

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780053734.4

[51] Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G12N 15/00 (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101687921A

[22] 申请日 2007.5.11

[21] 申请号 200780053734.4

[86] 国际申请 PCT/SG2007/000134 2007.5.11

[87] 国际公布 WO2008/140415 英 2008.11.20

[85] 进入国家阶段日期 2010.1.11

[71] 申请人 淡马锡生命科学研究院有限公司
地址 新加坡新加坡

[72] 发明人 Y·F·胡 Q·Y·杜 F·和
J·H-S·康

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 康健 林晓红

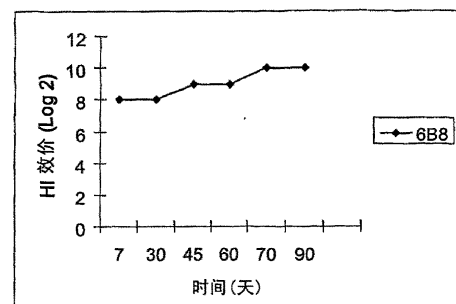
权利要求书4页 说明书20页 附图6页

[54] 发明名称

可用于 H5 禽流感诊断和监视的 H5 亚型特异性结合蛋白

[57] 摘要

本发明提供了特异性结合禽流感病毒(AIV) H5亚型的包膜糖蛋白的单克隆抗体及相关的结合蛋白。上述单克隆抗体及相关的结合蛋白可用于检测 AIV 的 H5 亚型,包括致病性 H5N1 亚型。病毒可以在福尔马林防腐的、石蜡包埋的样品以及冷冻样品和生物学液体中检测。因此,本发明提供了诊断和监视危险的病毒感染的方式方法。



1. 特异性结合禽流感病毒的 H5 亚型的包膜糖蛋白的线性表位的结合蛋白，其基本具有单克隆抗体 7H10 的免疫学结合特性。
2. 权利要求 1 的结合蛋白，其是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。
3. 权利要求 1 的结合蛋白，其是单克隆抗体。
4. 由杂交瘤 7H10 产生的单克隆抗体 7H10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8243。
5. 特异性结合禽流感病毒 H5 亚型的包膜糖蛋白的构象表位的结合蛋白，其基本具有单克隆抗体 6B8、8F10 或者 2D10 的免疫学结合特性。
6. 权利要求 5 的结合蛋白，其是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。
7. 权利要求 5 的结合蛋白，其是单克隆抗体。
8. 由杂交瘤 6B8 产生的单克隆抗体 6B8，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8246。
9. 由杂交瘤 8F10 产生的单克隆抗体 8F10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8245。
10. 由杂交瘤 2D10 产生的单克隆抗体 2D10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8248。
11. 一种检测生物样品中 H5 亚型禽流感病毒的方法，包括将该样品与特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的线性表位的结合蛋白接触，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 7H10 的免疫学结合特性。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。
13. 权利要求 11 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体。
14. 权利要求 13 的方法，其中所述单克隆抗体是由杂交瘤 7H10 产生的抗体 7H10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8243。
15. 一种检测生物样品中 H5 亚型禽流感病毒的方法，包括将该样品与特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的构象表位的结合蛋白接触，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 6B8、8F10 或者 2D10 的免疫学结合特性。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述单克隆抗体是由杂交瘤 6B8 产生的抗体 6B8，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8246。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述单克隆抗体是由杂交瘤 8F10 产生的抗体 8F10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8245。

20. 权利要求 17 的方法，其中所述单克隆抗体是由杂交瘤 2D10 产生的抗体 2D10，其保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号 PTA-8248。

21. 权利要求 15 的方法，包括将该样品与特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的第二种结合蛋白接触，其中所述第一种结合蛋白是捕获结合蛋白，第二种结合蛋白是含有或缀合有可检测元件的检测结合蛋白。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述第一种和第二种结合蛋白的至少一种是单克隆抗体。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述第一种和第二种结合蛋白是单克隆抗体。

24. 权利要求 21 的方法，其中第一种结合蛋白固定在固体表面上。

25. 权利要求 21 的方法，其中第二种结合蛋白含有放射性原子，与荧光分子缀合，或者与酶缀合。

26. 检测生物样品中 H5 亚型禽流感病毒的试剂盒，其包含特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的线性表位的结合蛋白以及检测所述结合蛋白与所述包膜糖蛋白结合的试剂，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 7H10 的免疫学结合特性。

27. 检测生物样品中 H5 亚型禽流感病毒的试剂盒，其包含特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的构象表位的结合蛋白以及检测所述结合蛋白与所述包膜糖蛋白结合的试剂，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 6B8、8F10 或者 2D10 的免疫学结合特性。

28. 权利要求 26 或 27 的试剂盒，其包含特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的第二种结合蛋白，其中所述第一种结合蛋白是捕获结合蛋白，第二种结合蛋白是含有或缀合有可检测元件的检测结合蛋白。

29. 权利要求 28 的试剂盒，其中所述第一种和第二种结合蛋白的至少一种是单克隆抗体。

30. 权利要求 28 的试剂盒，其中第一种和第二种结合蛋白是单克隆抗体。

31. 权利要求 28 的试剂盒，其中第一种结合蛋白固定于固体表面上。

32. 权利要求 28 的试剂盒，其中第二种结合蛋白含有放射性原子，与荧光分子缀合，或者与酶缀合。

33. 一种用有效量的特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的线性表位的结合蛋白治疗用 H5 亚型禽流感病毒感染的固定的组织样品的方法，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 7H10 的免疫学结合特性。

34. 权利要求 36 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。

35. 权利要求 36 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体。

36. 权利要求 36 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体 7H10。

37. 一种用有效量的特异性结合禽流感病毒 H5 亚型包膜糖蛋白的构象表位的结合蛋白治疗用 H5 亚型禽流感病毒感染的对象的方法，所述结合蛋白基本具有单克隆抗体 6B8、8F10 或者 2D10 的免疫学结合特性。

38. 权利要求 40 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体、单链抗体、抗体片段、嵌合抗体或者人源化抗体。

39. 权利要求 40 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体。

40. 权利要求 40 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体 6B8。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体 8F10。

42. 权利要求 40 的方法，其中所述结合蛋白是单克隆抗体 2D10。

43. 禽流感病毒株 H5N3 的中和逃逸突变株，其在所述毒株的由单克隆抗体 6B8 识别的 HA 序列的表位内包含突变，由此所述突变病毒不能由所述抗体中和。

44. 权利要求 43 的中和逃逸突变株，其中所述突变在第 205 位氨基酸。

45. 禽流感病毒株 H5N1 (PR8) 的中和逃逸突变株，其在所述毒株的由单克隆抗体 8F10 识别的 HA 序列的表位内包含突变，由此所述突变病毒不能由所述抗体中和。

46. 权利要求 45 的中和逃逸突变株,其中所述突变在第 210 位氨基酸。

47. 禽流感病毒株 H5N1 (PR8)的中和逃逸突变株,其在所述毒株的由单克隆抗体 2D10 识别的 HA 序列的表位内包含突变,由此所述突变病毒不能由所述抗体中和。

48. 权利要求 47 的中和逃逸突变株,其中所述突变在第 175 位氨基酸。

可用于 H5 禽流感诊断和监视的 H5 亚型特异性结合蛋白

发明领域

本发明涉及检测禽流感病毒(AIV)的抗体及相关的结合蛋白。更特别地,本发明涉及可用于检测 AIV 的高致病性 H5 亚型的单克隆抗体及相关的结合蛋白,以及涉及诊断和监视动物和人体内这种 AIV 感染的方法和制品。

发明背景

禽流感是禽类常见疾病。AIV 亚型 H5N1 已经在世界的许多地区导致不断蔓延的禽流感爆发(14)¹。受影响的区域包括欧洲、中东,特别是亚洲。根据世界卫生组织(WHO)报告,自 2006 年 4 月以来,大约 100 人死于 H5N1 禽流感,而且情况似乎正在恶化。见 WHO 网站(11)。虽然 AIV 感染罕见于人体,然而在过去能穿过物种屏障的新 AIV 亚型的出现已经导致流行性致死性流感(2, 8, 10)。

流感病毒根据其核蛋白和基质蛋白抗原特异性分类。这些病毒主要被分为甲(A)、乙(B)、丙(C)血清型,甲型具有编码 10 种病毒蛋白的 8 个 RNA 节段。所有已知的甲型流感病毒均源自禽类。这种病毒可以影响其它物种,如马、猪、猫头鹰和海豹,以及对人类造成威胁(22)。根据包膜糖蛋白的抗原性质,甲型流感病毒被进一步分为亚型,根据血凝素(HA)分为 H1-H16,根据神经氨酸酶(NA)分为 N1-N9(10, 12, 19)。确认在 HA1-HA2 连接处的 HA 蛋白的蛋白酶解与禽类品系中的致病性相关,且在这个裂解位点周围的疏水性氨基酸的存在是 H5 亚型的特征。此外,确认 HA 蛋白介导 sialoside 受体附着于宿主细胞,且随后通过膜融合方式进入宿主细胞(17),并且认为 HA 蛋白作为中和抗体的主要靶位(19)。

