺酸盐、3-(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基-1-丙烷磺酸盐(CHAPS)、或3-(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPSO)。

[0163] 在多于一个实施方案中,可能期望固定抗体或抗原,以促进在引入候选化合物后一种或两种的复合形式与未复合形式的分离,以及适应测定的自动化。在候选化合物的存在和不存在下,抗体-抗原复合物的观察可以在适合于含有反应物的任何容器中完成。这种容器的实例包括微量滴定板、试管和微型离心管。在一个实施方案中,可以提供融合蛋白,其加入允许蛋白质之一或两者与基质结合的结构域。例如,可以将GST-抗体融合蛋白或GST-抗原融合蛋白吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠(Sigma Chemical, St. Louis, MO)或谷胱甘肽衍生的微量滴定板上,然后将其与测试化合物组合,并且将混合物在有助于复合物形成的条件下(例如在盐和pH的生理条件下)温育。在温育后,洗涤珠或微量滴定板孔,以去除任何未结合的组分、在珠子的情况下固定的基质、直接或间接测定的复合物。可替代地,复合物可以从基质解离,并且可以使用标准技术测定抗体-抗原复合物形成的水平。

[0164] 用于将蛋白质固定在基质上的其他技术也可以用于本发明的筛选测定中。例如,抗体或抗原(例如可以利用生物素和链霉抗生物素蛋白的缀合进行固定。生物素化的抗体或抗原分子可以使用本领域众所周知的技术从生物素NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)进行制备(例如生物素化试剂盒,Pierce Chemicals, Rockford, IL),并且固定在链霉抗生物素蛋白包被的96孔板(Pierce Chemical)的孔中,可替代地,与目标抗体或抗原反应但不干扰目标抗体-抗原复合物形成的其他抗体可以衍生至平板的孔,并且未结合的抗体或抗原通过抗体缀合捕获在孔中。除上述用于GST-固定复合物的那些之外,用于检测这种复合物的方法包括使用与抗体或抗原反应的其他抗体的复合物的免疫检测。

[0165] 本发明进一步涉及通过前述筛选测定中的任一种鉴定的新型试剂及其用于如本文所述的治疗的用途。

[0166] 诊断测定

[0167] 本发明的抗体可以通过适当的测定,例如常规类型的免疫测定进行检测。例如,可以执行其中将流感蛋白(例如HA1、HA2或神经氨酸酶)或其片段附着至固相的测定。将温育维持足够的时间段,以允许样品中的抗体与固相上的固定化多肽结合。在此第一次温育后,将固相与样品分开。洗涤固相以去除未结合的材料和干扰物质(例如也可能存在于样品中的非特异性蛋白质)。随后将含有与固定化多肽结合的目标抗体的固相与第二标记抗体或

结合偶联剂如生物素或抗生物素蛋白的抗体一起温育。该第二抗体可以是另一种抗流感抗体或另一种抗体。用于抗体的标记是本领域众所周知的,包括放射性核素、酶(例如马来酸脱氢酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶)、荧光染料(fluor)(异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻蓝蛋白、荧光胺)、生物素等等。将标记的抗体与固体一起温育,并且测量与固相结合的标记。这些和其他免疫测定可以由本领域普通技术人员容易地执行。

[0168] 用于检测流感病毒在生物样品中的存在或不存在的示例性方法涉及从测试主体获得生物样品,并且使生物样品与根据本发明的标记的单克隆或scFv抗体接触,使得在生物样品中检测到流感病毒的存在。

[0169] 如本文使用的,关于探针或抗体,术语“标记的”预期涵盖通过将可检测物质与探针或抗体偶联(即物理连接)的探针或抗体的直接标记,以及通过与直接标记的另一种试剂的反应性的探针或抗体的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗,并且用生物素末端标记DNA探针,使得它可以用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样品”预期包括从主体分离的组织、细胞和生物流体,以及存在于主体内的组织、细胞和流体。即,本发明的检测方法可以用于在体外和在体内检测生物样品中的流感病毒。例如,用于检测流感病毒的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。此外,用于检测流感病毒的体内技术包括将标记的抗流感病毒抗体引入主体内。例如,抗体可以用放射性标记物进行标记,所述放射性标记物在主体中的存在和位置可以通过标准成像技术进行检测。

[0170] 在一个实施方案中,生物样品含有来自测试主体的蛋白质分子。一种优选的生物样品是通过常规手段从主体分离的外周血白细胞样品。

[0171] 本发明还涵盖用于检测生物样品中流感病毒的存在的试剂盒。例如,试剂盒可以包括:能够检测生物样品中的流感病毒的标记化合物或试剂(例如抗流感scFv或单克隆抗体);用于测定样品中的流感病毒的量的手段;以及用于将样品中的流感病毒的量与标准相比较的手段。化合物或试剂可以包装在合适的容器中。试剂盒可以进一步包括关于使用试剂盒检测样品中的流感病毒的说明书。

[0172] 被动免疫接种

[0173] 被动免疫接种已证明是用于预防和治疗病毒疾病的有效和安全的策略。(参见Keller等人,Clin. Microbiol. Rev. 13:602-14 (2000);Casadevall, Nat. Biotechnol. 20:114 (2002);Shibata等人,Nat. Med. 5:204-10 (1999);和Igarashi等人,Nat. Med. 5:211-16 (1999),其各自通过引用并入本文)。使用中和性人单克隆抗体的被动免疫接种可以提供立即的治疗策略用于禽流感例如流感的紧急预防和治疗,而疫苗和新药的替代和更耗时的开发在进行中。

[0174] 亚单位疫苗潜在地提供了超过常规免疫原的显著优点。它们避免了常规杀伤或减毒的全病原体疫苗的生产、分配和递送中固有的安全隐患。此外,它们可以被合理地设计为仅包括确认的保护性表位,从而避免抑制性T表位(参见Steward等人,J. Virol. 69:7668 (1995))或免疫显性B表位,其通过诱导无益、非保护性应答来破坏免疫系统(例如“诱饵”表位)。(参见Garrity等人,J. Immunol. 159:279 (1997))。

[0175] 此外,本领域技术人员将认识到,在体外抗体中和活性与针对许多不同病毒、攻击途径和动物模型的体内保护之间存在良好的相关性。(参见Burton, Natl. Rev. Immunol.

2:706-13 (2002); Parren等人, *Adv. Immunol.* 77:195-262 (2001)。本文呈现的数据证实D7、D8、F10、G17、H40、A66、D80、E88、E90和H98人单克隆抗体可以在体内动物研究中进一步开发且测试,以测定其作为用于紧急预防和治疗流感的有效病毒进入抑制剂的临床效用。

[0176] 疫苗接种中的抗原-Ig嵌合体

[0177] 自从第一种抗体用作支架用于将抗原决定簇有效呈递给免疫系统已过去十多年。(参见Zanetti, *Nature* 355:476-77 (1992); Zaghouani等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:631-35 (1995))。当肽被包括作为IgG分子的整体部分(例如本文所述的11A或256IgG1单克隆抗体)时,与游离肽相比,肽表位的抗原性和免疫原性得到极大增强。这种增强可能是由于抗原-IgRNA嵌合体更长的半衰期、更好的呈递和受限的构象,这模拟其天然结构。

[0178] 此外,使用抗原-Ig嵌合体的附加优点在于抗原-Ig嵌合体的可变区或Fc区可以用于靶向专职抗原呈递细胞(APC)。迄今为止,已生成了重组Igs,其中重链可变基因(V_H)的互补决定区(CDR)替换为由B或T细胞识别的各种抗原肽。这种抗原-Ig嵌合体已用于诱导体液和细胞免疫应答两者。(参Bona等人, *Immunol. Today* 19:126-33 (1998))。

[0179] 具有植入到CDR3环内的特异性表位的嵌合体已用于诱导针对HIV-1 gp120 V3环或人CD4受体的第一细胞外结构域(D1)的体液应答。(参见Lanza等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11683-87 (1993); Zaghouani等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:631-35 (1995))。免疫血清能够预防通过HIV-1MN(抗gp120 V3C)的CD4 SupT1细胞感染或抑制合胞体形成(抗CD4-D1)。CDR2和CDR3可以同时替换为肽表位,并且所插入的肽的长度可以长达19个氨基酸。

[0180] 可替代地,一个团体已开发了“troybody”策略,其中肽抗原存在于Ig恒定(C)区的环中,并且嵌合体的可变区可以用于靶向B细胞表面上的IgD,或专职APC包括B细胞、树突状细胞(DC)和巨噬细胞上的MHC II类分子。(参见Lunde等人, *Biochem. Soc. Trans.* 30: 500-6 (2002))。

[0181] 抗原-Ig嵌合体也可以通过将抗原与IgG分子的Fc部分直接融合来制备。You等人, *Cancer Res.* 61:3704-11 (2001)能够使用该方法获得特异性免疫应答的所有臂(arm),包括针对乙型肝炎病毒核心抗原的非常高水平的抗体。

[0182] DNA疫苗接种

[0183] DNA疫苗是稳定的,可以为抗原提供天然加工的机会,并且可以诱导更持久的反应。虽然是非常有吸引力的免疫接种策略,但DNA疫苗通常具有非常有限的诱导免疫应答的效力。注入的DNA通过专职APC如树突状细胞(DC)的弱摄取可能是这种限制的主要原因。与抗原-Ig嵌合体疫苗组合的、基于APC抗原呈递增强的有希望的新DNA疫苗策略已得到报道(参见Casares等人, *Viral Immunol.* 10:129-36 (1997); Gerloni等人, *Nat. Biotech.* 15:876-81 (1997); Gerloni等人, *DNA Cell Biol.* 16:611-25 (1997); You等人, *Cancer Res.* 61:3704-11 (2001)),其利用DC表面上Fc受体(Fc γ R)的存在。

[0184] 能够生成编码抗原(Ag)-Ig嵌合体的DNA疫苗。在免疫接种后,Ag-Ig融合蛋白被吸收DNA分子的细胞表达且分泌。在诱导B细胞应答的同时,分泌的Ag-Ig融合蛋白可以通过Fc片段与DC表面上的Fc γ R的相互作用来捕获且内化,这将促进有效的抗原呈递且极大增强

了抗原特异性免疫应答。应用相同的原理,携带功能性抗MHC II特异性scFv区域基因的编码抗原-Ig嵌合体的DNA也可以将免疫原靶向所有三种类型的APC。需要时,可以使用在体外生成的相同的蛋白质抗原来进一步加强免疫应答(即,“引发和加强”)。使用这种策略,通过DNA疫苗的肌内(i.m.)注射来实现针对流感病毒感染的特异性细胞和体液免疫应答。(参见Casares等人,Viral. Immunol. 10:129-36 (1997))。

[0185] **疫苗组合物**

[0186] 本文提供了治疗或预防组合物,其一般包含一种或多种单克隆抗体或ScFv及其组合的混合物。预防性疫苗可以用于预防流感病毒感染,并且治疗性疫苗可以用于治疗流感病毒感染后的个体。预防用途包括在疫苗接种主体中提供针对流感病毒增加的抗体滴度。以这种方式,处于接触流感的高风险中的主体可以提供针对流感病毒的被动免疫。

[0187] 这些疫苗组合物可以与辅助免疫调节剂结合施用。例如,细胞因子、淋巴因子和趋化因子,包括但不限于IL-2、经修饰的IL-2(Cys125 → Ser125)、GM-CSF、IL-12、γ-干扰素、IP-10、MIP1β和RANTES。

[0188] **免疫接种方法**

[0189] 本发明的疫苗具有超过其他抗病毒疫苗的优异的免疫保护和免疫治疗特性。

[0190] 本发明提供了主体的免疫接种例如诱导免疫应答的方法。通过向主体施用含有致病性有包膜病毒的膜融合蛋白的组合物来免疫主体。融合蛋白被包被或嵌入生物相容性基质中。

[0191] 融合蛋白是糖基化的,例如含有碳水化合物部分。碳水化合物部分可以是以单糖、二糖、寡糖、多糖或其衍生物(例如碘基或磷酸取代的)的形式。碳水化合物是直链或支化的。碳水化合物部分与多肽N联或O联。N联糖基化是天冬酰胺侧链的酰胺氮,并且O联糖基化是丝氨酸和苏氨酸侧链的羟基氧。

[0192] 碳水化合物部分对于待接种疫苗的主体是内源的。可替代地,碳水化合物部分对于待接种疫苗的主体是外源的。碳水化合物部分是待接种疫苗的主体的多肽上通常不表达的碳水化合物部分。例如,碳水化合物部分是植物特异性碳水化合物。植物特异性碳水化合物部分包括例如具有核心结合的α1,3岩藻糖或核心结合的β1,2木糖的N联聚糖。可替代地,碳水化合物部分是在待接种疫苗的主体的多肽或脂质上表达的碳水化合物部分。例如,许多宿主细胞已被遗传工程改造,以产生具有人样糖附着的人蛋白质。

[0193] 例如,融合蛋白是三聚体血凝素蛋白。任选地,血凝素蛋白在非哺乳动物细胞如植物细胞中产生。

[0194] 主体处于发展或患有病毒感染的风险中。有包膜病毒包括例如EB病毒、1型和2型单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒、8型人疱疹病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒和风疹病毒。

[0195] 本文描述的方法导致病毒感染的一种或多种症状的严重性中的降低或缓解。通常由医师使用标准方法来诊断和或监测感染。需要免疫接种的主体通过本领域已知的方法进行鉴定。例如,主体如CDC's General Recommendation on Immunization (51(RR02)第1-36页)中概述的进行免疫。例如,通过体检、活组织检查、血液检查或x射线诊断癌症。

[0196] 主体是例如任何哺乳动物,例如人、灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、猪、鱼

或鸟。治疗在感染诊断之前施用。可替代地,治疗在诊断之后施用。

[0197] 与用于诊断或治疗特定病症或感染的任何已知方法相关联来测定治疗的有效性。病症的一种或多种症状的减轻指示该化合物赋予临床益处。

[0198] 抗原蛋白片段(APF)关于疫苗潜力的评估

[0199] 靶向体液免疫的候选疫苗必须满足至少三个标准才能成功:它必须引发强烈的抗体应答(“免疫原性”);它引发的显著部分的抗体必须与病原体交叉反应(“免疫原性适应度”);它引发的抗体必须是保护性的。虽然通常可以使用佐剂或载体增强免疫原性,但免疫原性适应度和诱导保护的能力(如通过中和证明的)是抗原的固有特性,其将最终测定该抗原作为疫苗组分的成功。

[0200] 免疫原性适应度的评估

[0201] “免疫原性适应度”定义为由与病原体交叉反应的抗原诱导的抗体的分数。(参见Matthews等人,J. Immunol. 169:837 (2002))。它不同于免疫原性,其通过由抗原诱导的所有抗体(包括与病原体不交叉反应的那些抗体)的滴度来判定。不足够的免疫原性适应度很可能促成迄今为止令人失望的肽疫苗记录。以高亲和力结合抗体并且引发高抗体滴度的肽经常缺乏足够的免疫原性适应度,并且因此它们不能作为潜在的疫苗组分。因此,重要的是包括免疫原性适应度作为用于选择流感疫苗候选者的标准之一。

[0202] 关于不良免疫原性适应度的常见解释是大多数短肽的构象柔性。具体地,柔性肽可以良好结合来自患者的抗体,并且在首次用于实验的主体中引发显著的抗体滴度。然而,如果肽具有大量构象储库,则它在首次用于实验的主体中诱导的抗体优势可能不能与完整病原体上相应的天然表位交叉反应。

[0203] 像短肽一样,一些APF可能是高度柔性的,并且因此可能不能作为疫苗组分。最大免疫原性适应度的APF可能由自身折叠的蛋白质亚结构域组成,所述亚结构域被固有地约束在整个蛋白质的背景之外。

[0204] 因为免疫原性适应度主要是APF本身的特性,而不是响应免疫系统的特性,所以即使最终APF必须在人中执行,也可以在动物模型(例如小鼠)中评估免疫原性适应度。

[0205] 在类似于Matthews等人,J. Immunol. 169:837 (2002)中所述那种的程序中,通过抗APF血清与纯化的掺料或膜蛋白的免疫吸附来评估通过APF实现的免疫原性适应度。从已免疫的小鼠收集的血清中纯化IgG。纯化的生物素化蛋白(适当时,取决于小鼠用其免疫的特定APF)与小鼠IgG混合并且温育。然后以足够数量加入链霉抗生物素蛋白包被的琼脂糖珠,以捕获所有生物素化的蛋白质连同任何结合的IgG。通过在微量离心机中以13,000 rpm离心去除链霉抗生物素蛋白包被的珠,留下已耗尽的针对蛋白质的抗体的IgG。以相同的方式平行执行模拟免疫吸附,除了生物素化的BSA将取代流感蛋白作为模拟吸收剂。

[0206] 为了测量APF的免疫原性适应度,在ELISA中针对免疫APF将吸收的抗体和模拟吸收的抗体并排滴定。对于从噬菌体展示的NPL选择的APF亲和力,用于这些ELISA的抗原将是纯化的APF-GST融合蛋白。对于来自哺乳动物细胞展示的NPL的潜在糖基化APF,用于这些ELISA的抗原将是由哺乳动物细胞分泌并且用蛋白A纯化的APF-Fc融合蛋白。与模拟吸收抗体相比,吸收的抗体的抗APF滴度中的百分比降低将提供APF的免疫原性适应度的量度。

[0207] 治疗方法

[0208] 本发明提供了治疗处于流感病毒相关疾病或病症的风险中(或易感)的主体的预

防和治疗方法。这些疾病或病症包括但不限于例如禽流感。

[0209] 预防方法

[0210] 在一个方面,本发明提供了通过向主体施用本发明的单克隆抗体或scFv抗体或者根据本发明的方法鉴定的试剂,用于预防主体中的流感病毒相关疾病或病症的方法。例如,scFv和/或单克隆抗体可以以治疗有效量施用。任选地,共施用两种或更多种抗流感抗体。

[0211] 处于流感病毒相关疾病或病症的风险中的主体包括已与受感染个人接触或已以一些其他方式暴露于流感病毒的患者。预防试剂的施用可以在流感病毒有关疾病或病症特有症状体现之前发生,使得疾病或病症得到预防,或可替代地,在其进展中延迟。

[0212] 可以基于本文所述的筛选测定来测定适当的试剂。可替代地或另外,待施用的试剂是已根据本发明的方法鉴定的中和流感病毒的scFv或单克隆抗体。

[0213] 治疗方法

[0214] 本发明的另一个方面涉及治疗患者中的流感病毒相关疾病或病症的方法。在一个实施方案中,该方法涉及将试剂(例如通过本文所述的筛选测定鉴定的试剂和/或根据本发明的方法鉴定的scFv抗体或单克隆抗体)或中和流感的试剂组合施用于患有疾病或病症的患者。例如,本发明的抗体可以与其他抗病毒剂如Tamiflu组合使用。

[0215] 本发明在下述实施例中进一步描述,所述实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

实施例

[0216] **实施例1:从单一记忆B细胞的培养物中分离针对流感病毒的bnAb**

[0217] 宽中和抗体(BnAb)分离程序的图示在图1中描绘。为了从人记忆B细胞储库中分离针对流感病毒的bnAb,我们建立了快速可靠的培养方法,其允许在体外的人记忆B细胞活化和分化。使用四聚H3(A/Brisbane/10/07)三聚体从7个健康供体的外周血单核细胞(PBMC)中分离抗原特异性人记忆B细胞(CD19+CD27+);仅0.19%-1.08%的记忆B细胞与H3反应(表3)。将这些B细胞以一个细胞/孔的密度分选到384孔板内,并且在受辐射的CD40L转染细胞的存在下培养。在14天后,发现衍生自7个供体的1051个(2688个培养物中的39.1%)培养上清液分泌IgG或IgM,并且随后测试与乙型流感病毒的H3(A/Brisbane/10/07)、H7(A/Canada/RV444/04)、H1(A/California/04/09)和HA(B/Malaysia/2506/04)的反应性。通过该筛选,发现237个(22.55%)扩增的记忆B细胞分泌与H3结合的Ig(表3)。与仅通过分选加上RT-PCR的0.61%回收相比,这种体外扩增步骤导致H3反应性B细胞回收中的37倍增加(数据未显示)。组2毒株H3/H7内的交叉反应性克隆的平均百分比为18.14%。值得注意的是,H3结合克隆中的13.08%和8.44%分别显示与1组H1毒株和H7/H1毒株的异源亚型结合。发现仅3.38%的H3-反应性(H3+)克隆也结合乙型流感。接下来,就针对H3N2(A/Brisbane/10/07)的微量中和测试显示异源亚型结合的记忆B细胞克隆的上清液。进一步表征衍生自供体3的一种bnAb,3I14,其显示H3/H7/H1交叉反应性和中和。

表3: 7个健康供体中的扩增的记忆B细胞 (mB)

供体#	H3 ⁺ 群体 mB (CD19 ⁺ /CD27 ⁺)	可克隆的 H3 ⁺ mB	与 H7 ⁺ 交叉的可 克隆的 H3 ⁺ mB	与 H1 ⁺ 交叉的可 克隆的 H3 ⁺ mB	与 H1 ⁺ /H7 ⁺ 交叉的可 克隆的 H3 ⁺ mB	与 B ⁺ 交叉的可 克隆的 H3 ⁺ mB
1	0.94 %	29	0	1	0	1
2	0.30 %	32	6	1	0	0
3	0.32 %	29	8	10	6	0
4	0.19 %	28	4	2	1	0
5	0.95 %	31	2	0	0	2
6	0.51 %	66	20	14	11	5
7	1.08 %	22	3	3	2	0
总共	-	237	43	31	20	8
平均百分比(%)	0.61	22.55*	18.14**	13.08**	8.44**	3.38**

*百分比可克隆的mB来自1051个Ig阳性培养物。**百分比可克隆的mB来自237个H3阳性培养物。

[0219] 3I14是高度突变的IGHV3-30编码的抗体

[0220] 为了评价体细胞突变对亲和力成熟的贡献,我们产生了3I14 VH和VL种系形式(3I14-GL),以及由与种系(g)轻链配对的成熟(m)3I14重链形成的嵌合抗体(3I14-mHgL),以及相反情况(3I14-gHmL)(图11)。3I14变体抗体作为人IgG1表达,并且评估其针对H1、H5和H3的结合亲和力(表4和图20)。值得注意的是,3I14-GL变体仍然在nM和亚nM范围内结合H3和H1,同时分别显示与H3的结合亲和力中的>15倍降低以及与H1的结合亲和力中的4.7倍增加(表4)。3I14-GL对H3和H1的结合亲和力中的这些变化主要分别通过K_{off}中的13.9或7.5倍增加和减少引起。有趣的是,在这些测定条件下,3I14-GL不结合H5。

表4 3I14种系变体的结合亲和力

3I14 变体	H5-VN04			H3-PE09			H1-CA09		
	K _d (nM)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _d (nM)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _d (nM)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)
GL	n*	n*	n*	4.02 (-Δ15.3)	1.39E+05	5.56E-04 (-Δ13.9)	0.0597 (Δ 4.7)	1.09E+05	6.50E-06 (Δ7.5)
mHgL	7.71 (-Δ7.5)	2.58E+05	1.99E-03 (-Δ5.2)	0.658 (-Δ2.5)	1.92E+05	1.26E-04 (-Δ3.2)	<0.001**	1.38E+05	<1.0E-07**
gHmL	1.95 (-Δ1.9)	4.34E+05	8.44E-04 (-Δ2.2)	0.733 (-Δ2.7)	1.71E+05	1.25E-04 (-Δ3.1)	<0.001**	1.55E+05	<1.0E-07**
3I14 WT	1.02	3.75E+05	3.83E-04	0.263	1.52E+05	3.99E-05	0.279	1.74E+05	4.87E-05

(Δ) 指示与WT相比的倍数增加或 (-Δ) 指示与WT相比的倍数降低。

*n指示未检测到结合。**指示无可检测的解离。

[0222] 将两种嵌合形式与野生型(WT)3I14进行比较,3I14的VH和VL两者中存在的体细胞突变看起来对H3结合(K_d:0.658 nM相对于0.733 nM)作出相同的贡献。另外,重链和轻链嵌合体两者均导致与H1基本上不可逆的结合,其中K_{off} < 1.0E-7 s⁻¹。然而,在H5的情况下,分别由于K_{off}中的5.2倍和2.2倍降低,VL突变对亲和力增加的贡献比VH突变更多(7.5倍相对于1.9倍)。根据这些研究,我们得出结论,3I14-GL显示与H1更高亲和力的结合和与H3的中等亲和力,其中K_{off}中的变化在很大程度上负责与3I14-WT相比的动力学差异。对于H5结合,3I14中的体细胞突变是结合绝对必需的,其中VL突变对结合提供的贡献比VH变化更大。对于H1、H3和H5的结合亲和力中的所有变化主要是解离速率(K_{off})常数变化中的结果。

[0223] 使用RT-PCR从扩增的单细胞培养物中回收重链(VH)和轻链(VL)可变区的序列。3I14由IGHV3-30*18和IGLV1-44*01种系基因编码。重排的重链具有长的互补决定区3(HCDR3)(23个氨基酸),并且使用在VH和IGHJ4*02连接处由大的N添加侧接的IGHD3-22*01DH区段(图11C和11D)。3I14 mAb具有15个可变重链和7个可变轻链体细胞突变,排除引物-侧翼区,其在构架和CDRs中两者均观察到。

[0224] 实施例2:3I14 赋予对组1和组2流感病毒的结合和中和

[0225] 通过流式细胞术,3I14结合跨越组2(H3、H4、H7、H14和H15)和组1(H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12和H16)甲型流感两者的血清型的细胞表面表达的HA(图2)。3I14还以范围为

0.01 nM至10 nM的解离常数(Kd)结合属于组2(H3、H4、H7和H14)和组1(H1、H5和H9)的不同亚型的纯化HA蛋白(图3和图15C)。3I14以高亲和力(平均Kd < 0.1 nM)结合所有测试的组2 HA (H3、H4、H7和H14)。另外,3I14以高亲和力结合组1 H1亚型 (H1-CA09、H1-SI06和H1-PR8),而它对其他组1亚型 (H5-VN04、H5-IN05和H9-HK99)的亲和力较低(分别为平均Kd = 1.02、1.05和5.23 nM)。

[0226] 3I14有效中和众多组2(H3和H7)病毒,包括两个重配株病毒毒株(A/Wisconsin/67/05(HA、NA) x A/Puerto Rico/8/34和A/Aichi/2/68(HA、NA) x A/Puerto Rico/8/34)和新型H7N9-AH13毒株,其半最大抑制浓度(IC50)值范围为0.032至1.074 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (图4和图17)。它还中和假病毒H7N1-FPN和H7N1-NL219毒株,其IC50值范围为0.007至0.027 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (图5B和图17)。另外,分别地,3I14以0.225和0.413 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 的IC50值中和组1 H1毒株(H1-CA09和H1-PR8)(图5B和图10),并且以0.040和0.008 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 的IC50值中和假病毒H5-VN04和H5-HK97毒株(图5B和图17)。

[0227] 实施例3:3I14 IgG1结合(KD值)

[0228] 使用Octet® REDET仪器(ForteBio, Inc.)在25°C下在生物层干涉测量进行结合重组HA三聚体的bnAb的动力学分析。将以5 nM的bnAb IgG1捕获到Pierce无蛋白质封闭缓冲液(具有Tween-20的PBS)中的抗人IgG Fc生物传感器上180秒。重组全长HA以范围为6.25至100 nM的浓度装载。所有实验都含有另外的抗人IgG Fc抗体生物传感器,其测试HA和抗人IgG Fc之间潜在的非特异性相互作用。对于kon的测量,通过将传感器暴露于至多高达20个浓度的HA,测量3I14 IgG1的结合共600秒。对于koff的测量,测量3I14 IgG1的解离共900秒。使用ForteBio Data Analysis 7.0软件计算亲和常数(Kd)。

[0229] 3I14以范围为0.01 nM和10 nM的Kd值结合属于组1(H1和H5)和组2(H3、H4、H7和H14)的不同亚型的纯化的HA蛋白(图3)。3I14以高亲和力(平均Kd < 0.1 nM)结合大多数组2 HA (H3、H4、H7和H14)。相比之下,3I14以高亲和力结合H1亚型 (H1-CA409、H1-SI06和H1-PR8),而它对其他组1亚型 (H5-VN04和H5-IN05)的亲和力明显更低(平均Kd > 1 nM)。

[0230] H1亚型A/California/04/09(H1-CA409)、A/Solomon Island/3/06(H1-SI06)和A/Puerto Rico/8/34(H1-PR8);H3 subtypes A/Perth/16/09(H3-PE09)、A/Uruguay/716/07(H3-UY07)、A/Wisconsin/67/05(H3-WI05)、A/Brisbane/10/07(H3-BR07)、A/New York/55/04(H3-NY04)、和A/Victoria/341/11(H3-VIC11);H5 A/Vietnam/1203/04(H5-VN04)、A/Hong Kong/213/03(H5-HK03)和A/Indonesia/05/05(H5-ID05);H7 A/Netherlands/219/03(H7-NL219)、A/Canada/RV444/04(H7-CA444)和A/Anhui/1/13(H7-AH13)的重组全长HA蛋白(rHA)得自NIH BEIR Repository(NIAID, NIH)。重组全长H3A/Wisconsin/12/2010(H3-WI10)得自Influenza Reagent Resources(IRR, Manassas, USA)。亚型H3 A/Aichi/2/68(H3-A268)、H4 A/mallard/Netherlands/2/05(H4-NL05)和H14 A/mallard/Astrakhan/263/82(H14-AS82)的重组全长HA由Dr. R. C. Liddington(Burnham Institute for Medical Research, CA, USA)赠予。

[0231] 实施例4. 3I14 IgG1中和(IC50值)

[0232] IC50图描绘了2-3次独立实验的平均中和滴定度。3I14表示为正方形,而抗组1 mAb F10 IgG1(表示为三角形)用作对照(图4和5)。

[0233] 将MDCK细胞(1.5×10^4 个细胞/孔)接种到96孔组织培养板内,并且用PBS洗涤两

次,随后为在补充有2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶和0.5% BSA的DMEM中的温育。将100 TCID50(中值组织培养感染剂量)的病毒在96孔板中以等体积与两倍连续稀释的Ab或含抗体的上清液混合,并且在37°C下温育1小时。在温育后,将Ab-病毒混合物一式两份转移至汇合的MDCK单层,随后为在37°C下温育21小时。细胞用PBS洗涤,在丙酮中固定,并且通过用针对甲型流感病毒核蛋白(NP)的mAb(克隆A3,BEI)的间接ELISA检测病毒抗原。半最大抑制浓度(IC50)是在扣除背景后,与含有病毒对照的孔相比,在其下有效性降低50%的Ab浓度。

[0234] 3I14在体外中和组1(H1)和组2(H3和H7)病毒。3I14有效中和不同的H1、H3和H7病毒,其IC50值范围为0.032至1.336 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图4和图5)。

