



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105555802 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

(21) 申请号 201380070832.4

代理人 左路 林晓红

(22) 申请日 2013.08.23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/727,927 2012.11.19 US

G07K 16/10(2006.01)

A61K 39/42(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.07.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000366 2013.08.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/077777 EN 2014.05.22

(83) 生物保藏信息

CBA20120022 2012.09.11

CBA20120023 2012.09.11

(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 H·S·J·光 F·何

R·K·苏巴尚达拉沃塞

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

权利要求书4页 说明书27页

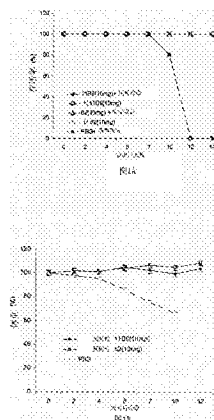
序列表6页 附图6页

(54) 发明名称

靶向 H7 流感病毒上中和表位的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及鼠单克隆抗体 (mAb) 11B9 和 mAb 62 及其活性片段,其各自靶向甲型流感 H7 血凝素的主要中和表位。本发明还涉及使用鼠 mAb11B9、mAb 62 或其片段预防和治疗 H7 流感的方法和组合物。本发明进一步涉及确定、鉴别和 / 定量 (a) 样品或疫苗中甲型流感血凝素或者 (b) 针对甲型流感血凝素的抗体的方法和试剂盒。



1. 特异性结合H7血凝素的中和构象表位的单克隆抗体或抗体片段,其中所述中和构象表位:(a)包含氨基酸136Ser、137Gly和氨基酸227Glu,或者(b)包含氨基酸175Lys和氨基酸227Glu。

2. 权利要求1的单克隆抗体或抗体片段,其中所述H7血凝素的中和构象表位:(a)是鼠单克隆抗体11B9特异性结合的表位,或者(b)是鼠单克隆抗体62特异性结合的表位。

3. 权利要求1的单克隆抗体或片段,其中所述单克隆抗体是:(a)鼠单克隆抗体11B9,或者(b)鼠单克隆抗体62。

4. 由杂交瘤11B9产生的单克隆抗体11B9,所述杂交瘤11B9保藏在Cell Bank Australia,保藏号为CBA20120022。

5. 由杂交瘤62产生的单克隆抗体62,所述杂交瘤62保藏在Cell Bank Australia,保藏号为CBA20120023。

6. 一种检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒的方法,包括将样品与第一抗体接触,其中所述第一抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段,及确定甲型流感H7亚型病毒的存在或不存在。

7. 权利要求6的方法,其进一步包括将样品与特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体接触,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合,其中所述与第二抗体接触在所述确定之前进行。

8. 权利要求7的方法,其中第一抗体固定在固体表面上。

9. 权利要求7的方法,其中第二抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

10. 权利要求9的方法,其中第一抗体是单克隆抗体11B9或者单克隆抗体62之一,且第二抗体是所述单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种。

11. 权利要求7-10任一项的方法,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

12. 权利要求6-11任一项的方法,其中所述甲型流感病毒是H7N7亚型。

13. 一种检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒的试剂盒,其包含第一抗体以及进行检测甲型流感病毒的测定的说明书,其中第一抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

14. 权利要求13的试剂盒,其进一步包括特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合。

15. 权利要求14的试剂盒,其中第一抗体固定在固体表面上。

16. 权利要求14的试剂盒,其中第二抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

17. 权利要求16的试剂盒,其中第一抗体是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62之一,且第二抗体是所述单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种。

18. 权利要求14-17任一项的试剂盒,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

19. 权利要求13-18任一项的试剂盒,其中所述甲型流感病毒是H7N7亚型。

20. 包含药剂和药物可接受的稀释剂或运载体的组合物,其中所述药剂是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

21. 一种降低对象中流感H7亚型病毒感染、或者降低对象中流感H7亚型病毒感染风险、或者抑制对象中一或多种流感H7亚型病毒毒株或分离株感染、或者预防一或多种流感H7亚型病毒毒株或分离株所致流感感染或疾病的方法,包括给有需要的对象施用治疗有效量的药剂,其中所述药剂是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

22. 权利要求21的方法,其中所述对象是免疫功能低下的婴儿、幼儿或老人。

23. 权利要求22的方法,其中所述施用提供治疗益处。

24. 权利要求23的方法,其中所述治疗益处包括:(a)抑制流感病毒滴度的增加,(b)降低流感病毒滴度,(c)抑制流感病毒复制的增加,(d)降低流感病毒复制,(e)抑制流感病毒增殖的增加或者降低流感病毒的增殖,(f)降低对象中与流感病毒感染相关的一或多个症状或并发症的进展、严重度、频率、持续时间或可能性,或者(g)促进对象从流感病毒感染中康复。

25. 权利要求24的方法,其中症状或并发症选自发冷、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、窦充血、鼻感染、窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛和死亡。

26. 权利要求21-25任一项的方法,其中所述甲型流感病毒是H7N7亚型。

27. 一种对包含甲型流感H7亚型病毒免疫原性物质的疫苗中的甲型流感H7亚型病毒免疫原性物质进行定量的方法,所述方法包括将所述疫苗与第一抗体接触,其中第一抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段,及确定疫苗中所述免疫原性物质的量。

28. 权利要求27的方法,其进一步包括将样品与特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体接触,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合。

29. 权利要求28的方法,其中第一抗体固定在固体表面上。

30. 权利要求28的方法,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

31. 权利要求27-30任一项的方法,其中所述免疫原性物质包含H7血凝素或其抗原性部分。

32. 权利要求31的方法,其中所述免疫原性物质由表达系统表达。

33. 权利要求32的方法,其中所述表达系统是病毒表达载体且所述免疫原性物质呈现或展示在由所述病毒表达载体产生的病毒表面上。

34. 一种用于鉴别和/或定量患者样品中或者包含甲型流感H7亚型病毒免疫原性物质的疫苗中的甲型流感H7亚型病毒免疫原性物质的试剂盒,所述试剂盒包含第一抗体,其是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段,及包含用于进行测定以鉴别和/或定量所述患者样品或所述疫苗中甲型流感H7亚型病毒免疫原性物质的说明书。

35. 权利要求34的试剂盒,其进一步包含特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合。

36. 权利要求35的试剂盒,其中第二抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

37. 权利要求36的试剂盒,其中第一抗体是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62之一,且第二抗体是所述单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种。

38. 权利要求34-37任一项的试剂盒,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

39. 一种检测生物样品中针对甲型流感H7亚型病毒的抗体的方法,包括使所述样品和对照H7血凝素抗原的混合物与第一抗体接触,其中第一抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段,并确定针对甲型流感H7亚型病毒的抗体的存在或不存在。

40. 权利要求39的方法,其进一步包括将所述样品与特异性结合所述对照H7血凝素抗原的表位的第二抗体接触,其中第二抗体含有可检测元件或与可检测元件缀合,其中所述与第二抗体接触在所述确定之前进行。

41. 权利要求40的方法,其中第一抗体固定在固体表面上。

42. 权利要求40的方法,其中第二抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

43. 权利要求42的方法,其中第一抗体是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62之一,且第二抗体是所述单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种。

44. 权利要求40-43任一项的方法,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

45. 一种用于检测生物样品中针对甲型流感H7亚型病毒的抗体的试剂盒,其包含第一抗体,其中第一抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段,以及包含用于进行测定以检测针对甲型流感H7亚型病毒的抗体的说明书。

46. 权利要求45的试剂盒,其进一步包含对照血凝素抗原。

47. 权利要求45或46的试剂盒,其进一步包含特异性结合对照H7血凝素抗原的表位的第二抗体,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合。

48. 权利要求47的试剂盒,其中第一抗体固定在固体表面上。

49. 权利要求47的试剂盒,其中第二抗体是权利要求1-5任一项的单克隆抗体或抗体片段。

50. 权利要求49的试剂盒,其中第一抗体是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中之一,且第二抗体是所述单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种。

51. 权利要求47-50任一项的试剂盒,其中第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。

52. 一种检测生物样品中甲型流感H7抗原或抗-H7抗体存在的方法,包括:

(a)将样品与结合于固相的捕获抗体接触,其中所述捕获抗体结合H7抗原并且是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62之一;

(b)将(a)的固相与检测抗体接触,其中所述检测抗体结合H7抗原并且是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一种,其含有可检测元件或与可检测元件缀合;及

(c)确定结合的检测抗体或者检测抗体的结合量,

其中:

(i)如果所述样品是在与捕获抗体接触之前未与对照H7抗原混合的生物样品,结合的检测抗体表示生物样品中存在甲型流感H7抗原,及

(ii)如果所述样品是在与捕获抗体接触之前与对照H7抗原混合的生物样品,结合的检测抗体表示生物样品中存在抗-H7抗体。

53. 检测生物样品中甲型流感H7抗原或抗-H7抗体存在的试剂盒,包含:

(a)第一抗体,其是捕获抗体,其中第一抗体结合H7抗原,是单克隆抗体11B9或单克隆

抗体中62之一；

(b)第二抗体,其是检测抗体,其中第二抗体结合H7抗原,是单克隆抗体11B9或单克隆抗体62中的另一中,其含有可检测元件或者与可检测元件缀合;及

(c)用于进行检测甲型流感H7抗原或抗-H7抗体的测定的说明书。

54. 权利要求53的试剂盒,其进一步包含对照H7抗原。

靶向H7流感病毒上中和表位的单克隆抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明申请涉及并要求2012年11月19日提请的美国临时专利申请系列号61/727,927的优先权。这个申请通过引用并入本文。