本发明涉及特异性结合 AIV 的单克隆抗体及相关的结合蛋白。单克隆抗体(mAb)是衍生自一种产生抗体的细胞的一群基本均质的抗体。因此该群中的所有抗体均相同,且对于指定表位具有相同特异性(5)。mAb 应答的特异性提供了有效诊断试剂的基础。也发现了衍生自其中的单克隆抗体和结

合蛋白作为治疗剂的用途。

由于 AIV 感染对野生动物、驯养动物和人造成危险，因此迫切需要检测组织样品中的病毒快速、特异性及可靠的方法。特别地，检测保存的样品中病毒的能力对于诊断疾病和监测疾病进展的能力很重要，所述保存的样品例如是福尔马林固定的包埋于石蜡中的冷冻切片样品。迄今为止，还未有关于使用 H5 亚型单克隆抗体诊断高致病性 H5N1 AIV 毒株的有效方法的报道。因此，本发明在 H5N1 及其它 H5 毒株的诊断和监视中取得突破。

发明概述

根据本发明，提供了特异于 H5-亚型血凝素糖蛋白的线性和构象表位的单克隆抗体及相关的结合蛋白。线性 H5 表位的 mAb 能以良好的特异性和灵敏性检测变性样品如福尔马林固定的组织样品中的病毒，而靶向构象表位的那些抗体可用于检测冷冻样品及其它生物学液体中的病毒。

特别地，称作 7H10 的 mAb 靶向血凝素的线性表位，且已经证实对于福尔马林固定的组织中的病毒抗原具有高效及灵敏性，而对于冷冻的组织切片具有较小的作用。称作 6B8 的 mAb 靶向构象血凝素表位，且能结合及识别未经预处理的组织如冷冻组织样品及其它生物学组织和液体中的病毒抗原。称作 8F10 和 2D10 的单克隆抗体也靶向构象血凝素表位且提供与 mAb 6B8 相似的应用。

因此，本发明包含这样的结合蛋白，其基本具有如 mAb 7H10 对于线性 H5 亚型血凝素表位的免疫学结合特性。本发明进一步包含这样的结合蛋白，其基本具有如 mAb 6B8、8F10 或 2D10 对于构象 H5 亚型血凝素表位的免疫学结合特性。

另一方面，本发明包含检测样品中 H5 亚型的方法，包括检测 AIV 与基本具有 mAb 7H10 的免疫学结合特性的 mAb 或结合蛋白的结合。再一方面，本发明包含检测样品中 AIV 的方法，包括检测 AIV 与基本具有 mAb 6B8、8F10 或 2D10 的免疫学结合特性的 mAb 或结合蛋白的结合。特别地，本发明涉及利用这种结合蛋白的免疫荧光测定、免疫组织化学测定以及 ELISA 方法。

另一方面,本发明涉及检测 AIV 的试剂盒,其包含基本具有 mAb 7H10 或者 mAb 6B8、8F10 或 2D10 的免疫学结合特性的结合蛋白。

本发明进一步涉及治疗 H5 AIV 毒株如 H5N1 AIV 毒株感染的对象的方法,包括给予这种对象有效量的一或多种基本具有 mAb 6B8、8F10 或者 2D10 的免疫学结合特性的单克隆抗体或者结合蛋白。

附图简述

图 1: 在 90 天期间的 mAb 效价分布。图 1 中的数据证实所述 mAb 在大部分期间能保持稳定。

图 2: 在 HI 测定中测量的 H5 亚型 mAb 与非 H5 亚型病毒和 H5 亚型病毒的交叉反应性。各个病毒的血清抗体效价如下所示: 浅阴影, 无 HI 活性; 深阴影- > 16。

图 3: Western 印迹分析。各个 mAb 与在大肠杆菌总细胞裂解物中表达的 H5N1 病毒的 HA1 蛋白的反应性。RPMI 1640 用作 mAb 对照。

图 4: 在不同组织样品中信号强度分布。样品是 H5N1 AVI 感染的鹊鸂 Magpie Robin (信号/损害在图中用箭头标示)。

a) 脑冷冻切片。组织与 mAb 6B8 一起保温。观测到作为多个红点的较大强度的阳性信号。在神经元中见到损害。

b) 脑冷冻切片。RPMI 1640 用作 mAb 6B8 阴性对照。无信号可见。

c) 肝石蜡切片。组织与 mAb 7H10 一起保温。在胆管内皮可见较小损害。

d) 肝石蜡切片。RPMI 1640 用作 mAb 7H10 对照。无信号可见。

e) 肺切片。组织与 mAb 7H10 一起保温。仅在上皮组织的内侧可见损害。

f) 肺石蜡切片。RPMI 1640 用作 mAb 7H10 对照。无信号可见。

g) 肺切片。组织与 mAb 7H10 一起保温。在肺泡组织可见损害。

h) 肺石蜡切片。RPMI 1640 用作 mAb 7H10 对照。无信号可见。

i) 肾石蜡切片。组织与 mAb 7H10 一起保温。大量高强度信号遍布于肾细胞中。

j) 肾石蜡切片。RPMI 1640 用作 mAb 7H10 对照。无信号可见。

k) 肝石蜡切片。组织与 mAb 7H10 一起保温。在肝细胞中可见损害。

l) 肝石蜡切片。RPMI 1640 用作 mAb 7H10 对照。无信号可见。

图 5: H5 亚型 mAb 能检测 2002 年以来载明日期的 H5N1 感染的组织的信号。

a) 家鸭的脑组织。

b) 池鹭的肺组织。

c) 苍鹭的脑组织。

d) 鸡的脑组织。

图 6: AC-ELISA 形式中的捕获和检测抗体的反应性。(a)使用 AC ELISA 检测的不同 AIV 亚型。当仅 H5 AIV 产生阳性结果时示出这个检测的特异性。“N Ctrl”是阴性对照,其中无病毒加入孔中。(b)将不同的 H5 AIV 用 PBS 连续稀释并在 AC ELISA 中检测。使用 0.100 作为阳性和阴性结果之间的截断值(cut-off),可以用 AC ELISA 检测的 H5 AIV 的最小量平均为大约 0.5 HA 单位, 7H10 和 6B8。

图 7: 7H10 表位的作图。A, 血凝素蛋白 1 的示意图, 示出表达不同长度 HA1 片段的克隆结构及其与 Mab 7H10 的反应性。aa, 氨基酸。B, 在大肠杆菌 BL21 中表达的 12 个重组融合蛋白的 Western 印迹。样品来自总细胞裂解物。M, 标记; NC, 阴性对照; HA1, 全长 HA1 蛋白; A-K, 不同的片段。C, 突变株血凝素 1 片段的示意图, 示出表达 HA1 片段上不同突变的克隆构建体及其与 Mab 7H10 的反应性。D, 在大肠杆菌 BL21 中表达的 9 个重组融合蛋白的 Western 印迹。样品来自总细胞裂解物。M, 标记; NC, 阴性对照; J, B 中片段 J。

发明详述

本发明涉及特异性结合 AIV 的 H5 亚型血凝素包膜糖蛋白的 mAb 及相关的抗原结合蛋白。特别地, 所述 mAb 或者相关的抗原结合蛋白具有如下 mAb 的免疫学结合特性: mAb 7H10, 由杂交瘤 7H10 产生, 2007 年 3 月 20 日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC), 保藏号为 PTA-8243; mAb 6B8, 由杂交瘤 6B8 产生, 2007 年 3 月 20 日保藏在 ATCC, 保藏号 CRL PTA-8246; mAb 8F10, 由杂交瘤 8F10 产生, 2007 年 3 月 20 日保藏在 ATCC,

保藏号 PTA-8245；或者 mAb 2D10，由杂交瘤 2D10 产生，2007 年 3 月 20 日保藏在 ATCC，保藏号 PTA-8248。本发明进一步包含那些杂交瘤，并且提供了本发明的 mAb 和结合蛋白的持续来源。本发明进一步涉及检测及诊断 H5 亚型 AIV 感染的方法及包含本发明的 mAb 或者结合蛋白的检测试剂盒。本发明另外涉及通过给予有效量的一或多种本发明的抗体或相关结合蛋白治疗 H5 AIV 毒株感染的对象的方法。特别地，在这个实施方案中所述对象感染 AIV 的 H5N1 亚型。本发明的抗体也可以预防性地给予可能发生流感的对象。在这种情况下，给予抗体的有效量是用于治疗 H5 AIV 感染的有效量的大约一半左右。