[0235] 实施例5. 代表组1和组2亚型的假病毒的3I14 IgG1中和(IC50值)。

[0236] IC50图描绘了2-3次独立实验的平均中和滴定度。3I14表示为正方形,而抗组1 mAb F10 IgG1(表示为三角形)用作对照。

[0237] 3I14有效中和H7N1-FPN和H7N1-NL219,所述两者为组2假病毒,其IC50值范围为0.032至1.336 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。它还中和组1假病毒H5-VN04和H5-HK97,其IC50值分别范围为2.137和4.601 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图5)。

[0238] 实施例6. 3I14在小鼠中针对组2和1流感病毒的预防功效

[0239] 我们将3I14转换为全长人IgG1,以在BALB/c小鼠模型中评估针对H5N1、H3N2、H7N7和H7N9感染的保护功效(图6)。抗组1 Ab, F1012用作毒株特异性对照。在用致死剂量的H7N7-NL219、H7N9-AH13、H3N2-BR07-ma和H5N1-VN04病毒攻击前一天,用不同剂量的3I14和F10IgG1处理小鼠。在H7N7-NL219或H7N9-AH13攻击后,使用5 mg kg^{-1} 3I14 IgG1的预防完全保护小鼠免于死亡,伴随在14至18天时最低限度的体重减轻(图6A)。在25 mg kg^{-1} 的剂量时,3I14 IgG1显示针对H3N2-BR07的80%保护,以及针对H5N1-VN04的60%保护。所有幸存的小鼠显示到观察期结束时重量减轻的逆转(图6b)。在通过用H3N2 BR07、H5N1 VN04、H7N9 AU13或H7N7 NL219流感病毒的i.n.接种的致死攻击前,将5只小鼠的组用25或5 mg/kg 纯化IgG腹膜内处理24小时。用bnAb 3I14(红色)、组1对照mAb F10(黑色)和组2对照mAb A533(蓝色)处理的小鼠的(A)存活率(%)和(B)体重变化(%)。

[0240] 在实验前一天,在0.5 mL体积中通过腹膜内(i.p.)途径分别以5 mg/kg 的低浓度和20或25 mg/kg 的高浓度,用3I14、F10和A533-IgG1注射5只雌性8-10周龄BALB/c小鼠的组。6组小鼠鼻内感染10 LD50的小鼠适应的A/Vietnam/1203/04(H5N1)、A/Brisbane/10/07(H3N2)、A/Netherlands/219/03(H7N7)或A/Anhui/1/13(H7N9)。在病毒攻击当天称重小鼠,然后监测存活,并且每天称重共14天或18天。根据批准的机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)方案进行动物研究。

[0241] 在用致死剂量的H5N1-VN04、H3N2-BR07、H7N7-NL219和H7N9-AU13病毒的攻击前一天,用不同剂量的3I14、F10(组1对照Ab)和A533(组2对照Ab)IgG1处理小鼠。在H7N7-NL219或H7N9-AU13攻击后,使用 $\geq 5 \text{ mg/kg}$ 3I14 IgG1的预防完全保护小鼠免于死亡,伴随在观察期最低限度的体重减轻。这些结果指示当用致死剂量的H3N2-BR07攻击时,3I14 IgG1有效保护(60-80%)小鼠,并且对于致死剂量的H5N1-VN04,部分保护(20-60%)小鼠(图6A)。尽管5 mg/kg 3I14 IgG1的剂量仅是部分保护性的,以预防由H3N2和H5N1引起的发病率,但所有存活的小鼠都显示在5或25 mg/kg 的剂量下在观察期结束时体重减轻的逆转(图6B)。

[0242] 实施例7:3I14阻断胰蛋白酶介导的HA成熟和pH依赖性构象变化

[0243] 已知茎定向的bnAb干扰pH依赖性构象变化和HA的膜融合^{12,14,16}。前体HA0的切割引发HA用于在酸性内体环境中膜融合的后续活化。未成熟的HA0通常由呼吸上皮细胞上的表面蛋白酶加工成HA1和HA2^{28,29}，其通过用胰蛋白酶处理HA0在实验上模拟³⁰。因为3I14靶向包含HA0切割位点和HA2 N末端融合肽的HA的茎结构域，所以我们测试3I14是否也可以阻断HA0的胰蛋白酶切割活化或干扰HA介导的病毒-宿主膜融合。图7显示了3I14 IgG1而不是对照抗SARS IgG1(Fm-6)阻止未成熟HA0的切割。我们还使用表面表达的H3-A2/68和H3-BR07分析了3I14的低pH触发构象重排的预防。图8(上图)示出了3I14结合未切割的HA前体(HA0)(左)和两种成熟形式(HA)，或在单独的胰蛋白酶活化后(左中)或当随后为低pH触发时(右中)。相比之下，它不结合通过DTT还原介导的解离的HA2(右)。当3I14在低pH触发之前预结合成熟的HA时，抗体在DTT处理后维持结合(图8，第4个小图)，指示3I14抑制pH依赖性HA重排(图8，下图)。另外，3I14的预结合阻止HA1-HA2解离，因为E730 Ab(抗HA1)的结合在DTT处理后得到保存(图8，下图)。根据这些数据，我们得出结论，3I14结合HA茎表位导致HA0切割和pH依赖性构象变化的抑制。

[0244] 实施例8:3I14 IgG1阻止表面表达的H3-A268和H3-BR07上的低PH触发的构象重排。

[0245] 通过3I14(实心条)和头部结合对照mAb E730(空心条)的FACS染色，检测表面表达的H3的构象重排(图8)。各种构象在相应的图上方指示，并且如下：未切割的前体(HA0)；胰蛋白酶活化的，切割的(HA)；低pH触发，切割的(pH 4.9)；和DTT还原的，三聚体HA2(tHA2)。结合表示为与未处理的HA(HA0)结合的百分比。对于抗体抑制测定，在将切割的HA暴露于pH 4.9之前，H3不用mAb预处理，用3I14或对照Ab，Fm-6预处理。数据代表三次独立实验的平均值 + SD。

[0246] 如图8中所示，在胰蛋白酶活化和低pH触发后，3I14结合未切割的HA前体(HA0)和成熟形式(HA)，但不结合由DTT还原介导的解离的HA2。虽然3I14在低pH触发之前预结合成熟的HAs，但在DTT处理后，抗体保持结合，指示3I14抑制pH依赖性HA重排和后续膜融合。另外，3I14的预结合阻止了HA1与HA2的解离，因为E730 Ab(抗HA1)的结合在DTT处理后得到保存。

[0247] 用全长重组甲型流感pcDNA3.1-H3-A268和H3-BR07质粒转染MDCK细胞。在转染~30小时后，使用0.2% EDTA/PBS使细胞从塑料支持物脱离。为了测量mAb与不同HA结构形式和构象的结合，在每个加工步骤之后，将细胞样品分开并且用3I14或E730 IgG1(抗H3头部)染色。脱离的细胞随后用胰蛋白酶(TrypLETM Select Enzyme, Gibco)在室温下处理5分钟，用1% BSA/PBS洗涤，并且在柠檬酸-磷酸钠缓冲液pH 4.9中温育15分钟，洗涤，然后在室温下与PBS中的50 mM二硫苏糖醇(DTT)温育20分钟。可替代地，在低pH步骤之前加入5 μg 3I14或Fm-6 IgG1。后续处理的样品用APC-缀合的抗人Fc(BioLegend, Inc.)染色。使用具有FACS Diva软件(Becton Dickinson)的BD FACSAria TM II分析染色细胞。

[0248] 实施例9:3I14介导Fc依赖性病毒清除

[0249] 据报道抗茎bnAb有效介导流感病毒受感染细胞的Fc γ R依赖性细胞毒性³¹，这被视为mAb介导的抗病毒清除的主要机制。为了研究通过3I14和其他抗茎bnAb的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的特性，我们在体外执行基于替代报道基因的ADCC测定，使用稳定表达人Fc γ IIIa和活化T细胞核因子(NFAT)诱导的萤光素酶的经工程改造的Jurkat效应细胞³²连同

作为靶的表达HA的293T细胞。在与H3表达的293T靶细胞一起温育后,3I14以剂量依赖的方式,并且以与其他抗茎bnAb包括FI6v3、CR9114、39.29和组2 mAb CR8020可比较的水平,在Jurkat报道细胞中诱导显著的萤光素酶应答(图9)。该测定的特异性由来自抗组1 mAb, F10的应答缺乏加以证实。3I14还特异性诱导针对H5表达的293T细胞的萤光素酶应答,但以比FI6v3、CR9114、39.29和F10更低的水平。我们观察到CR8020针对H5表达的293T靶细胞的低反应性(图9)。这些数据支持3I14也可能参与Fc依赖性免疫介导的体内保护机制。

[0250] 实施例10. 3I14与其他抗茎bnAb,FI6、CR9114、39.29、F10和CR8020交叉竞争与H3或H5的结合。

[0251] 将固定在ELISA平板上的5 μ g/ml H3-BR07或H5-VN04蛋白与范围为80 nM至0.3 nM的3I14 Fab的2倍连续稀释物一起温育,并且与以5 nM的其他scFvFc Ab混合。在共温育1小时后,使用HRP缀合的抗人CH2抗体检测scFvFc Ab的结合。3I14 Fab与其他抗茎Ab(包括CR8020、CR9114、FI6和39.29)交叉竞争与H3-BR07的结合,但不与E730(抗HA1抗体竞争)(图10A-D)。3I14还抑制39.29和F10与H5-VN04的结合,但不抑制抗头部抗体2A的结合(图10E-F)。这些结果提示3I14靶向HA茎区中的表位,其与其他抗茎bnAb的已知表位重叠或非常接近。

[0252] 实施例11. 体外基于结构的亲和力成熟

[0253] 为了表征对H 3和H 5的不等结合强度的分子基础,并且以对H5N1毒株改善的亲和力工程改造3I14,我们首先使用抗体结构预测程序BioLuminate用于3I14结构的计算机芯片模拟³³。3I14模型与其他三种IGHV3-30 bnAb,FI6v3、39.29和MAb3.1的叠加显示于图12B中。明确的是这些抗体中的主要差异是HCDR3的构象,除了形成与HA接触的环结构的FI6v3的较长LCDR1之外。

[0254] 接下来,使用RosettaDock服务器将3I14模型对接到H3三聚体结构³⁴。因为3I14与FI6v3和39.29竞争结合H3和H5,并且MAb 3.1占据与FI6v3和39.29相同的保守表位¹⁸,我们假设3I14采用与FI6v3、39.29和MAb3.1相似的结合方案与H3/H5相互作用。对于这三种Ab-HA共晶体结构,HCDR3在形成具有融合肽和螺旋A的疏水核心方面起主要作用^{15,17,18}。与HA作出显著相互作用不同,HCDR1和HCDR2看起来使HCDR3环稳定,以促进结合。亲水性轻链CDR残基还与HA相互作用并且包围疏水核心,然而轻链的取向不是保守的,残基也不涉及结合。这些观察提示轻链主要通过将HCDR3定向到与表位相互作用的最佳位置来促成结合。

[0255] 基于这些分辨的共晶体结构,我们从1000个诱饵中选择了3I14/H3(图13B)和3I14/H5复合物最相似的结合模型(未显示)。进行两种复合物的界面的彻底分析,以便理解3I14结合H3/H1为何强于H5(表5)。能量计算³⁵显示了3I14轻链的D94和H3模型中的K39之间的非常有利的结合贡献,其可以形成盐桥,而E39由于电斥力而在H5/3I14模型中旋转远离D94,并且可能不利于H5结合(图13C)。除H5之外,E39氨基酸变化也在组1 H2、H6、H11和H13毒株中发现(表6)。另一个引人注目的变化是在H3位置L38处,其中对于某些组1毒株,该残基变为K/R38(表6)。然而,结合贡献显示在两种模型中L/K38接触HCDR3残基Y104、F105和F109,伴随有利至非常有利的结合(总有利自由能的~70%),并且因此我们认为这些残基对两种HA的结合具有积极作用。

[0256]

表5在 H3/3I14 和 H5/3I14 界面处的接触残基												
3I14	HCDR3					LCDR1			LCDR2		LCDR3	
	Y10 3	Y10 4	F105 *	D10 6	F109 *	G31	N32	T33	N52	S53*	D94	
H3	I18	W21	D19	D19	L38	Q42	Q42	Q42	N49		K39	
		L38	L38			D46						
		I45										
H5	D19	D19	D19	D19	K38	Q42	Q42		T49	N53	E39	
	I45	K38	K38		E39	D46						
	T41											
	I45											

接触残基通过原子间距离 $< 4 \text{ \AA}$ 限定, 除了 H3 和 H5 复合物中的残基 D94 分别由距离 $< 5 \text{ \AA}$ 和 $< 7 \text{ \AA}$ 限定之外。

颜色方案指示对结合能的贡献: 非常有利的 (红色); 有利的 (橙色); 中性 (蓝色) 和不利的 (黑色)。

*残基指示种系编码残基的体细胞突变。

[0257]

组	毒株	K _d [*] (nM)	与 CR9114 的相对 K _d ^{**}	螺旋 A												
				融合肽	18	19	20	21	36	38	39	41	42	45	46	49
组1	H1-CA09	0.28	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	T	N
	H1-SI06	0.03	-	V	D	G	W	A	Q	K	T	Q	I	N	T	N
	H1-PR8	0.08	-	I	D	G	W	A	Q	K	T	Q	I	N	T	N
	H2-JP57	-	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	F	D	T	N
	H5-VN04	1.02	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N
	H5-IN05	1.05	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N
	H6-NY98	-	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N
	H11-MEM74	-	-	I	N	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N
	H13-MD77	-	-	I	N	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N
	H16-SE06	-	> 20 nM	I	N	G	W	A	K	A	T	Q	I	D	T	N
	H8-ON68	-	-	I	D	G	W	A	Q	K	T	Q	I	D	T	N
	H9-HK99	5.23	-	V	A	G	W	A	R	D	T	Q	I	D	T	N
	H12-AB76	-	> 2.9 nM	V	A	G	W	A	R	D	T	Q	I	D	Q	N
组2	H3-PE09	0.26	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N
	H3-UY07	0.18	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N
	H3-VIC11	0.33	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N
	H4-NL05	0.29	-	I	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N
	H14-AS82	0.29	-	I	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N
	H7-NL219	0.03	-	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N
	H7-AH13	0.67	-	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N
	H10-SE02	-	-	V	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N
	H15-WA79	-	< 10 nM	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N

*K_d通过表面等离振子共振 (SPR) 生物传感器进行测定 (图1B)。**相对 K_d通过流式细胞术 (图2) 和参考文献16进行测定。

携带带正电侧链的残基标记为橙色; 而带负电的侧链残基标记为蓝色。

[0258]

实施例12: 在H3三聚体模型的茎上的3I14表位的结构。

[0259] 图13是在H3的茎上的3I14表位的图示。在示意图中, 3I14的重链以蓝色显示, 并且轻链为品红色。H3三聚体的茎着色为橙红色、绿色和青色。残基编号完全在H3或Ab序列的基础上。

[0260] 3I14/H3对接

[0261] 使用作为独立软件安装在我们的Linux机器上的RosettaDock, 将3I14模型与H3三聚体结构对接。RosettaDock因其处理本地高分辨率对接的能力被选择, 并且允许额外的旋转异构体和环重排。在对接之前, 3I14模型与在H3/39.29复合物结构内的39.29叠加。加入额外的侧链旋转异构体, 并且仅进行高分辨率方案。生成1000个诱饵, 并且用PyMol彻底分析了具有最佳分数的聚类模型。鉴于3I14与FI6竞争结合H3, 我们假设3I14采用与39.29、

FI6和Mab3.1相同的方案与H3相互作用。因此,在选择最终模型时应用下述标准:HCDR3和H3的HA2的融合肽和螺旋A上的疏水残基必须作出紧密接触,以在界面处形成疏水核心;HCDR2和HCDR1残基制备与其他复合物相似的与HCDR3的相互作用;轻链CDR主要制备与H3的亲水相互作用。在来自1000个诱饵的最佳的10个模型中,6个模型符合这些标准,并且它们彼此非常相似。因此,选择6个内具有最佳分数的一个用于进一步分析。

[0262] 实施例13 H3/3I14和H5/3I14模型的序列比对和结构叠加。

[0263] 图14A描绘了H3、H5和乙型流感的茎表位的序列比对。图14B描绘了在残基38和39处H3/3I14和H5/3I14模型的结构叠加。H3显示为青色,并且H5显示为黄色;来自H3/3I14模型的3I14显示为蓝色(重链)和黄色(轻链),并且来自H5/3I14模型的3I14显示为橙色。H3残基Leu38和Lys39是标记的。来自重链的残基F100F和来自轻链的D93分别与38和39相互作用,并且也是标记的。

[0264] 3I14/H5对接

[0265] 以与3I14/H3复合物相同的方式,将H5/3I14和流感B/3I14复合物建模。3I14模型和H5三聚体或H3三聚体两者均叠加到H3/39.29复合物结构中,并且将两个结构文件合并成一个3I14/H5复合物或3I14/乙型流感复合物作为用于对接的初始模型。有趣的是,与对于H3/3I14复合物模型选择的那些相似的模型在用于H5/3I14和乙型流感/3I14复合物两者最佳模型中。因此,选择这些相似模型作为用于进一步分析的最终模型。

[0266] 用于更好的H5结合的3I14工程改造

[0267] 已进行了H3/3I14和H5/3I14界面的彻底分析,以便理解3I14结合H3为何强于H5。所有表位残基的序列比对已显示最惊人的变化是H3中的L38-K39在H5中变成K38-E39(图14A)。L38是H3/3I14模型中的疏水核心的部分,并且它与来自3I14的HCDR3的F100F相互作用(图14B)。令人惊讶的是,H5/3I14模型中的K38能够通过将荷电胺基指向溶剂并且使脂肪链面向F100F而作出相同的接触。根据模型,该突变看起来不能影响结合亲和力。相反,K39在H3/3I14模型中与来自3I14轻链的D94进行接触,而E39由于电斥力而在H5/3I14模型中旋转远离D94(图14B)。显而易见的是,K39E突变不利于H5结合,并且可能这就是与H3相比,3I14具有与H5更弱的结合的原因。为了测试这一假设,与其结合3I14的能力相比,检查了来自不同亚型的HA在38-39位置处的残基。强相关性可以揭示具有L38和K39的HA强烈结合3I14,并且具有K38和E39的HA具有更弱的结合。总之,我们假设3I14轻链中的D94K突变逆转3I14针对H5的结合偏好,并且降低对H3的结合亲和力。另外,我们假设D94N 3I14变体与H3和H5同样良好地结合。我们并不预期D94N突变导致削弱H3结合,因为用于相互作用的主要驱动力是来自HCDR3的疏水相互作用。只要在这个位置处的相互作用不是排斥性的,它就不应该显著影响亲和力。

[0268] 实施例14:3I14 WT和VLD94N突变IgG1与重组H5-VN04 (A) 和H3-PE09 (B) 的结合 (KD值)。

[0269] 3I14 VLD94N变体改善了与H5的结合和对H5的中和活性

[0270] 为了消除所提出的E39和D94的排斥效应,我们假设导致在该位点处的负电荷丧失的单个Asp至Asn(D至N)突变将同样良好地结合H3和H5两者。为了检查这种基于结构的修饰,我们首先评估了WT3I14和VLD94N变体IgG1两者的结合亲和力。如表3中所示,VLD94N变体使与H5的结合亲和力增加了将近10倍,但并未引起与H3结合中的任何显著变化。有趣的

是,与H5的较高亲和力也是由于降低的解离速率,而结合速率是相等的(表7和图15)。

表7 3I14 VLD94N变体的结合亲和力。							
	3I14	H5-VN04			H3-PE09		
变体	K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	
3I14 WT	1.02	3.27E+05	3.87E-04	0.263	1.52E+05	3.99E-05	
3I14 VLD94N	0.187	3.83E+05	7.74E-05	0.308	1.77E+05	5.44E-05	

[0272] 我们还执行中和测定,以评价3I14 VLD94N变体针对H5假型或H3传染性病毒的活性(图16C和16D)。与3I14相比,VLD94N变体以高10倍的效力中和H5-VN04假病毒(IC_{50} : 8.65 ng ml^{-1} 相对于81.58 ng ml^{-1})(图16C)。同时,针对H3-BR07的中和活性在VLD94N变体中保持完整(IC_{50} : 336.6 ng ml^{-1} 相对于305.4 ng ml^{-1})(图16D)。这些结果证实优化的3I14 VLD94N变体导致与H5的结合和中和能力中的增加,同时维持其对H3的功效。

[0273] 进一步的实验证实3I14以1.96 nM的 K_d 值与H3-PE09结合,而3I14 VLD94N突变体对H3-PE09的亲和力是相似的(平均 K_d = 2.34 n M)。D94N突变不导致H3结合的弱化,但确实导致对H5的结合亲和力中的增加(图15A和15B)。

[0274] 实施例15:3I14 WT和VLD94N突变体IgG1中和假型病毒H5N1-VN04和传染性病毒H3N2-BR07。

[0275] 图16是描绘H5N1-VN04和H3N2-BR07感染病毒的中和的一系列图。3I14 WT(黑色)和VLD94N突变体(红色)中和假型病毒H5N1-VN04(A)和H3N2 BR07病毒(B)。抗组1 mAb F10(蓝色)用作对照。这些数据代表了2-3次独立实验的平均中和滴度。

[0276] 3I14 VLD94N突变体IgG1以比3I14 WT更高的 IC_{50} 值中和假病毒H5N1-VN04,而它也以相似的 IC_{50} 值中和H3N2病毒。

[0277] 实施例16:用于分离具有与H5的增加结合的3I14变体的经工程改造的酵母展示。

[0278] 通过随机化HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和LCDR4的残基,产生7个酵母展示文库。这些酵母展示文库用于生成单链3I14变体的库,其被选择且克隆到酵母展示载体pCTCON2内。分离的构建体将在抗体的C末端处附着c-Myc标签,以充当用于呈现的标记物。通过将文库在SGCAA培养基中在20度下生长24-48小时,诱导抗体表达和表面展示。通过抗c-Myc FITC标记检测到3I14变体的成功呈现。H5 HA用荧光标记进行标记并且加入染色1小时。未结合的试剂被洗去,并且标记的文库就H5HA阳性克隆进行分选。

[0279] 如图18中所示,3I14 WT-酵母和CDR-文库两者对于C-myc和H5均为阳性的,如通过FACS分析证实的。与3I14-WT-酵母文库相比,双重阳性H5和c-myc阳性群体在3I14酵母CDR文库中从0.039%增加到0.090%。

[0280] 在未来的研究中,阳性克隆将再次繁殖且分选三次,以富集阳性群体。阳性克隆通过FACS分析加以验证,并且通过测序进行鉴定。与FACS分选组合的酵母展示已证明成功用于抗体工程改造,并且用于分离能够结合乙型流感HA的3I14变体克隆。一旦鉴定了与乙型流感HA的初始结合物,就用多色分选进行后续筛选循环,即H3、H5和乙型流感HA用不同的荧光标记进行标记,并且分选三重阳性3I14变体。

[0281] 实施例17:表位作图和结合竞争

[0282] 为了研究用于3I14识别的HA表位,我们在Octet® RED96仪器中评价了其与全长HA或HA1亚单位的结合活性。3I14结合的三聚体全长H3毒株A/Perth/16/09(PE-09),但不结合其HA1亚单位(图19)。我们进一步执行了3I14与其他茎导向bnAb之间的结合竞争测定:

FI6v3、CR9114、39.29、F10和CR8020(图2)。3I14 Fab强烈抑制其他抗茎Ab CR9114、FI6v3和39.29与H3-BR07的结合,但不抑制头部导向的抗H3 mAb E730(未公开的抗体序列)(图10)。3I14还与CR8020竞争,所述CR8020针对更近膜端的表位14。3I14部分抑制39.29和F10与H5-VN04的结合,但不抑制抗H5头部抗体2A12的结合(图2e,f)。这些结果证实3I14与其他bnAb的已知茎表位重叠或非常接近。另外,3I14是H3的有效抑制剂和H5的中等抑制剂。这些结果与3I14结合H3和H5的亲和力测量一致。

[0283] 实施例18:材料和方法

[0284] 细胞

[0285] 根据IRB批准的人方案,2012年12月在DFCI Kraft Family Blood Donor Center处,使用在白细胞去除术过程中收集的丢弃的“套环(collar)”,获得未报告近期季节性流感疫苗接种的7名健康成年人的新鲜PBMC。Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞、293T和293F细胞得自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA, USA)。

[0286] 重组血凝素的制备

[0287] H3(A/Brisbane/10/2007)的细胞外结构域,残基17至531,作为融合蛋白表达,所述融合蛋白包括含有Avitag(氨基酸序列:GGGLNDIFEAQKIEWHE)的C末端肽、凝血酶切割位点、三聚T4 fibritin折叠结构域和六个组氨酸残基。融合蛋白H3-ATTH在293F细胞中表达,并且通过Ni-NTA亲和层析从上清液中纯化。纯化的重组HA蛋白被凝血酶(Novagen, Darmstadt, 德国)切割,然后根据制造商的说明书用BirA酶(Avidity, Aurora, CO)生物素化。

[0288] 将A/New York/18/09(H1-NY09)、A/Texas/05/09(H1-TX09)、A/Japan/305/57(H2-JP57)、A/Aichi/2/68(H3-A2/68)、A/Brisbane/10/07(H3-BR07)、A/Netherlands/2/2005(H4-NL05)、A/Vietnam/1203/04(H5-VN04)、A/Hongkong/1073/99(H5-HK99)、A/chicken/New York/14677-13/98(H6-NY98)、A/Netherlands/219/03(H7-NL219)、A/turkey/Ontario/6118/68(H8-ON68)、A/HongKong/1073/99(H9-HK99)、A/duck/Memphis/546/74(H11-MEM74)、A/duck/Alberta/60/76(H12-AB76)、A/mallard/Astrakhan/263/1982(H14-AS82)、A/shearwater/West Australia/2576/79(H15-WA79)和A/black-headed gull/Sweden/2/99(H16-SE06)的全长HA基因克隆到pcDNA3.1载体内,并且转染到293T/17细胞内,以产生细胞表面表达的HA。

[0289] H1亚型A/California/04/09(H1-CA09)、A/Solomon Islands/3/06(H1-SI06)和A/Puerto Rico/8/34(H1-PR8);H3 A/Perth/16/09(H3-PE09)、A/Uruguay/716/07(H3-UY07)和A/Victoria/341/11(H3-VIC11);H5 A/Vietnam/1203/04(H5-VN04)和A/Indonesia/05/05(H5-ID05);H7 A/Netherlands/219/03(H7-NL219)、A/Canada/RV444/04(H7-CA444)和A/Anhui/1/13(H7-AH13);H9 A/Hong Kong/1073/99(H9-HK99)的重组全长HA蛋白得自NIH BEIR Repository(NIH, Manassas, VA)。亚型H4 A/mallard/Netherlands/2/05(H4-NL05)和H14 A/mallard/Astrakhan/263/82(H14-AS82)的重组全长HA由Dr. R. C. Liddington(Burnham Institute for Medical Research, CA, USA)赠予。

[0290] 流感病毒和HA假型病毒的制备

[0291] 野生型流感病毒A/California/4/09(H1N1-CA09)、A/Puerto Rico/8/34(H1N1-PR8)、A/Perth/16/09(H3N2-PE09)、A/Aichi/2/68(H3N2-A2/68)、A/Hong kong/8/68(H3N2-

HK68)、A/Sydney/5/97(H3N2-SY97)、A/Brisbane/10/07(H3N2-BR07)、A/Wisconsin/67/05(HA、NA) x A/Puerto Rico/8/34(H3N2)、A/Aichi/2/68(HA、NA) x A/Puerto Rico/8/34(H3N2)和A/Nanchang/993/95(H3N2-NC95)得自NIH BEIR Repository(NIH, Manassas, VA),并且通过标准病毒培养技术在Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞中生长。用于动物攻击研究中的A/Brisbane/10/2007-ma(H3N2)是衍生自PR8重配病毒x-171的小鼠适应病毒⁴⁶。

[0292] A/Vietnam/1203/04(H5-VN04)、A/Hong Kong/156/97(H5-HK97)、A/Netherlands/219/07(H7-NL219)、A/FPV/Rostock/1934(H7-FPV)的全长HA基因和H5-VN04(Genbank登录号AAW80723)的神经氨酸酶基因N1分别克隆到pcDNA3.1质粒内。如先前所述,在293T/17细胞中产生Env-假型萤光素酶报道病毒¹²。简言之,将pcDNA3.1-H5-VN04、H5-HK97、H7-NL219或H7-FPV质粒分别与N1表达质粒pcDNA3.1-N1-VN04、HIV包装载体pCMVR8.2和报道载体pHIV-Luc一起共转染到293T/17细胞内。在转染后48小时收获病毒上清液。通过使用POLARstar Omega Microplate Reader(BMG LABTECH, Ortenberg, 德国)测量萤光素酶活性来评估病毒滴定。

[0293] H3结合记忆细胞的FACS分选

[0294] 通过使用Ficoll-Paque梯度(GE HealthCare)从收集的血液中分离新鲜的PBMC。用生物素化的H3-ATTH和别藻蓝蛋白(APC)标记的链霉抗生物素蛋白染色CD19⁺/CD27⁺ B细胞。将单个H3反应性记忆B细胞分选到384孔板中。在扩增14天后,测试上清液对重组H1(H1-CA09)、H3(H3-BR07)和H7(H7-CA444)HA蛋白的反应性,并且通过Meso Scale Discovery multiplex (MSD, Rockville, Maryland)进行分析。随后,在体外测量反应性上清液针对H3N2-BR07的中和活性。所有H3N2中和抗体都通过使用引物的单细胞RT-PCR进行援救,如先前所述⁴⁷。

[0295] 3I14 scFv和IgG抗体的表达和纯化

[0296] 我们使用快速单步克隆程序,以将3I14 Ab最初移动到pcDNA3.1-Hinge scFvFc微型抗体表达载体内,生成作为具有人IgG1的铰链、CH₂和CH₃结构域的融合产物的scFv¹²。纯化的3I14 scFvFc用于评价不同亚型的多种HA和病毒的结合和中和活性(图1A-B和图2)。对于全人IgG1,将scFv的基因片段分开亚克隆到人IgG1表达载体TCAE6内⁴⁸。scFvFc或IgG1通过瞬时转染在293F细胞中表达,并且通过蛋白A琼脂糖亲和层析纯化。

[0297] 动力学和K_d测定

[0298] 我们使用快速单步克隆程序,以将3I14 Ab最初移动到pcDNA3.1-Hinge scFvFc微型抗体表达载体内,生成作为具有人IgG1的铰链、CH₂和CH₃结构域的融合产物的scFv¹²。纯化的3I14 scFvFc用于评价不同亚型的多种HA和病毒的结合和中和活性(图1A-B和图2)。对于全人IgG1,将scFv的基因片段分开亚克隆到人IgG1表达载体TCAE6内⁴⁸。scFvFc或IgG1通过瞬时转染在293F细胞中表达,并且通过蛋白A琼脂糖亲和层析纯化。