[0003] 序列提交

[0004] 本申请和电子版的序列表一起提交。该序列表命名为2577226PCTSequenceListing.txt,2013年8月9日创建,大小为13kb。序列表电子版的信息以其全部内容通过引用并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] 本发明涉及鼠单克隆抗体(mAb)11B9和mAb 62及其活性片段,其均靶向甲型流感H7血凝素的主要中和表位。本发明还涉及使用鼠mAb 11B9、mAb 62或其片段预防和治疗H7流感的方法和组合物。本发明进一步涉及确定、鉴别和/或定量(a)样品或疫苗中甲型流感血凝素或者(b)针对甲型流感血凝素的抗体的方法和试剂盒。

[0007] 本文中用于阐明本发明背景或者提供关于实践的另外的详细描述的出版物及其它材料通过引用并入,方便起见归类在参考文献中。

[0008] 高致病性禽流感(HPAI)H7亚型在禽类中的发生持续是关注的公共卫生问题(Jadhao et al.,2008;Abbas et al.,2011)。2002年以来,来自欧亚和北美谱系的甲型流感H7亚型病毒在荷兰、意大利、加拿大、英国和美国已经导致100例以上的人感染。在2003年,HPAI H7N7在荷兰爆发,与感染禽类密切接触的89人感染,并导致1人死亡。这些情况包括2003年荷兰HPAI H7N7病毒的爆发,导致超过80例人感染及1人死亡;HPAI H7N3病毒在2004年在加拿大英属哥伦比亚导致2例结膜炎;在2007年英国一群人感染低致病性禽流感(LPAI)H7N2病毒,导致几例流感样疾病和结膜炎;及在2003年在纽约的1例呼吸道感染。H7亚型病毒已经呈现出显著的大流行可能(Min et al.,2010)。

[0009] 人对于H7禽流感病毒是免疫学天然的,循环于欧亚和北美的家禽和野禽中的LPAI H7亚型病毒具有进化和获得高致病性表型的潜力,通过积累突变或者通过在血凝素(HA)裂解位点重组导致在禽类中是毒性基序的高度可裂解的HA。近年来的研究也提示在2002-2003年分离的现时北美谱系H7亚型病毒部分适于识别2-6-连接的唾液酸,其是人流感病毒的优选受体及优先在人上呼吸道中发现(Gambaryan et al.,2012)。此外,H7禽流感病毒与人流感病毒包括季节性H1N1和H3N2及流行性H1N1病毒之间RNA基因组的共感染和遗传重配,可导致在人群中有效传递并导致流行的重配病毒的产生。家禽可作为重要的中间宿主将野生禽流感病毒传递至人,猪也可以,如在2009年世界范围内流行性H1N1流感病毒的猪源人感染感染所证明。

[0010] 使用单克隆抗体的被动免疫被认为是治疗许多感染性疾病的切实可行的选项。目前已经有许多使用流感病毒HA1蛋白的中和抗体的治疗方法(Prabakaran et al.,2009)。这种蛋白易于靶向,因为其在病毒表面上及这种蛋白的抗体可有效中和病毒。因此,H7血凝素(HA)的中和表位的单克隆抗体可以是人主动免疫接种的感兴趣的另一选择,特别是对于处于流感感染高危中的那些个体,如免疫功能低下(immuno-compromised)的患者或者对主

动免疫应答不佳的老年人。重要的是任何mAb产物均应赋予针对循环中的H7流感毒株的广泛保护作用。

[0011] 期望鉴别可用于预防和治疗H7流感的单克隆抗体。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及鼠单克隆抗体(mAb)11B9和mAb 62及其活性片段,其均靶向甲型流感H7血凝素的主要中和表位。本发明还涉及使用鼠mAb 11B9、mAb 62或其片段预防和治疗H7流感的方法和组合物。本发明进一步涉及确定、鉴别和/或定量(a)样品或疫苗中的甲型流感血凝素或者(b)甲型流感血凝素的抗体的方法和试剂盒。

[0014] 因此,第一方面,本发明提供了特异于流感H5血凝素的主要构象表位的单克隆抗体及其活性片段即抗原结合片段(在本文也称作抗体片段)。在一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中所述构象表位包含H7N7(A/Netherlands/219/03)蛋白的全长HA蛋白的氨基酸136Ser、137Gly和227Glu,所述全长HA蛋白包括信号蛋白。全长编码序列示于SEQ ID NO:1,其相应于也包括5'和3'侧翼序列的GenBank登录号AY338459所示序列的核苷酸22-1710。全长蛋白序列示于SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合鼠mAb 11B9所特异性结合的H7血凝素的构象表位。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9。在进一步的实施方案中,所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤11B9产生的鼠mAb 11B9。

[0015] 在一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中所述构象表位包含全长HA蛋白的氨基酸175Lys和227Glu,所述全长HA蛋白包括信号蛋白。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合鼠mAb 62所特异性结合的H7血凝素的构象表位。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 62。在进一步的实施方案中,所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤62产生的鼠mAb 62。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码本文所述单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸。在一个实施方案中,所述核酸编码鼠mAb 11B9或mAb62或者其抗原结合片段。在再一个实施方案中,本发明提供了包含所述核酸的载体(vector)。在进一步的实施方案中,本发明提供了包含和表达所述载体的细胞。

[0017] 第二方面,本发明提供了使用鼠单克隆抗体mAb 11B9或mAb 62或其片段预防和治疗H5N1流感的方法和组合物。在一个实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的单克隆抗体及药物可接受的稀释剂或运载体(carrier)。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含本文描述的单克隆抗体的抗原结合片段及药物可接受的稀释剂或运载体。在一些实施方案中,所述抗原结合片段是鼠mAb 11B9或mAb 62的抗原结合片段。在再一个实施方案中,所述药物组合物包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子及药物可接受的稀释剂或运载体。在进一步的实施方案中,所述药物组合物包含具有所述核酸的载体及药物可接受的稀释剂或运载体。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含表达所述载体的细胞及药物可接受的稀释剂或运载体。在再一个实施方案中,所述药物组合物包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子及药物可接受的稀释剂或运载体。在进一步的实施方案中,所述药物组合物包含具有所述核酸的载体及药物可接受的稀释剂或运载体。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含表达所述载体的细胞及药物可接受的稀释剂或运载体。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供了一种减少对象中流感H7病毒感染或者降低对象中流感H7病毒感染风险、抑制对象一或多种流感H7病毒毒株感染或者预防一或多种流感H7病毒毒株所致流感感染或疾病的方法。在这个实施方案中,所述方法包括给有需要的对象施用治疗有效量的本文所述单克隆抗体或其抗原结合片段、包含编码所述抗体或抗体片段的多核苷酸的核酸分子、包含所述多核苷酸的载体或者表达所述载体的细胞。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在一个实施方案中,所述对象是免疫功能低下的,是婴儿、幼儿或者老人。在另一个实施方案中,所述施用提供了治疗益处。在再一个实施方案中,所述治疗益处包括抑制流感病毒滴度的增加、降低流感病毒滴度、抑制流感病毒复制的增加、降低流感病毒复制、抑制流感病毒增殖的增加或者降低流感病毒的增殖,或者降低对象中与流感病毒感染相关的一或多个症状或并发症的进展、严重度、频率、持续时间或可能性。在一个实施方案中,所述症状或并发症选自发冷、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、窦充血、鼻感染、窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛和死亡。在另一个实施方案中,所述治疗益处包括促进对象从流感H7病毒感染中康复。在进一步的实施方案中,给对象施用的药剂在对象感染流感H7病毒之前、基本同时或者之后施用。

[0019] 第三方面,本发明提供了使用本文所述单克隆抗体或其片段鉴别、表征和/或定量H7表达的方法和组合物。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在一个实施方案中,所述H7表达涉及H7流感病毒的HA的表达。在一个实施方案中,所述组合物包含本文描述的单克隆抗体或其片段。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在另一个实施方案中,所述方法包括检测H7与本文描述的单克隆抗体或其片段的结合。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb11B9或mAb 62。在一个实施方案中,本发明涉及利用这种结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定及病毒中和(VN)测定。在一个实施方案中,可以利用本文描述的双功能ELISA测定。

[0020] 在一些实施方案中,所述鉴别和/或定量H7表达的方法和组合物是用于鉴别和/或定量疫苗中的H7病毒免疫原性物质。在一个实施方案中,所述免疫原性物质包含血凝素或其抗原性部分,或者编码血凝素或其抗原性部分的核酸。在另一个实施方案中,所述抗原性部分包括血凝素的表位。在一个实施方案中,所述免疫原性物质是包含血凝素的病毒。在另一个实施方案中,所述病毒是灭活的。在再一个实施方案中,所述病毒是减毒的病毒。在另一个实施方案中,所述病毒是病毒体(virosome)形式。在进一步的实施方案中,所述病毒是得自鸡蛋或者得自细胞培养。在另一个实施方案中,所述免疫原性物质是包含血凝素的裂解病毒(split virus)或者裂解病毒抗原性制备物。在一个实施方案中,所述免疫原性物质是血凝素或其抗原性部分。在另一个实施方案中,所述血凝素或其抗原性部分已经被分离。在再一个实施方案中,所述血凝素或其抗原性部分是由表达系统产生的。在一个实施方案中,所述表达系统是何种表达系统,如病毒表达载体,其中所述血凝素或其抗原性部分呈现或展示于病毒表面上。在一个实施方案中,所述病毒表达载体是何种表达载体,如修饰的痘苗病毒表达载体、腺病毒表达载体、痘病毒表达载体、杆状病毒表达载体等。在一个实施方案中,所述表达载体是杆状病毒表达载体,且呈现或展示血凝素或其抗原性部分的病毒是杆状病毒。在另一个实施方案中,所述免疫原性物质是编码血凝素或其抗原性部分的核酸,其能在对象中表达。