本文使用许多术语，其具有如下含义：

术语 mAb 或者相关的结合蛋白的“免疫学结合特性”是指所述 mAb 或者结合蛋白对于其抗原的特异性、亲和性以及交叉反应性。

术语“线性表位”是指形成抗体结合位点的大约 4-12 个氨基酸的连续序列。本发明的 mAb 的线性表位优选是在由 HA1 病毒基因编码的血凝素蛋白的大约第 244-251 个氨基酸的区域中。结合所述 mAb 或结合蛋白形式的线性表位可以是基本上没有三级结构的变性蛋白质。

术语“构象表位”是指以其天然三维形式存在于 H5 亚型血凝素糖蛋白中的 mAb 或相关结合蛋白结合位点。

术语“结合蛋白”是指包括下述那些的蛋白质，其包含本发明的 mAb 或者具有本发明 mAb 的免疫学结合特性的 mAb 的抗原结合位点。

本发明有利地提供了制备具有 mAbs 8F10 或 2D10 的结合特性的单克隆抗体的方法，通过用 AIV 亚型 H5N1 (PR8)免疫动物，通过用 H5N3 蛋白免疫动物制备具有 6B8 结合特性的单克隆抗体，以及通过用 H5 HA1 蛋白免疫动物制备具有 7H10 结合特性的单克隆抗体。任何这种抗原均可用作免疫原以产生具有希望的免疫学结合特性的抗体。这种抗体包括但不限于包含 mAb 7H10、6B8、8F10 或 2D10 的抗原结合序列的单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段以及蛋白质。

本发明的 mAb 可以通过在培养物中由连续细胞系产生的抗体分子的任何技术产生。这种方法包括但不限于杂交瘤技术，该技术最初由 Kohler 和 Milstein 开发(1975, Nature 256:495-497)，以及 trioma 技术，人 B 细胞杂交

瘤技术(Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), 和 EBV-杂交瘤技术已产生人单克隆抗体(Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。可以使用人抗体且可以通过使用人杂交瘤而获得(Cote et al., 1983, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:2026-2030), 或者通过用 EBV 病毒在体外转化人 B 细胞而获得(Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96)。此外, 可以使用针对产生“嵌合抗体”或者“人源化抗体”而开发的技术(Morrison et al., 1984, *J. Bacteriol* 159-870; Neuberger et al., 1984, *Nature* 322:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 3/4:452-454), 一起导入本发明鼠抗体分子如 mAb 7H10、6B8、8F10 或 2D10 的序列与具有适当生物学活性的人抗体分子的基因而产生抗体。嵌合抗体是含有人 Fc 部分和鼠(或者其它非人动物)Fv 部分的那些抗体。人源化抗体是其中鼠(或者其它非人动物)互补决定区(CDR)掺入人抗体中的那些抗体。嵌合抗体与人源化抗体均是单克隆抗体。这种人或者人源化嵌合抗体优选用于人疾病或病症的体内诊断或治疗中。

根据本发明, 可以对针对产生单链抗体的技术(美国专利 4,946,778)加以调整, 以提供本发明的单链抗体。本发明另一实施方案利用构建 Fab 表达文库的技术(Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275-1281), 得以快速且简便地鉴别具有希望的本发明抗体特异性的单克隆 Fab 抗体片段或者其衍生物或类似物。

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

在抗体的产生中, 筛选希望的抗体可以利用本领域已知技术实现, 例如使用放射性免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、放射免疫测定、凝胶扩散沉降反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(例如使用胶体金、酶或者放射性同位素标记)、western 印迹、沉淀反应、凝集试验(例如凝胶凝集试验、凝血试验)、免疫荧光测定以及免疫电泳测定等。在一个实施方案中, 通过检测检测第一抗体上的标记检测抗体结合。在另一个

实施方案中，通过检测第二抗体或者其它试剂与第一抗体的结合而检测第一抗体。在再一个实施方案中，所述第二抗体是标记的。在免疫测定中检测结合的方式为本领域所已知且在本发明范围内。

前述抗体可用于本领域已知的关于检测或定位 AIV 的 H5 亚型的方法中，例如用于 Western 印迹、ELISA、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫组织化学测定等。本文揭示的技术可用于定性和定量确定 AIV 的 H5 亚型，以及诊断和监视该病毒感染的动物或人。

本发明还包括定性和/或定量确定 AIV 的 H5 亚型的测定法和检测试剂盒。这种测定系统和检测试剂盒可包含标记的成分，例如通过用放射性原子、荧光基团或者酶标记，将标记与本发明的 mAb 或相关的结合蛋白或者与其结合配体结合而制备。这种测定或者检测试剂盒进一步可包含免疫测定技术领域技术人员熟知的试剂、稀释剂和使用说明书。

在本发明的某些实施方案中，这种试剂盒至少包含本发明的 mAb 或者相关的结合蛋白，检测所述 mAb 或者相关的结合蛋白与生物样品中 AIV 的免疫特异性结合的方式方法，以及根据选择的方法如“竞争性”、“夹心”“DASP”等方法的使用说明书。该试剂盒也可含有阳性和阴性对照物。它们可以被配置成用于自动分析仪或者自动免疫组织化学载玻片染色设备中。

本发明的试剂盒可进一步包含第二抗体或结合蛋白，其可以被标记或者可以被提供用于附着于固体支持物(或者附着于固体支持物)。这种抗体或者结合蛋白可例如是结合 AIV 的抗体或结合蛋白。这种第二抗体或者结合蛋白可以是多克隆或单克隆抗体。

H5 亚型血凝素蛋白的单克隆抗体可以通过用 AIV 或 H5 蛋白或者其片段免疫动物而制备。优选的方法包括扩增 H5 亚型 HA1 基因，随后表达该基因，回收及纯化 H5 亚型重组蛋白，并且使用该纯化的蛋白质作为免疫原。例如，H5N1 AIV 通过用可利用的毒株接种鸡胚而增殖，随后分离所述病毒 RNA。HA1 基因通过逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)扩增，然后可克隆进杆状病毒载体中，用于在昆虫细胞中表达 H5 蛋白质。由此产生的蛋白质然后可用于免疫小鼠或者其它合适物种以产生杂交瘤。

根据其稳定产生能特异性结合 H5 蛋白且能区分其与其它 AIV 亚型的

高亲和性 mAb 的能力筛选杂交瘤。根据本发明,发现具有病毒中和能力的抗体能识别 H5 亚型血凝素蛋白中的构象表位。这个发现得自这样的事实,即在存在每种中和 mAb 的条件下在 Madin-Darby 犬肾(MDCK)细胞中 1-2 轮选择后产生病毒逃逸突变株。通过 RT-PCR 从这些中和逃逸突变株中克隆 HA1 基因并测序以鉴别点突变。在这组抗体中,在 mAb 6B8、8F10 和 2D10 中发现 3 个中和表位,称作 1、2 和 3。使用凝血抑制测定证实中和-逃逸能力。

HA1 含有 338 个氨基酸。为了研究蛋白质上线性表位的分布,有利地例如通过 Western 印迹或者相似技术检测截短和突变的片段与 mAb 的结合。可以使用免疫组织化学染色方法鉴别线性表位,其是 mAb 的结合靶位,在检测如在福尔马林固定的组织中存在的变性的 H5 亚型蛋白中提供良好性能。以这种方式对 H5 亚型 mAb 作图提供了进一步研究平台以及对感染性 H5N1 AIV 更有效的临床诊断。

本发明还提供了对于 AIV 的 H5 亚型的血凝素分子的抗原性结构的更好理解。本发明的 mAb 及相关的结合蛋白提供了检测石蜡固定的变性组织以及冷冻切片和生物样品中这种高致病原性病毒的方式方法。

检测石蜡切片中病毒的能力是非常重要的。在大多数情况中,感染的组织中的 H5N1 抗原由于固定处理而被破坏。福尔马林和乙醇具有除去液体包膜和包膜糖蛋白包括血凝素的潜力,因此增加了在病毒抗原检测中的难度。因此,这种形式的诊断具有提供更安全及更精确诊断 H5 感染的动物和人的潜力。

正如下文提供的实施例所例证,mAb 7H10 对于福尔马林固定的组织中的病毒抗原是高效且灵敏的,而对于冷冻的组织切片作用最小。这个抗体使得可以在光学显微镜下简便地观测到感染区域。抗体 7H10 不具有凝血抑制作用或者病毒中和活性;然而其在免疫荧光测定和 Western 印迹分析中呈现出阳性结果,观测到相应于重组 H5NI-HA 蛋白(MW 36kDa)的显著条带。

相反,mAb 6B8、8F10 和 2D10 对于冷冻的组织切片具有高效性,但是不能检测福尔马林固定的组织中的抗原。这些结果提示这两组 mAb 与不同的病毒表位反应。通过表位作图,确定 mAb 7H10 靶向线性表位。当对组织进行强力热处理时,其仅可检测病毒抗原。在这种苛刻的抗原修复方