[0299] 微量中和测定

[0300] 在实验之前,将MDCK细胞(1.5 × 10⁴个细胞/孔)接种到96孔组织培养板,并且用PBS洗涤两次,然后在补充有2 μg/mL胰蛋白酶和0.5% BSA的DMEM中温育。将100 TCID₅₀(半数组织培养感染剂量)的病毒在96孔板中以等体积与两倍连续稀释的Ab或含抗体的上清液混合,并且在37°C下温育1小时。在温育后,将Ab-病毒混合物一式两份转移至汇合的MDCK单层,随后为在37°C下温育21小时。细胞用PBS洗涤,在80%丙酮中固定,并且通过用针对甲型

流感病毒核蛋白 (NP) 的 mAb (克隆 A3, BEI) 的间接 ELISA 检测病毒抗原。

[0301] 小鼠中的预防研究

[0302] 在病毒攻击前的二十四小时, 在 0.5 mL 体积中通过腹膜内 (i. p.) 途径分别以低剂量 (5 mg kg^{-1}) 或高剂量 (20 或 25 mg kg^{-1}), 用 3I14 和 F10 IgG1 注射 5 只雌性 8-10 周龄 BALB/c 小鼠的接种组。所有小鼠组 ($n=6$) 都鼻内感染 10 LD_{50} (半数致死剂量) 的 A/Vietnam/1203/04 (H5N1)、A/Brisbane/10/07-ma (H3N2)、A/Netherlands/219/03 (H7N7) 或 A/Anhui/1/13 (H7N9)。在病毒攻击当天称重小鼠, 然后监测临床体征, 并且每天记录体重共 14 天或 18 天。相对于初始重量 $\geq 25\%$ 的体重减轻或关于临床体征 (无应答性或严重神经学症状如后肢麻痹, 共济失调) 指数的分数 4 用作存活终点。根据批准的机构动物护理和使用委员会方案进行动物研究。

[0303] 抗体结合竞争

[0304] 将固定在 ELISA 平板上的 $5 \mu\text{g/ml}$ H3-BR07 或 H5-VN04 蛋白与范围为 80 nM 至 0.3 nM 的 3I14 Fab 的 2 倍连续稀释物一起温育, 并且与以 5 nM 的其他 scFvFc Ab 混合。在共温育 1 小时后, 使用 HRP 缀合的抗人 CH_2 抗体 (Life Technologies, Grand Island, NY) 检测 scFvFc Ab 的结合, 并且使用 Super AquaBlue ELISA 底物 (ebioscience, San Diego, CA) 在 POLARstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH, Ortenberg, 德国) 上进行测量。

[0305] 胰蛋白酶切割抑制测定

[0306] 将 $0.4 \mu\text{g}$ 重组 H3-组氨酸 (H3-ATTH) 蛋白在 $2.5 \mu\text{g}$ 3I14 或抗 SARS Fm-6 IgG1 的存在下温育, 或在不存在抗体的情况下在含有 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Trypsin-ultra (New England Biolabs, Ipswich, MA) 的以 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中在 37°C 下温育。通过添加 1% BSA 在几个时间点抑制胰蛋白酶消化。样品在还原条件下在 12% 还原的 SDS-PAGE 上运行, 并且使用 HisProbe-HRP 和 SuperSignal West HisProbe Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 进行印迹。

[0307] 构象变化 FACS 测定

[0308] 用全长重组甲型流感 pcDNA3.1-H3-A2/68 和 H3-BR07 质粒转染 293T/17 细胞。在转染后 ~30 小时, 使用 0.2% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 使细胞从培养容器脱离。为了测量 mAb 与不同 HA 结构构象的结合, 将细胞样品暴露于不同的处理, 等分并且用 3I14 或 E730 scFvFc Ab 染色。脱离的细胞连续用胰蛋白酶 (Gibco, Grand Island, NY) 在室温下处理 5 分钟, 用 1% BSA/PBS 洗涤, 并且在柠檬酸-磷酸钠缓冲液 pH 4.9 中温育 15 分钟, 洗涤, 然后在室温下与 PBS 中的 50 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 温育 20 分钟。可替代地, 在低 pH 步骤之前加入 $5 \mu\text{g}$ 3I14 或抗 SARS Ab Fm-6 IgG1。连续处理的样品用 APC-缀合的抗人 Fc (BioLegend, San Diego, CA) 染色。使用具有 FACS Diva 软件 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY) 的 BD FACSAriaTM II 分析染色细胞。

[0309] 抗体依赖性细胞毒性测定

[0310] ADCC Reporter Bioassay 使用经工程改造的 Jurkat 细胞作为效应细胞 (Promega), 所述 Jurkat 细胞稳定表达 Fc γ RIIIa 受体、V158 (高亲和力) 变体和驱动萤火虫萤光素酶表达的 NFAT 响应元件。通过由于 NFAT 途径活化产生的萤光素酶, 定量 ADCC 中的抗体生物活性; 用发光读数定量效应细胞中的萤光素酶活性。作为靶细胞, 在测定之前, 将 1×10^4 / 孔的表达 H3 或 H5 的 293T 细胞附着至平底 96 孔板, 然后将培养基替换为低 IgG 血清测定。

缓冲液(具有0.5%低IgG FBS 的RPMI 1640)。scFvFc抗体以1、0.2和0.04 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 的最终浓度加入每个孔中。1小时后,将Jurkat效应细胞以 6.0×10^4 /孔加入低IgG血清测定缓冲液中的测定平板中,并且温育6小时。通过以 $300 \times g$ 离心回收上清液,并且通过POLARstar Omega Microplate Reader(BMG LABTECH, Ortenberg, 德国),在490 nm处使用Bio-GloTM Luciferase Assay试剂盒(Promega, Madison, WI)进行测量。

[0311] 随后描述关于图9B的另外ADCC方法。对HA表达的293T细胞与来自健康人供体的新鲜PBMC执行ADCC测定。通过乳糖脱氢酶(LDH)释放测定(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)来测定ADCC活性。通过使用Ficoll-Paque梯度(GE HealthCare),从收集的血液中分离作为效应细胞的新鲜PBMC。作为靶细胞,在测定之前,将 2×10^4 /孔的H3或H5表达的293T细胞附着至固体圆底96孔板,然后将培养基替换为低IgG血清测定缓冲液(具有0.5%低IgG FBS 的RPMI 1640)。scFvFc抗体以10、5、2.5和1.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 的最终浓度加入每个孔中。1小时后,将PBMC以 1.2×10^5 /孔加入低IgG血清测定缓冲液中的测定平板中,并且温育6小时。通过以 $300 \times g$ 离心回收上清液,并且通过Benchmark Plus Reader(Bio-Rad, Hercules, CA),在490 nm和680 nm处使用LDH细胞毒性测定试剂盒(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)进行测量。通过从490 nm吸光度读数中减去680 nm吸光度值(背景)来测定LDH活性。细胞毒性百分比计算为: %细胞毒性 = $100 \times (E - SE - ST) / (M - ST)$; E, 用抗体从E/T培养物中释放的LDH; SE, 来自效应子的自发释放的LDH; ST, 来自靶的自发释放的LDH; M, 来自裂解靶的最大释放的LDH。数据代表来自三次独立实验的代表性实验,并且所有测试都一式三份执行。数据代表来自三次独立实验的代表性实验,并且所有测试都一式三份执行。

[0312] 序列分析

[0313] 从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 数据库的流感病毒资源中下载全长甲型流感HA序列。系统发生(PHYML)树基于使用Geneious软件的其氨基酸序列比较。使用IMGT数据库(<http://imgt.cines.fr>)分析新的bnAb, 3I14的种系基因使用、体细胞突变、N-核苷酸插入和同源可变重(VH)和轻(VL)链基因对。通过合成(Genewiz, South Plainfield, NJ)产生其中单个或多重种系突变回复到种系的抗体变体,并且通过测序加以证实。通过蛋白质数据库(PDB登录号)获得F10、FI6v3、CR9114、CR8020和39.29的VH和VK序列,并且通过瞬时转染合成且表达相应的基因。

[0314] 计算机芯片结构建模

[0315] 使用BioLuminate中的抗体建模模块对3I14进行同源性建模。该模型在与RosettaDock对接之前与H3/FI6v3复合物结构叠加。仅执行高分辨率对接,其中允许侧链和环重排。对于每个对接生成1000个诱饵,并且基于RMSD值进行聚类。最终模型基于聚类大小和结果部分中所述的标准进行选择。

[0316] 其他实施方案

[0317] 虽然本发明已结合其详细描述进行描述,但前述描述预期示出而不是限制本发明的范围,所述本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在下述权利要求的范围内。

[0001]	序列表			
[0002]	<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc.			
[0003]	<120> 人源化流感单克隆抗体及其使用方法			
[0004]	<130> DFCI-109/01W0 322270-2476			
[0005]	<150> US 62/144,729			
[0006]	<151> 2016-04-08			
[0007]	<160> 25			
[0008]	<170> PatentIn version 3.5			
[0009]	<210> 1			
[0010]	<211> 390			
[0011]	<212> DNA			
[0012]	<213> 智人			
[0013]	<400> 1			
[0014]	caggtgcagc tggggaggc gtggccagc ctggaggc cctgagactc 60			
[0015]	tcctgtcag cctctggatt cacccatgt aactatggca tgcactgggt ccggcaggct 120			
[0016]	ccaggcaagg ggctggatgt ggtggcaatt atatcatttg atggaagtaa aaaatattat 180			
[0017]	gcaaactccg tgaaggccg atccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtct 240			
[0018]	ctgcaaatga acagcctggg acctgaggac acggctctat attactgtgc gaaactgccc 300			
[0019]	tccccgtatt actttgatag tcggtcggtg tgggtcgccg ccagcgcatt tcacttctgg 360			
[0020]	ggccagggaa tcctggtcac cgtctttca 390			
[0021]	<210> 2			
[0022]	<211> 130			
[0023]	<212> PRT			
[0024]	<213> 智人			
[0025]	<400> 2			
[0026]	Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[0027]	1	5	10	15
[0028]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
[0029]	20	25	30	
[0030]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0031]	35	40	45	
[0032]	Ala Ile Ile Ser Phe Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asn Ser Val			
[0033]	50	55	60	
[0034]	Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser			
[0035]	65	70	75	80
[0036]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0037]	85	90	95	
[0038]	Ala Lys Leu Pro Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Arg Phe Val Trp Val			
[0039]	100	105	110	
[0040]	Ala Ala Ser Ala Phe His Phe Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val			
[0041]	115	120	125	

[0042] Ser Ser
 [0043] 130
 [0044] <210> 3
 [0045] <211> 330
 [0046] <212> DNA
 [0047] <213> 智人
 [0048] <400> 3
 [0049] aattttatgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccggcagag ggtcaccatc 60
 [0050] tcttgctctg gaagcagctc caacatcgga ggttaatactg tacactgggtt ccagcagctc 120
 [0051] ccaggaacgg ccccaaact cctcatctat actaatagtc tgcggccctc aggggtccct 180
 [0052] gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagectccc tggccatcag tggcgtccag 240
 [0053] tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatggatg acagcctaaa tggtcagggt 300
 [0054] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 [0055] <210> 4
 [0056] <211> 110
 [0057] <212> PRT
 [0058] <213> 智人
 [0059] <400> 4
 [0060] Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 [0061] 1 5 10 15
 [0062] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
 [0063] 20 25 30
 [0064] Thr Val His Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0065] 35 40 45
 [0066] Ile Tyr Thr Asn Ser Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 [0067] 50 55 60
 [0068] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 [0069] 65 70 75 80
 [0070] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 [0071] 85 90 95
 [0072] Asn Gly Gln Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0073] 100 105 110
 [0074] <210> 5
 [0075] <211> 330
 [0076] <212> DNA
 [0077] <213> 人工序列
 [0078] <220>
 [0079] <223> 3I14VLD94N核酸的经修饰的VL链
 [0080] <400> 5
 [0081] aattttatgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccggcagag ggtcaccatc 60
 [0082] tcttgctctg gaagcagctc caacatcgga ggttaatactg tacactgggtt ccagcagctc 120
 [0083] ccaggaacgg ccccaaact cctcatctat actaatagtc tgcggccctc aggggtccct 180

[0084] gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 [0085] tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatggata acagcctaaa tggtcaggtg 300
 [0086] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 [0087] <210> 6
 [0088] <211> 110
 [0089] <212> PRT
 [0090] <213> 人工序列
 [0091] <220>
 [0092] <223> 3I14VLD94N氨基酸的经修饰的VL链
 [0093] <400> 6
 [0094] Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 [0095] 1 5 10 15
 [0096] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
 [0097] 20 25 30
 [0098] Thr Val His Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0099] 35 40 45
 [0100] Ile Tyr Thr Asn Ser Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 [0101] 50 55 60
 [0102] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 [0103] 65 70 75 80
 [0104] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asn Ser Leu
 [0105] 85 90 95
 [0106] Asn Gly Gln Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0107] 100 105 110
 [0108] <210> 7
 [0109] <211> 8
 [0110] <212> PRT
 [0111] <213> 智人
 [0112] <400> 7
 [0113] Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 [0114] 1 5
 [0115] <210> 8
 [0116] <211> 8
 [0117] <212> PRT
 [0118] <213> 智人
 [0119] <400> 8
 [0120] Ile Ser Phe Asp Gly Ser Lys Lys
 [0121] 1 5
 [0122] <210> 9
 [0123] <211> 25
 [0124] <212> PRT
 [0125] <213> 智人

- [0126] <400> 9
- [0127] Cys Ala Lys Leu Pro Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Arg Phe Val Trp
- [0128] 1 5 10 15
- [0129] Val Ala Ala Ser Ala Phe His Phe Trp
- [0130] 20 25
- [0131] <210> 10
- [0132] <211> 8
- [0133] <212> PRT
- [0134] <213> 智人
- [0135] <400> 10
- [0136] Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr
- [0137] 1 5
- [0138] <210> 11
- [0139] <211> 3
- [0140] <212> PRT
- [0141] <213> 智人
- [0142] <400> 11
- [0143] Thr Asn Ser
- [0144] 1
- [0145] <210> 12
- [0146] <211> 13
- [0147] <212> PRT
- [0148] <213> 智人
- [0149] <400> 12
- [0150] Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Gln Val Phe
- [0151] 1 5 10
- [0152] <210> 13
- [0153] <211> 13
- [0154] <212> PRT
- [0155] <213> 人工序列
- [0156] <220>
- [0157] <223> 经修饰的3I14VLD94N轻CDR3
- [0158] <400> 13
- [0159] Cys Ala Ala Trp Asp Asn Ser Leu Asn Gly Gln Val Phe
- [0160] 1 5 10
- [0161] <210> 14
- [0162] <211> 8
- [0163] <212> PRT
- [0164] <213> 人工序列
- [0165] <220>
- [0166] <223> 经修饰的3I14VLD94N轻CDR1
- [0167] <220>

[0168] <221> MISC_FEATURE
 [0169] <222> (6) .. (6)
 [0170] <223> Xaa = 除甘氨酸外的任何氨基酸; 优选地, X是丝氨酸
 [0171] <400> 14
 [0172] Ser Ser Asn Ile Gly Xaa Asn Thr
 [0173] 1 5
 [0174] <210> 15
 [0175] <211> 324
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 甲型流感病毒
 [0178] <400> 15
 [0179] Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Lys Val
 [0180] 1 5 10 15
 [0181] Asp Thr Asn Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile
 [0182] 20 25 30
 [0183] Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro
 [0184] 35 40 45
 [0185] Pro Leu Glu Leu Gly Asp Cys Ser Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 [0186] 50 55 60
 [0187] Pro Glu Cys Asp Arg Leu Leu Ser Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met
 [0188] 65 70 75 80
 [0189] Glu Lys Glu Asn Pro Arg Asp Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 [0190] 85 90 95
 [0191] Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu
 [0192] 100 105 110
 [0193] Lys Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr
 [0194] 115 120 125
 [0195] Gly Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg
 [0196] 130 135 140
 [0197] Asn Met Val Trp Leu Thr Lys Glu Gly Ser Asp Tyr Pro Val Ala Lys
 [0198] 145 150 155 160
 [0199] Gly Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly
 [0200] 165 170 175
 [0201] Val His His Pro Ile Asp Glu Thr Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn
 [0202] 180 185 190
 [0203] Val Gly Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser
 [0204] 195 200 205
 [0205] Thr Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Gly Gly Arg
 [0206] 210 215 220
 [0207] Met Glu Phe Ser Trp Thr Leu Leu Asp Met Trp Asp Thr Ile Asn Phe
 [0208] 225 230 235 240
 [0209] Glu Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Glu Tyr Gly Phe Lys Ile Ser

[0210]	245	250	255
[0211]	Lys Arg Gly Ser Ser Gly Ile Met Lys Thr Glu Gly Thr Leu Glu Asn		
[0212]	260	265	270
[0213]	Cys Glu Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Thr Thr Leu		
[0214]	275	280	285
[0215]	Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr		
[0216]	290	295	300
[0217]	Val Lys Ser Glu Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro		
[0218]	305	310	315
[0219]	320		
[0220]	Gln Ile Glu Ser		
[0221]	<210> 16		
[0222]	<211> 974		
[0223]	<212> DNA		
[0224]	<213> 甲型流感病毒		
[0225]	<400> 16		
[0226]	gaccagatat gcattggata ccatgccaat aattccacag agatggtcga cacaattcta 60		
[0227]	gagcggAACg tcactgtgac tcatgccaag gacattctt agaagaccca taacggaaag 120		
[0228]	ttatgcAAAC taaacggaat ccctccactt gaacttagggg actgttagcat tgccggatgg 180		
[0229]	ctccttgaa atccagaatg ttagggctt ctaagtgtgc cagaatggc cttatataatg 240		
[0230]	gagaaagaaaa acccgagaga cgggttgtt tatccaggca gcttcaatga ttatgaagaa 300		
[0231]	ttgaaacatc tcctcagcag cgtgaaacat ttcgagaaag taaagattct gcccAAAGAT 360		
[0232]	agatggacac agcatacaac aactggaggt tcacggcct gcgcgggtgc tggtaatcca 420		
[0233]	tcattcttca ggaacatggt ctggctgaca aagaaaggat cagattatcc ggttgccaaa 480		
[0234]	ggatcgtaca acaatacaag cggagaacaa atgctaataa tttgggggtt gcaccatccc 540		
[0235]	aatgtatgaga cagaacaaag aacattgtac cagaatgtgg gaacctatgt ttccgttaggc 600		
[0236]	acatcaacat tgaacaaaag gtcaacccca gaaatagcaa caaggctaa agtgaatgga 660		
[0237]	caaggaggta gaatggatt ctcttgacc ctcttgata tgtggacac cataaatttt 720		
[0238]	gagagtactg gtaatcta at gtcaccagag tatggattca aaatatcgaa aagaggtgt 780		
[0239]	tcagggatca tgaaaacaga aggaacactt gagaactgtg agaccaaattg ccaaactcct 840		
[0240]	ttgggagcaa taaatacaac attgccttt cacaatgtcc acccactgac aataggttag 900		
[0241]	tgccccaat atgtaaaatc ggagaagttt gtcttagcaa caggactaag gaatgttccc 960		
[0242]	cagattgaat caag 974		
[0243]	<210> 17		
[0244]	<211> 222		
[0245]	<212> PRT		
[0246]	<213> 甲型流感病毒		
[0247]	<400> 17		
[0248]	Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly 15		
[0249]	1 5 10		
[0250]	Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Asp Gln Gly Ser 20 25 30		
[0251]	Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Phe Asp Gly Ile		

[0252]	35	40	45
[0253]	Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu		
[0254]	50	55	60
[0255]	Ala Val Gly Lys Glu Phe Gly Asn Leu Glu Arg Arg Leu Glu Asn Leu		
[0256]	65	70	75
[0257]	Asn Lys Arg Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala		
[0258]	85	90	95
[0259]	Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp		
[0260]	100	105	110
[0261]	Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met Gln Leu Arg Asp		
[0262]	115	120	125
[0263]	Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys		
[0264]	130	135	140
[0265]	Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro		
[0266]	145	150	155
[0267]	Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu Ile Lys Gly Val		
[0268]	165	170	175
[0269]	Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ala Thr		
[0270]	180	185	190
[0271]	Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Ile Ser Phe		
[0272]	195	200	205
[0273]	Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile		
[0274]	210	215	220
[0275]	<210> 18		
[0276]	<211> 668		
[0277]	<212> DNA		
[0278]	<213> 甲型流感病毒		
[0279]	<400> 18		
[0280]	gattgtttgg ggcaatagct ggtttatag aaggaggatg gcaaggaatg gttgatggtt	60	
[0281]	ggtatggata ccatcacagc aatgaccagg gatcagggtta tgcagcagac aaagaatcca	120	
[0282]	ctcaaaaaggc atttgatgga atcaccaaca aggttaattc tgtgattgaa aagatgaaca	180	
[0283]	cccaatttga agctgttggg aaagaattca gtaacttaga gagaagactg gagaacttga	240	
[0284]	acaaaaaagat ggaagacggg tttctagatg tgtggacata caatgctgag cttctagttc	300	
[0285]	tgatggaaaa tgagaggaca cttgacttcc atgattctaa tgtcaagaat ctgtatgata	360	
[0286]	aagtgcagaat gcagttgaga gacaacgtca aagaacttagg aaatggatgt tttgaatttt	420	
[0287]	atcacaaatg tgatgatgaa tgcataataa gtgtgaaaac cgggacgtat gattatccca	480	
[0288]	agtatgaaga agagtctaaa ctaaatagaa atgaaatcaa agggtaaaa ttgagcagca	540	
[0289]	tgggggttta tcaaattcctt gccatttatg ctacagtagc aggttctctg tcactggcaa	600	
[0290]	tcatgatggc tgggatctct ttctggatgt gctccaacgg gtctctgcag tgcaggatct	660	
[0291]	gcatata		668
[0292]	<210> 19		
[0293]	<211> 562		

[0294]	<212> PRT																
[0295]	<213> 甲型流感病毒																
[0296]	<400> 19																
[0297]	Met	Ala	Ile														
	Ile	Tyr	Leu														
	Ile	Leu	Leu														
	Phe	Thr	Ala														
	Val	Arg	Gly														
[0298]	1	5	10	15													
[0299]	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Met	Val	Asp	
[0300]		20		25		30											
[0301]	Thr	Ile	Leu	Glu	Arg	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Lys	Asp	Ile	Leu	
[0302]		35		40		45											
[0303]	Glu	Lys	Thr	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Pro	Pro	
[0304]		50		55		60											
[0305]	Leu	Glu	Leu	Gly	Asp	Cys	Ser	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	
[0306]		65		70		75									80		
[0307]	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Met	Glu	
[0308]			85			90								95			
[0309]	Lys	Glu	Asn	Pro	Arg	Asp	Gly	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Ser	Phe	Asn	Asp	
[0310]			100			105								110			
[0311]	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	His	Phe	Glu	Lys	
[0312]			115			120								125			
[0313]	Val	Lys	Ile	Leu	Pro	Lys	Asp	Arg	Trp	Thr	Gln	His	Thr	Thr	Thr	Gly	
[0314]			130			135								140			
[0315]	Gly	Ser	Arg	Ala	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Asn	Pro	Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	
[0316]			145			150								155			160
[0317]	Met	Val	Trp	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Ser	Asp	Tyr	Pro	Val	Ala	Lys	Gly	
[0318]				165			170							175			
[0319]	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Ser	Gly	Glu	Gln	Met	Leu	Ile	Ile	Trp	Gly	Val	
[0320]				180			185							190			
[0321]	His	His	Pro	Asn	Asp	Glu	Thr	Glu	Gln	Arg	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn	Val	
[0322]				195			200							205			
[0323]	Gly	Thr	Tyr	Val	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Arg	Ser	Thr	
[0324]			210			215								220			
[0325]	Pro	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Met	
[0326]			225			230								235			240
[0327]	Glu	Phe	Ser	Trp	Thr	Leu	Leu	Asp	Met	Trp	Asp	Thr	Ile	Asn	Phe	Glu	
[0328]				245			250							255			
[0329]	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Gly	Phe	Lys	Ile	Ser	Lys	
[0330]				260			265							270			
[0331]	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Ile	Met	Lys	Thr	Glu	Gly	Thr	Leu	Glu	Asn	Cys	
[0332]				275			280							285			
[0333]	Glu	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	
[0334]				290			295							300			
[0335]	Phe	His	Asn	Val	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	

[0336]	305	310	315	320
[0337]	Lys Ser Glu Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Gln			
[0338]	325	330	335	
[0339]	Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly			
[0340]	340	345	350	
[0341]	Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn			
[0342]	355	360	365	
[0343]	Asp Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala			
[0344]	370	375	380	
[0345]	Phe Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn			
[0346]	385	390	395	400
[0347]	Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser Asn Leu Glu Arg Arg			
[0348]	405	410	415	
[0349]	Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp			
[0350]	420	425	430	
[0351]	Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu			
[0352]	435	440	445	
[0353]	Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met			
[0354]	450	455	460	
[0355]	Gln Leu Arg Asp Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe			
[0356]	465	470	475	480
[0357]	Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Thr Gly Thr			
[0358]	485	490	495	
[0359]	Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu			
[0360]	500	505	510	
[0361]	Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala			
[0362]	515	520	525	
[0363]	Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala			
[0364]	530	535	540	
[0365]	Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile			
[0366]	545	550	555	560
[0367]	Cys Ile			
[0368]	<210> 20			
[0369]	<211> 1689			
[0370]	<212> DNA			
[0371]	<213> 甲型流感病毒			
[0372]	<400> 20			
[0373]	atggccatca tttatctcat tctcctgttc acagcagtga gagggacca gatatgcatt	60		
[0374]	ggataccatg ccaataattc cacagagatg gtcgacacaa ttcttagagcg gaacgtcact	120		
[0375]	gtgactcatg ccaaggacat tcttgagaag acccataacg gaaagttatg caaactaaac	180		
[0376]	ggaatccctc cacttgaact agggactgt agcattgccg gatggctcct tggaaatcca	240		
[0377]	gaatgtgata ggcttctaaag tgtgccagaa tggctctata taatggagaa agaaaacccg	300		

[0378]	agagacggtt tgtgttatcc aggagcttc aatgattatg aagaattgaa acatctcctc	360
[0379]	agcagcgtga aacatttcga gaaagtaaag attctgccc aagatagatg gacacagcat	420
[0380]	acaacaactg gaggttcacg ggctcgcg gtgtctggta atccatcatt cttaggaac	480
[0381]	atggtctggc tgacaaagaa aggatcagat tatccggtt ccaaaggatc gtacaacaat	540
[0382]	acaagcggag aacaaatgct aataatttg ggggtgcacc atccaatgta tgagacagaa	600
[0383]	caaagaacat tgtaccagaa tgtggacc tatgtttccg taggcacatc aacattgaac	660
[0384]	aaaaggtcaa ccccagaaat agcaacaagg cttaaagtga atggacaagg aggtagaatg	720
[0385]	gaattctctt ggaccctctt ggatatgtgg gacaccataa atttgagag tactggtaat	780
[0386]	ctaattgcac cagagtatgg attcaaataa tcgaaaagag gtagttcagg gatcatgaaa	840
[0387]	acagaaggaa cacttgagaa ctgtgagacc aaatgccaaa ctcccttggg agcaataaat	900
[0388]	acaacattgc ctttcacaa tgtccacca ctgacaatag gtgagtgccc caaatatgta	960
[0389]	aaatcgaga agttggtctt agcaacagga ctaaggaatg ttcccagat tgaatcaaga	1020
[0390]	ggattgttt gggcaatagc tgggtttata gaaggaggat ggcaaggaat ggttgatggt	1080
[0391]	tggatggat accatcacag caatgaccag gcatcaggat atgcagcaga caaagaatcc	1140
[0392]	actcaaaagg catttgatgg aatcaccac aaggtaaatt ctgtgattga aaagatgaac	1200
[0393]	acccaatttg aagctgttg gaaagaattc agtaacttag agagaagact ggagaacttg	1260
[0394]	aacaaaaaga tggaaagacgg gttcttagat gtgtggacat acaatgctga gcttctagtt	1320
[0395]	ctgatggaaa atgagaggac acttgacttt catgattcta atgtcaagaa tctgtatgat	1380
[0396]	aaagtcagaa tgcagtttag agacaacgatc aaagaacttag gaaatggatg tttgaattt	1440
[0397]	tatcacaaat gtgatgatga atgcatgaat agtgtaaaaa ccggacgta tgattatccc	1500
[0398]	aagtatgaag aagagtctaa actaaataga aatgaaatca aagggtaaa attgagcagc	1560
[0399]	atggggttt atcaaattct tgcatttat gctacagtag cagttctct gtcactggca	1620
[0400]	atcatgatgg ctggatctc tttctggatg tgctccaacg ggtctctgca gtgcaggatc	1680
[0401]	tgcatatga	1689
[0402]	<210> 21	
[0403]	<211> 755	
[0404]	<212> DNA	
[0405]	<213> 智人	
[0406]	<400> 21	
[0407]	catggagttt gggctgagct gggtttcct cgttgctttt ttaagaggatg attcatggag	60
[0408]	aaatagagag actgagtgatg agtgaacatg agtgagaaaaa actggatttg tgtggcattt	120
[0409]	tctgataacg gtgtcctctt gtttcaggt gtccagtgtc aggtcagct ggtggagtct	180
[0410]	gggggaggcg tggccagcc tggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattt	240
[0411]	accttcagta gctatggcat gcactgggtc cgccaggatc cagggcaagg gctggagttt	300
[0412]	gtggcagttt tatcatatga tggaaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga	360
[0413]	ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaatgaa cagcctgaga	420
[0414]	gctgaggaca cggctgtgtt ttactgtgtc aaagacacag tgagggaaag tcattgtgtc	480
[0415]	cccgacaca aacccctcg caggaacgct ggcggaaat cagccggagg gggcgctcag	540
[0416]	gagccactga tcagagtca gccctagaggc aggtcagat ggaggctgtt tcctgtcagg	600
[0417]	atgtggact ttgtcttctt ctgacagtcc cccaaaggaaat ctctaaatt tagaaaactg	660
[0418]	tgcctaacaat tgtcttcctt atgcatatga ggacctttt tccctagcac aaaatgcaga	720
[0419]	ttgacgctga cacggatgaa aattcctcaa ccatg	755

[0420]	<210>	22		
[0421]	<211>	66		
[0422]	<212>	PRT		
[0423]	<213>	智人		
[0424]	<400>	22		
[0425]	Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[0426]	1	5	10	15
[0427]	Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[0428]		20	25	30
[0429]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0430]		35	40	45
[0431]	Lys Asp Phe Gly Pro Lys Arg Pro Thr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp			
[0432]		50	55	60
[0433]	Gly Gln			
[0434]	65			
[0435]	<210>	23		
[0436]	<211>	296		
[0437]	<212>	DNA		
[0438]	<213>	智人		
[0439]	<400>	23		
[0440]	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctggaccc ccggcagag ggtcaccatc	60		
[0441]	tcttgtctg gaagcagetc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagctc	120		
[0442]	ccaggaacgg ccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct	180		
[0443]	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggctccag	240		
[0444]	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatggatg acagcctgaa tggtcc	296		
[0445]	<210>	24		
[0446]	<211>	98		
[0447]	<212>	PRT		
[0448]	<213>	智人		
[0449]	<400>	24		
[0450]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[0451]	1	5	10	15
[0452]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
[0453]		20	25	30
[0454]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0455]		35	40	45
[0456]	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0457]		50	55	60
[0458]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[0459]		65	70	75
[0460]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu			80
[0461]		85	90	95