[0021] 第四方面,本发明提供了检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒或者检测生物样品中针对甲型流感H7血凝素的抗体(在本文称作抗-H7抗体)的试剂盒和方法。在检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒的一个实施方案中,所述方法包括将样品与第一抗体接触,第一抗体是如本文所述的单克隆抗体或其抗体片段(有时称作捕获抗体)。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括将样品与如本文所述的特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体或其抗体片段接触,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合(有时称作检测抗体)。在检测生物样品中针对甲型流感H7血凝素的抗体的一个实施方案中,所述方法包括将已经加入甲型流感H7亚型病毒的对照H7血凝素(在本文有时称作对照H7抗原)的样品与第一抗体接触,第一抗体是如本文所述的单克隆抗体或其抗体片段(有时称作捕获抗体)。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括将样品与本文所述的特异性结合甲型流感H7亚型病毒的H7血凝素表位的第二抗体或其抗体片段接触,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合(有时称作检测抗体)。在一些实施方案中,第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。在其它实施方案中,第一抗体固定在固体表面上。在一些实施方案中,第一单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在其它实施方案中,第二单克隆抗体是mAb 11B9或mAb 62。在一个实施方案中,对照H7抗原是重组H7抗原。在另一个实施方案中,对照H7抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。在一个实施方案中,本发明涉及利用这种单克隆抗体或相关结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定和病毒中和(VN)测定。在一个实施方案中,可以利用如本文所述的双功能ELISA测定。

[0022] 在一个实施方案中,测定是双功能ELISA,其对于H7禽流感病毒的抗原和抗体检测均有效。在一个实施方案中,mAb 11B9或mAb 62之一用作捕获抗体,mAb 11B9或mAb 62的另一种用作检测抗体。在一个实施方案中,捕获抗体包被在固相如微滴定板、微珠等上。为了检测生物样品中的抗原,将样品与捕获抗体接触足以使得样品中的任何H7抗原与捕获抗体结合的一段时间。然后将检测抗体与结合的样品H7抗原(如果有的话)接触足以使得检测抗体与所述结合的样品H7抗原结合的一段时间。然后确定任何检测抗体的结合,以确定样品中H7抗原的存在和/或量。为了检测生物样品中的抗-H7抗体,将对照H7抗原加入生物样品中以制备混合物。在一个实施方案中,将固定量的对照H7抗原加入生物样品中。对照H7抗原结合生物样品中也许存在的任何抗-H7抗体。然后将混合物与捕获抗体接触足以使得对照H7抗原结合捕获抗体的一段时间。如果抗-H7抗体存在于生物样品中,与捕获抗体结合的对照H7抗原中的一些将结合抗-H7抗体,且与捕获抗体结合的对照H7抗原中的一些将游离于结合的抗体。在一个实施方案中,对照H7抗原是重组H7抗原。在另一个实施方案中,对照H7抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。然后将检测抗体与不与样品H7抗体(如果有的话)结合的任何结合的对照H7抗原接触一段时间,所述时间足以使得检测抗体结合不与样品H7抗体结合的结合的对照H7抗原。然后确定检测抗体的结合,以确定样品中H7抗体的存在和/或量。在一个实施方案中,结合的检测抗体的水平降低表示生物样品中存在抗-H7抗体。

[0023] 在一个实施方案中,所述试剂盒包含第一抗体及进行检测甲型流感H7亚型病毒的测定的说明书,所述第一抗体是本文描述的单克隆抗体或其抗体片段。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在另一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含特异性结合甲型流感病毒的H7血凝素表位的第二抗体,其中第二抗体含有或者与可检测元件

缀合。在一些实施方案中,第二抗体是mAb 11B9或mAb 62。在一些实施方案中,第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。在其它实施方案中,第一抗体固定在固体表面上。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含H7血凝素抗原。在一些实施方案中,H7血凝素抗原是重组H7蛋白。在其它实施方案中,H7血凝素抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。在一个实施方案中,试剂盒可用于鉴别和/或定量疫苗中的H7病毒免疫原性物质。在另一个实施方案中,试剂盒可用于检测生物样品中H7血凝素或者针对H7血凝素的抗体。在一个实施方案中,本发明涉及利用这种单克隆抗体或相关结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定和病毒中和(VN)测定。在一些实施方案中,可利用本文所述双功能ELISA测定。

[0024] 附图简述

[0025] 图1A和1B示出mAb 11B9和62在小鼠中对抗H7N7的预防作用。图1A:结果以存活百分比表示。PBS用作阴性对照。图1B:结果以体重百分比(在实验开始时)表示。PBS用作阴性对照。

[0026] 图2A-2D示出在小鼠中mAb 62对抗H7攻击的预防作用。图2A和2B:小鼠组(n=5)经鼻内给予2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或者0mg/kg(PBS)的mAb 62进行预处理。图2C和2D:小鼠组(n=5)在经5MLD₅₀的小鼠适应的HPAI H7N7(A/Netherlands/219/03, RG)攻击前一天经腹膜内用5mg/kg、10mg/kg或0mg/kg(PBS)的mAb 62预处理。监测小鼠在14天观测期的存活及体重丧失情况。结果分别以存活百分比(图2C和2D)和体重百分比(图2A和2B)(在实验开始时)表示。

[0027] 图3A和3B示出mAb 62在小鼠中针对H7攻击的治疗效力。小鼠组(n=5)感染5MLD₅₀的小鼠适应的HPAI H7N7(A/Netherlands/219/03, RG)。在攻击后一天,将小鼠通过腹膜内途径用15mg/kg的mAb 62或者通过鼻内途径用5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg或0mg/kg(PBS)的mAb 62处理。监测在14天观测期小鼠的存活和体重丧失情况。结果分别以存活百分比(图3B)和体重百分比(图3A)(在实验开始时)表示。

[0028] 图4A和4B示出在小鼠中两剂mAb 62针对H7攻击的治疗效力。小鼠组(n=5)感染10MLD₅₀的小鼠适应的HPAI H7N7(A/Netherlands/219/03, RG)。在攻击后1天、2天或7天,将小鼠通过鼻内途径用10mg/kg或0mg/kg(PBS)的mAb 62处理一或两次。监测14天观测期小鼠的存活及体重丧失情况。结果分别以存活百分比(图4B)和体重百分比(图4A)(在实验开始时)表示。Dpi:感染后天数。

[0029] 图5A-5E示出在被动处理的小鼠中肺组织的组织病理学。在用5MLD₅₀的HPAI H7N7(A/Netherlands/219/03, RG)实验性病毒感染后通过鼻内或腹膜内途径用mAb 62(15mg/kg)处理的小鼠的HE染色的肺切片的显微照片。图5A:在感染后14天收集的经鼻内途径用mAb 62处理的小鼠的肺切片。图5B:在感染后14天收集的经腹膜内途径用mAb 62处理的小鼠的肺切片。图5C:在感染后6天收集的未处理的感染小鼠的肺切片。图5D:在感染后8天收集的未处理的感染小鼠的肺切片。图5E:未感染的小鼠的肺切片。

[0030] 图6示出在被动处理的小鼠肺中病毒感染性滴度的测量。小鼠在用5MLD₅₀的HPAI H7N7(A/Netherlands/219/03, RG)实验性病毒感染之后用mAb 62(15mg/kg)通过鼻内或腹膜内途径处理。在感染后2、4、6和14天收集肺样品。肺中荷载的病毒结果以log₁₀TCID₅₀/g平均数表示。“#”表示组中无任何动物存活。(*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; n=5; 与腹

膜内途径对应组相比鼻内途径组的点)。

[0031] 图7示出在双功能ELISA中抗原和抗体检测程序。

[0032] 图8示出在双功能ELISA中H7抗原检测的特异性。在双功能-ELISA中H7抗原检测的特异性使用100 μ l含有H7毒株的PBS(调节为HA滴度为8或者非H7病毒的HA滴度 ≥ 16)检验。数值表示来自两个独立检验的一式两份孔的吸光度平均数。OD 490:在490nm的光密度;虚线:截断值(cut-off);Blank AF:无病毒的尿囊液。

[0033] 图9示出在双功能ELISA中H7抗原检测的灵敏度。将HA滴度为16的测试病毒双倍稀释,并进行双功能ELISA检测抗原。数值表示两个独立检验的一式两份孔的吸光度平均值。OD 490:在490nm的光密度;虚线:截断值。

[0034] 图10示出在双功能ELISA中H7抗体检测的特异性。在第二次免疫后10天收集来自用不同流感病毒亚型免疫的不同动物的血清,并标准化至16的HI滴度,之后在双功能ELISA中检测。截断值为30%封闭以上的抑制被认为是阳性;即存在H7的抗体。结果以封闭值百分比的算术平均值表示。aH7N7:A/鸭/北海道/1/10;Ck:鸡;Gp:豚鼠;Ms:小鼠;Bac:野生型杆状病毒免疫的血清;空白:免疫前血清。虚线:截断值。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明涉及鼠单克隆抗体(mAb)11B9和mAb 62及其活性片段,其靶向甲型流感H7血凝素的主要中和表位。本发明还涉及使用鼠mAb 11B9、mAb 62或其片段预防和治疗H7流感的方法和组合物。本发明进一步涉及确定、鉴别和/或定量(a)样品或疫苗中甲型流感血凝素或者(b)甲型流感血凝素的抗体的方法和试剂盒。

[0037] “分离的”是指不含其天然伴随的至少一些组分的生物分子。

[0038] 如本文所用,术语“抗体”是本领域公认的术语,是指结合已知抗原的分子或分子的活性片段,特别是免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原的结合位点的分子。免疫球蛋白是包含基本上由免疫球蛋白 κ 和 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及众多免疫球蛋白可变区基因编码的一或多个多肽的蛋白。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其进而分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。重链的亚类也已知。例如,人中IgG重链可以是任何IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚类。本发明的免疫球蛋白可以是任何类别(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)或亚类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的免疫球蛋白分子。

[0039] 如本文所用,关于抗体的“特异性结合”是指抗体结合其靶抗原的亲和力高于其与结构不同的抗原的结合亲和力。

[0040] 已知典型的免疫球蛋白结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一“轻链”(大约25kD)和一“重链”(大约50-70kD)。每条链的N末端定义一个大约100-110或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指这些轻链和重链。