法中，病毒的表面蛋白被破坏，剩下的 H5N1 病毒的核蛋白暴露。因此，靶向线性表位的 mAb 对冷冻的组织切片不起作用。

通过表位作图确定单克隆抗体 6B8、8F10 和 2D10 靶向 H5N1 病毒的构象表位。在对组织切片无预处理的条件下，这些抗体能结合并识别这些病毒抗原。

在免疫组织化学分析中观测到的对于不同组织样品的染色强度的差异反映病毒对组织的不同浸润水平。例如，在脑和肾组织中，各个细胞被深度染色，且染色的细胞在脑和肾组织中也广泛分布。这些发现表明在病毒血症的晚期阶段，肺也许不是最严重感染的器官。先前已经报道了 H5N1 感染的动物肺中的严重损害(2, 13, 14)。然而，本发明的发现表明肺鱼肾相比损害较低。由于本发明实验中使用的组织样品得自感染晚期阶段的鸟类，因此这些结果也许提示肺通常在感染早期阶段具有高水平病毒血症，而在晚期阶段期间病毒将传播并集中在肾。因此这些结果表明来自怀疑感染 H5N1 AIV 的动物的诊断样品应包括脑组织和肾组织以及肺组织。

本发明提供了检测 H5 亚型 AIV 的便利的、高特异性且灵敏的方式方法。一种这样的方式方法是 ELISA。在优选的实施方案中，mAb 7H10 和 6B8 用作捕获抗体。发现这种组合与单独的抗体或者其它组合相比在检测 H5 亚型 AIV 中提供高密度目测结果。虽然不受任何特殊理论的约束，对这些结果做出的可能的解释是这两种抗体与 HA1 蛋白上的不同表位反应，且是不同抗体亚类的，因此提供多个结合位点。

针对构象表位的单克隆抗体保持重要的生物学功能，如凝血抑制作用和中和活性，而针对线性表位的 mAb 也有利于诊断应用。因此，分别针对线性和构象表位且组合 IgG 和 IgM 免疫学性质的 mAb 7H10 和 6B8 在抗原-抗体相互作用中的应用，可显著有助于 ELISA 的高灵敏性。使用两种 mAb 的方法也可用于开发检测 H5 病毒的其它免疫学方法，例如通过斑点印迹(dot-blot)和原位杂交形式。

本发明优选的 ELISA 试验能在中国感染禽类及在越南感染人类的 H5N1 禽流感病毒中检测 HA 抗原，表明本发明在检测禽类和人类 H5N1 感染中的用途。

本发明的 H5 亚型 mAb 作为诊断工具具有超过目前使用的其它方法的

至少三个优势。首先,所述 mAb 对于高感染性 H5 亚型 AIV 具有高特异性。这种特异性已经在从 2002-2006 年得自各个来源的 H5N1 感染的组织样品的分类中证实。这种高特异性单克隆抗体代表禽流感诊断领域的突破。其次,这些 mAb 在感染的福尔马林固定的组织以及在血清学检测如 HI 和 IFA 中检测和精确定位 H5 病毒抗原的能力是一独特优势。第三,这些 mAb 提供了检测 H5 AIV 的安全且便利的诊断方法。其在石蜡切片中检测病毒抗原的能力便于感染的样品的转运和诊断,所述感染的样品不感染人类或者具有将感染性病毒粒子释放进环境中的潜力。此外,冷冻切片可以长期低温贮存,便于感染的进一步诊断和监视。

本发明的另一实施方案涉及 H5 禽流感的中和逃逸突变株。术语“中和逃逸突变株”是指编码血凝素的基因中的点突变产生的突变病毒,导致 H5 病毒中抗原性漂移及影响中和表位。中和逃逸突变株可以通过某些单克隆抗体逃逸中和作用,有效中和其亲代病毒。在人工筛选逃逸突变株中,将亲代病毒与某中和抗体一起保温并接种于宿主中,所述宿主如 MDCK 细胞或鸡胚。在筛选 2-3 次之后,克隆中和 mAb 的逃逸突变株并进行 HA1 基因测序。突变的氨基酸通过与亲代病毒序列进行对比而确定,突变的位点准确地表示出包含所述中和 mAb 识别的中和表位的氨基酸之一。

在本发明中,6B8 逃逸突变株通过 6B8 中和单克隆抗体从 H5N3 AIV 中产生。8F10 逃逸突变株通过 8F10 中和抗体从 H5N1 (PR8) AIV 中产生,2D10 逃逸突变株通过 2D10 中和单克隆抗体从 H5N1 (PR8) AIV 中产生。突变位点列于下文实施例 3 表 3 中。

中和逃逸突变株与其亲代病毒不同,其不再可由特异性结合亲代病毒的某些中和抗体识别。在这点上,这些突变株可用于免疫小鼠,根据上述教导产生新的单克隆抗体。在所述新的 mAb 中,可以筛选出精确识别突变的表位的单克隆抗体,然后可将其用于提供互补性监视除了其亲代病毒之外的禽流感病毒。通过重复这个过程至几个世代,可以发现进一步的逃逸突变株以及获得进一步的中和抗体。这些抗体可用于本发明的方法中。

在本发明的进一步实施方案中,可以给予本发明的抗体及相关的结合蛋白以治疗 H5 AIV 感染对象,特别是 AIV 亚型 H5N1 感染对象。本发明的抗体及相关的结合蛋白也可以在流感流行或即将流行的情况中作为预防

措施给予对象。所述抗体及相关的结合蛋白可以单一剂量给予或者重复给予，任选以缓释形式给予。可以通过使抗体达到治疗对象机体中其作用部位的任何方式给予，例如通过静脉内、肌内、皮内、口服或经鼻给予。典型地，所述抗体在药物可接受的稀释剂或载体如无菌水溶液中给予，且所述组合物可进一步包含一或多种稳定剂、佐剂、增溶剂、缓冲液等。精确的给予方法、组合物和特定剂量根据对象的个体需要、考虑到如对象年龄、体重、一般状况及其症状的性质和程度以及给予治疗的频率等因素，在治疗时予以确定和调整。通常地，当给予所述抗体以治疗 H5 AIV 感染患者时，给予的抗体的剂量在大约 0.1 mg/kg-1 mg/kgbody 体重范围内。典型地，当作为预防措施给予时，所述剂量减少大约一半，即在大约 0.05 mg/kg-0.5 mg/kg 体重范围内。

对于治疗目的可以给予本发明的单一抗体或者结合蛋白，或者可以给予两或多种抗体或结合蛋白的组合。如果已经产生了一或多个世代的中和逃逸突变株的抗体，这种抗体与上述 6B8、8F10 和/或 2D10 抗体可以作为治疗性抗体“鸡尾酒混合物”给予对象。

提供如下实施例是为了例证实施本发明的优选模式。本发明非限于所述实施例的描述，而是与所附权利要求书的全部范围一致。

实施例 1

杂交瘤的产生

称作 H5N1/PR8 的病毒得自美国疾病控制中心。其是非致病性重组 H5N1 流感病毒，含有在越南感染人类的 AIV H5N1 病毒(A/越南/1203/2004)的 HA 和 NA 基因。另一 AIV 亚型 H5N3 (A/鸡/新加坡/97)得自新加坡农业食品和兽医局(AVA)。这两个病毒原种用于感染 9-11 天龄含胚鸡蛋(Chew's Poultry Farm, Singapore)，并使其复制两个世代。然后从含胚鸡蛋中抽取尿囊液，使用血凝素测定(HA)确定病毒效价。纯化这些 H5N1 和 H5N3 病毒，通过在 10,000 rpm 离心 30 分钟含有病毒的尿囊液以除去碎片，随后对上清在 40,000 rpm 超离心 3 小时。将病毒沉淀物重悬于 PBS 中。

单克隆抗体(IgG 和 IgM)纯化自澄清液，使用蛋白质 A 亲和柱(Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA)和 Immunopure[®] IgM 纯化试剂盒(Pierce

Biotechnology; Rockford, Illinois, USA)根据厂商指导进行。IgG 和 IgM 的浓度通过使用 ND-1000 分光光度计(NanoDrop Technologies; Wilmington, Delaware, USA) 测量。

失活的 H5N1 AVI (A/鹅/广东/97)用作 RNA 来源以通过 RT PCR 扩增 HA1 基因进行表位作图。病毒 RNA 分离自病毒感染的细胞,使用 LS Trizol 试剂(Invitrogen)根据厂商指导进行。使用 H5 亚型的 HA1 基因的特异性引物进行逆转录反应和 PCR。然后通过标准方法对 PCR 产物测序。将扩增的 DNA 克隆进 pQE-30 载体中,随后用于转化大肠杆菌 BL-21 感受态细胞。对于杆状病毒介导的蛋白质表达,将基因克隆进 pFASTBAC Ta 载体中,构建含有 H5N1 HA1 基因的重组杆状病毒。该杆状病毒随后用于感染 SF9 细胞系以扩增所述重组病毒。对于逃逸突变株的选择, H5N1 AIV (A/越南/1203/2004/H5N1)用作 RNA 来源。