- [0462] Asn Gly
- [0463] <210> 25
- [0464] <211> 17
- [0465] <212> PRT
- [0466] <213> 人工序列
- [0467] <220>
- [0468] <223> C末端肽标签
- [0469] <400> 25
- [0470] Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
- [0471] 1 5 10 15
- [0472] Glu

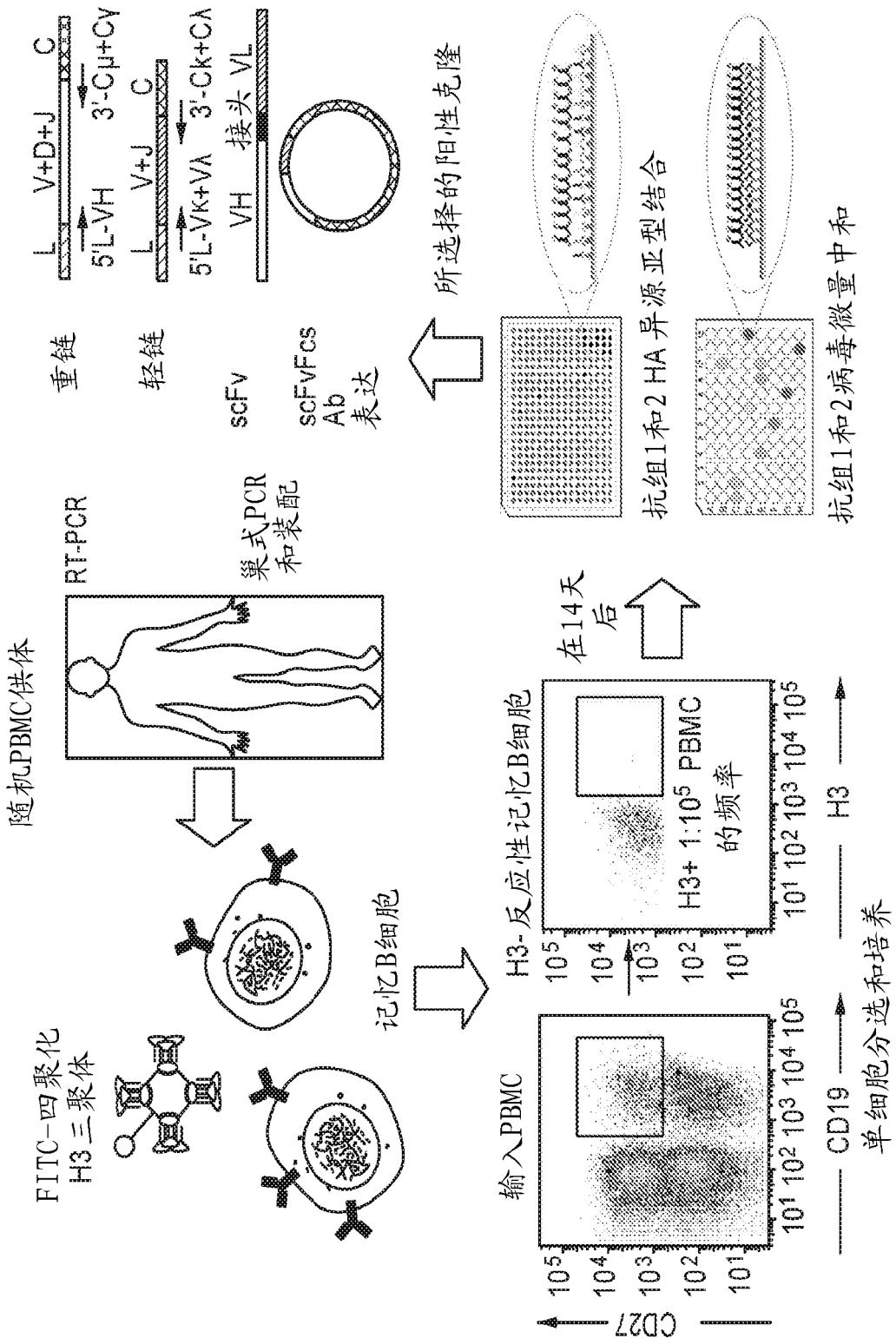


图 1A

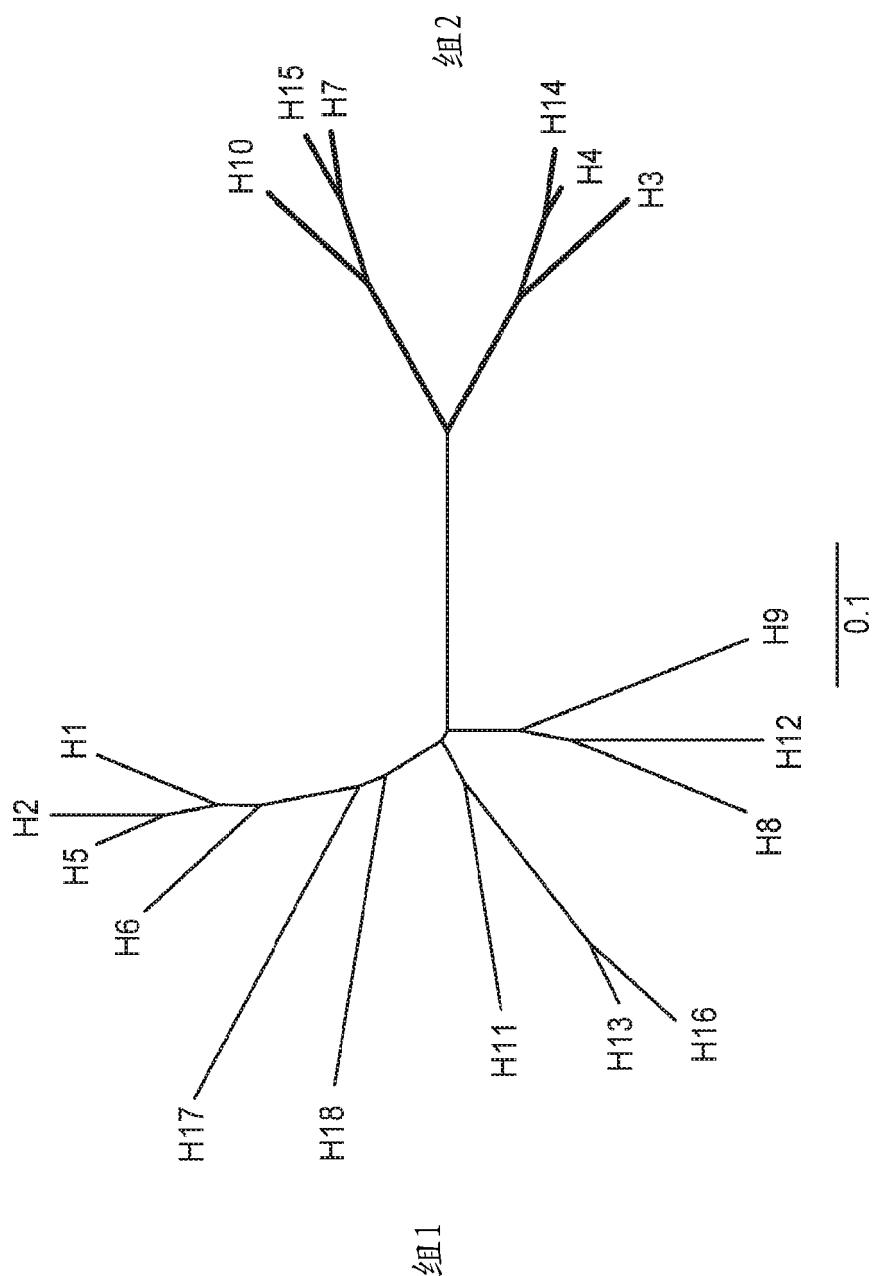


图 1B

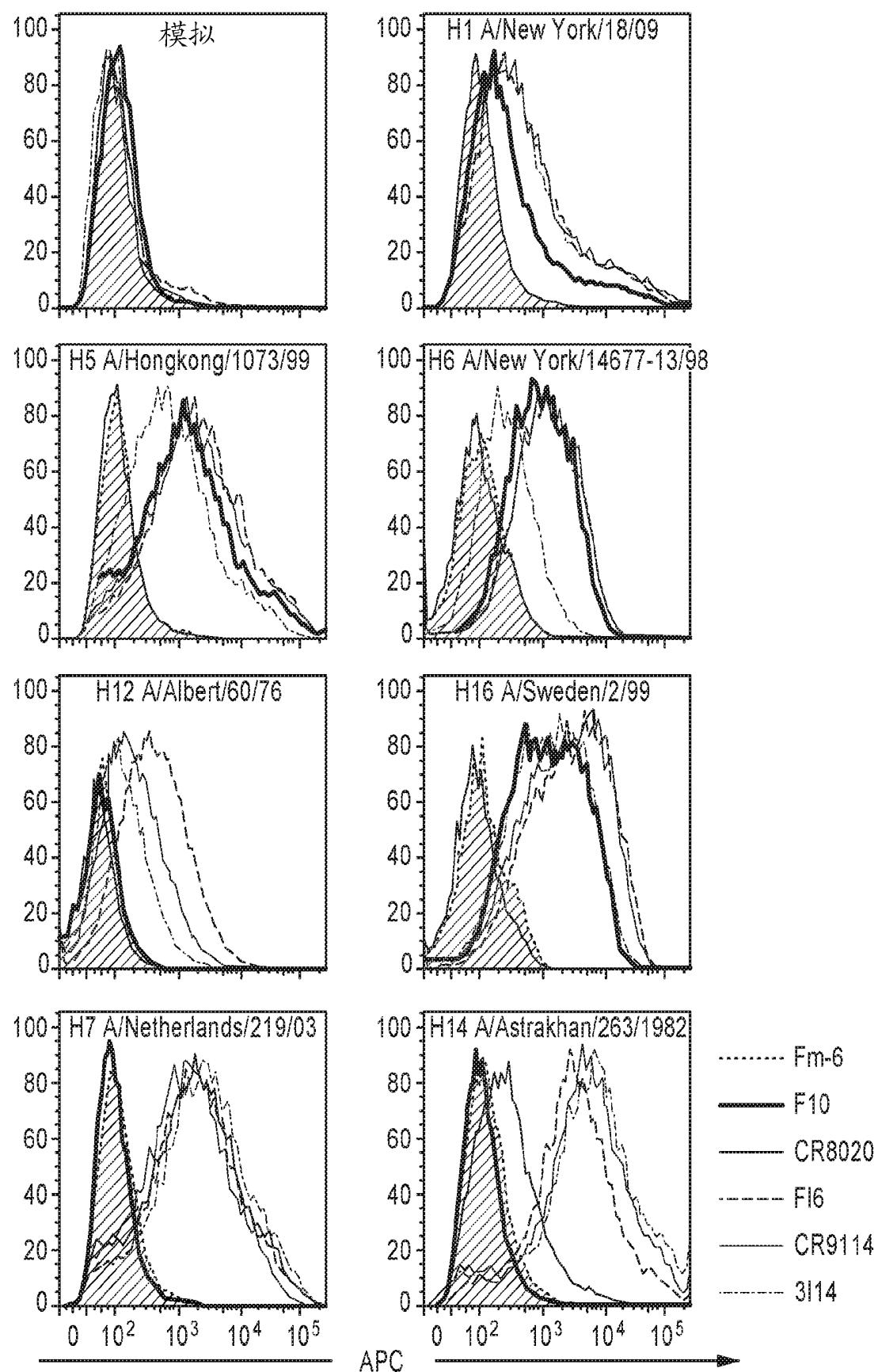


图 2

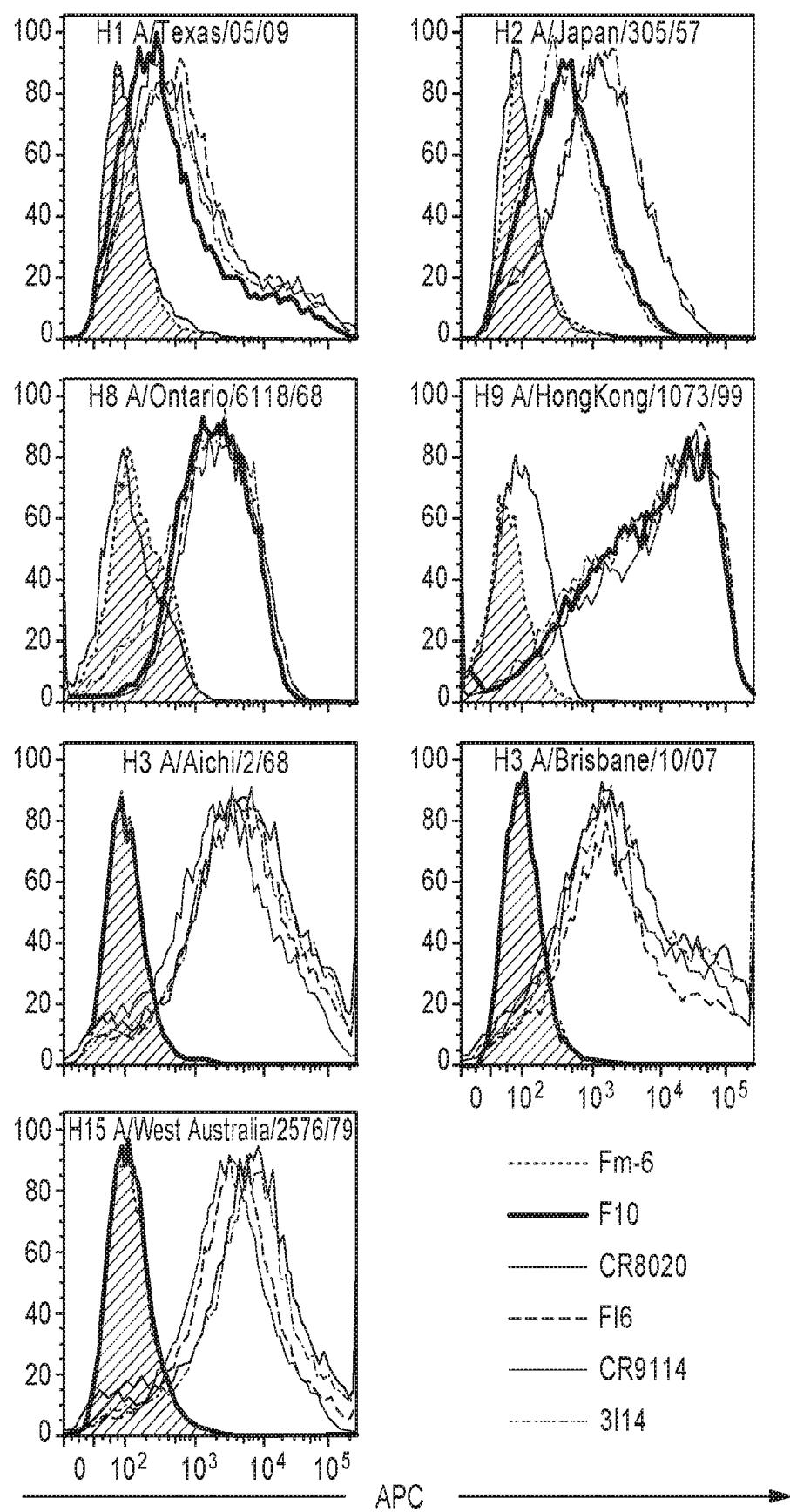


图 2续

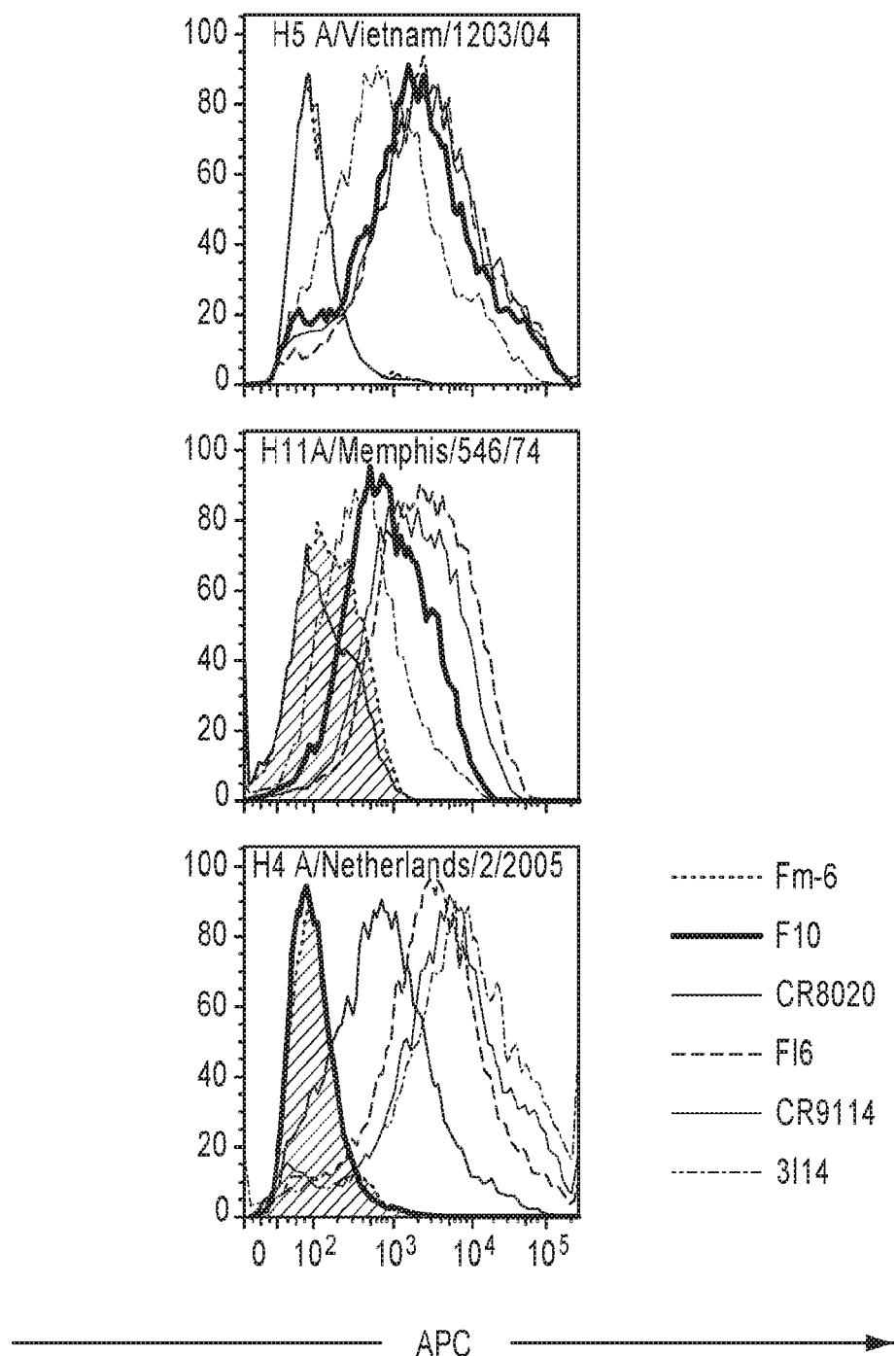


图 2续

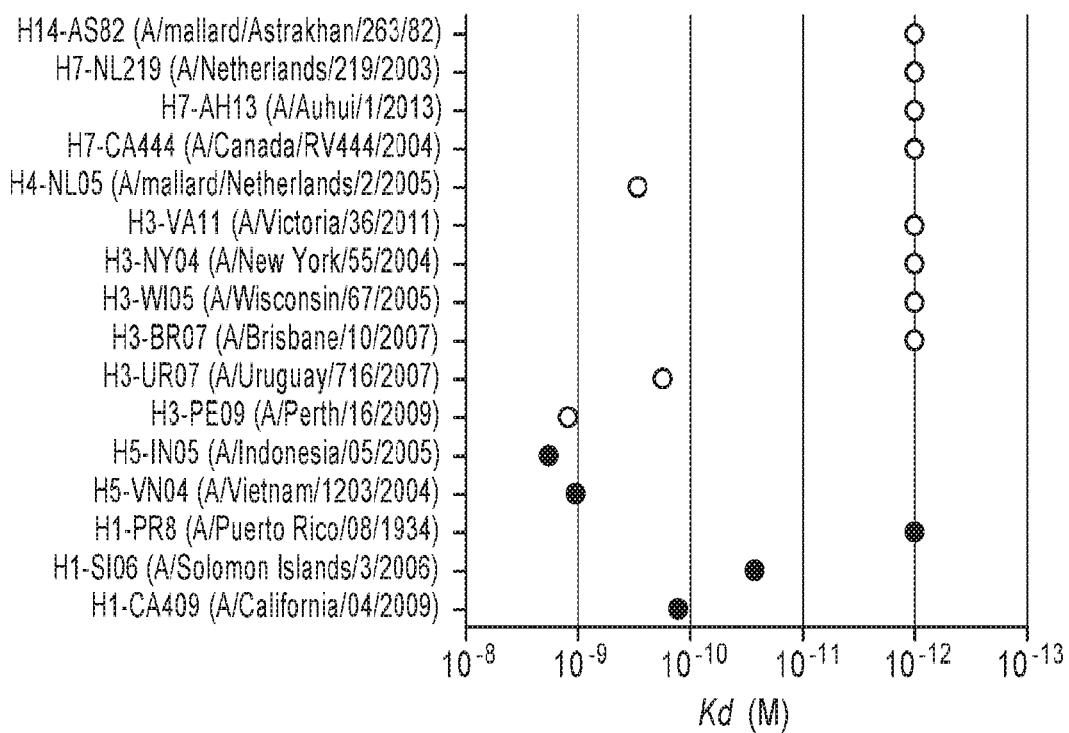


图 3A

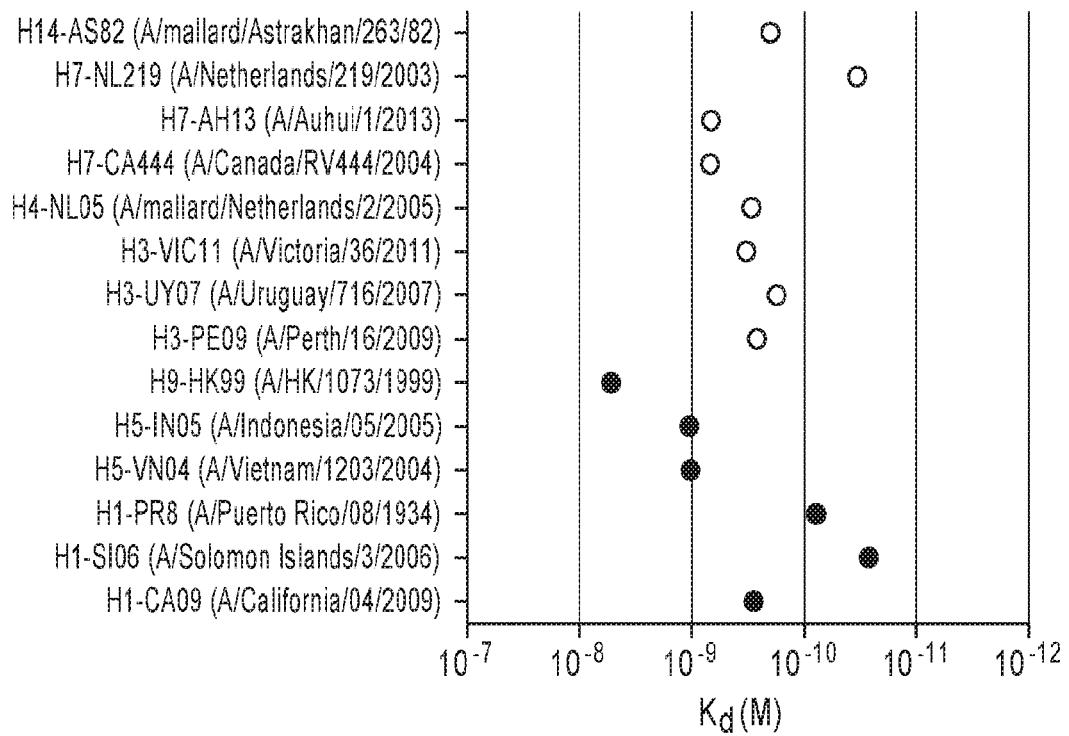


图 3B

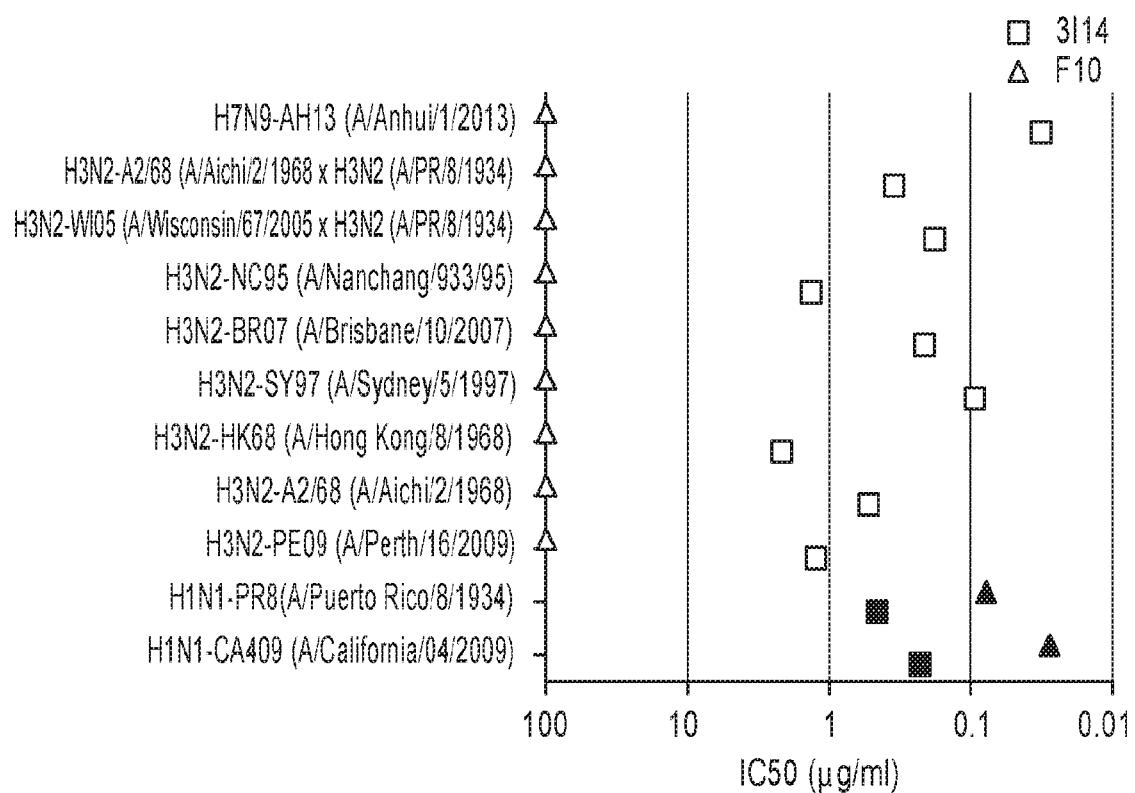


图 4A

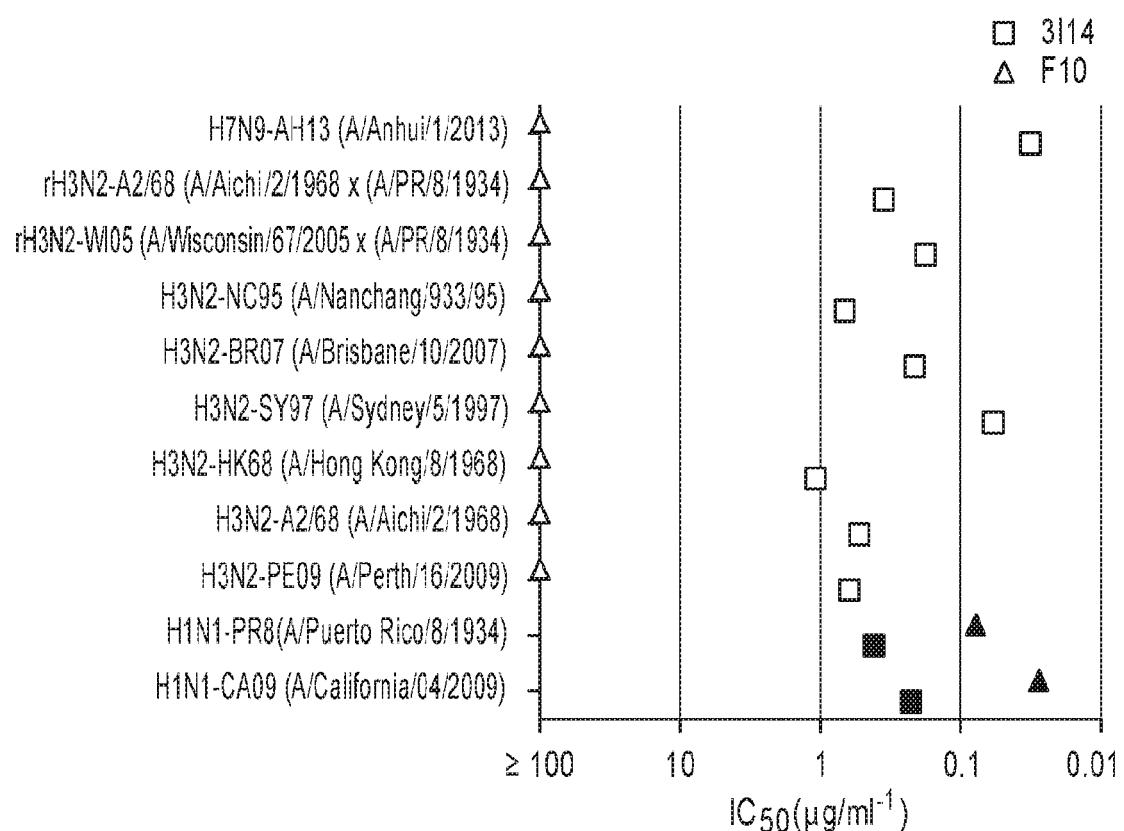


图 4B

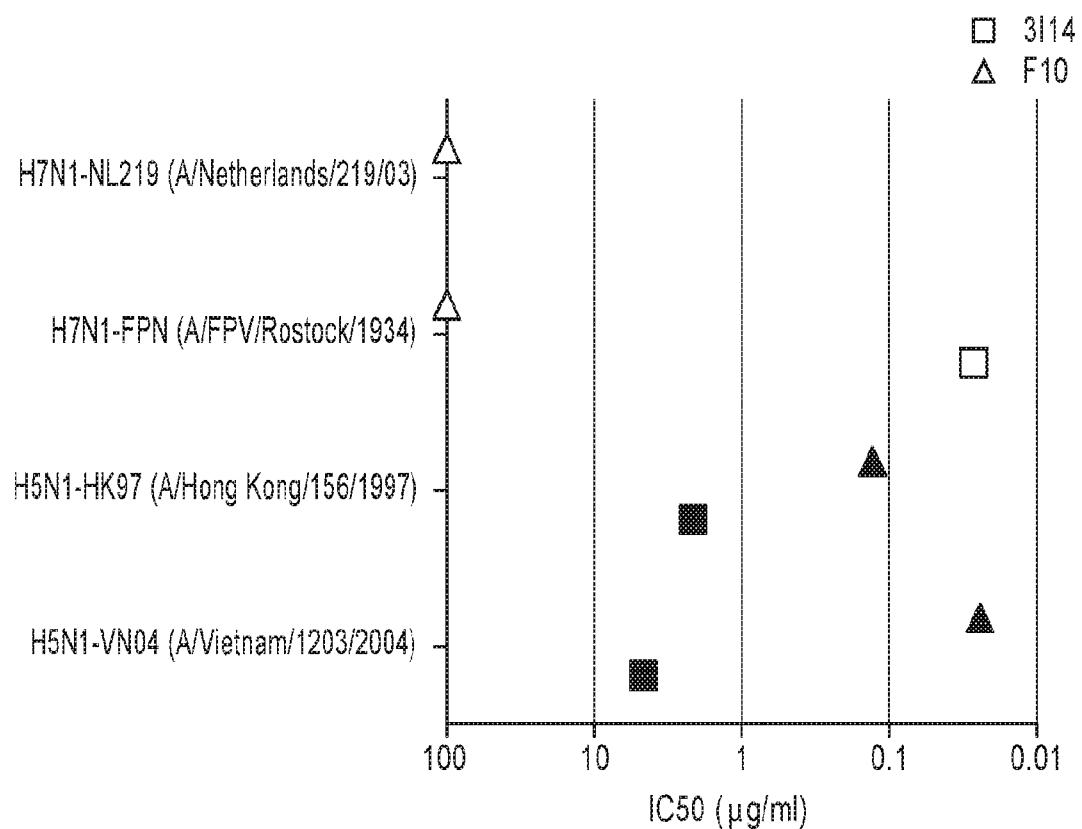


图 5A

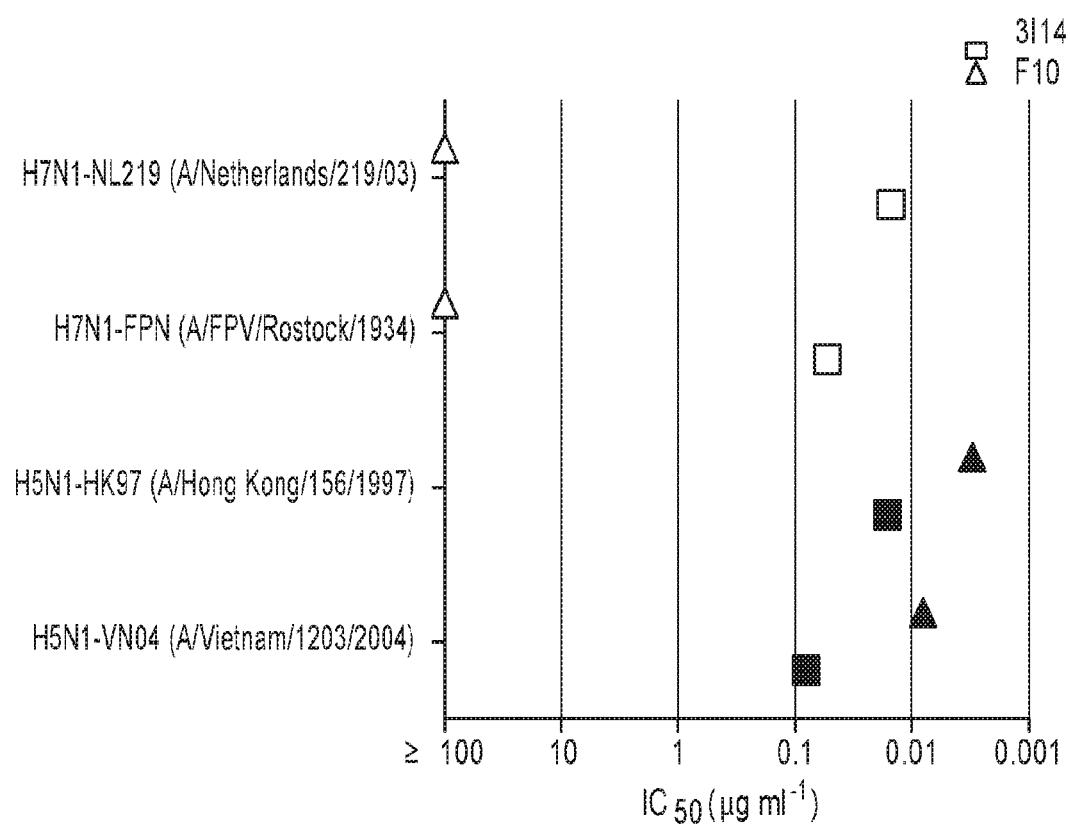


图 5B

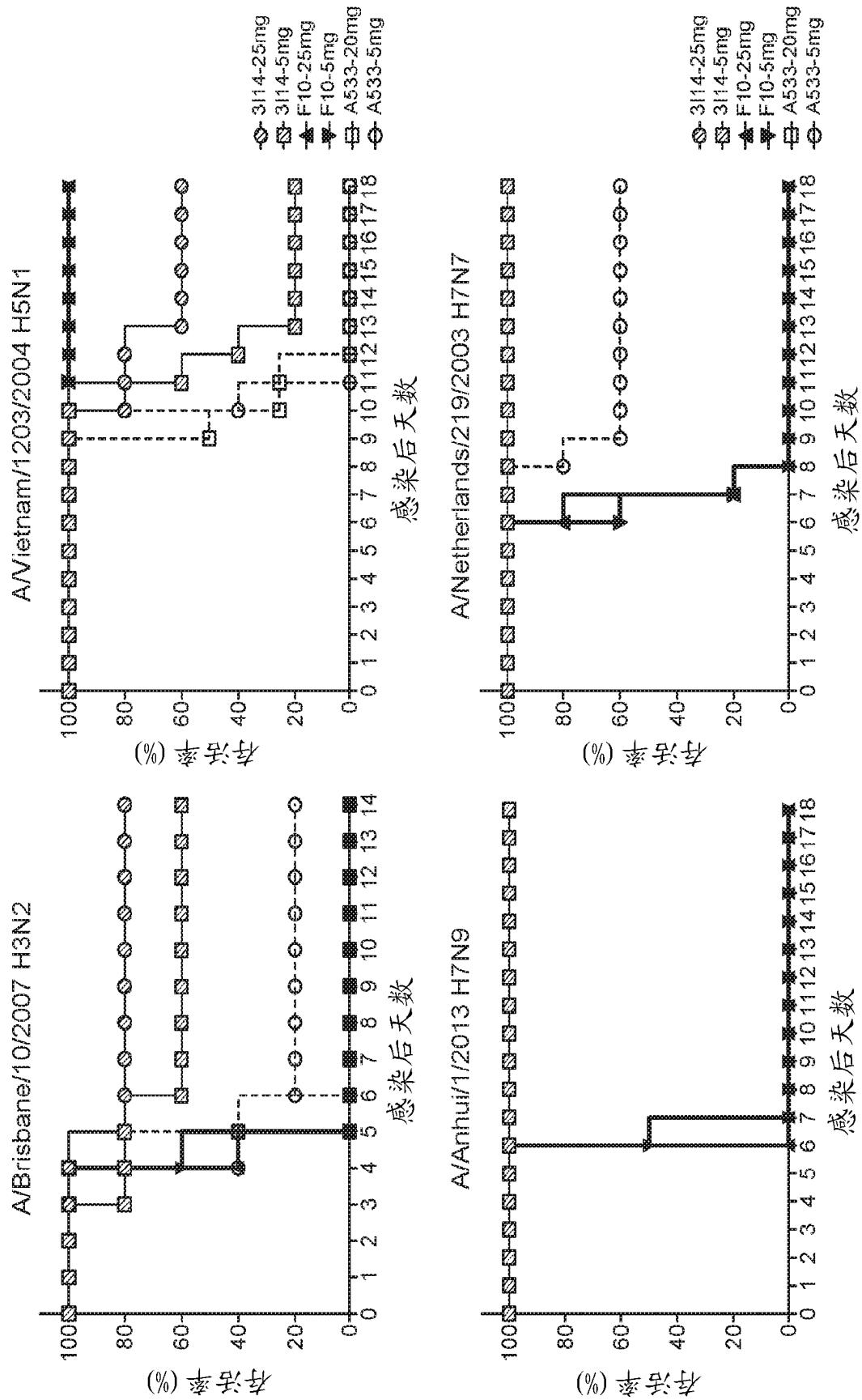


图 6A

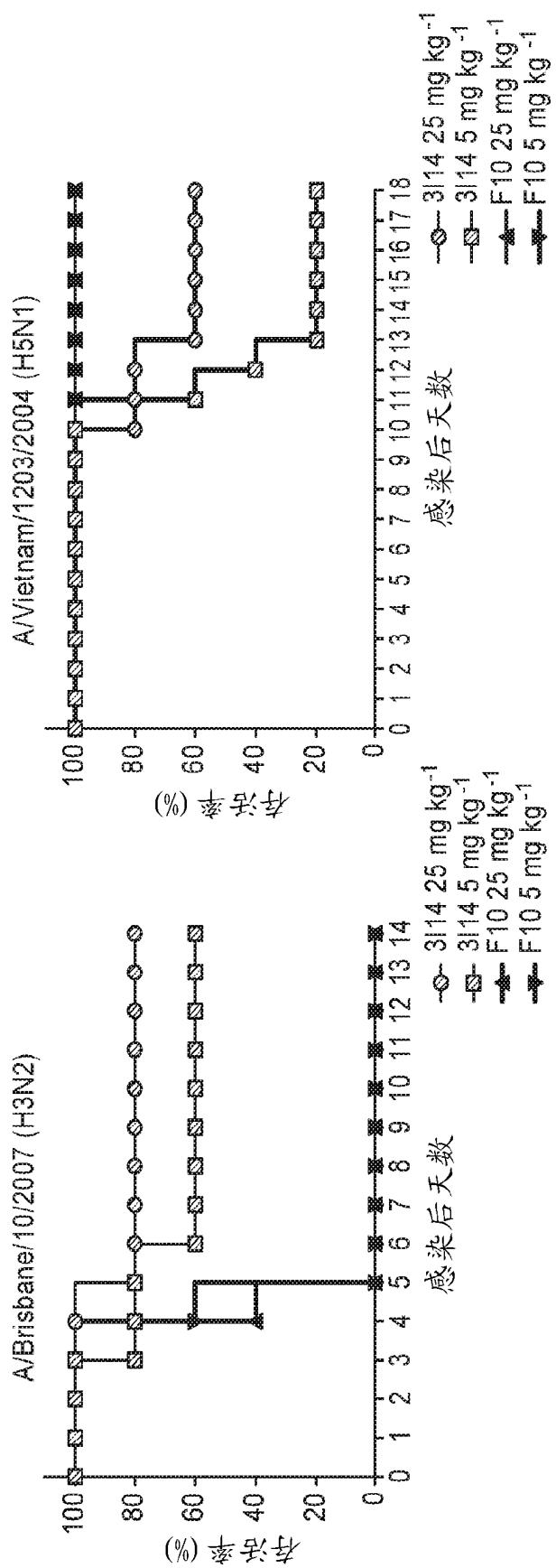
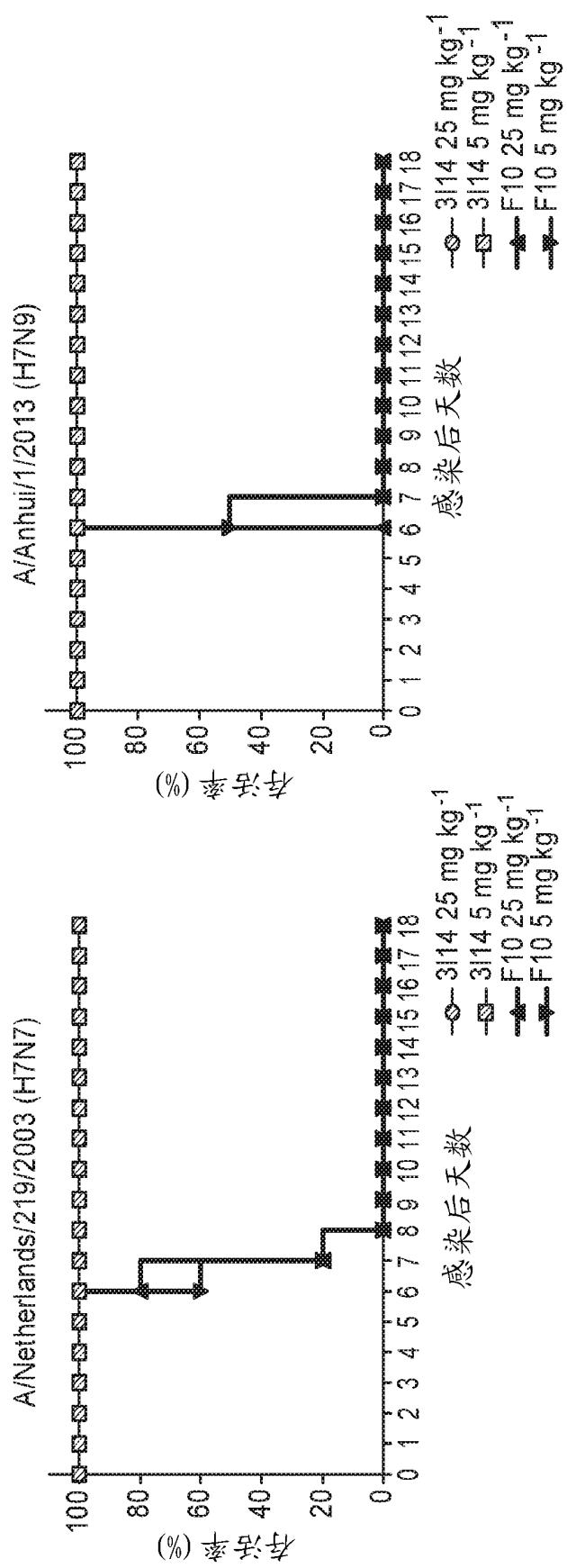