[0041] 抗体以全长完整的抗体或者以许多充分鉴定的通过各种肽酶或化合物消化而产生的片段而存在。因此,例如,胃蛋白酶消化抗体铰链区中二硫键产生 $F(ab')_2$,这是Fab二聚体,Fab本身是轻链通过二硫键与 V_H-CH_1 结合。 $F(ab')_2$ 在适当条件下可以还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将 $F(ab')_2$ 二聚体转变为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区部分的Fab片段(见Fundamental Immunology,W.E.Paul,ed.,Raven Press,N.Y.(1993)关于其

它抗体片段的更详细的描述)。虽然各种抗体片段是根据完整抗体的消化而定义,但是技术人员意识到任何各种抗体片段可以通过化学或利用重组DNA方法重新合成。因此,如本文所用,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的或者重新合成的抗体片段或者通过使用重组DNA方法获得的抗体和片段。

[0042] 在本发明范围内的“抗体”包括嵌合的或人源化的单克隆抗体,以及其活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段例如包括分开的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab'和(ab')₂片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物及上述任何抗体和片段的表位结合片段。

[0043] 这些活性片段可以通过许多技术而衍生自本发明的抗体。例如,单克隆抗体可以用酶如胃蛋白酶裂解,并进行HPLC凝胶过滤。然后收集含有Fab片段的合适级分,并通过膜过滤等浓缩。关于分离抗体的活性片段的一般技术的进一步描述见例如Khaw et al.(1982);Rousseaux et al.(1986)。

[0044] 重组产生的抗体可以是常规的全长抗体、已知来自蛋白酶消化的活性抗体片段、独特的活性抗体片段如Fv或单链Fv(scFv)、结构域缺失的抗体等。Fv抗体大小为大约50Kd,包含轻链和重链的可变区。单链Fv(scFv)多肽是共价连接的VH::VL异源二聚体,其可以表达自包括直接连接或通过肽编码接头连接的VH和VL编码序列的核酸。见Huston et al.(1988)。将来自抗体V区的天然聚集的但是化学上分开的轻多肽链和重多肽链转变为scFv分子的许多结构折叠为与抗原结合位点的结构基本相似的三维结构。见例如美国专利号5,091,513;5,132,405和4,956,778。

[0045] 组合位点(combining site)是指参与抗原结合的抗体分子的部分。抗原结合位点是由重链(H)和轻链(L)的N末端可变(V)区的氨基酸残基形成的。抗体可变区包含三个非常不同的序列,称作“高变区”或者“互补决定区(CDR)”,其插入在称作“框架区(FR)”的更保守的两侧序列之间。在抗体分子中,轻链的三个高变区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)和重链的三个高变区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)在三维空间彼此相对地形成抗原结合表面或口袋。因此抗体组合位点代表组成抗体的CDR的氨基酸及组成结合位点口袋的任何框架残基。

[0046] 特定抗体中的组成组合位点的氨基酸残基的身份可以使用本领域熟知的方法确定。见例如美国专利申请公开No. 2010/0080800。特定抗体中在CDR外部但是通过具有是组合位点边界(lining)一部分的侧链(即其可用于连接组合位点)而组成组合位点一部分的氨基酸残基的身份,可以使用本领域熟知的方法确定,如分子建模和X-射线晶体学方法。见例如Riechmann et al.(1988)。

[0047] 嵌合抗体是其中抗体的一或多个区来自一种动物且所述抗体一或多个区来自不同种动物的那些抗体。优选的嵌合抗体是包含来自灵长类动物免疫球蛋白区域的抗体。人临床应用的嵌合抗体一般理解为具有来自非人动物如啮齿动物的可变区及来自人的恒定区。相反,人源化抗体使用来自非人抗体的CDR,及大多数或所有可变框架区来自人免疫球蛋白及所有恒定区来自人免疫球蛋白。人嵌合抗体一般理解为具有啮齿动物可变区。典型的人嵌合抗体具有人重链恒定区和人轻链恒定区,重链和轻链的可变区均来自啮齿动物抗体。嵌合抗体可在人恒定区的天然氨基酸序列和天然啮齿动物可变区序列包含一些改变。嵌合的和人源化抗体可以通过本领域熟知的方法制备,包括CDR移植方法(见例如美国专利No. 5,843,708、6,180,370、5,693,762、5,585,089、5,530,101)、链改组策略(见例如美国专利No. 5,565,332;Rader et al.(1998))、分子建模策略(美国专利No. 5,639,641)等。

[0048] 如本文所用,“人源化抗体”在两条链的抗体的情况中,至少一条链是人源化的。人源化抗体链具有可变区,其中一或多个框架区是人框架区。单链的人源化抗体是其中所述链具有可变区,其中一或多个框架区是人框架区。人源化抗体链或其片段的可变区的非人部分衍生自非人来源,特别是非人抗体,典型是啮齿动物来源。人源化抗体的非人部分一般以至少一个CDR区的形式提供,其散布于衍生自一(或多)个人免疫球蛋白的框架区之中。此外,框架支持残基可以被改变以保留结合亲和力。

[0049] 人源化抗体可进一步包含恒定区(例如在轻链情况中至少一个恒定区或其一部分,及优选在重链情况中三个恒定区)。人源化抗体的恒定区如果存在通常是人恒定区。获得“人源化抗体”的方法为本领域技术人员熟知。见例如美国专利申请公开No.2010/0080800。

[0050] 如本文所用,术语恒定区(CR)是指免疫球蛋白的恒定区基因。恒定区基因编码赋予效应子功能的抗体分子部分。对于嵌合的人抗体和人源化抗体,典型地非人(例如鼠)恒定区由人恒定区取代。所述嵌合或人源化抗体的恒定区典型衍生自人免疫球蛋白。重链恒定区可选自任何五个同种型: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。进一步地,各个亚类的重链(如重链IgG亚类)与不同的效应子功能相关,因此通过选择希望的重链恒定区,可以产生具有希望的效应子功能的抗体。在本发明范围内可以使用的恒定区是 γ 1(IgG1),特别是 γ 1(IgG1)同种型的Fc区, γ 3(IgG3)及特别是 γ 4(IgG4)。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 类型,优选 κ 类型。在一个实施方案中,轻链恒定区是人 κ 恒定区(Hieter et al.(1980)),重链恒定区是人IgG4恒定区。

[0051] 如本文所用,术语可变区(VR)是指抗体中每对轻链和重链内的结构域,其直接参与抗体与抗原的结合。每个重链在一个末端具有一个可变结构域(V_H),随后是许多恒定结构域。每个轻链在一个末端具有一个可变结构域(V_L)及在另一末端的一个恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域对其,且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。

[0052] 如本文所用,术语框架区(FR)是指抗体的轻链和重链的可变区内的一或多个框架区(见Kabat et al.(1992);Johnson and Wu(2001);[http colon backslash backslash immuno dot bme dot nwa dot edu](http://colon.backslash.backslash.immuno.dot.bme.dot.nwa.dot.edu))。这些表述包括插入在抗体轻链和重链的可变区内CDR之间的那些氨基酸序列。

[0053] CDR和FR残基根据标准序列定义(Kabat et al.(1991)和结构定义(例如Chothia and Lesk(1987))确定。在这两种方法导致略微不同的CDR鉴别的情况中,优选结构定义,但是通过序列定义方法鉴别的残基被认为是重要的FR残基以确定哪个构架残基进入共有序列中。

[0054] 术语“单克隆抗体”在本领域也充分认可,是指单克隆的抗体生产细胞的产物。单克隆抗体典型是通过融合正常短存活的抗体生产B细胞与快速生长细胞如癌细胞(有时称作“永生细胞”)而产生的。所得的杂交细胞或者杂交瘤快速倍增,获得产生抗体的克隆。

[0055] 术语“片段”是指抗体或抗体链的一部分,其包含比完整的或完全的抗体或抗体链较少的氨基酸残基。片段可以通过化学或酶处理完整或完全抗体或抗体链而获得。片段也可以通过重组方式获得。举例的片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc和/或Fv片段。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体的结合抗原或与完整抗体(及与其衍生自之中的完整抗体)竞争结合抗原(即特异性结合)的多肽片段。结合片段是通过重组DNA技术产生的,或者

通过酶或化学裂解完整免疫球蛋白产生的。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、单链和单链抗体。

[0056] 具有降低的免疫原性的人源化抗体是指这样的人源化抗体,其呈现出相对于亲代抗体如鼠抗体降低的免疫原性。

[0057] 基本上保留亲代结合性质的人源化抗体是指这样的人源化抗体,其保留特异性结合由用于产生这种人源化抗体的亲代抗体所识别的抗原的能力。优选地,人源化抗体呈现出与亲代抗体相同或基本相同的抗原结合亲和力和亲合力。理想地,抗体的亲和力不低于亲代抗体亲和力的10%,更优选不低于大约30%,最优选所述亲和力不低于亲代抗体的50%。测定抗原结合亲和力的方法为本领域熟知,包括半最大结合测定、竞争测定和Scatchard分析。