然后将来自杆状病毒的这些纯化的 H5 亚型病毒或者纯化的 H5 HA1 蛋白用于免疫 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,间隔两周肌肉注射两次。每个动物均接种用等体积佐剂(SEPPIC, France)乳化的 20-60 μ g 纯化的 H5-亚型 AIV。在细胞融合前 3 天,经腹膜内给予该小鼠相同剂量的病毒加强免疫。然后通过 Western 印迹筛选该小鼠的血清,选择具有最高抗体效价的小鼠进行细胞融合。将得自选择的小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 1:10 比率在 50%聚乙二醇(Sigma, mol. wt. 3350)中组合,以融合细胞并产生杂交瘤(21)。

使用活病毒的所有实验均在生物安全 3 级密闭实验室(20)中进行,该实验室符合 CDC/NIH 生物安全要求,如 Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)第四版指定。所述实验也遵照可适用的 WHO 要求进行,且由新加坡 AVA 和卫生部(MOH)许可。

实施例 2

杂交瘤的筛选

如下述通过血凝素抑制作用(HI)检验和免疫荧光测定(IFA)筛选杂交瘤培养上清。

血凝反应抑制作用试验 得自 CDC 的 H5N1/PR8 病毒用于感染 9-11

天龄的含胚鸡蛋 (Chew's Poultry Farm, 新加坡), 并在 35°C 保温 72-96 小时。在病毒增殖后, 从该鸡胚中提取尿囊液并用作 H5N1 病毒抗原。如先前所述(15)对各个杂交瘤培养上清进行 HI 检验, 使用鸡红细胞凝集及 4 个血凝单位 H5N1/PR8 病毒株。连续稀释的杂交瘤上清最初以 1:50 稀释, 然后与在鸡胚中增殖的 4 个 HA 单位的 H5N1/PR8 病毒(用 0.1% β -丙内酯失活)和每孔 0.5%(vol/vol)鸡红细胞悬浮液一起保温。相应于抑制血凝反应的最高稀释度倒数的抗体效价以几何平均值效价(GMT)表示。

免疫荧光测定 用得自各个尿囊液的 H5N1/PR8、H5N2 和 H5N3 病毒感染在 96 孔平板中生长 24 小时的 Madin Darby 犬肾细胞(MDCK)。平板孔交替用作阴性对照(未感染的 MDCK 细胞)。将该 96 孔平板置于湿化的 35°C、5%CO₂ 保温仪中 18-22 小时。当感染的细胞达到 75%细胞病理效应(CPE)时, 将其用 100 μ l 无水乙醇在室温固定 10 分钟。然后将 96 孔平板中的细胞用 pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次。随后, 将固定的细胞与 50 μ l 各个杂交瘤上清在 37°C 保温 1 小时。在洗涤 3 次后, 将所述抗原与异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的抗小鼠 Ig (1:100 DAKO, Denmark)在 37°C 反应及保温 1 小时。对于通过 IFA 筛选 mAb 的更具识别力的方式而言, 应用额外的对照。如先前所提及, 未感染的 MDCK 细胞用作阴性对照。作为额外的阴性对照, 将细胞与 RPMI 1640 一起保温。对于阳性对照, 使用得自免疫的小鼠的 100 倍稀释的血清。通过对比与具有不同对照的各个杂交瘤上清保温的 MDCK 细胞, 选择提供阳性染色的杂交瘤上清用于通过限制稀释克隆。通过这种方法获得稳定产生 mAb 的杂交瘤。

实施例 3

H5-亚型单克隆抗体的鉴定

mAb 的稳定性 对在不同时期(第 7、30、45、60、70 和 90 天)获得的各个杂交瘤上清进行血凝反应抑制作用试验, 以测量细胞系的稳定性。进行稀释以计算终点。mAb 6B8 的杂交瘤上清的 HI 效价为 29。该效价在甚至低 90 天仍保持稳定(见图 1)。因此, 分泌 H5 抗原的 mAb 的杂交瘤能长期保持高效价值。

mAb 分型(Isotyping) 使用小鼠 mAb 分型试剂盒(Amersham Bioscience,

England)进行分型(数据未示出)。同种型 6B8、8F10 和 2D10 被确定为 IgM, 7H10 被确定为 IgG1。

mAb 特异性分析 将 H5-亚型 mAb 与相关的 H5 亚型 AIV H5N2 和 H5N3 以及也与非 H5 亚型流感病毒 H3N2、H4N1、H7N1、H9N2 和 H10N5 交叉反应。使用 HI 试验检测交叉反应性。在图 2 中示出的结果示出当 H5 亚型 mAb 暴露于非 H5 亚型病毒 H3N2、H4N1、H7N1、H9N2 和 H10N5 时无交叉反应性。mAb 6B8、2D10 和 8F10 与 H5N2 和 H5N3 具有交叉反应性。表 1 示出各个 H5 亚型 mAb 对于冷冻的和福尔马林固定的组织的效力。在表 1 中, 如下在感染的组织中观测到的信号强度赋予半定量评分: 无信号(-)、轻(+)、中(++)、强(+++)及极强(++++)。RPMI 1640 用作 H5 亚型 mAb 的对照物, 感染鸡新城疫的鸡组织用作 H5N1 感染组织的对照物。得自其它来源的 AI 和 H5 mAb 用于与本发明的 H5 亚型 mAb 对比。

表 1

mAb	mAb 的来源	冷冻切片组织	石蜡切片组织
6B8	F59/04/98	++++	-
7H10	A/鹅/广东/97	-	++++
AI	其它来源	++	-
H5	其它来源	++	-

下文论述的免疫组织化学染色进一步证实这些 H5 亚型 mAb 对于 H5N AIV 的特异性。

mAb 的病毒中和作用 MDCK 细胞和 10 天龄的胚胎分别用于确定 50% 组织培养感染剂量(TCID₅₀)和 50%胚胎感染剂量(EID₅₀)。使 MDCK 细胞(2×10^4 /ml)生长至 70%-90%铺满。检测使用 10^{-1} - 10^{-8} 倍连续稀释的各个病毒感染的尿囊液的 TCID₅₀ 和 EID₅₀, 通过在其指数生长期(对于病毒感染最高程度敏感)和 10 天龄鸡胚感染 MDCK 细胞进行检测。未感染的 MDCK 细胞和尿囊液用作阴性对照物。细胞在 35°C 保温, 并观测 CPE。使用 Reed and Muench 数学方法(9), 感染性效价表示为 TCID₅₀/100 μ l 和 1000 EID₅₀/200 μ l, 且将各个病毒均稀释为在 50 μ l 和 100 μ l 分别具有 100 TCID₅₀ 和 500 EID₅₀。连续稀释的 mAb 6B8 能中和感染的 MDCK 细胞和胚胎中终浓度为 100 TCID₅₀ 和 500 EID₅₀ 的病毒。见表 2。表 2 中的数据也示出 mAb 6B8 能

与 H5N1 病毒产生中和活性。表 2 中的数字反映出 H5N1 病毒的最高稀释比率，在此稀释比率所述 mAb 仍能检测并中和感染的 MDCK 细胞和胚胎中终浓度为 100 TCID₅₀ 和 500 EID₅₀ 的病毒。

表 2

感染的细胞	mAb			
	6B8	7H10	8F10	2D10
MDCK 细胞	130	0	200	200
胚胎	40	0	160	40

逃逸突变株的选择 将 10 倍系列稀释的亲代病毒与等体积的 mAb 混合。在室温保温 1 小时后，将该混合物接种于 DMEM 培养基中单层 MDCK 细胞上，所述 DMEM 培养基含有 200 μ g/ml TPCK-处理的胰蛋白酶(Sigma)和 0.001% DEAE-葡聚糖(Sigma)。在 35 $^{\circ}$ C 培养 7 天后，收集病毒上清进行进一步选择。为了选择逃逸突变株，H5N1 AIV (A/越南/1203/2004/H5N1) 用作 RNA 来源。克隆所述逃逸突变株并与亲代序列对比。使用中和 mAb 6B8 选择逃逸突变株。确定与 mAb 6B8 中和抗性相关的点突变发生在 HA1 序列的第 614 位核苷酸。所述突变包含第 614 位核苷酸由“A”改变为“C”，由此导致在第 205 位的氨基酸由赖氨酸改变为苏氨酸。这个突变使得突变病毒逃逸 mAb 6B8 中和作用的能力通过中和测定及血凝反应抑制作用测定而证实。这个结果表明 mAb 6B8 靶向含有血凝素上第 205 位氨基酸的表位。通过相同方法分别鉴别了 mAb 8F10 和 2D10 的两个其它中和表位。结果示于表 3，表 3 示出 AIV (A/越南/1203/2004 H5N1)血凝素分子上 mAb 中和表位的位置。