图 6A续



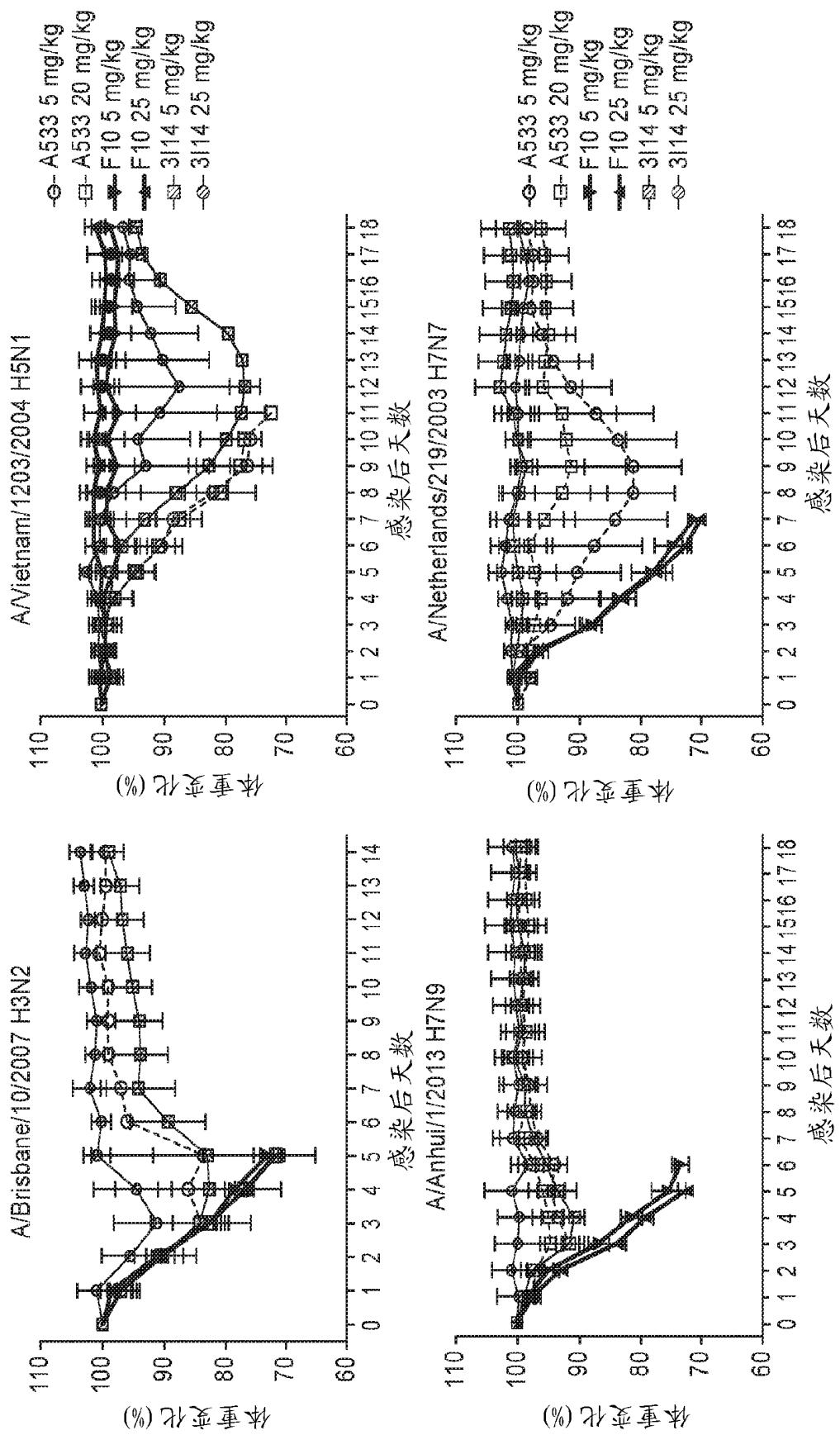


图 6B

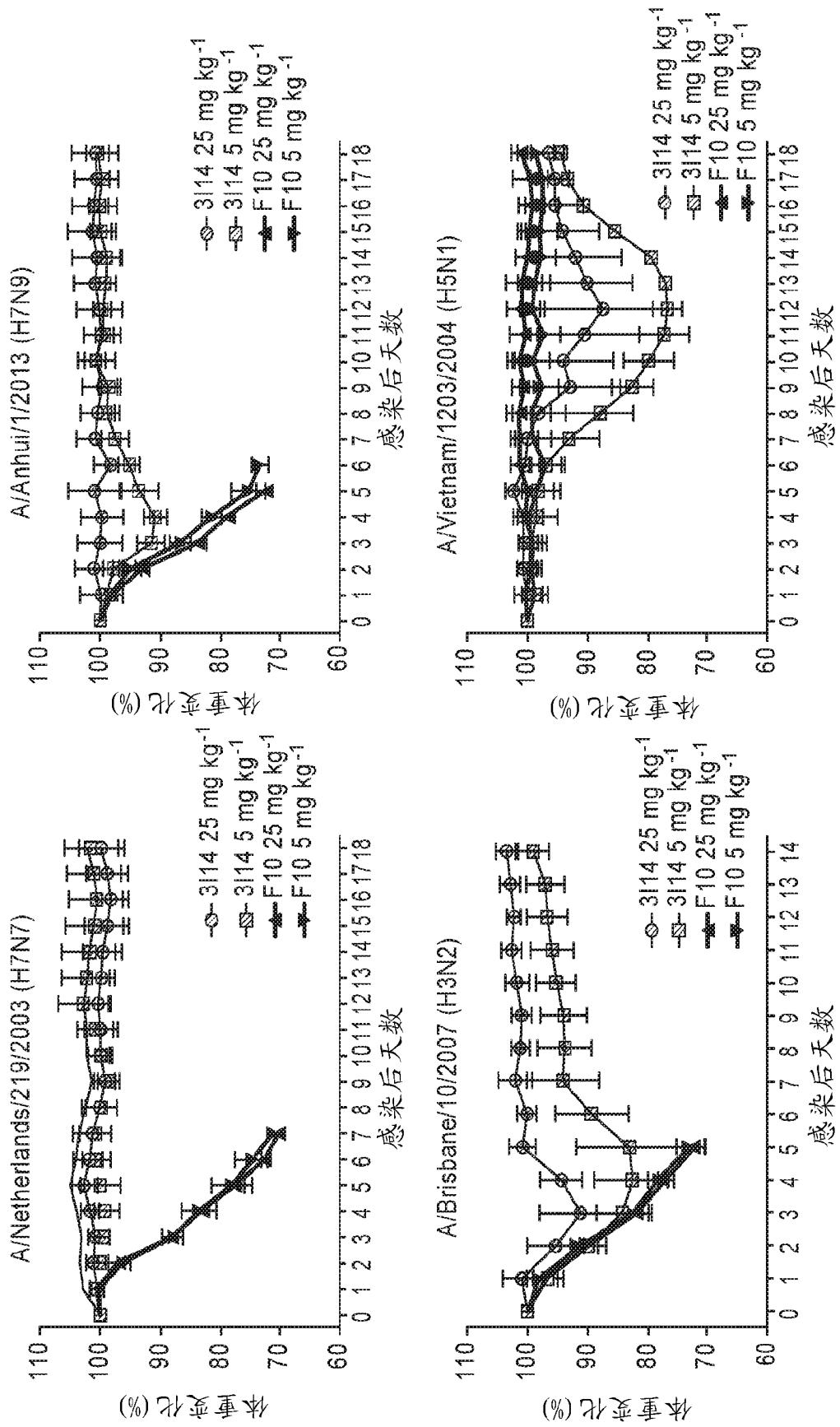


图 6B续

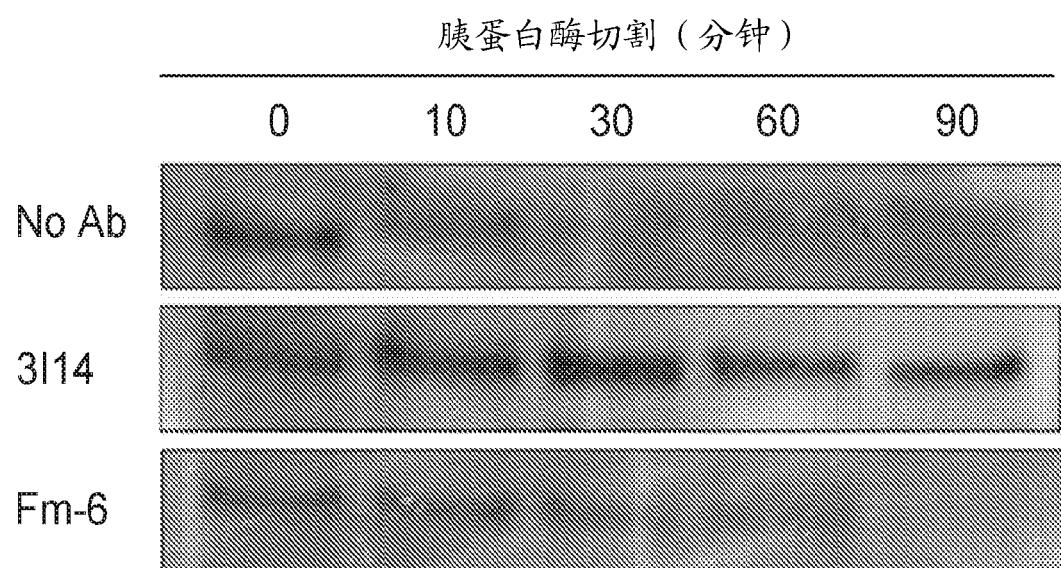


图 7

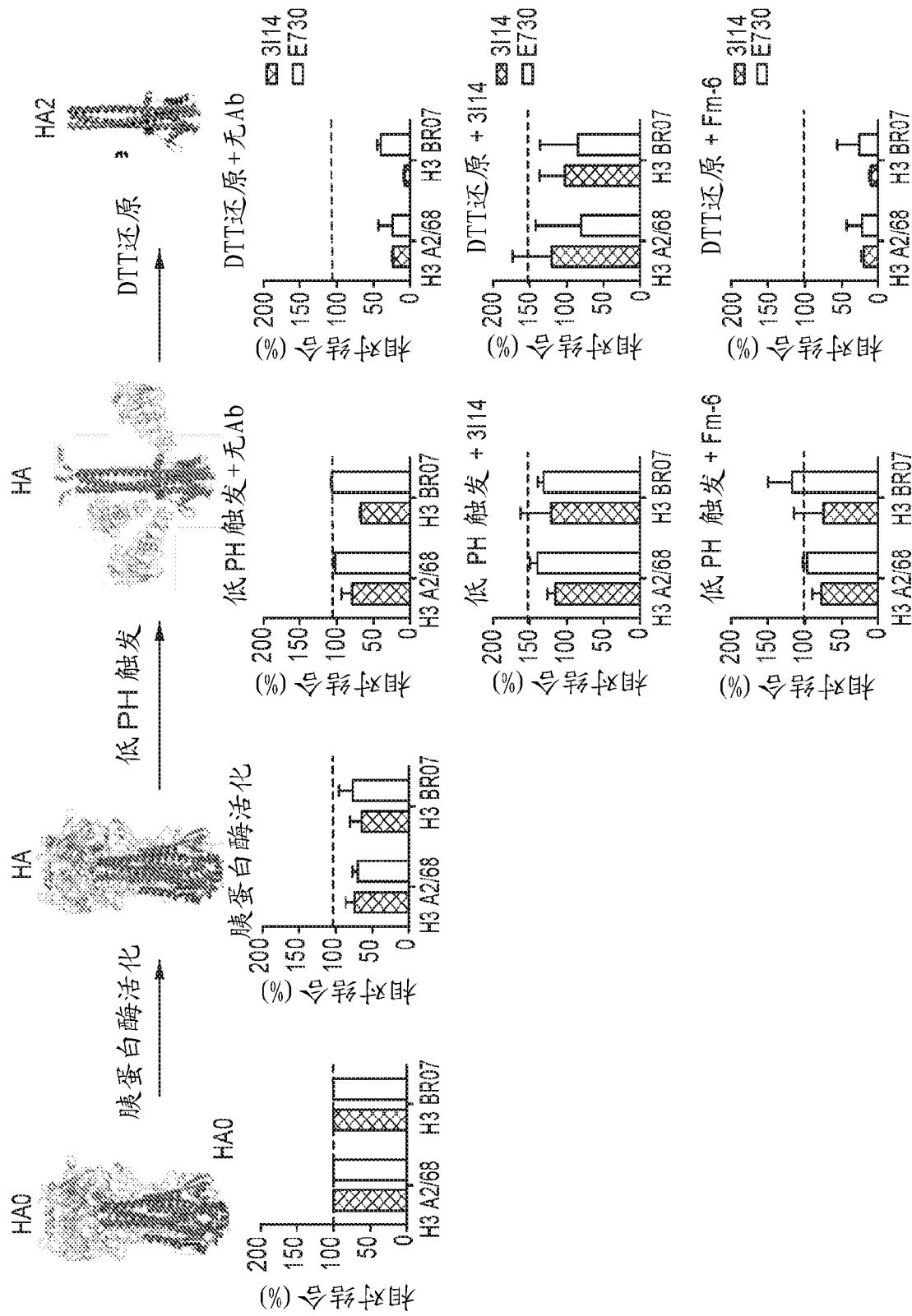


图 8

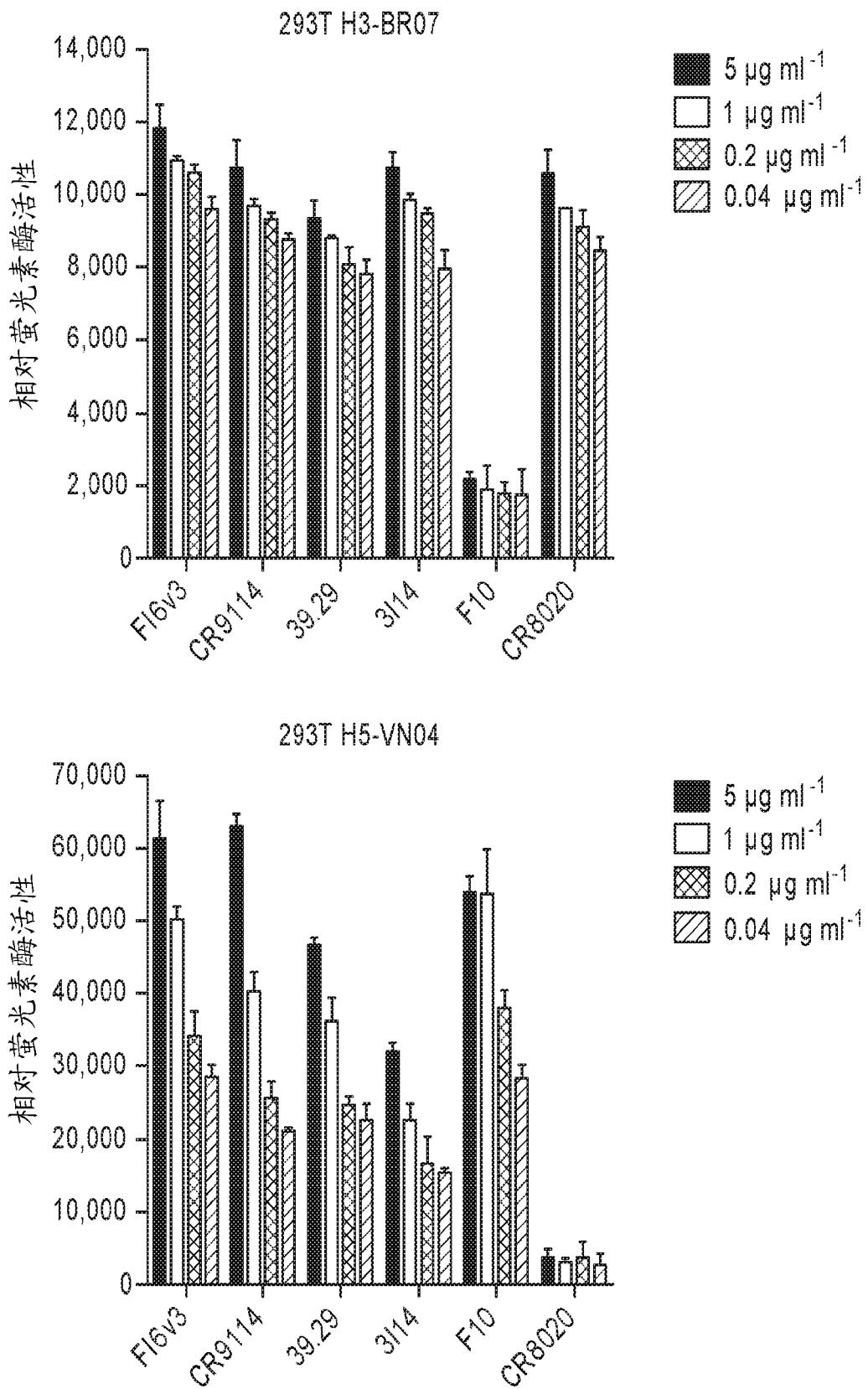


图 9A

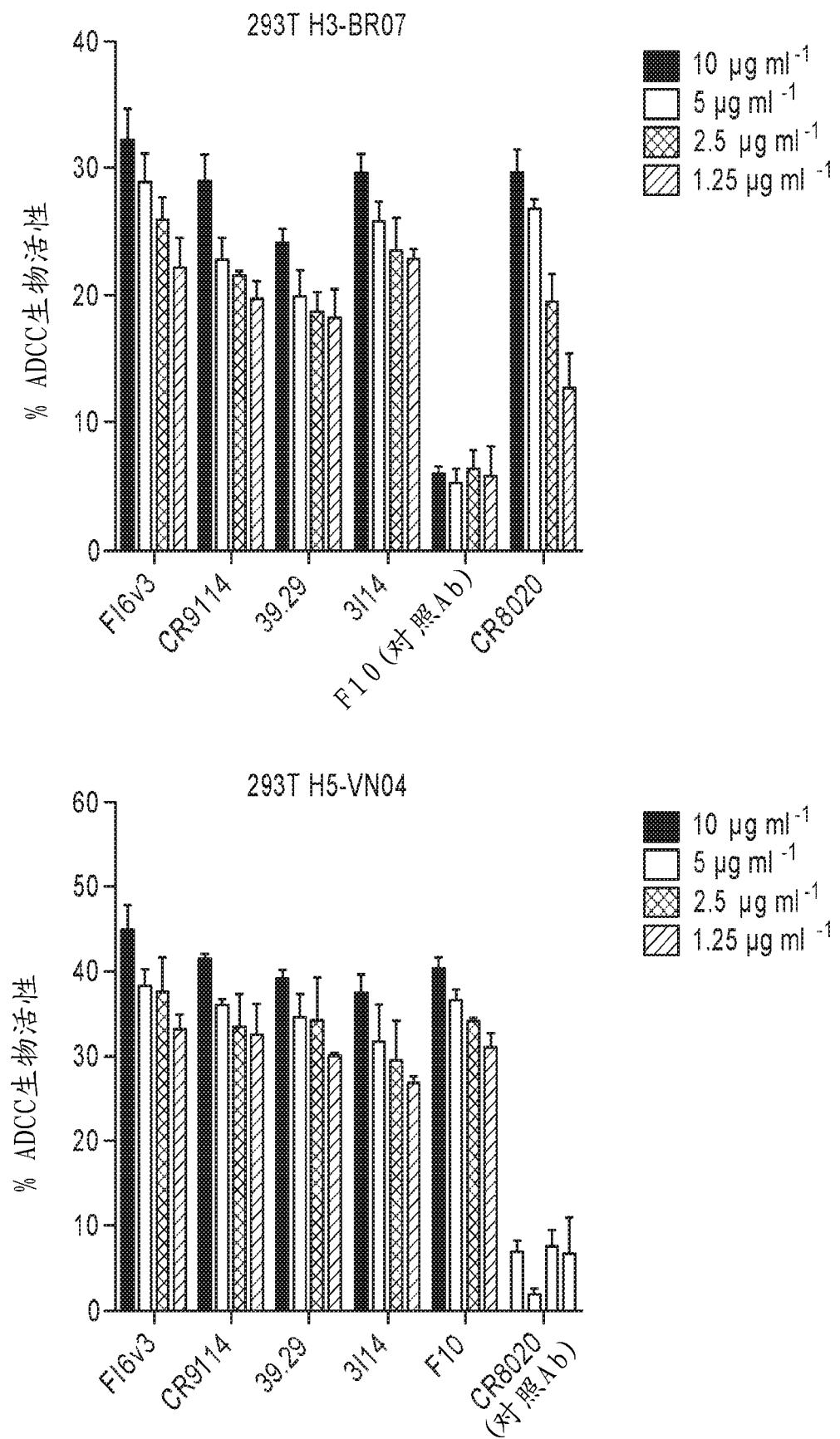


图 9B

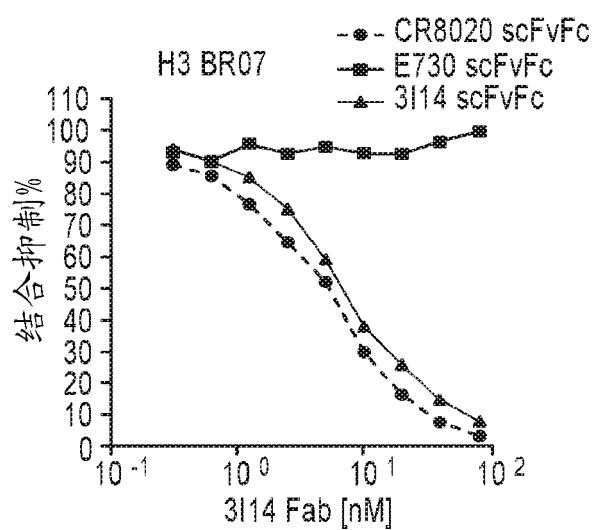


图 10A

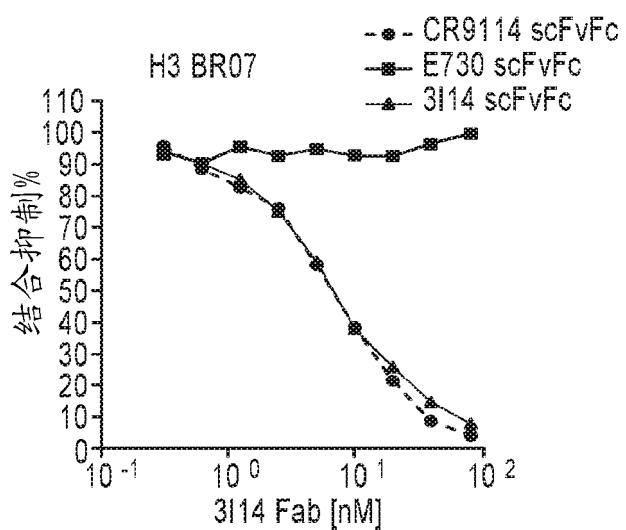


图 10B

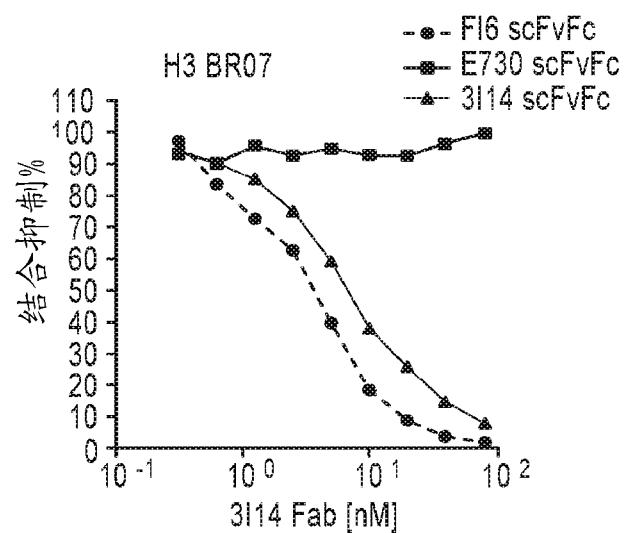


图 10C

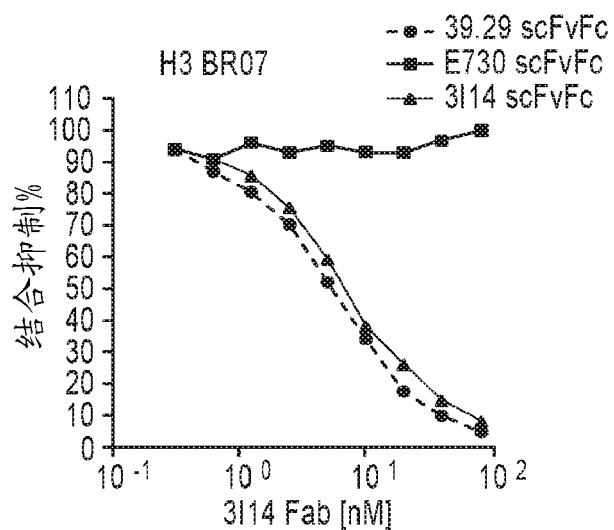


图 10D

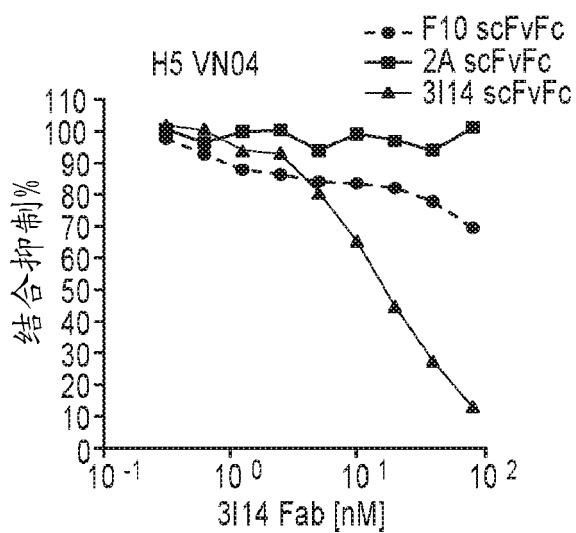


图 10E

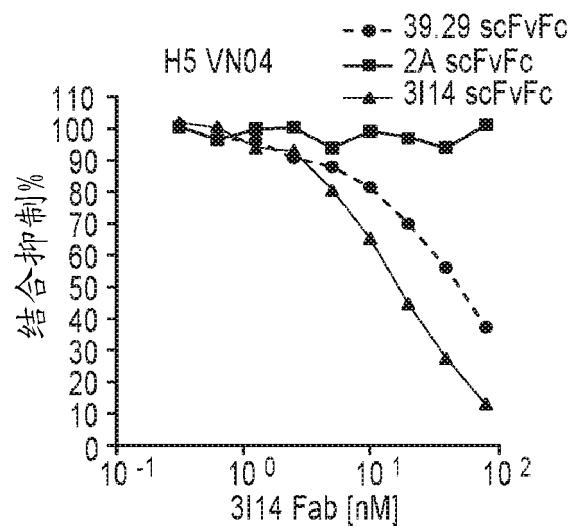


图 10F

A		10	20	30	40	50	60
3 14 VH	QVQLLESGGG	VVQPGRSLLR	SCAASGFTFS	NYGMHWVRQA	PGKGLEWVAI	TISFDGSKKKY	
VH3-30*18V.....S.....V.....N.....	
GHD3-22*01							
GHJ4*02	70	80	90	100	110	120	
3 14 VH	ANSVKGRSTI	SRDNISKNTLS	LQMNISLGPED	TALYYCAKLP	SPYYFDSDREV	WVAASAFHFW	
VH3-30*18	..D.....F...Y.....RA.....V.....RV.....V.....	
GHD3-22*01							
GHJ4*02	130						
3 14 VH	QQGILTVSS						
VH3-30*18							
GHD3-22*01T.....	
GHJ4*02							
B		10	20	30	40	50	60