[0058] 进一步地,术语“治疗有效量”是指当给人或动物施用时足以在所述人或动物中获得治疗作用的抗体的量。有效量易于由本领域技术人员根据常规方法确定。

[0059] 如本文所用,术语“治疗”、“预防”是指在对象中由于施用预防性或治疗性药剂而获得的预防疾病的一或多个症状复发或发生。

[0060] 第一方面,本发明提供了特异于流感H7血凝素的主要中和表位的单克隆抗体及其活性片段即抗原结合片段(在本文也称作抗体片段)。在一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中所述构象表位包含全长HA蛋白的氨基酸136Ser、137Gly和227Glu,所述全长HA蛋白包括信号蛋白。编码包含信号蛋白的HA蛋白的核苷酸序列在SEQ ID NO:1示出,包含信号蛋白的HA蛋白的氨基酸序列在SEQ ID NO:2示出。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合鼠mAb 11B9所特异性结合的H7血凝素的构象表位。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9。在进一步的实施方案中,所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤11B9产生的鼠mAb 11B9。鼠杂交瘤11B9于2012年9月11日根据布达佩斯条约保藏在CellBank Australia,214Hawkesbury Rd,Westmead NSW 2145,Australia,指派保藏号为CBA20120022。本发明还涉及产生鼠单克隆抗体11B9的鼠杂交瘤。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体是嵌合或人源化单克隆抗体。特别地,所述嵌合或人源化单克隆抗体特异性结合鼠单克隆抗体11B9所特异性结合的H5血凝素的构象表位。在一个实施方案中,所述单克隆抗体(鼠单克隆抗体或嵌合或人源化单克隆抗体)或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中所述构象表位包含全长HA蛋白的氨基酸136Ser、137Gly和227Glu,所述全长HA蛋白包括信号蛋白。

[0061] 在一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中构象表位包含全长HA蛋白的氨基酸175Lys和227Glu,所述全长HA蛋白包含信号蛋白。编码包含信号蛋白的HA蛋白的核苷酸序列在SEQ ID NO:1示出,包含信号蛋白的HA蛋白的氨基酸序列在SEQ ID NO:2示出。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体或其片段特异性结合鼠mAb 62所特异性结合的H7血凝素的构象表位。在再一个实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 62。在进一步的实施方案中,所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤62产生的鼠mAb 62。鼠杂交瘤62于2012年9月11日根据布达佩斯条约保藏在CellBank Australia,214Hawkesbury Rd,Westmead NSW 2145,Australia,指派保藏号为CBA20120023。本发明还涉及产生鼠单克隆抗体62的鼠杂交瘤。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体是嵌合或人源化单克隆抗体。特别地,所述嵌合或人源化单克隆抗体特异性结合鼠单克隆抗体62所特

异性结合的H5血凝素的构象表位。在一个实施方案中,所述单克隆抗体(鼠单克隆抗体或嵌合的或人源化单克隆抗体)或其片段特异性结合H7血凝素(HA)的构象表位,其中构象表位包含全长HA蛋白的氨基酸175Lys和227Glu,所述全长HA蛋白包含信号蛋白。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码鼠mAb 11B9或mAb 62或者本文所述嵌合的或人源化单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸。在再一个实施方案中,本发明提供了包含所述核酸的载体。在进一步的实施方案中,本发明提供了包含和表达所述载体的细胞。

[0063] 在一个实施方案中,人源化抗体是通过使用本文所述技术以及本领域技术人员熟知的技术组合人重链和轻链恒定区与小鼠重链和轻链可变区而制备的。在另一个实施方案中,制备人源化抗体,其中DNA序列是合成的,其编码含有鼠mAb 11B9或mAb 62的小鼠轻链和重链可变区的CDR人源化V_L和V_H序列。

[0064] 合成编码已知序列的蛋白的DNA的方法为本领域熟知。使用这种方法,合成编码本发明人源化抗体的DNA序列,然后在适于重组抗体表达的载体系统中表达。这可以在提供本发明人源化抗体序列的任何载体系统中实现,如包含人恒定区序列及与产生功能性(抗原结合)抗体相关的小鼠可变结构域序列的融合蛋白的表达。

[0065] 表达载体、适于表达重组抗体和人源化抗体的宿主细胞及适于表达这种抗体的方法为本领域熟知。见例如美国专利No.7,074,406。

[0066] 已知能表达功能性免疫球蛋白的宿主细胞包括例如哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞、细菌如大肠杆菌、酵母细胞如酿酒酵母等宿主细胞。在这些细胞中,鉴于CHO细胞的有效表达和分泌免疫球蛋白的能力而由许多研究者使用。

[0067] 本质上,人源化抗体的重组表达是通过两种一般方法之一实现的。在第一方法中,将宿主细胞用单一载体转染,所述载体提供与选择的恒定区融合的重链和轻链可变序列的表达。在第二方法中,宿主细胞用两种载体转染,其分别提供与选择的恒定区融合的可变重链或轻链序列的表达。

[0068] 第二方面,本发明提供了预防和治疗H7流感的方法和组合物,使用本发明所述单克隆抗体或抗体片段如鼠mAb 11B9或mAb 62或者嵌合的或人源化单克隆抗体或其片段进行。在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明所述鼠mAb 11B9或mAb 62或者嵌合的或人源化单克隆抗体及药物可接受的稀释剂或运载体的药物组合物。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含本发明所述单克隆抗体的抗原结合片段及药物可接受的稀释剂或运载体。在一个实施方案中,所述抗原结合片段是mAb 11B9或mAb 62的抗原结合片段。在再一个实施方案中,所述药物组合物包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子及药物可接受的稀释剂或运载体。在进一步的实施方案中,所述药物组合物包含具有所述核酸的载体及药物可接受的稀释剂或运载体。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含表达所述载体的细胞及药物可接受的稀释剂或运载体。

[0069] 在一个实施方案中,本发明提供了降低对象中H5N1流感病毒感染、或者降低对象中H7流感病毒感染风险、抑制对象感染一或多种H7流感病毒毒株或分离株、或者预防由一或多种H7流感病毒毒株或分离株所致流感感染或疾病的方法。在这个实施方案中,所述方法包括给有需要的对象施用治疗有效量的本发明所述单克隆抗体如鼠mAb 11B9或mAb 62或者嵌合的或人源化单克隆抗体或者其抗原结合片段、包含编码所述抗体或抗体片段的多核苷酸的核酸分子、包含所述多核苷酸的载体、或者表达所述载体的细胞。在一个实施方案

中,所述对象是免疫功能低下的,是婴儿、幼儿或老人。在另一个实施方案中,所述施用提供了治疗益处。在再一个实施方案中,所述治疗益处包括抑制流感病毒滴度的增加、降低流感病毒滴度、抑制流感病毒复制的增加、降低流感病毒复制、抑制流感病毒增殖的增加或者降低流感病毒增殖,或者降低对象中与流感病毒感染相关的一或多个症状或并发症的进展、严重度、频率、持续时间或可能性。在一个实施方案中,所述症状或并发症选自发冷、发热、咳嗽、咽喉痛、鼻充血、鼻窦充血、鼻感染、鼻窦感染、身体疼痛、头痛、疲劳、肺炎、支气管炎、耳感染、耳痛和死亡。在另一个实施方案中,所述治疗益处包括促进对象从H7流感病毒感染中康复。在进一步的实施方案中,给对象施用的药剂是在对象感染流感H7病毒之前、基本同时或之后施用。

[0070] 本发明的抗体可以使用已知技术制备为生理学可接受的配制物,可包含药物可接受的运载体、稀释剂和/或赋形剂。例如,将本发明的及如本文所述的抗体包括任何功能性等价抗体或其功能部分与药物可接受的运载体、稀释剂和/或赋形剂组合以形成药物组合物。合适的药物运载体、稀释剂和/或赋形剂为本领域熟知,包括例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳状液如油/水乳状液、各种类型增湿剂、无菌溶液等。

[0071] 本发明的药物组合物的配制可以根据本领域技术人员已知的标准方法实现。见例如通过引用并入本文的Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Ed., Ed.D.B.Troy,Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,2006。

[0072] 本发明的组合物可以固体、液体或气雾剂形式以合适的药物有效剂量给对象施用。举例的固体组合物包括丸剂、乳霜和可植入的剂量单位。丸剂可以口服。治疗性乳霜可以局部施用。可植入的剂量单位可以局部施用(例如在肿瘤部位),或者可以植入以全身性释放治疗组合物(例如皮下植入)。举例的液体组合物包括适合肌肉、皮下、静脉内、动脉内注射的配制物,及适于局部和眼内施用的配制物。举例的气雾剂配制物包括向肺部施用的吸入性配制物。

[0073] 组合物可以通过标准施用途径施用。通常地,组合物可以通过局部、口服、直肠、鼻、皮内、腹膜内或肠道外(例如静脉内、皮下或肌肉注射)途径施用。此外,组合物可以掺入缓释基质如可生物降解的聚合物中,该聚合物植入希望施用的部位附近,例如在肿瘤部位。所述方法包括施用单一剂量,在预定时间间隔施用重复剂量,及在预定时间持续施用。如本文所用,持续释放基质是由通常为聚合物的材料制成的基质,所述聚合物可通过酶或酸/碱水解或通过溶解而降解。一旦插入机体,所述基质通过酶和体液起作用。持续释放的基质选自生物相容的材料如脂质体、聚交酯(聚乳酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚交酯共乙交酯(乳酸与乙醇酸的共聚物)、聚酞、聚(正)酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅树脂。优选的可生物降解的基质是聚交酯、聚乙交酯或聚交酯共乙交酯(乳酸与乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[0074] 本发明的组合物可以与其它组合物组合施用,所述其它组合物包含生物活性物质或化合物,特别是选自如下一组的至少一种化合物:抗氧化刺激的化合物,抗凋亡化合物,金属螯合物,DNA修复抑制剂如哌仑西平和代谢物,3-氨基-1-丙磺酸(3APS),1,3-丙烷二磺酸(1,3PDS), α -分泌酶激活物, β -和 γ -分泌酶抑制剂, τ 蛋白,神经递质, β -折叠破坏剂,淀粉样 β 清除/耗竭细胞成分,N-末端截短的淀粉样 β 抑制剂包括焦谷氨酸化淀粉样 β 3-42,抗