表 3

Escape Mutant	Epitope	Nucleotide	Nucleotide Change	Amino Acid	Amino Acid Change
6B8a	1	614	A \rightarrow C	205	Lys \rightarrow Thr
6B8b	1	615	G \rightarrow T	205	Lys \rightarrow Asn
8F10a	2	629	C \rightarrow T	210	Pro \rightarrow Leu
8F10b	2	628	C \rightarrow T	210	Pro \rightarrow Ser
2D10a	3	524	C \rightarrow T	175	Thr \rightarrow Ser
2D10b	3	523	A \rightarrow G	175	Thr \rightarrow Ala

Western 印迹 对重组 H5N1-HA1 蛋白进行 10% SDS-PAGE。分离的蛋

白质固定于硝化纤维膜上。将该膜用在含有 Tween-20 的 PBS 中 5%脱脂乳封闭 1 小时。在用 PBS-Tween 洗涤 3 次(5 分钟/次)后,将该膜与各个 mAb 一起保温,随后与 HRP-缀合的兔抗小鼠 Ig (1:2000)一起保温。然后将该膜与 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)反应(develop)5 分钟。通过用 PBS-Tween 漂洗终止反应。在每次保温后,用 PBS-Tween 洗涤反应物 3 次(5 分钟/次)。mAb 7H10 用作阳性对照物,因为其衍生自纯化的重组 HA1,而 RPMI 1640 用作阴性对照物。如图 3 所例证, H5-亚型 mAb 7H10 能与重组 H5N1-HA1 蛋白反应。在硝化纤维膜上形成的条带是 36 kDa。这等于所述重组蛋白质的分子量。另一方面, mAb 6B8、8F10、2D10 和 RPMI 1640 提供阴性结果。由于 6B8 及其它 mAb 一起天然形式靶向病毒蛋白,因此这组 mAb 不能通过 Western 印迹检测病毒蛋白。Western 印迹中使用的 SDS-PAGE 不能使天然的蛋白质折叠且使其线性化,因此不能检测。

实施例 4

mAb 7H10 线性表位的作图

将 H5 亚型 AIV 的 HA1 基因通过 PCR 切割成 3 个重叠片段,并且表达为组氨酸融合蛋白。通过用 mAb 7H10 进行 Western 印迹分析表明表位最初在片段 B 和 C 的重叠区域(第 201-266 位氨基酸)中发现。为了定位这个表位的 C 末端,设计 8 个截短的片段,使用 mAb 7H10 通过 Western 印迹筛选(图 7a 和 b)。发现 HA1 上的第 251 位氨基酸是 7H10 的表位的 C 末端。为了定位这个表位的 N 末端,设计 8 个突变的片段,使用 mAb 7H10 筛选。在这 8 个突变体中, HA1 上的第 240-247 位氨基酸通过某些引物被逐个改变为丙氨酸。根据 Western 印迹结果,该表位的 N 末端氨基酸是 HA1 上的第 244 位氨基酸(图 7c 和 d)。这些结果表明由 mAb 7H10 靶向的线性表位位于 H5 亚型 AIV 的血凝素上第 244-251 位氨基酸。

实施例 5

免疫组织化学

检测从 2002-2006 年的 30 个 H5N1 感染的组织样品。它们包括不同类型的组织器官如脑、肾、肝、肺和胰腺。这些样品是石蜡切片样品或者冷

冻样品。可商购的免疫过氧化物酶染色系统(Dako Cytomation EnVision + System-HRP (AEC))用于这些样品。染色技术包括两个步骤(16)以基于与第二抗体缀合的辣根过氧化物酶标记的聚合物识别结合的抗体(20)。由于这个试剂盒不含有抗生物素蛋白或生物素,因此非特异性内源抗生物素蛋白-生物素活性被充分降低。

石蜡切片样品 石蜡切片样品的染色结果示于图 4。在感染的肾组织中观测到极强阳性信号。在整个肾组织中普遍可见信号分布,且每个信号均具有较高强度。相反,肺组织在信号分布和强度方面未反映出这种强信号。肺组织中仅上皮内层被轻度染色。对于肝组织,信号稀疏分布。然而,检测到的每个信号均是强烈的。也注意到对于感染的肝组织,信号通常沿着胆管上皮被检测到。在更接近的检测中,观测胆管被感染。这些结果示出 mAb 7H10 是 H5-亚型 AIV 单克隆抗体,其能从 H5N1 感染的福尔马林固定的组织中找回 H5 抗原。

冷冻切片样品 冷冻切片样品的染色结果示于图 5。抗体 6B8 可检测不同年度的所有样品上的强阳性信号。这些染色组织的显微照片清晰示出被染色的是这些感染的脑组织的神经元。对于冷冻和石蜡切片样品,清晰可见不论组织类型如何,组织中仅核被染色。H5N1 病毒感染的鸟类的主要损害(20)是肾和脑组织。表 1 的数据证实本发明的 mAb 区分 H5 亚型 AIV 与其它来源禽流感病毒的能力。

实施例 6

AC-ELISA 的开发

如下所述在 ELISA 中评估单克隆抗体 7H10 和 6B8。将 6B8 (IgM)以半对数增加量连续稀释,并用于包被 96 孔平底微滴定平板(Nunc, Demark)。将捕获抗体悬浮于 50 μ l 碳酸盐缓冲液(73 mM 碳酸氢钠和 30 mM 碳酸钠)中。然后将该微滴定平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时或者在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜。在所有随后的保温步骤之间用含有 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲盐水(PBS) (PBS-T)洗涤该平板 3 次,所有稀释均在含有 1%脱脂乳的 PBST 中进行。将该平板通过与 50 μ l 封闭溶液(在 PBS-T 中 5%脱脂乳)在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时而封闭,漂洗,且与 50 μ l 纯化的重组 H5N1 重组 HA1(100 ng)或者 H5 AIV

在 37°C 保温 1 小时。在漂洗后，加入 50 μ l 豚鼠单一特异性抗体 IgG (1:480 稀释)，在 37°C 保温 1 小时，洗涤，并且与 50 μ l 的 1:1000 稀释的 HRP-缀合的兔抗豚鼠免疫球蛋白保温。通过加入 50 μ l 新鲜制备的底物溶液(o-苯二胺(OPD))生色，使用 ELISA 阅读器(Tecan, Switzerland)在 490nm 读吸光度。mAb 和单特异性抗体的最佳工作稀释度通过方格板滴定法确定。最佳条件通过对比 H5 AIV (H5N1、H5N2、H5N3)与非-H5 AIV (H7N1 和 H9N2)反应确定，以达到对于这个测定最高信号-噪音比。所述信号-噪音比通过用同源抗原的吸光度除以异源抗原吸光度而计算。

单克隆抗体 6B8 在 AC-ELISA 用作捕获抗体也用作检测抗体。单克隆抗体 6B8 与其它单克隆抗体相比在 ELISA 中示出较强的反应性。这种使用 6B8 进行的 AC-ELISA 特别适用于 H5 亚型 AIV 检测，且与任何其它 AIV 亚型不反应(图 6a)。AC-ELISA 的检测限度低于 0.5 HA 单位(图 6b)。在方格滴定法检测之后，确定对于捕获 ELISA 而言的最佳抗体浓度是 600 ng/孔/mAb(捕获抗体)以及 800 ng/孔(检测多克隆抗体)。

参考文献

1. A.N Hamir , G. M., D.T.Galligan, S.W.Davis. D.E Granstrom, J.P.Dubey. 1993. Immunohistochemical study to demonstrate Sarcocystis neurona in equine protozoal myeloencephalitis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 5:418-422.
2. Cauthen, A. N., D. E. Swayne, S. Schultz-Cherry, M. L. Perdue, and D. L. Suarez 2000. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. J. Virol, 74:6592-9.
3. Crawford, J., B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. Garcia, H. Stone, and M. L. Perdue. 1999. Baculo virus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. Vaccine, 17 :2265- 74.
4. Dilbeck, P. M., and T. F. McElwain. 1994. Immunohistochemical detection of Coxiella burnetii in formalin-fixed placenta. J. Vet. Diagn. Invest., 6:

125-7.

5. EH Benjamin, R. C5 Geoffrey Sunshine. 2000. Immunology: A short course, 4th ed. A John Wiley & Sons, Inc.

6. Evensen, O., O. B. Dale, and A. Nilsen. 1994. Immunohistochemical identification of *Renibacterium salmoninarum* by monoclonal antibodies in paraffin-embedded tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)³ using paired immunoenzyme and paired immunofluorescence techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.*, (5:48-55).

7. Fitzgerald, S. D., W. M. Reed, and R. M. Fulton. 1995. Development and application of an immunohistochemical staining technique to detect avian polyomaviral antigen in tissue sections. *J. Vet. Diagn. Invest*, 7:444-50.

8. Fouchier, R. A., T. M. Bestebroer, S. Herfst, L. Van Der Kemp, G. F. Rimmelzwaan, and A.D. Osterhaus. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol*, 38:4096-5101.

9. Grimes, S. E. 2002. A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine RAP Publication 2002/22 136 pg.

10. Horimoto, T., N. Fukuda, K. Iwatsuki-Horimoto, Y. Guan, W. Lim, M. Peiris, S. Sugii, T. Odagiri, M. Tashiro, and Y. Kawaoka. 2004. Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *J. Vet. Med. Sci*, 66:303-5).

11. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_04_27/en/index.html.

12. Iwasaki, T., S. Itamura, H. Nishimura, Y. Sato, M. Tashiro, T. Hashikawa, and T. Kurata. 2004. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 108:485- 92.

13. Lu, X., T. M. Tumpey, T. Morken, S. R. Zaki, N. J. Cox, and J. M. Katz. 1999. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to

influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J. Virol.*, 73:5903-11.

14. Mase, M., K. Tsukamoto, T. Imada, K. Imai, N. Tanimura, K. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Hitomi, T. Kira, T. Nakai, M. Kiso, T. Horimoto, Y. Kawaoka, and S. Yamaguchi. 2005. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology*, 332:167-76.

15. Dose-response relationship after immunization of volunteers with a new, surface- antigen-adsorbed influenza virus vaccine. *J. Infect. Dis.*, /35:423-31.

16. Renee Larochelle, R. M. 1995. Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 540-543.

17. Robert G. Webster, A. G. 1994. *Encyclopedia of Virology*, 2:709-724.

18. Ross, T. M., Y. Xu, R. A. Bright, and H. L. Robinson, 2000. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat. Immunol.* ,7:127-31.

19. Stevens, J., O. Blixt, T. M. Tumpey, J. K. Taubenberger, J. C. Paulson, and I. A. Wilson. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 372:404-10.

20. Tanaka, H., C. H. Park, A. Ninomiya, H. Ozaki, A. Takada, T. Umemura, and H. Kida. 2003. Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet. Microbiol*, 95: 1-13.

21. Yokoyama W.M, C. J. E., A.M Kruisbeek, D.H Margulies, E.M.Shevach, W.Strober (eds). 2001. Production of monoclonal antibodies. *Currents protocols in immunology*:2.5A- 2.6.9.

22. Zhou, N. N., D. A. Senne, J. S. Landgraf, S. L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K. Yoon, S. Krauss, and R. G. Webster. 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pig: *Virol*, 73:8851-6.

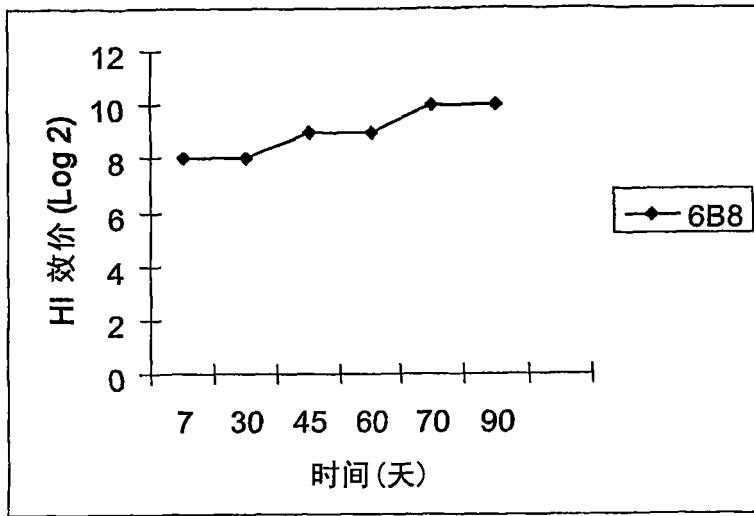


图1

克隆 No.	mAb 同种型	H5亚型 AIV			非-H5亚型				
		H5N1	H5N2	H5N3	H3N2	H4N1	H7N1	H9N2	H10N5
6B8	IgM	+	+	+	-	-	-	-	-
7H10	IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
2D10	IgM	+	+	+	-	-	-	-	-
8F10	IgM	+	+	+	-	-	-	-	-