3 14 VL	NEMLITQFOPSA	SGTPGQORVII	SCSGSSSSNIG	GNTVHWFOQL	PGTAPKLIIY	TNSLRPSGVF	
GLV1-44	QSV.....S.....N.....Y.....S.....NQ.....	
GLJ3*02	70	80	90	100	110		
3 14 VL	DRFSGSKSGT	SASLAISSGLO	SEDEADYYCA	AMDDSLNGQV	FGGGTTKLTVL		
GLV1-44	W.....	
GLJ3*02							

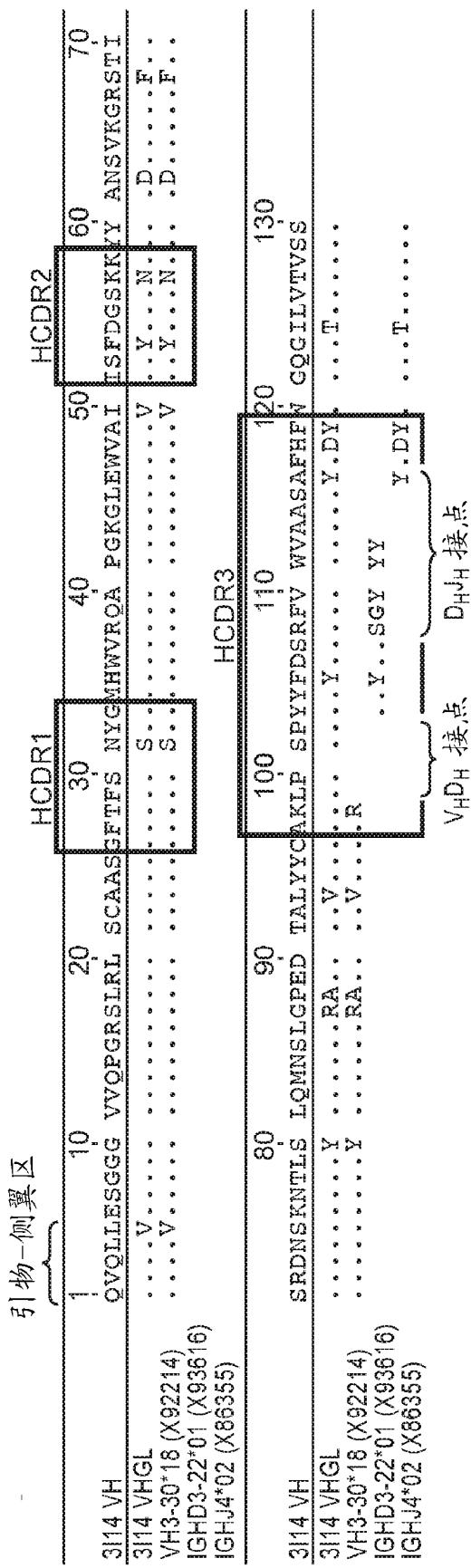


图 11C

引物-侧翼区		LCDR1		LCDR2	
3114 VL	10	20	30	40	50
3114 VLGL	QSV	SGTPGORVTI	SCSGSSSNIG	GNTIHWFOOL	PGTAPKLIIY
IGLV1-44 (Z73654)	QSV	S..	N.Y..
IGLV3*02 (M15642)	S..	N.Y..
LCDR3		LCDR4		LCDR5	
3114 VH	80	90	100	110	120
3114 VLGL	SASLAISGLO	SEDEADYYCA	AWDDSLINGQV	EGGGTKILIV	W.....W.....W.....W.....W.....
IGLV1-44 (Z73654)
IGLV3*02 (M15642)

图 11D

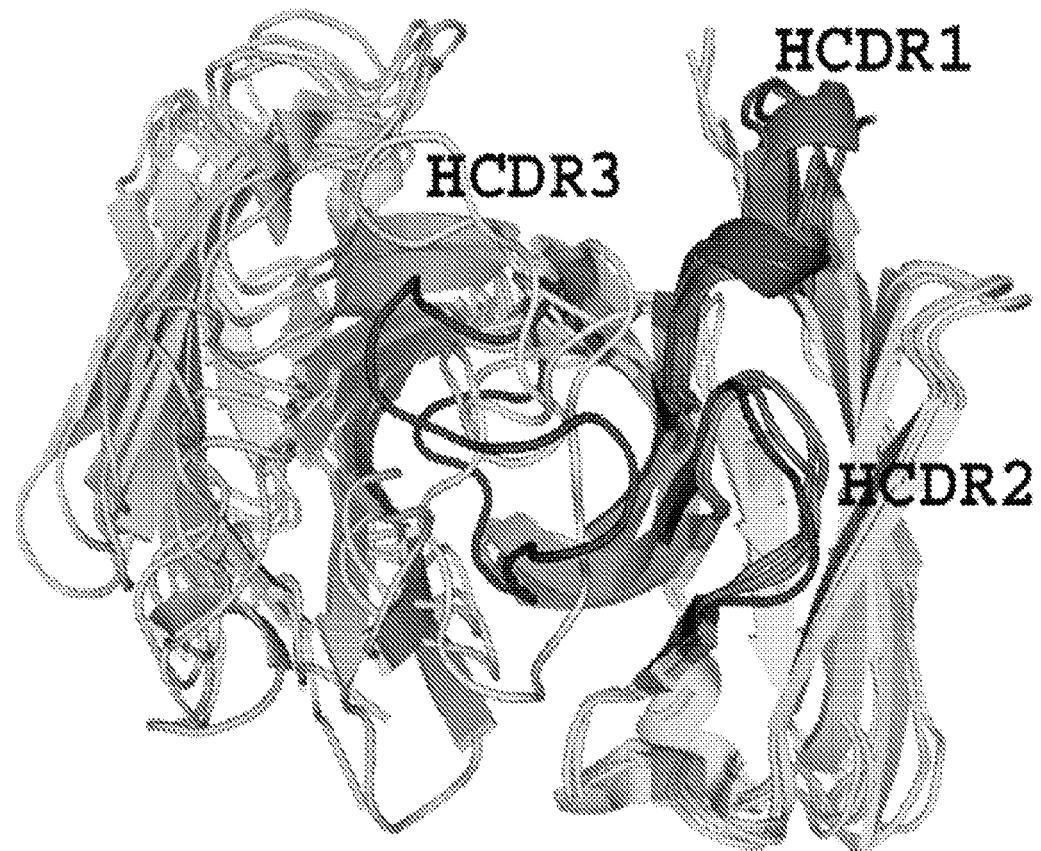


图 12A

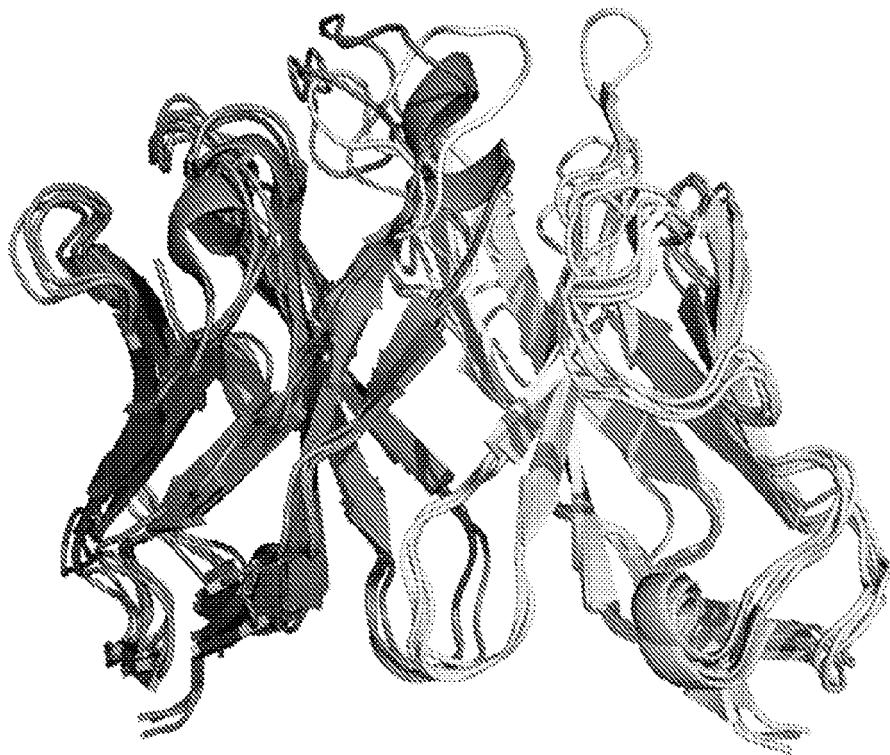


图 12B

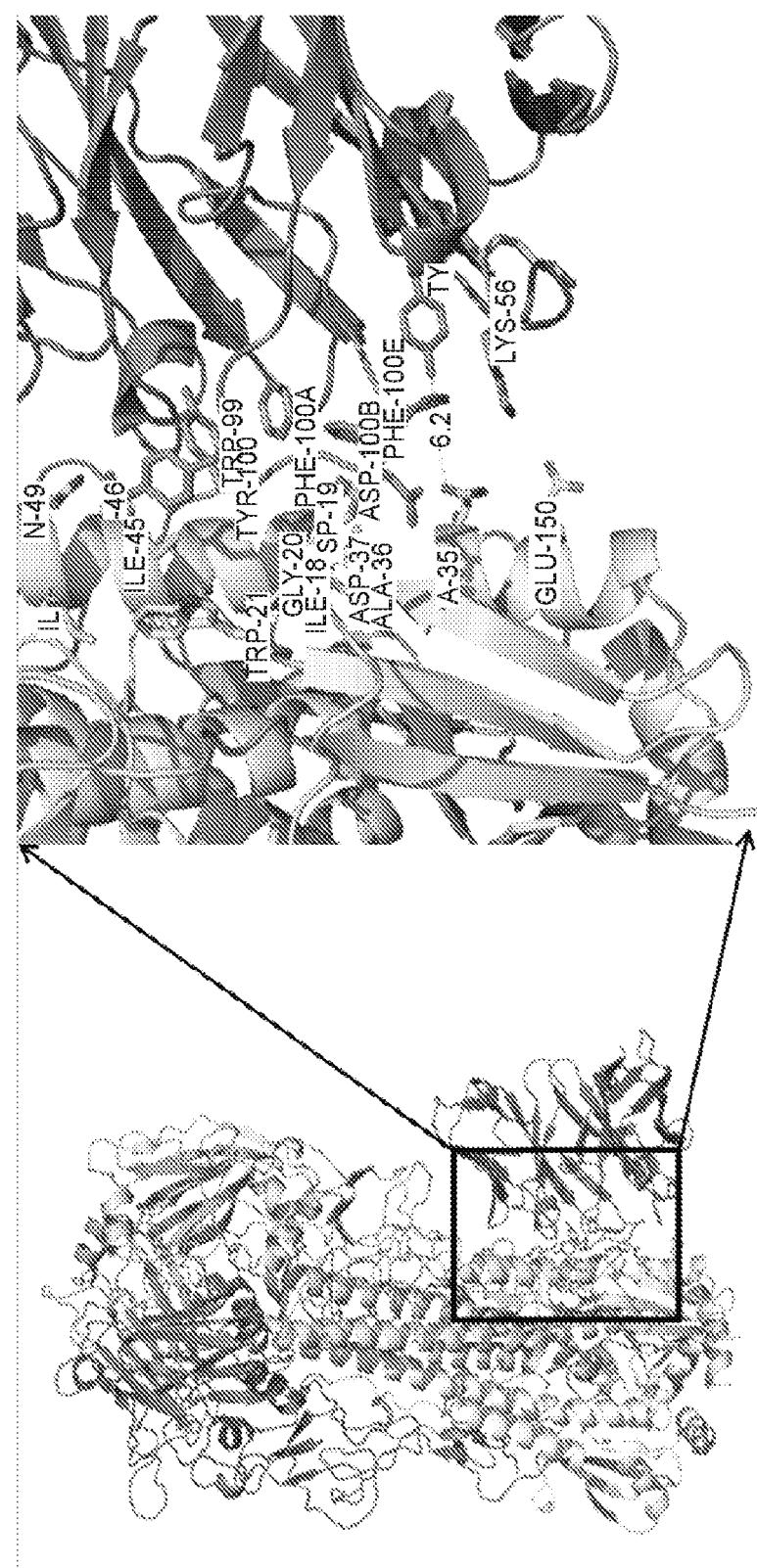


图 13A

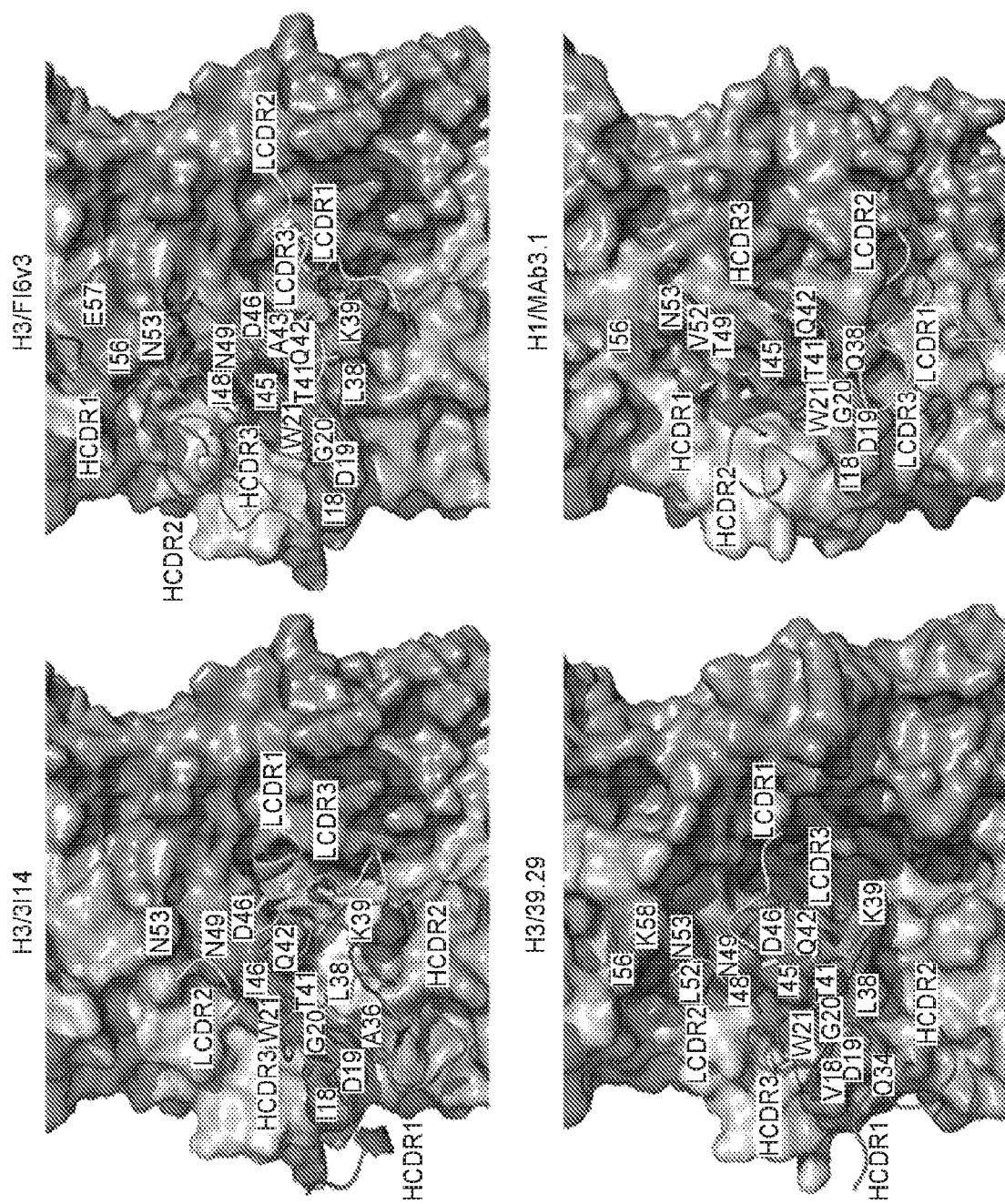


图 13B

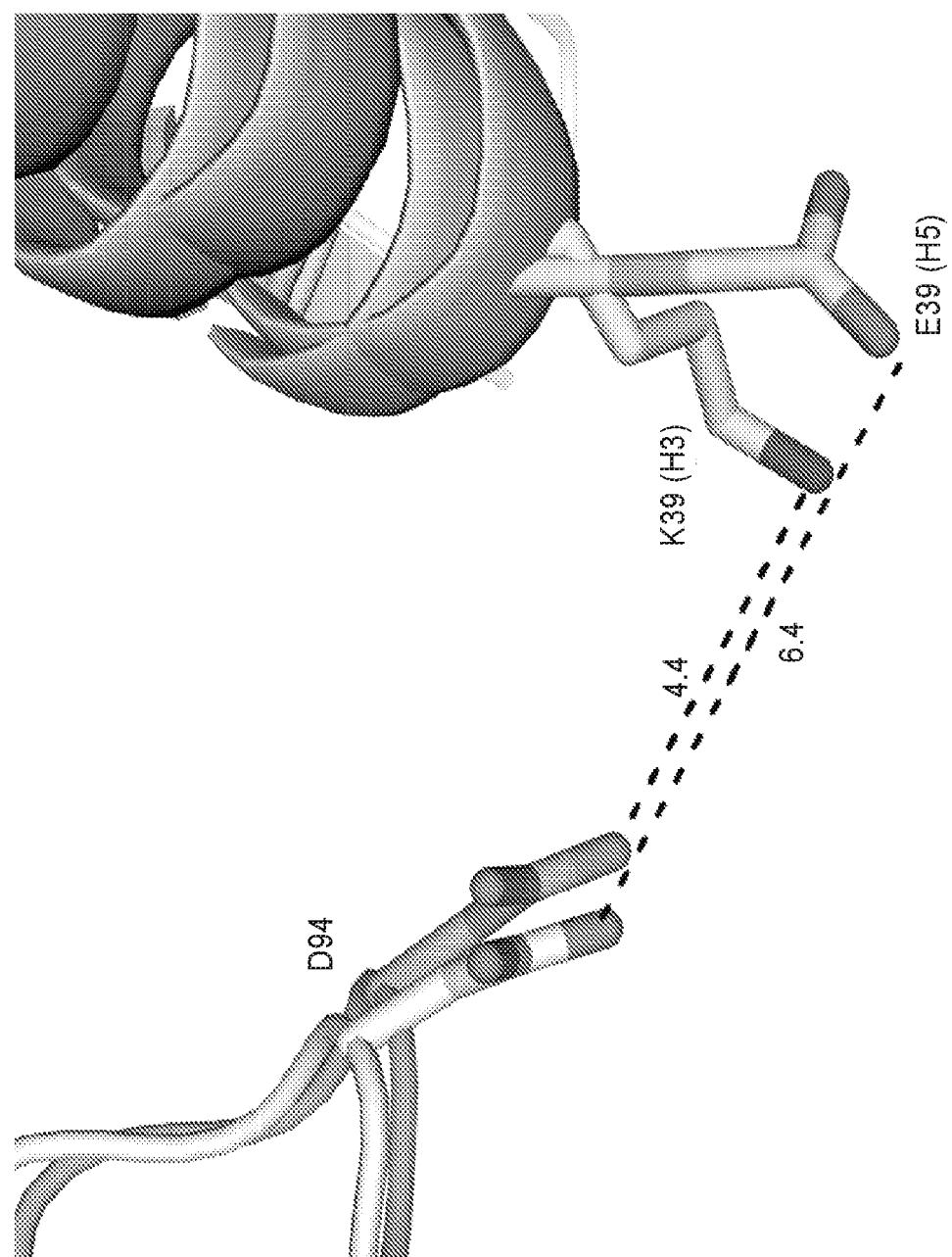


图 13C

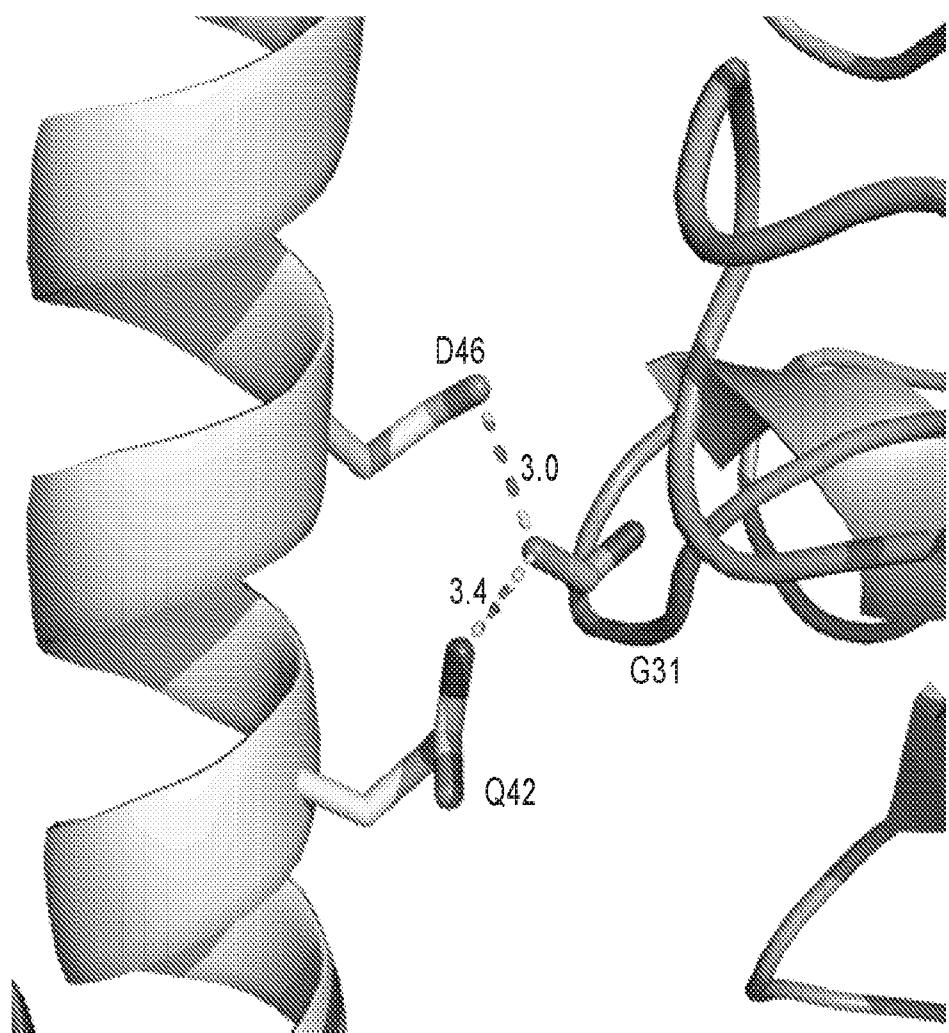


图 13D

		1	1	2	2		3	3		4	4			4	4	4		4	4	5
		8	9	0	1		8	9		1	2			5	6	7		8	9	0
H3		I	D	G	W		L	K		T	Q			I	D	Q		I	N	G
H5		V	D	G	Q		K	E		T	Q			I	D	G		V	T	N
B		I	A	G	W		L	K		T	Q			I	N	K		I	T	K