炎分子,“非典型抗精神病药”如氯氮平、齐拉西酮、利培酮、阿立哌唑或奥氮平或者胆碱酯酶抑制剂(ChEIs)如他克林、利斯的明、多奈哌齐和/或加兰他敏,M1激动剂及其它药物包括任何淀粉样或 τ 修饰药物和营养补充剂如维生素B12,半胱氨酸,乙酰胆碱前体,卵磷脂,胆碱,银杏(Ginkgo biloba),乙酰-L-肉毒碱,艾地苯醌,丙戊茶碱,或者黄嘌呤衍生物,以及本发明的抗体,及任选药物可接受的运载体和/或稀释剂和/或赋形剂及治疗疾病的程序。

[0075] 蛋白质药物活性物质可以1ng-10mg/剂的量存在。通常地,施用方案应在0.1 μ g-10mg本发明抗体范围之间,特别是在1.0 μ g-1.0mg,及更特别是在1.0 μ g-100 μ g范围之间,这些范围内的所有个体数值均也是本发明的一部分。如果通过持续注入形式施用,更合适的剂量可以是在0.01 μ g-10mg单位/kg体重/小时之间,在这些范围内的所有个体数值均也是部分的一部分。

[0076] 通常是肠道外施用,例如静脉内注射。肠道外施用的制备物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳状液。非水性溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,及可注射有机酯如油酸乙酯。水性溶剂可以选自水、乙醇/水溶液、乳状液或悬浮液,包括盐水和缓冲剂。肠道外运载体包括氯化钠溶液、Ringer's葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化Ringer's或者不挥发油。静脉内运载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于Ringer's葡萄糖的那些补充剂)等。也可以存在防腐剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0077] 药物组合物可进一步包含蛋白质运载体如血清白蛋白或免疫球蛋白,特别是人来源的。进一步地,根据指定用途,生物活性剂可以存在于本发明的药物组合物中。

[0078] 第三方面,本发明提供了使用本文描述的单克隆抗体或其片段鉴别、表征和定量H7表达的方法和组合物。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在一个实施方案中,H5表达与H7流感病毒的HA表达相关。在一个实施方案中,所述组合物包含本文描述的单克隆抗体或其片段。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在另一个实施方案中,所述方法包括检测H5与本文描述的单克隆抗体或其片段的结合。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb62。在一个实施方案中,本发明涉及利用这种单克隆抗体或相关结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定及病毒中和(VN)测定。所有这些测定为本领域技术人员熟知。在一个实施方案中,可以利用如本文所述的双功能的ELISA。

[0079] 在一些实施方案中,鉴别和/或定量H7表达的方法和组合物是用于鉴别和/或定量疫苗中的H7病毒免疫原性物质。在一个实施方案中,所述免疫原性物质包含血凝素或其抗原性部分或者编码血凝素或其抗原性部分的核酸。在另一个实施方案中,所述抗原性部分包括血凝素的表位。在一个实施方案中,所述免疫原性物质是包含血凝素的病毒。在另一个实施方案中,所述病毒是灭活的。在再一个实施方案中,所述病毒是减毒的病毒。在另一个实施方案中,所述病毒是病毒体形式。在进一步的实施方案中,所述病毒得自蛋或细胞培养。在另一个实施方案中,所述免疫原性物质是包含血凝素的分裂病毒或者分裂病毒抗原性制备物。在一个实施方案中,所述免疫原性物质是血凝素或其抗原性部分。在另一个实施方案中,所述血凝素或其抗原性部分已经分离。在再一个实施方案中,所述血凝素或其抗原性部分是通过表达系统产生的。在一个实施方案中,所述表达系统是何种表达系统,如病毒表达载体,其中血凝素或其抗原性部分呈现或展示在病毒表面上。在一个实施方案中,所述

病毒表达载体是任何病毒表达载体,如修饰的痘苗病毒表达载体、腺病毒表达载体、痘病毒表达载体、杆状病毒表达载体等。在一个实施方案中,所述表达载体是杆状病毒表达载体,且呈现或展示血凝素或其抗原性部分的病毒是杆状病毒。在另一个实施方案中,所述免疫原性物质是编码血凝素或其抗原性部分的核酸,其能在对象中表达。

[0080] 第四方面,本发明提供了检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒或者检测生物样品中针对甲型流感H7血凝素的抗体(在此称作抗-H7抗体)的试剂盒和方法。在检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒的一个实施方案中,所述方法包括将样品与第一抗体接触,第一抗体是如本文所述单克隆抗体或其抗体片段(有时称作捕获抗体)。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括将样品与本文所述第二抗体或其抗体片段接触,第二抗体或其抗体片段特异性结合甲型流感H7血凝素的表位,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合(有时称作检测抗体)。在检测生物样品中甲型流感H7亚型病毒血凝素的抗体的一个实施方案中,所述方法包括将已经加入甲型流感H7亚型病毒的对照H7血凝素(在此有时称作对照H7抗原)的样品与第一抗体接触,第一抗体是如本文所述的单克隆抗体或其抗体片段(有时称作捕获抗体)。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括将样品与如本文所述的第二抗体或其抗体片段接触,第二抗体或其抗体片段特异性结合甲型流感H7亚型病毒的表位,其中第二抗体含有或与可检测元件缀合(有时称作检测抗体)。在一些实施方案中,第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。在其它实施方案中,第一抗体固定在固体表面上。在一些实施方案中,第一单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在其它实施方案中,第二单克隆抗体是mAb 11B9或mAb 62。在一个实施方案中,对照H7抗原是重组H7抗原。在另一个实施方案中,对照H7抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。在一个实施方案中,本发明涉及利用这种单克隆抗体或相关结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定和病毒中和(VN)测定。在一个实施方案中,利用如本文所述的双功能ELISA测定。

[0081] 在一个实施方案中,所述测定是双功能ELISA,其对于H7禽流感病毒的抗原和抗体检测均有效。在一个实施方案中,mAb 11B9或mAb 62之一用作捕获抗体,mAb 11B9或mAb 62的另一种用作检测抗体。在一个实施方案中,捕获抗体包被在固相上,如微滴定板、微珠等。为了检测生物样品中的抗原,将样品与捕获抗体接触足以使得样品中的任何H7抗原均与捕获抗体结合的一段时间。然后将检测抗体与已结合的样品H7抗原(如果有的话)接触足以使得检测抗体结合已结合的样品H7抗原的一段时间。然后确定任何检测抗体的结合情况,以确定样品中H7抗原的存在和/或量。为了检测生物样品中的抗-H7抗体,将对照H7抗原加入生物样品中制备混合物。在一个实施方案中,在生物样品中加入固定量的对照H7抗原。对照H7抗原结合生物样品中也许存在的任何抗-H7抗体。然后将混合物与捕获抗体接触足以使得对照H7抗原结合捕获抗体的一段时间。如果抗-H7抗体存在于生物样品中,则结合捕获抗体的对照H7抗原中的一些将结合抗-H7抗体,且结合捕获抗体的对照H7抗原中的一些将游离于结合的抗体。在一个实施方案中,对照H7抗原是重组H7抗原。在另一个实施方案中,对照H7抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。然后将检测抗体与未被样品H7抗体(如果有的话)结合的任何结合的对照H7抗原接触一段时间,所述时间足以使得检测抗体结合未被样品H7抗体结合的对照H7抗原。然后确定检测抗体的结合情况,以确定样品中H7抗体的存在和/或量。在一个实施方案中,结合的检测抗体的水平降低表示生物样品中存在抗-

H7抗体。

[0082] 在一个实施方案中,试剂盒包含第一抗体,其是本文所述单克隆抗体或其抗体片段以及进行检测甲型流感H7亚型病毒的测定的说明书。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是鼠mAb 11B9或mAb 62。在另一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含第二抗体,其特异性结合甲型流感病毒的H7血凝素的表位,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合。在一些实施方案中,第二抗体是mAb 11B9或mAb 62。在一些实施方案中,第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。在其它实施方案中,第一抗体固定在固体表面上。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含H7血凝素抗原。在一些实施方案中,H7血凝素抗原是重组H7蛋白。在其它实施方案中,H7血凝素抗原是表面表达H7的病毒如杆状病毒。在一个实施方案中,所述试剂盒可用于鉴别和/或定量疫苗中的H7病毒免疫原性物质。在另一个实施方案中,所述试剂盒可用于检测生物样品中的H7血凝素或者针对H7血凝素的抗体。在一些实施方案中,所述试剂盒涉及利用这种结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定和病毒中和(VN)测定。所有这些测定均为本领域技术人员熟知。在一些实施方案中,可利用如本文所述的双功能ELISA。

[0083] 在本研究中,表征了针对H7HA1的一组mAb,并鉴定其代表性中和表位。在用HPAI H7N7病毒感染攻击的小鼠中评估这些mAb的预防效力。通过观测体重丧失、存活率及感染的小鼠肺中病毒荷载清除率的动力学确定效力。

[0084] 如本文所示,在H7N1免疫的小鼠中产生的mAb 11B9和mAb 62能特异性结合及中和不同的H7流感病毒毒株。基于其中和活性,使用逃逸突变体测序鉴别两个mAb的中和表位。被动施用抗体仍是对抗流行性感冒的策略。因此,在小鼠中根据存活百分比和体重百分比评估两种抗H7流感病毒的mAb的预防效力。在单一剂量中施用mAb 11B9或mAb 62在小鼠模型中示出针对致死性H7N7流感的100%保护作用。用这两种mAb治疗帮助控制感染的初始进程,因此使得动物增加有效的免疫应答。这些研究示出使用mAb 11B9或mAb 62的被动免疫治疗在预防高致病性H7N7感染中是有效工具,提供了将来流感流行需要的立即免疫力。这种方法的临床应用通过人源化这些抗体及在用H7N7流感病毒攻击的非人灵长类动物中作为治疗剂进行评估而进一步确定。

[0085] 除非特别指出,实施本发明是应用本领域技术人员已知的常规化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养和转基因生物学技术进行,见例如Maniatis et al.,1982,Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning,2nd Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Sambrook and Russell,2001,Molecular Cloning,3rd Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Green and Sambrook,2012,Molecular Cloning,4th Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Ausubel et al.,1992,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,including periodic updates);Glover,1985,DNA Cloning(IRL Press,Oxford);Russell,1984,Molecular biology of plants:a laboratory course manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Guthrie and

Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, RNA Interference in Practice, Wiley-VCH, 2005; Engelke, RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology, DNA Press, 2003; Gott, RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application, CRC, 2004.