图2

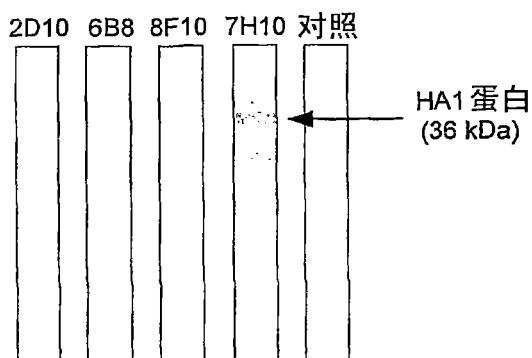


图3

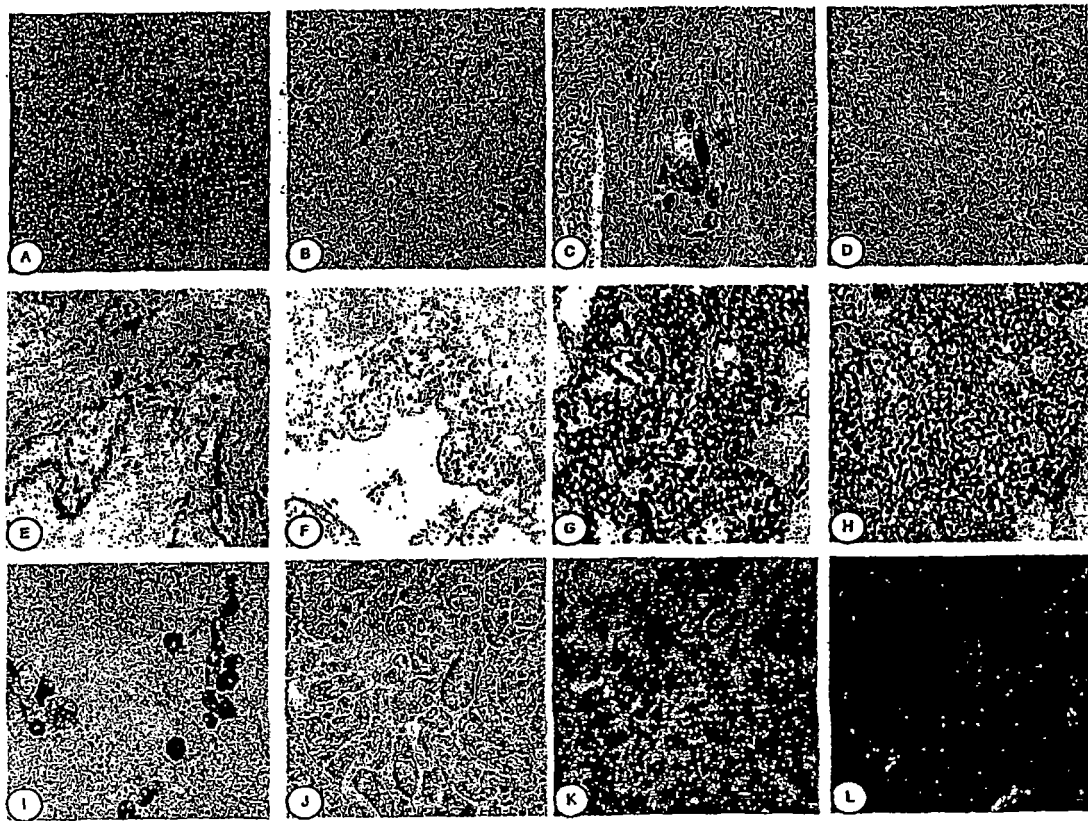


图4

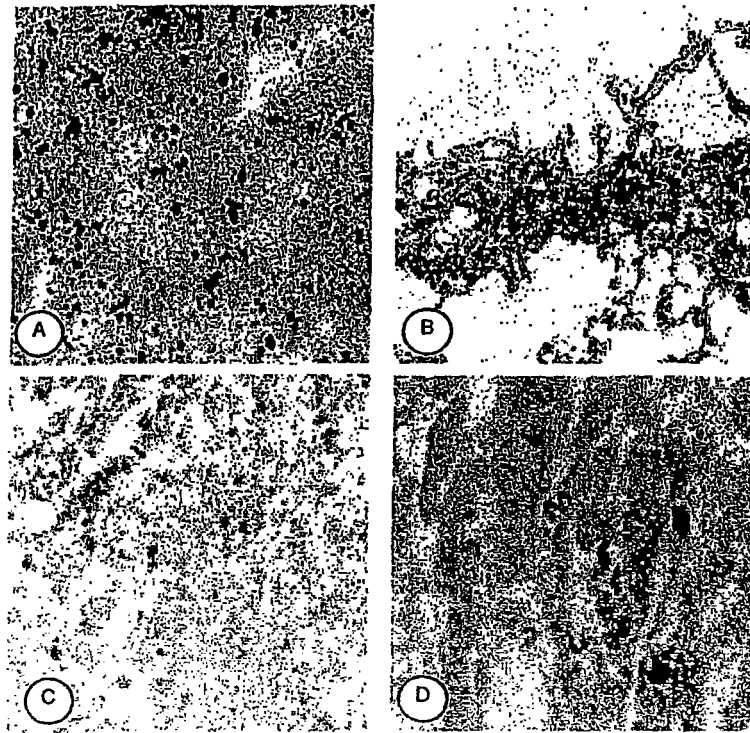


图5

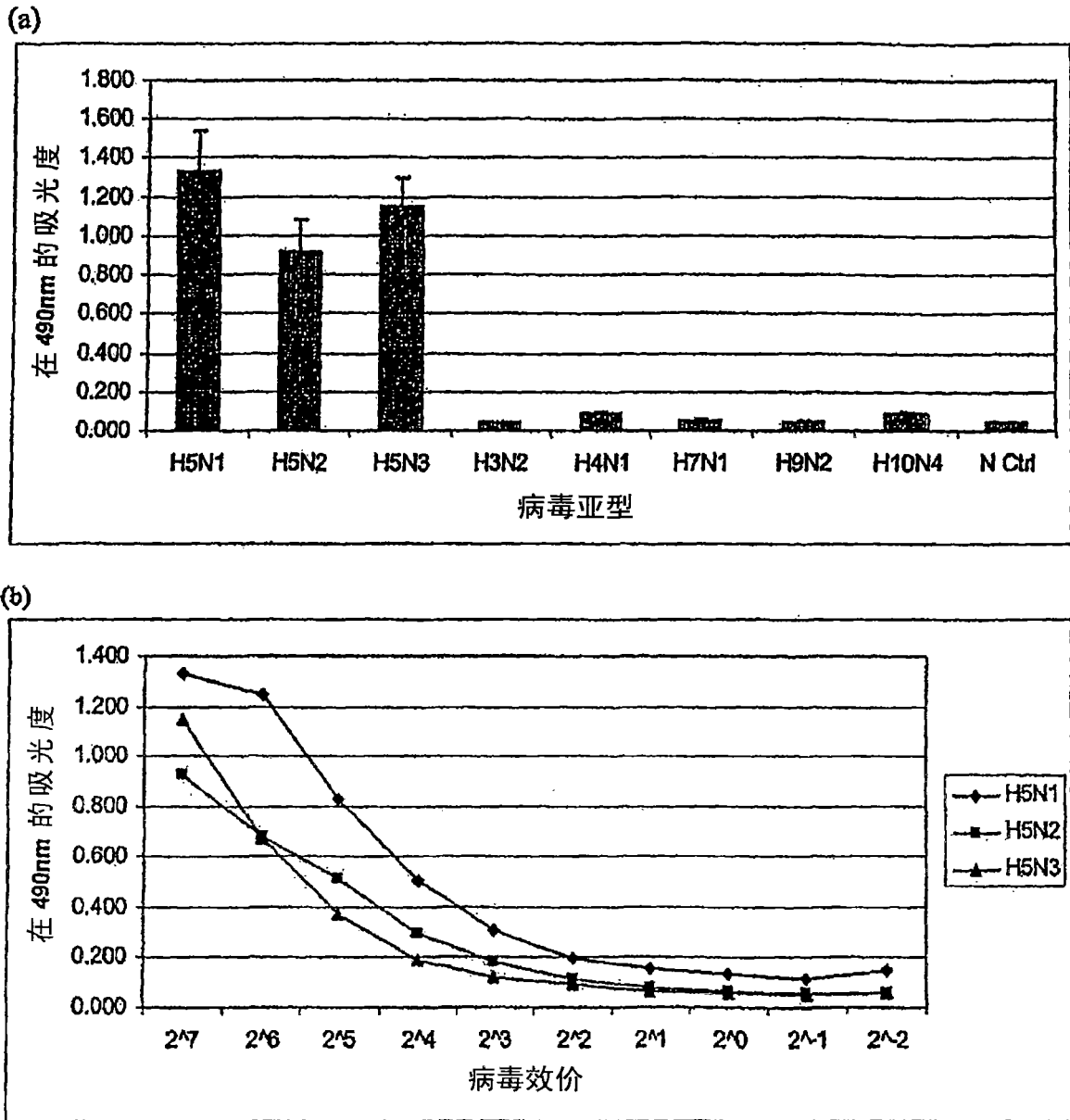


图6

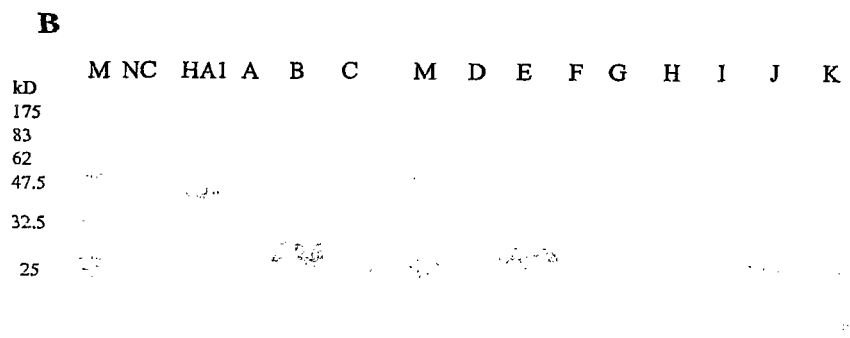
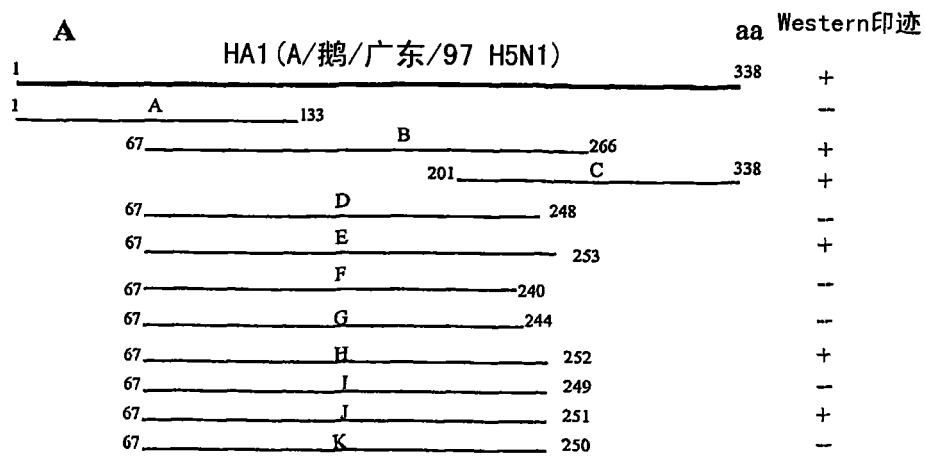


图7

C HA 片段 J

WT	240aa	GRMEFFWTILKP	251aa	251aa Western印迹
T247A		GRMEFFWAILKP		-
W246A		GRMEFFFATILKP		-
F245A		GRMEFAWTILKP		-
F244A		GRMEAFTWILKP		-
E243A		GRMAFFWTILKP		+
M242A		GRAEFFWTILKP		+
R241A		GAMEFFWTILKP		+
G240A		ARMEFFWTILKP		+

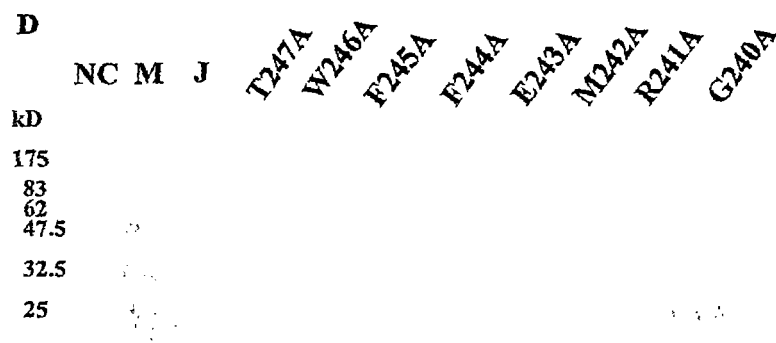


图8

专利名称(译)	可用于H5禽流感诊断和监视的H5亚型特异性结合蛋白		
公开(公告)号	CN101687921A	公开(公告)日	2010-03-31
申请号	CN200780053734.4	申请日	2007-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学研究院有限公司		
[标]发明人	YF胡 QY杜 F和 JH S康		
发明人	Y·F·胡 Q·Y·杜 F·和 J·H·S·康 J·H - S·康		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/00 G01N33/563 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/1018 C07K2317/34 G01N33/56983 G01N2333/11 C07K2316/96 C07K2317/76		
代理人(译)	康健 林晓红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了特异性结合禽流感病毒(AIV)H5亚型的包膜糖蛋白的单克隆抗体及相关的结合蛋白。上述单克隆抗体及相关的结合蛋白可用于检测AIV的H5亚型，包括致病性H5N1亚型。病毒可以在福尔马林防腐的、石蜡包埋的样品以及冷冻样品和生物学液体中检测。因此，本发明提供了诊断和监视危险的病毒感染的方式方法。