图 14A

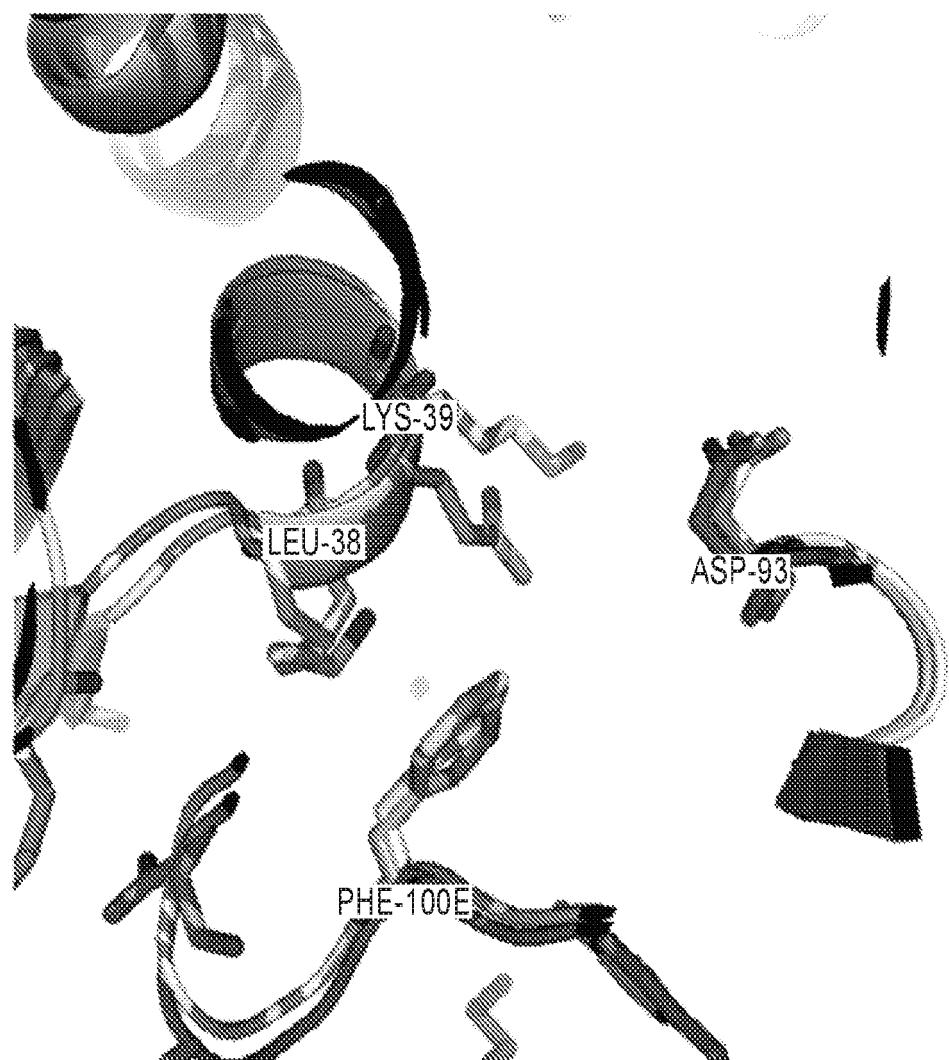
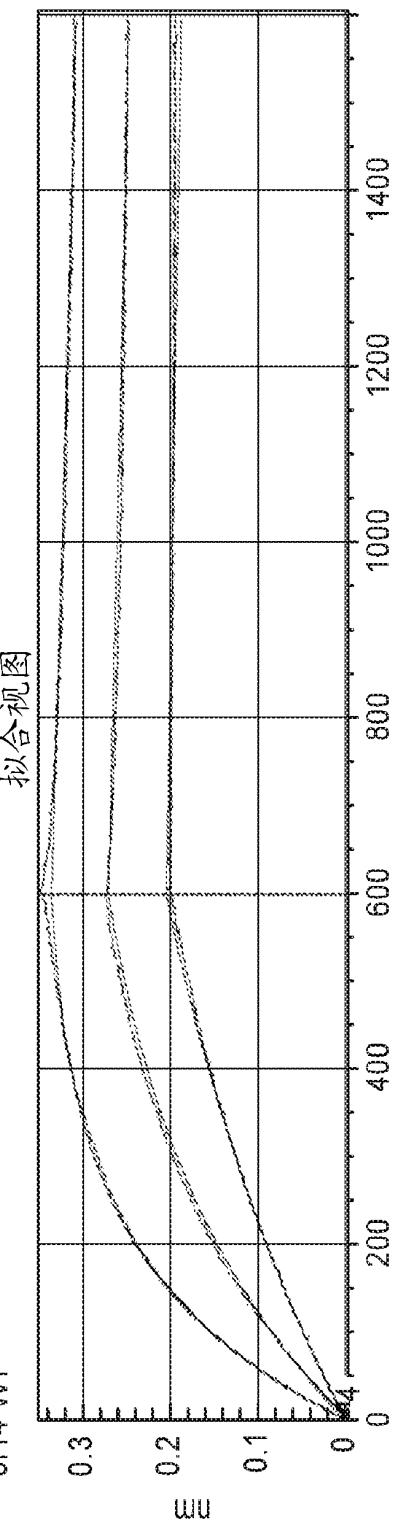
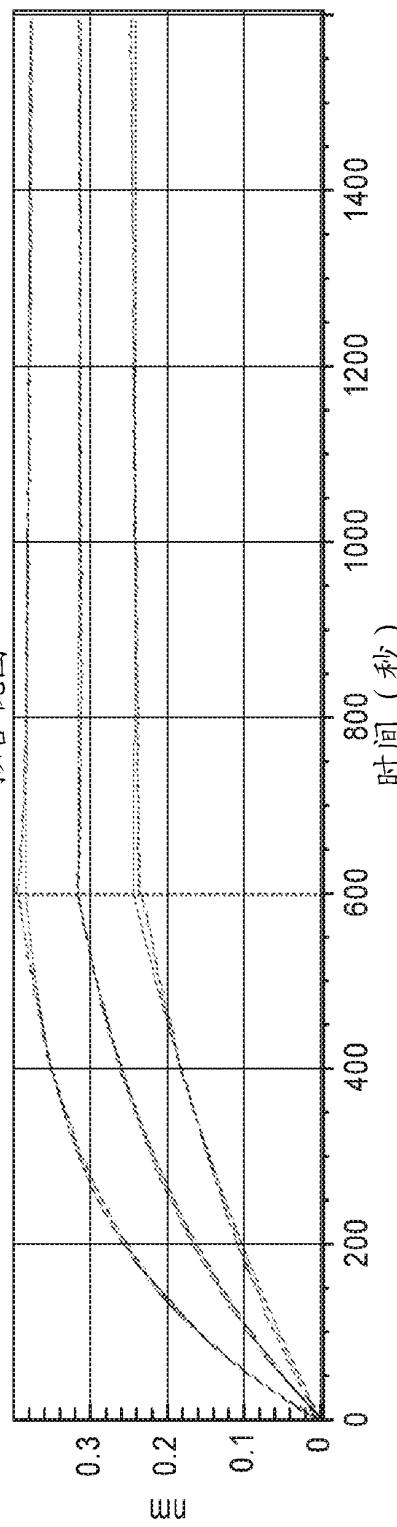


图 14B

3|14 WT

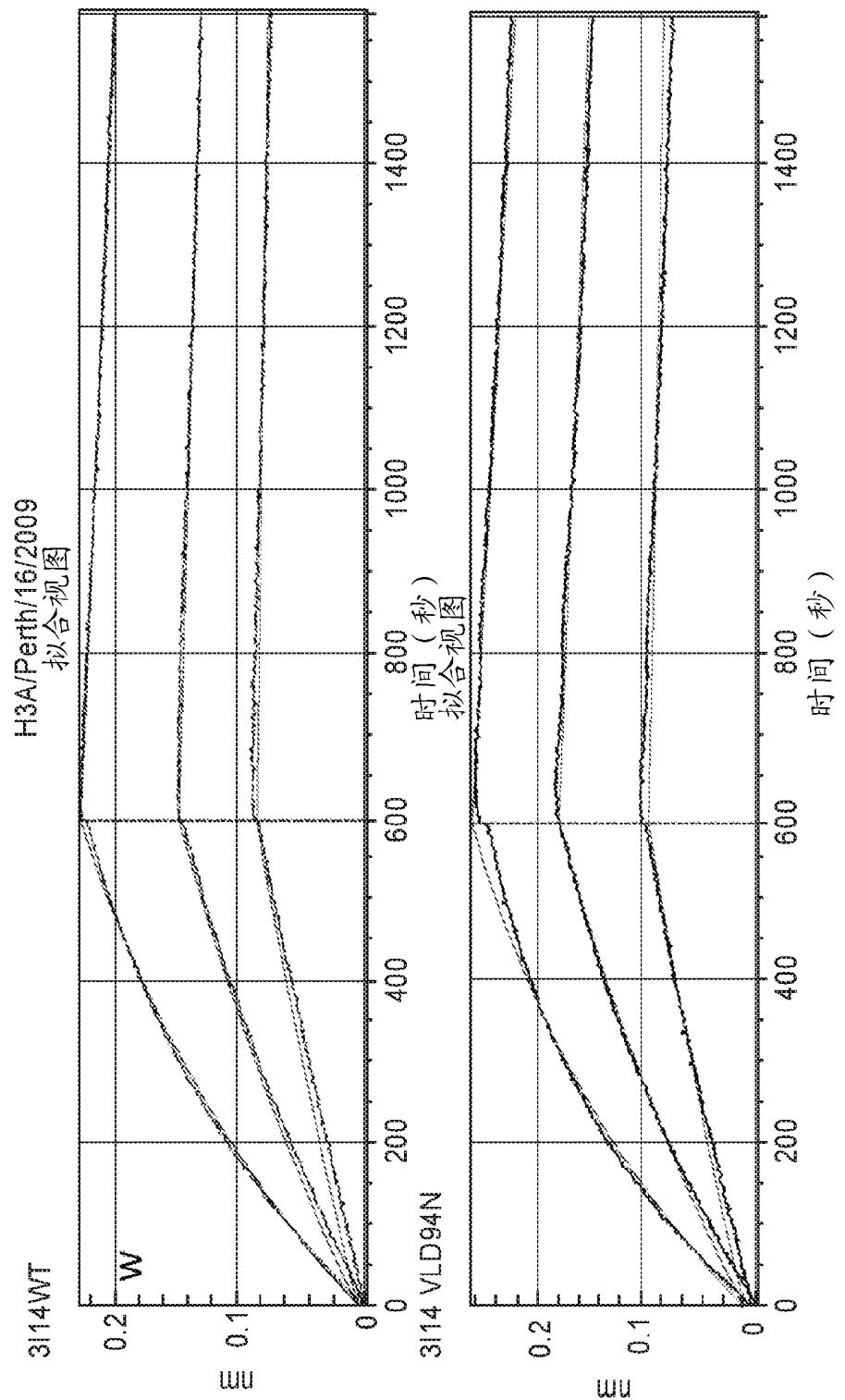


3|14 VLD94N



抗体	应答	KD(M)	KD 误差	kon(1/M/s)	kon 误差	kdis(1/s)	kdis 误差
3 14 wt	0.3438	1.15E-09	8.50E-12	7.77E+04	1.61E+02	8.93E-05	6.34E-07
3 14 VLD94N	0.3927	1.87E-10	9.39E-12	6.72E+04	1.50E+02	1.26E-05	6.30E-07

图 15A



抗体	应答	KD(M)	KD 误差	kon(1/Ms)	kon 误差	kdis(1/s)	kdis 误差
3 14 WT	0.2215	1.96E-09	2.13E-11	6.47E+04	4.66E+02	1.27E-04	1.03E-06
3 14 VLD94N	0.247	2.34E-09	2.66E-11	7.41E+04	6.16E+02	1.73E-04	1.35E-06