实施例

[0086] 本发明通过如下实施例描述, 所述实施例只是例证本发明, 不以任何方式限制本发明。利用本领域熟知的标准技术或者下文特别描述的技术。

[0087] 实施例1

[0088] 材料和方法

[0089] 病毒和细胞: 这项研究中使用的H7N1(A/chicken/Malaysia/94)及其它AIV得自新加坡Agri-Food & Veterinary Authority。重配株流感病毒H7N9(A/Shanghai/1/13)、H7N3(A/Canada/rv504/04)、H7N6(A/quail/Aichi/3/09)、H7N7(A/duck/Hokkaido/1/10)和H7N7(A/Netherlands/219/03)通过先前所述的反向遗传学产生(Ho et al., 2009)。简而言之, 基于NCBI流感病毒数据库的序列合成H7病毒的HA和NA基因的互补DNA, 内部基因的六个cDNA基于PR8(A/Puerto Rico/8/1934)病毒序列(GenScript, USA)合成。将8个流感病毒基因节段每一个的cDNA插入pC1polsap1T载体的pol I启动子(pIh)与pol I终止子之间(由Ruben Donis, CDC, USA善意提供), 并共转染进共培养的293T人胚胎肾(293T)细胞和Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞中, 使用lipofectamine 2000(Life Technologies, USA)进行。在48小时后, 收集转染的上清并通过标准血凝测定确定。使用如先前所述(Prabakaran et al., 2009)一特定系列的通用引物证实序列。将原种病毒(stock virus)在11天龄含胚鸡卵的尿囊腔中在35°C增殖36小时-91小时。然后通过Muench-Reed方法(1938)计算重配株病毒的组织培养感染剂量50(TCID50)。

[0090] MDCK细胞得自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。将MDCK细胞在补加10%胎牛血清的Dulbecco's最小基本培养基(DMEM; Life Technologies, USA)中增殖。将病毒原种在补加

0.5%牛血清白蛋白(BSA)和200ng/ml胰蛋白酶的DMEM中在MDCK细胞中生长。将293T细胞在含有5%FBS的Opti-MEMI(Life Technologies,USA)中维持。

[0091] 使用高致病性病毒的所有实验均遵从CDC/NIH和WHO的建议在生物安全水平3(BSL 3)防护设备中进行且也获得新加坡Agri-Food and Veterinary Authority许可。

[0092] MAb产生:将BALB/c小鼠以2周的规律间隔用在0.1ml磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的来自H7N1(A/chicken/Malaysia/94)的二乙烯亚胺(BEI)灭活的完整病毒在皮下注射免疫两次,其用等体积的Montanide ISA 563佐剂(SEPPIC,France)乳化。在脾细胞与SP2/0细胞(He et al.,2009)融合之前3天,将小鼠用相同的病毒抗原加强(boosted)。将融合的细胞接种在96孔平板中,其上清通过如下述免疫荧光测定筛选。产生mAb的杂交瘤通过至少3次有限稀释进行克隆。如下文所述检测阳性mAb的血凝抑制活性。将来自选择的阳性mAb的免疫球蛋白使用商业分型试剂盒(Amersham Bioscience,England)根据厂商指导分型。在接种后3天收获杂交瘤上清,细胞碎片通过在400g离心10分钟沉淀,随后收集上清并在-20°C贮存。将mAb用Montage kit Prosep-G(Millipore)针对IgG纯化或者使用蛋白A琼脂糖珠(Millipore)纯化。抗体的纯度通过SDS-PAGE分析证实。然后通过如下文所述的标准血凝抑制测定检测mAb的中和活性。

[0093] 免疫荧光测定(IFA):将在96孔平板中培养的MDCK细胞用不同的AIV H7毒株感染。在感染后24小时,将细胞用4%多聚甲醛在室温固定30分钟,及用磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH 7.4洗涤2次。将固定的细胞与杂交瘤培养上清在37°C保温1小时,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)漂洗,然后与1:400或1:200稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)-缀合的兔抗小鼠免疫球蛋白(Dako,Denmark)保温。将细胞在PBS中再次漂洗,通过宽场epi-荧光显微镜(Olympus IX71)评估抗体结合情况。

[0094] 血凝抑制测定:血凝抑制(HI)测定如先前所述((Prabhu et al.,2009;Prabakaran et al.,2010)进行。简而言之,将mAb在V形底的96孔平板中系列稀释(2倍),并与4HA单位的H7病毒混合。将平板在室温保温30分钟,在每个孔中加入1%鸡RBC。血凝抑制终点是未观测到凝集的最高mAb稀释。

[0095] 微量中和测定:H7毒株的单克隆抗体的中和活性通过先前所述的微量中和测定分析(He and Kwang,2013)。简而言之,将10倍稀释的mAb进一步系列稀释(2倍),并与10050%组织培养感染剂量(TCID50)的不同H7毒株进化枝在室温保温1小时,并一式两份铺板于在96孔平板中生长的MDCK细胞上。或者,将mAb以2倍系列稀释,与100TCID50的不同H7毒株进化枝在室温保温1小时,并一式两份铺板于96孔平板中生长的MDCK细胞上。MDCK细胞培养中每个H7毒株的TCID50通过Reed and Muench(1938)方法确定。中和滴度评价为通过光学显微镜观测到无细胞病理效应的最高mAb稀释度。

[0096] 逃逸突变体的分离和分析:由mAb 11B9和mAb 62识别的表位如先前所述通过鉴定逃逸突变体而作图(He et al.,2010;Kaverin et al.,2007)。简而言之,将H7亲代病毒与过量的mAb保温1小时,然后接种于11天龄的含胚鸡卵中。将鸡卵在37°C保温48-72小时。收获病毒并用于在含胚鸡卵中有限稀释克隆,并经噬斑纯化逃逸突变体。从尿囊液中提取RNA。将血凝素(HA)基因经逆转录酶(RT)-PCR扩增并克隆进TA克隆载体(Promega)中,对一些克隆进行测序。通过与亲代病毒的序列对比分析各个克隆的序列。

[0097] 攻击研究(实施例4):4-6周龄的近交系SPF BALB/c小鼠用于攻击研究。小鼠(n=

10只/组)经鼻内感染5MLD50(50%小鼠致死剂量)的适应的H7N7毒株(A/Netherlands/219/03)。所有动物实验均根据Guides for Animal Experiments Performed at NIID和实验方案进行。

[0098] 预防效力(实施例4):为了确定预防效力,将小鼠用10mg/kg或0mg/kg(PBS)的mAb 11B9或mAb 62经腹膜内注射在病毒攻击之前预处理。24小时后,将小鼠用5MLD50的H7N7毒株攻击。每天观测小鼠以监测体重和死亡率直至所有动物死亡或者直至攻击后14天。

[0099] 免疫和攻击(实施例6-10):对于攻击实验,如先前所述(Brown, 1990)将H7N7重配株病毒通过三次连续的肺至肺传递以适应小鼠。将在肺传递中存在的病毒在10天龄鸡卵的尿囊腔中在37°C增殖48小时以制备病毒原种。如Reed和Munch方法所述计算50%小鼠致死剂量(MLD50)。4-6周龄的SPF雌性BALB/c小鼠用于攻击研究。小鼠(n=5只/组)经鼻内接种5或10MLD50(50%小鼠致死剂量)的致病性H7N7(A/Netherlands/219/03)毒株。

[0100] 对于鼻内免疫,首先将小鼠经腹膜内用100 μ l氯胺酮(10mg/ml)和甲苯噻嗪(1mg/ml)盐水麻醉。每只小鼠用经鼻内接种100 μ l的于PBS中的Mab或病毒。

[0101] 预防效力(实施例6-10):为了确定预防效力,小鼠经鼻内或腹膜内用2.5mg/kg、5mg/kg或10mg/kg纯化的Mab 62在进行病毒攻击之前预处理。对照小鼠经鼻内仅用PBS处理。24小时后,将小鼠用5MLD50的H7N7毒株攻击。每天观测小鼠以监测体重和死亡率直至死亡或攻击后14天。

[0102] 治疗效力(实施例6-10):为了确定治疗效力,将每组小鼠实验性感染5MLD50的H7N7毒株。在病毒感染后1天、2天或7天,将小鼠经鼻内或腹膜内途径用5mg/kg、10mg/kg或15mg/kg的Mab 62处理。感染的对照小鼠经鼻内仅用PBS处理。每天观测小鼠以监测体重和死亡率直至死亡或者攻击后14天。

[0103] 组织病理学分析(实施例6-10):在攻击后第2天、第4天和第6天从每组小鼠(N=3)收获进行组织学检验的肺样品,并固定于10%缓冲的福尔马林(pH 7.4)中,在石蜡中包埋并切成4 μ m切片。将切片使用Hist-choice(Amersco)脱蜡,在连续梯度乙醇浴中再水合。玻片用HE染色,通过光学显微镜(Olympus, UK)进行病理学评估。通过数字成像系统捕获图像(Nikon, USA)。

[0104] 统计学分析(实施例6-10):数据以算术平均数和标准差(SD)表示。进行未配对双尾Student's t检验以确定两组平均值之间差异的显著水平。单向方差分析(ANOVA)也用于检测组间差异。所有统计学分析均用SigmaStat 2.0(Jandel Corporation)软件进行。