图 15B

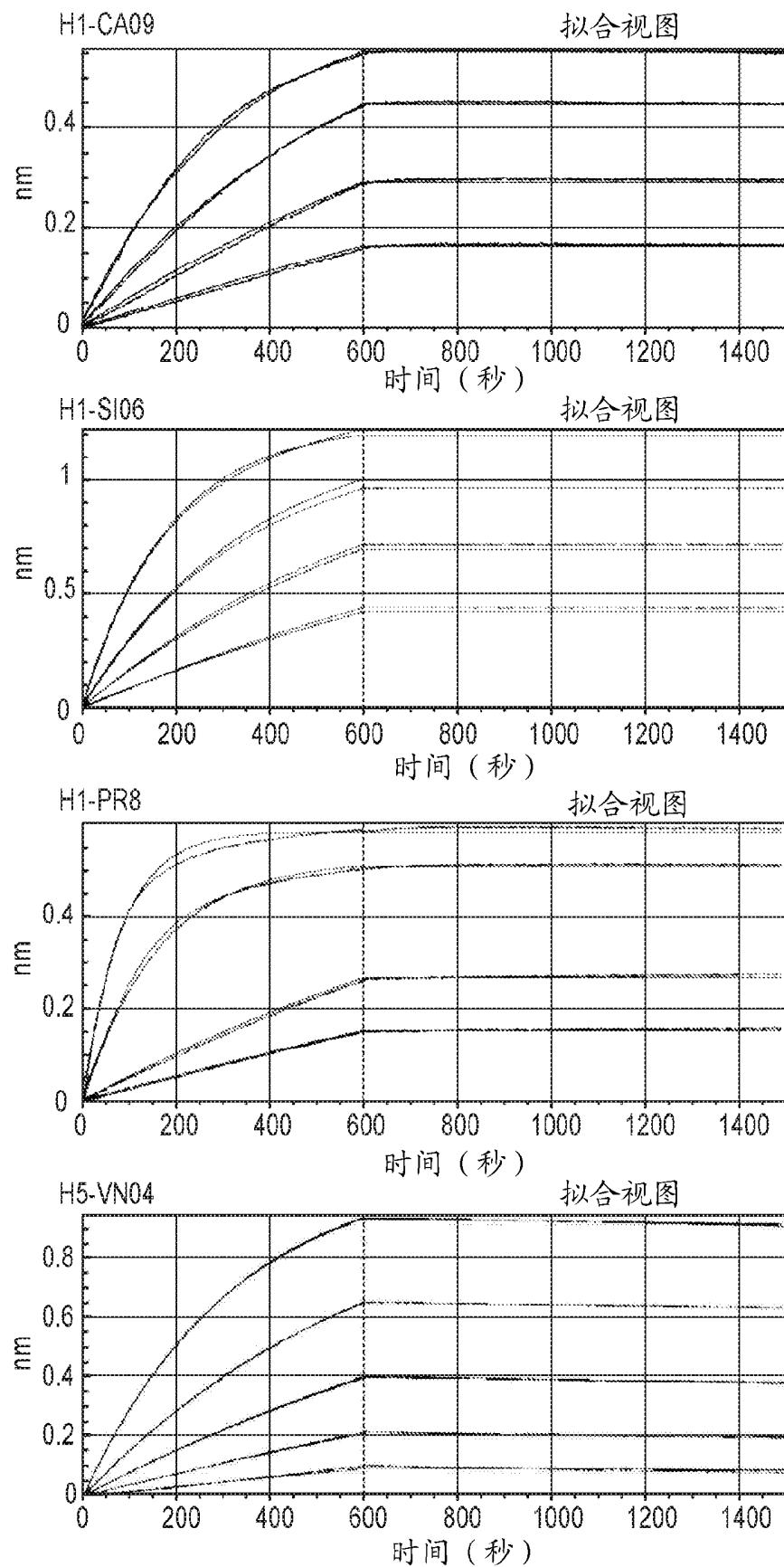


图 15C

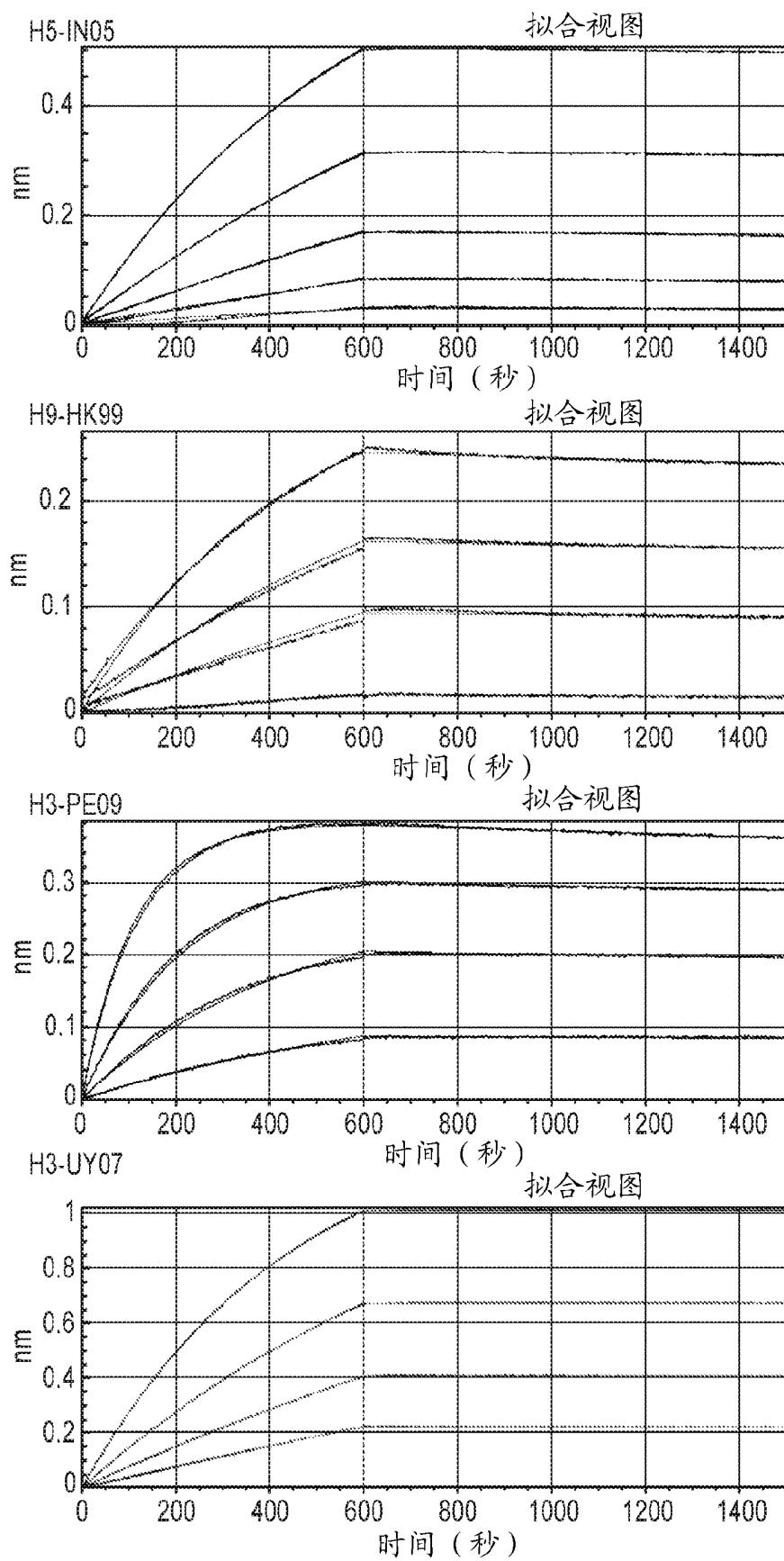


图 15D

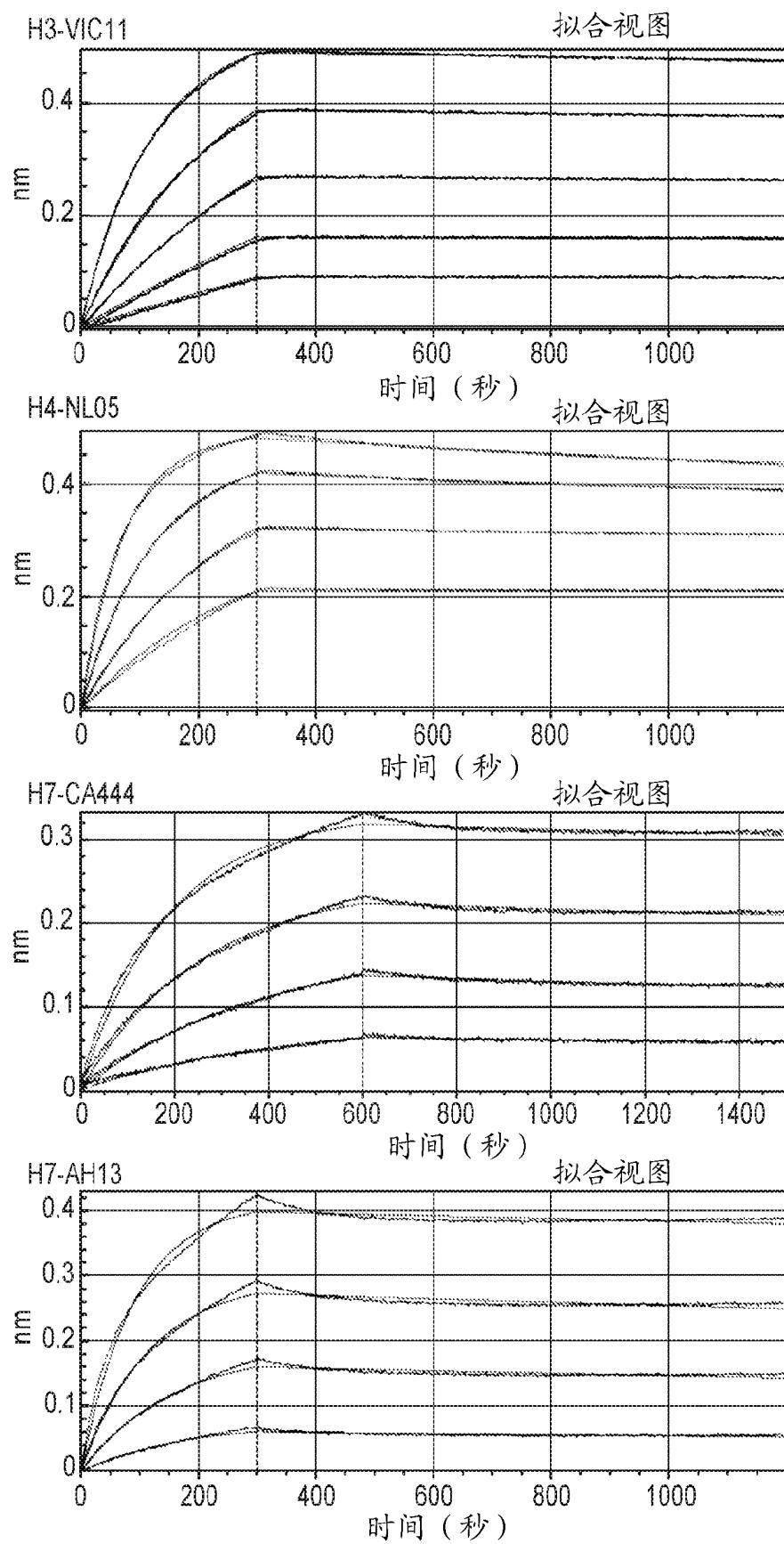


图 15E

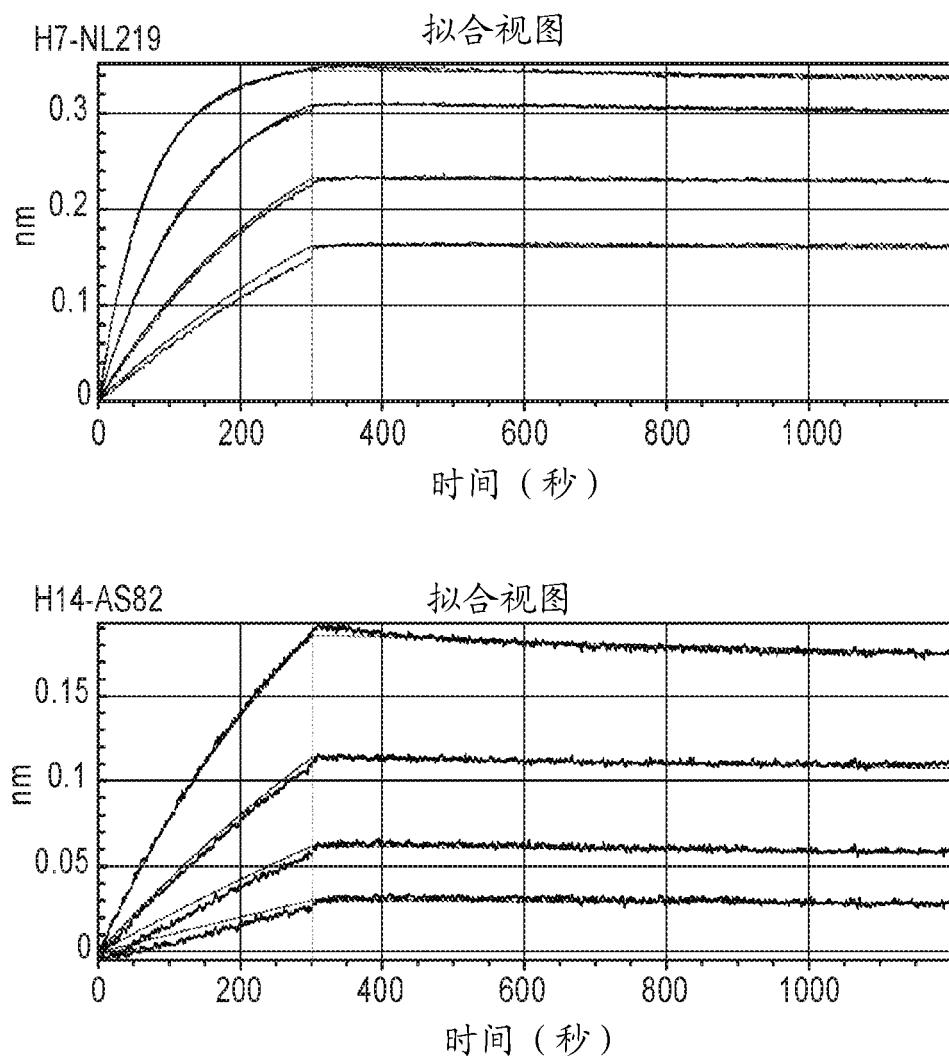


图 15F

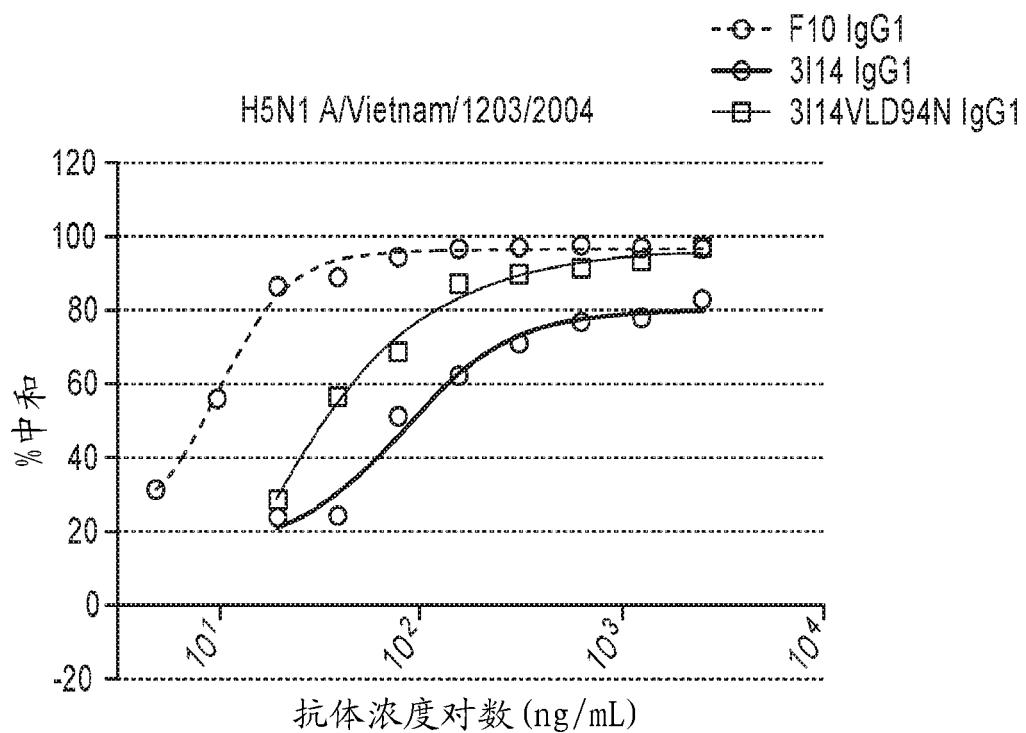


图 16A

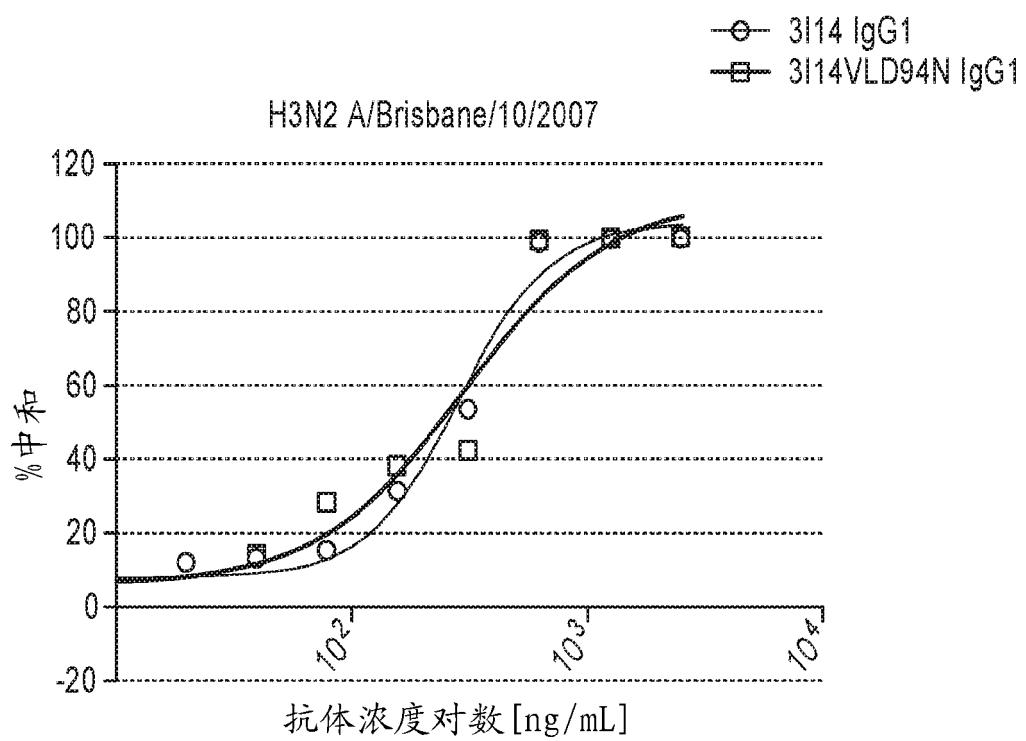


图 16B

A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

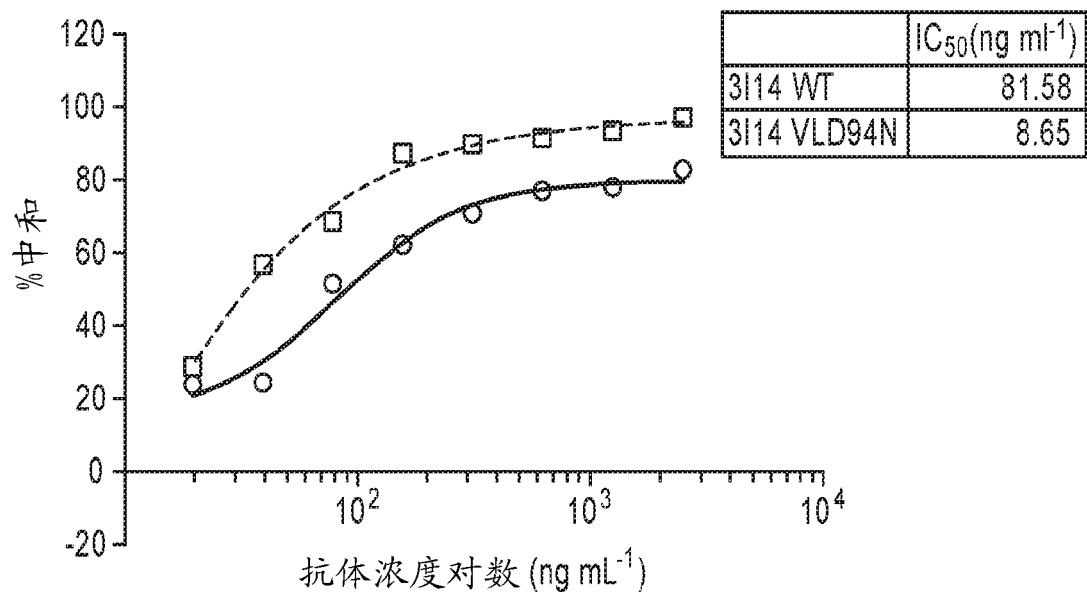


图 16C

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)

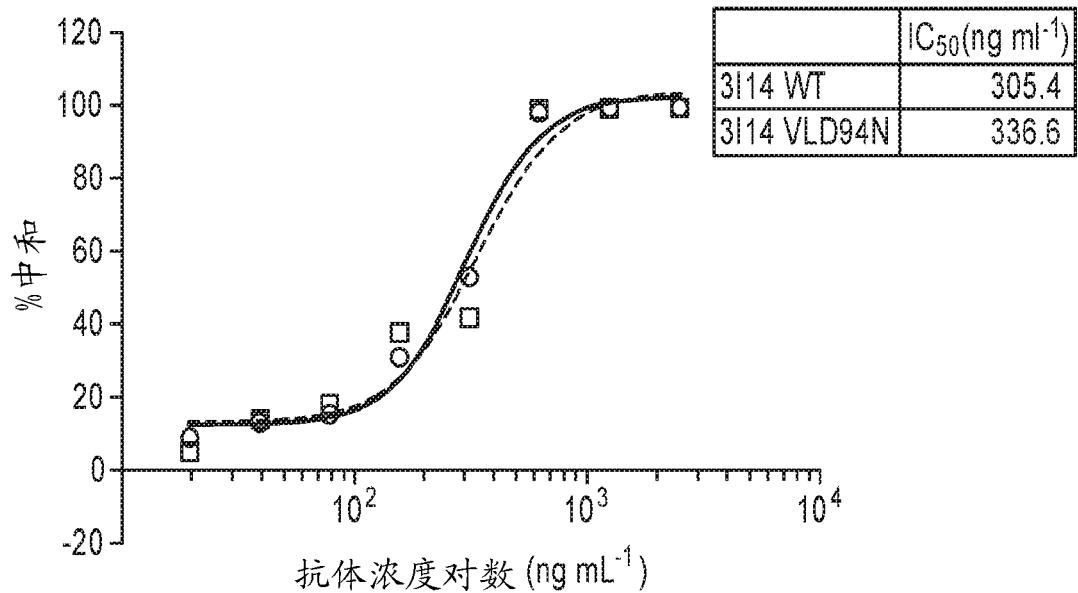


图 16D

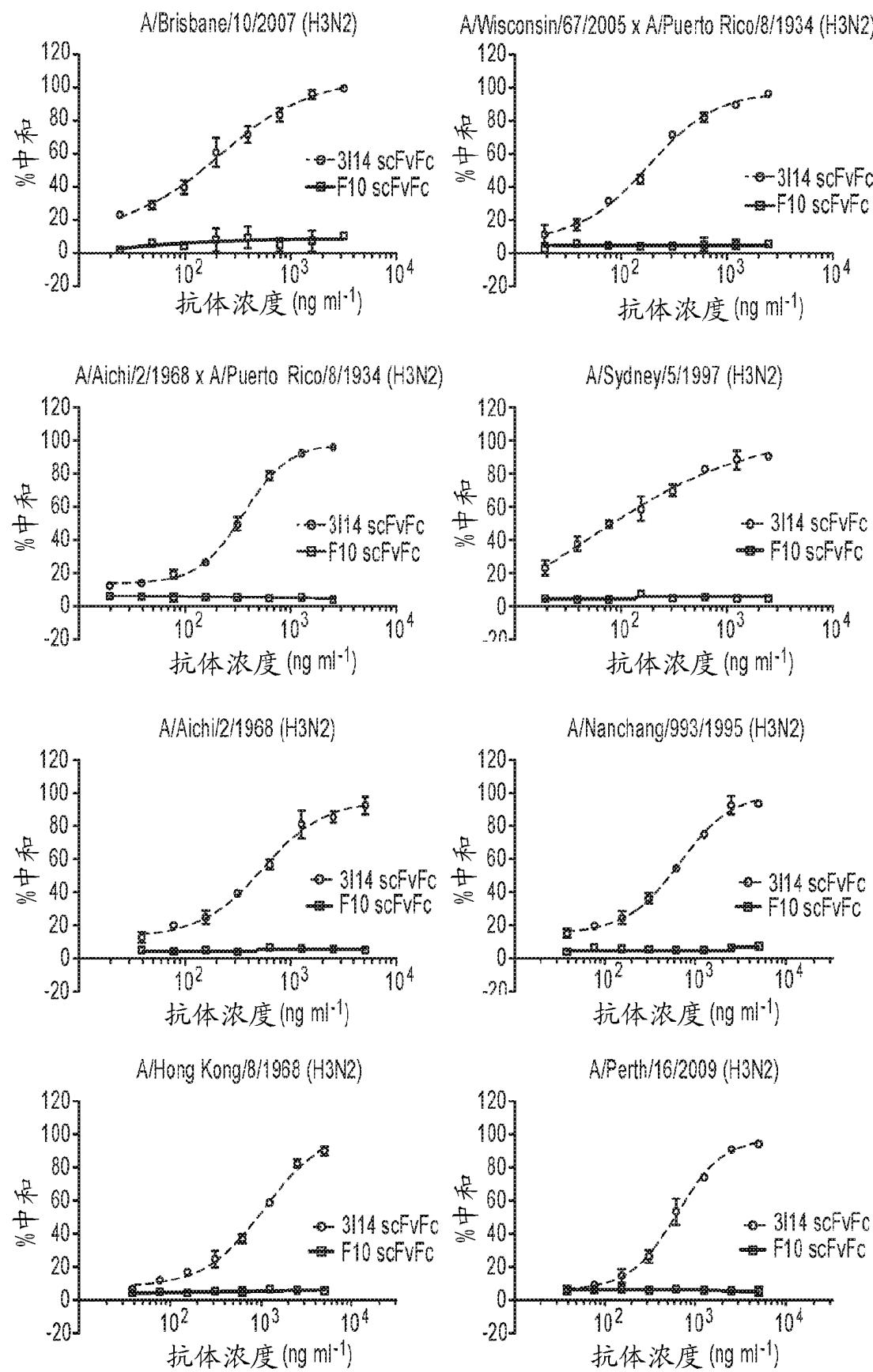


图 17

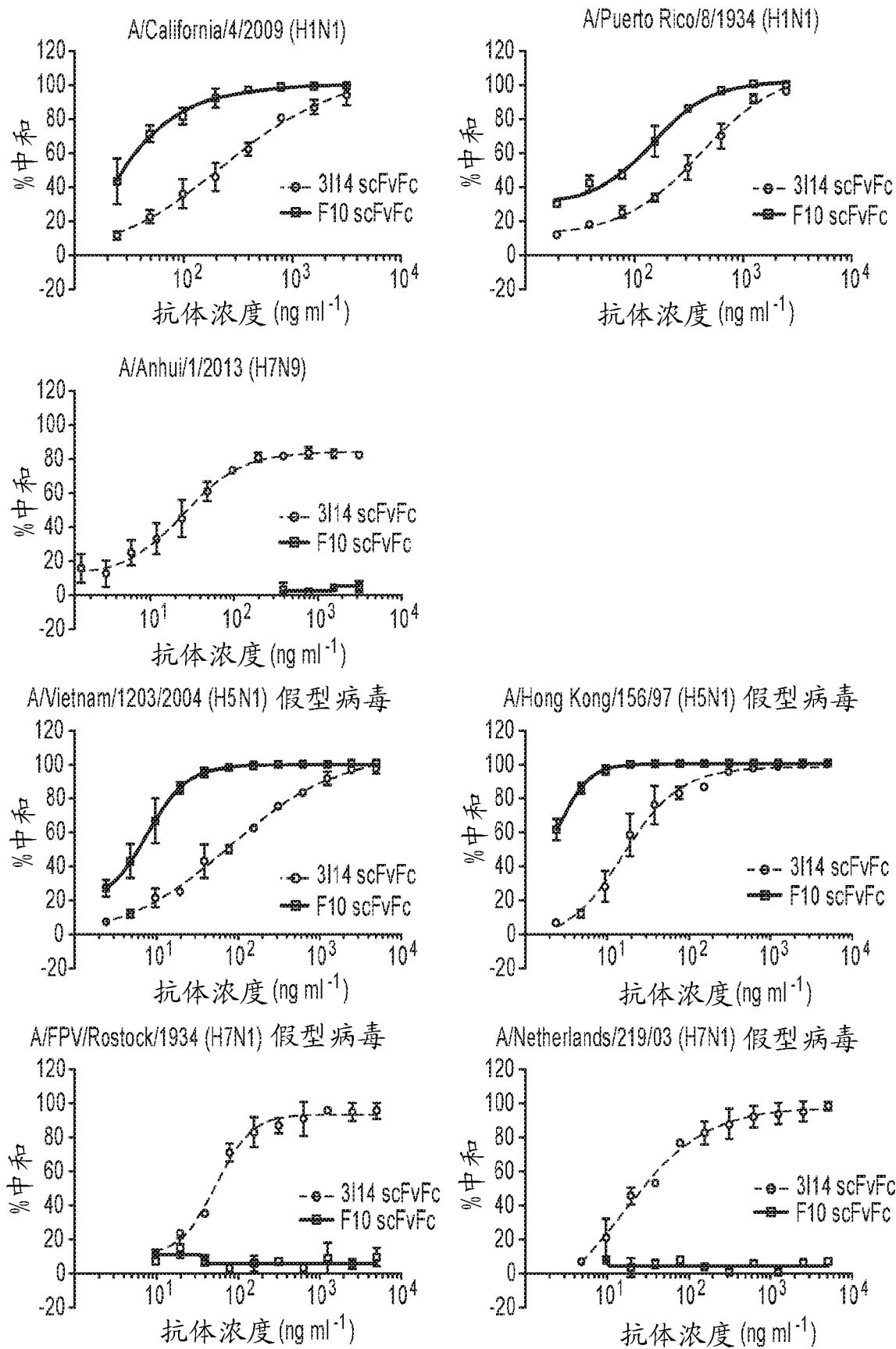


图 17 续

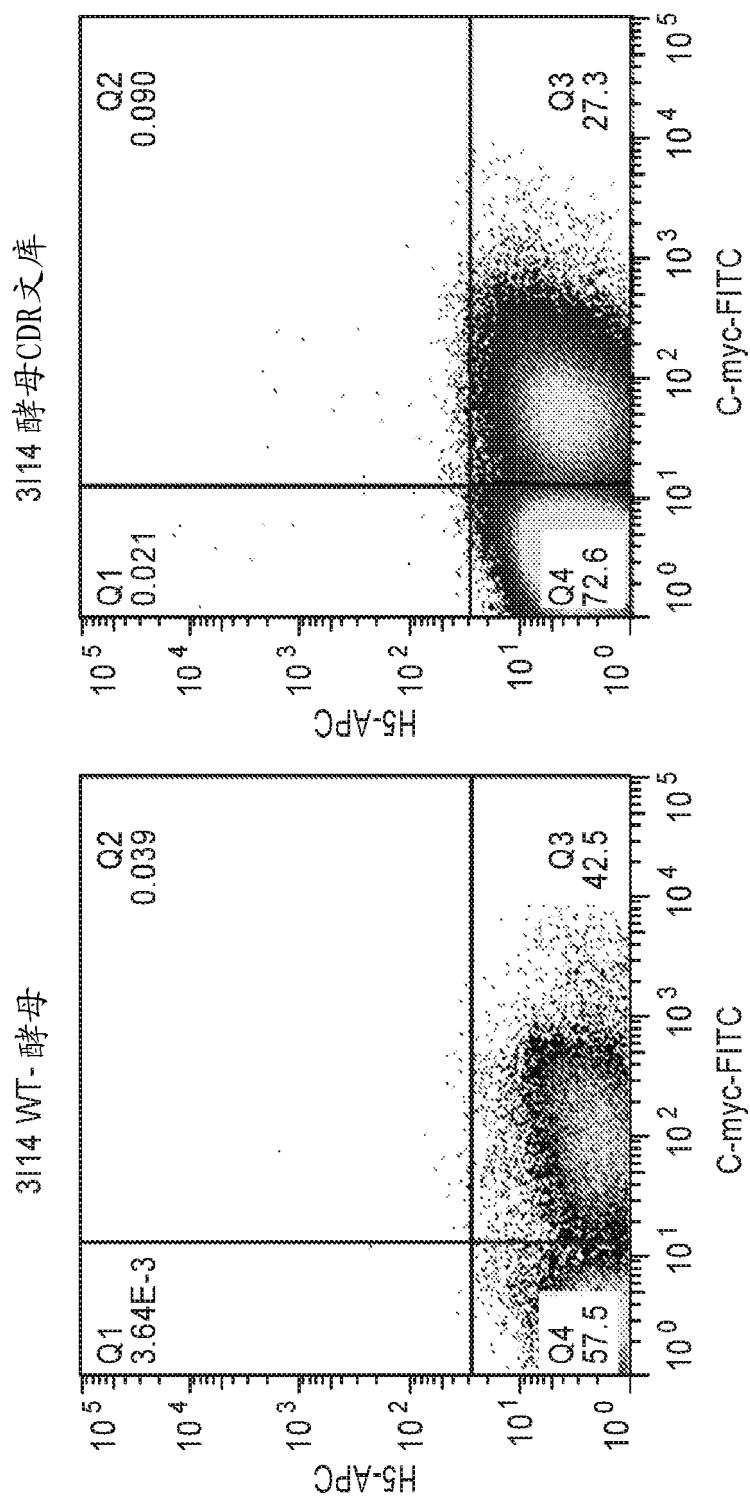


图 18

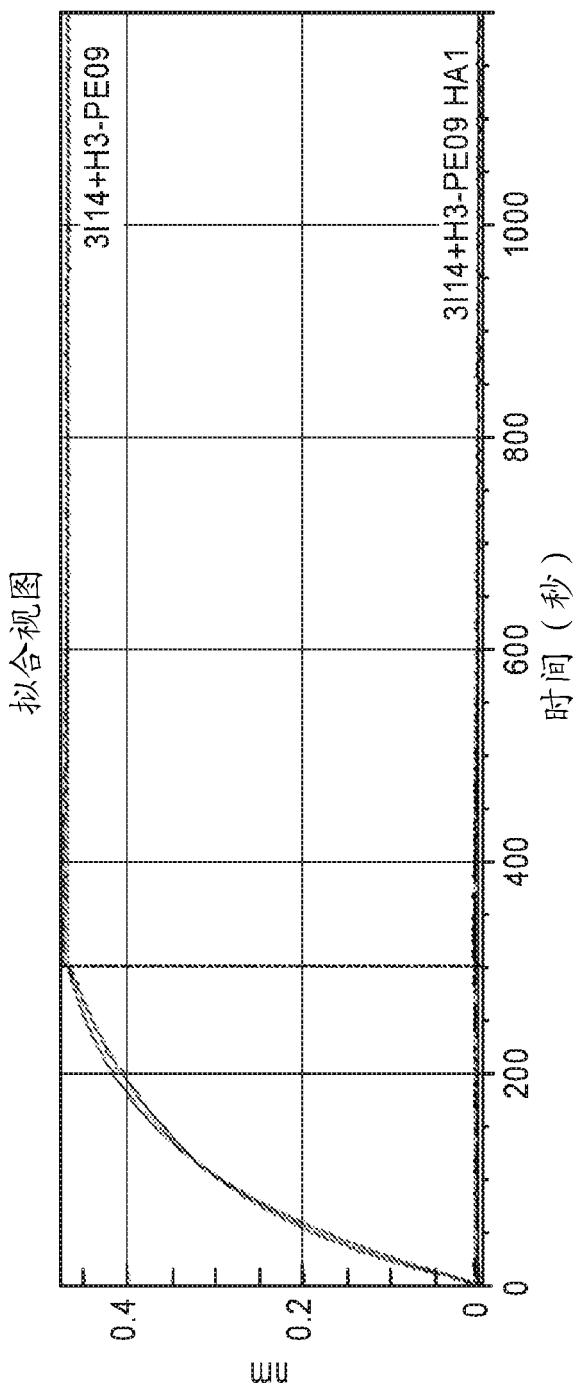


图 19

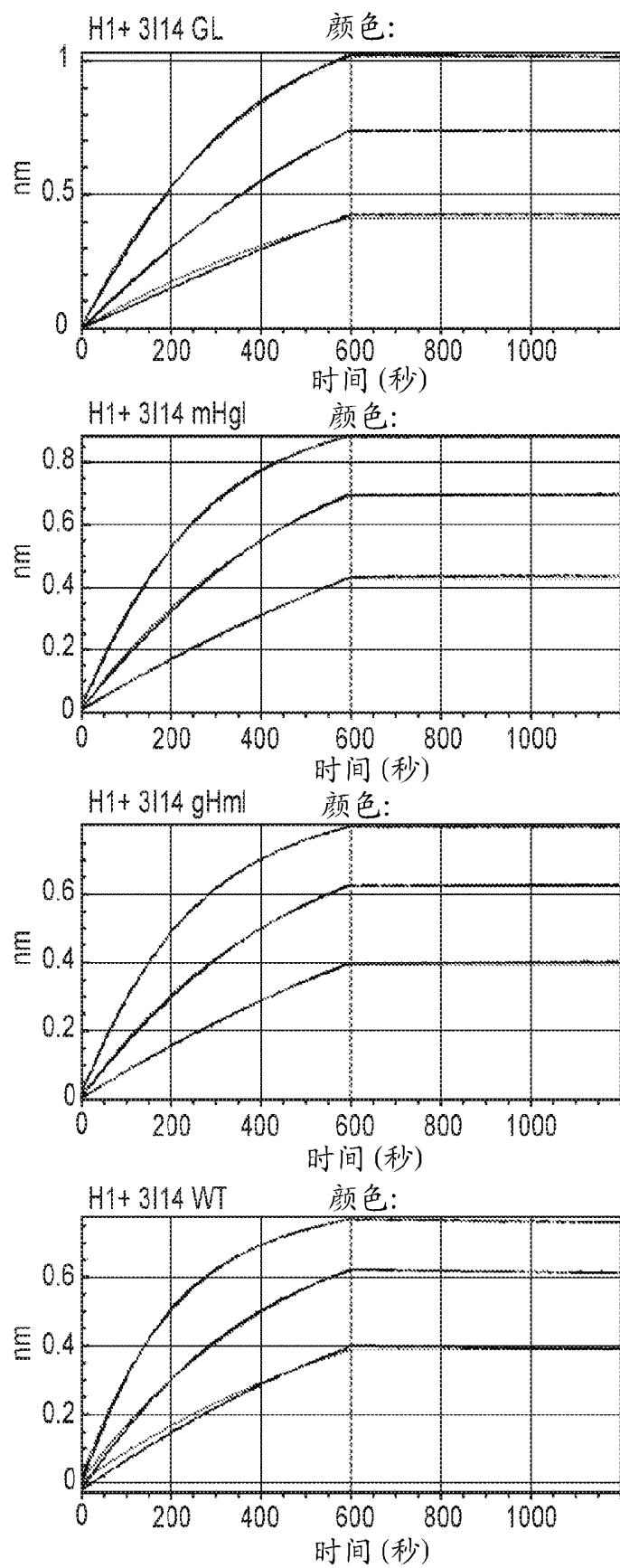


图 20

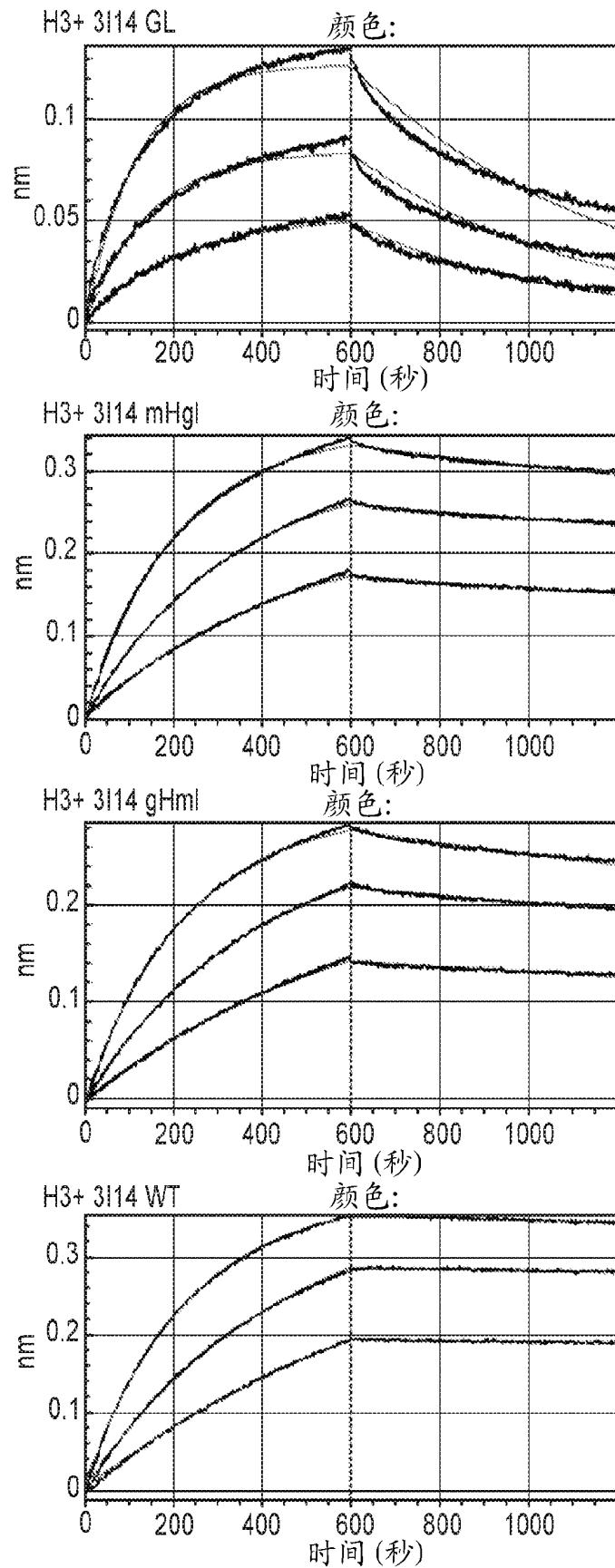


图 20续

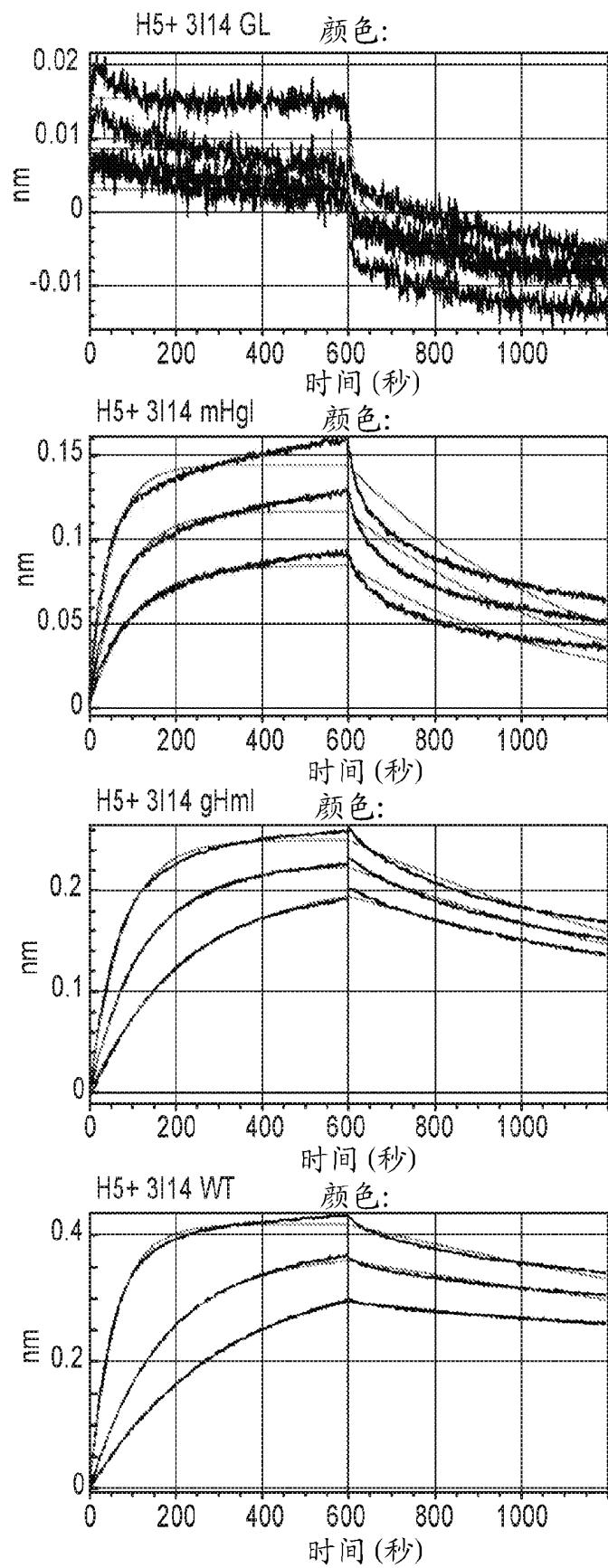


图 20续