[0105] 实验性血清样品(实施例11-15):灭活的AI病毒(表1)在ISA-70(SEPPIC, France)佐剂中乳化并肌肉注射至3周龄白色来亨鸡(n=4)中。以2周间隔施用两次加强。从在第一次和第二次注射后10天收集的血液中制备血清。应答同源株系的抗体通过下述HI评估。小鼠组(n=4)肌肉注射在佐剂(SEPPIC, France)中单独乳化的不同的灭活的H7AIV。以两周间隔重复注射两次。此外,用灭活的H7N1(A/Chicken/Malaysia/94)免疫豚鼠。在第二次免疫后14天收集血液。

[0106] H7杆状病毒产生(实施例11-15):如先前所述产生重组杆状病毒载体(Prabakaran et al., 2010)。在标准PCR反应中从H7N7(A/NL/219/03)重配病毒中扩增全长HA基因。将扩增的HA基因插入穿梭载体pFASTBacHT A(Invitrogen, San Diego, CA, USA)中以在白斑综合征病毒(WSSV)立即早期(ie1)启动子下表达。将这个表达盒通过位点特异性转位整合进

DH10Bac™(Invitrogen, USA)内的杆状病毒基因组中,根据Bac-to-Bac系统(Invitrogen)的方案进行。将SF9II细胞在28°C在SF900II无血清培养基(Gibco BRL, USA)中维持以合成重组杆状病毒。然后将重组杆粒转染进SF9II细胞中,在感染后96小时收获含有重组杆状病毒展示的H7-HA(Bac-H7)的上清。

[0107] 双功能ELISA(实施例11-15):将96孔圆底微滴定板(Nunc, Roskilde, Demark)用在100μl碳酸盐缓冲液(73mM碳酸氢钠和30mM碳酸钠, pH 9.7)中的0.5μg/孔的捕获mAb 11B9在4°C包被过夜或者在37°C包被2小时。将平板用PBST洗涤两次,随后在每次与抗体或抗原保温后用PBS洗涤两次。抗体包被的平板通过与100μl封闭缓冲液(含有5%牛奶的PBS)在室温保温1小时而封闭。对于抗原检测,然后将经封闭的平板与在PBST中稀释的100μl含有病毒的样品在37°C保温1小时。对于抗体检测,将与50μl的8HAU表面表达H7的杆状病毒混合的50μl血清加入经封闭的平板中,在37°C保温1小时。病毒结合或抗体封闭通过与100μl的辣根过氧化物酶缀合的检测mAb 62(800ng)(内部标记;Roche)在37°C保温1小时而检测。生色团显色通过加入100μl新鲜制备的底物溶液(o-苯二胺-二盐酸化物;Sigma)而介导。使用0.1N硫酸终止反应,记录在490nm的光密度。抗原检测限通过给出信号-噪音比为3的光密度值确定。对于抗体检测,计算每个样品稀释液的由于阻断mAb结合的血清抗体所致OD密度降低,使用下式计算:抑制%=[(阴性参考血清OD-检测血清OD)/(阴性参考血清OD-阳性参考血清OD)]×100%。为了确定抗体检测的截断值,从新加坡的Animal Health Biotechnology Serum Bank, Temasek Life Sciences Laboratory获得无特定病原体鸡血清、小鼠和豚鼠。

[0108] 实施例2:表征鼠单克隆抗体11B9和62

[0109] 单克隆抗体11B9和62从用A/chicken/Malaysia/94H7N1病毒免疫的小鼠中产生。经鉴别mAb 11B9和mAb 62均属于同种型IgG1。除了在使用H7N1感染的MDCK细胞中阳性活性之外,均呈现针对H7N1毒株A/chicken/Malaysia/94的中和活性(图1A和1B),提示其均识别H7中的中和表位。在中和和IFA中针对不同H7毒株进一步检测两种mAb。在使用不同AIV感染的MDCK细胞的IFA中,这两种mAb均呈现与检测的所有四种H7毒株的特异性反应,而与任何非H7毒株无任何交叉反应(表1)。因此,mAb 11B9和mAb 62均特异于H7亚型,而非H7毒株无任何相互作用。在与不同AIV的中和检测中观测到相似结果。mAb 11B9和mAb 62能中和所有四种检测的H7,而与任何非H7毒株检测到无活性(表2),表示两种mAbs均是H7特异性中和抗体。

[0110] 表1:在多种AIV感染的MDCK细胞中筛选单克隆抗体11B9和62

[0111]

病毒	mAb 62	mAb 11B9	PBS
A/chicken/Singapore/94(H7N1)	+	+	-
A/Netherlands/219/03(H7N7)	+	+	-
A/duck/Hokkaido/1/10(H7N7)	+	+	
A/Canada/rv504/04(H7N3)	+	+	
A/Chicken/Malaysia/04(H5N2)	-	-	-
A/chicken/Singapore/02(H3N2)	-	-	-
A/Singapore/TLL54/2009(H1N1)	-	-	-

A/Chicken/Singapore/Singapore/98(H9N2)	-	-	-
A/Chicken/Singapore/Singapore/92(H4N1)	-	-	-
未感染的MDCK	-	-	-

[0112] 表2:使用Mab 11B9和62^{a,b}的中和滴度

[0113]

病毒	mAb 62	mAb 11B9	PBS
A/chicken/Singapore/94(H7N1)	256	256	<8
A/Netherlands/219/03(H7N7)	256	256	<8
A/duck/Hokkaido/1/10(H7N7)	256	64	<8
A/Canada/rv504/04(H7N3)	32	128	<8
A/Chicken/Malaysia/04(H5N2)	<8	<8	<8
A/chicken/Singapore/02(H3N2)	<8	<8	<8
A/Singapore/TLL54/2009(H1N1)	<8	<8	<8
A/Chicken/Singapore/Singapore/98(H9N2)	<8	<8	<8
A/Chicken/Singapore/Singapore/92(H4N1)	<8	<8	<8

[0114] ^a MAb浓度为0.1mg/ml.

[0115] ^b 100个TCID50病毒毒株用于微量中和测定。

[0116] 实施例3:针对鼠单克隆抗体11B9和62的表位作图

[0117] 由于两种mAb能中和H7病毒,使用中和化逃逸突变体选择分析参与两种mAb的表位形成的氨基酸。A/chicken/Malaysia/94H7N1病毒用作用于选择的亲代病毒。将分离自多个逃逸变体的完整HA基因的序列与亲代病毒对比。发现来自mAb 11B9的突变体在氨基酸组合136(Ser to Gly)和227(Glu突变为Gly)或者137(Gly突变为Arg)和227(Glu to Gly)携带双突变,而对mAb 62的突变体在氨基酸175(Lys突变为Glu)和227(Glu突变为Gly)具有双突变。序列编号包括信号肽(表3)。

[0118] 表3:使用mAb 11B9和mAb 62通过逃逸突变的H7HA的中和表位

mAb	核苷酸	核苷酸改变	氨基酸	氨基酸改变
[0119] 11B9	406	A 变为 G	136	Ser 变为 Gly
	680	A 变为 G	227	Glu 变为 Gly
	407	G 变为 A	136	Ser 变为 Asn
	680	A 变为 G	227	Glu 变为 Gly
	409	G 变为 A	137	Gly 变为 Arg
	680	A 变为 G	227	Glu 变为 Gly
62	523	A 变为 G	175	Lys 变为 Glu
	680	A 变为 G	227	Glu 变为 Gly

[0120] 实施例4:使用mAb 11B9和mAb 62保护小鼠免于致死性病毒攻击的预防性治疗

[0121] 在用适应的H7N7病毒(A/Netherlands/219/03)攻击的小鼠中单独检验mAb 11B9和mAb 62的预防性效力。用单一剂量的10mg/kg任一mAb预处理的所有小鼠在用5MLD50的H7N7病毒(A/Netherlands/219/03)致死性攻击之后均得以保护免于死亡(100%保护),而所有未处理的对照小鼠在攻击后7天均死于病毒感染(图1A)。用单一剂量的10mg/kg任一

mAb预处理的所有小鼠示出在病毒攻击后低于1%体重丧失。大多数这些mAb处理的小鼠在病毒攻击后获得体重增加直至8%，而未用mAb处理的小鼠组示出在病毒攻击后显著的体重丧失(>30%)(图1B)。

[0122] 实施例5:抗体及抗体片段的产生

[0123] 本发明的单克隆抗体可以通过任何技术产生,所述技术允许通过培养连续细胞系产生抗体。这种方法包括但不限于最初由Kohler和Milstein在1975年揭示的杂交瘤技术(Nature 256:495-497),以及三瘤技术,人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor et al.,1983, Immunology Today 4:72)以及EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(Cole et al.,in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy Alan R.Liss,Inc.,pp 77-96(1985))。可以使用人抗体及人抗体可以通过使用人杂交瘤获得(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,可以使用产生“嵌合抗体”或“人源化抗体”而开发的技术(Morrison et al.,1984,J.Bacteriol.159-870;Neuberger et al.,1984,Nature 312:604-608;Takeda et al.,1985,Nature 314:452-454),通过导入本发明的鼠抗体分子如mAb 11B9或mAb 62的序列以及具有合适生物活性的人抗体分子的基因进行。嵌合抗体是含有人Fc部分和鼠(或其它非人)Fv部分的那些抗体。人源化抗体是其中鼠(或其它非人)互补决定区(CDR)掺入人抗体的那些抗体。嵌合抗体和人源化抗体是单克隆抗体。这种人或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。

[0124] 根据本发明,可以调整产生单链抗体描述的技术(美国专利4,946,778)以提供本发明的单链抗体。本发明的另一实施方案利用针对构建Fab表达文库描述的技术(Huse et al.,1989,Science 246:1275-1281),以使得可以快速和简便地鉴别本发明的抗体具有希望的特异性的单克隆Fab片段或其衍生物或类似物。

[0125] 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;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或单克隆抗体中产生。

[0126] 在抗体的产生中,筛选希望的抗体可以通过本领域已知的技术实现,例如放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、免疫放射性测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记)、蛋白印迹、沉淀反应、凝集测定(例如凝胶凝集测定、血凝测定)、免疫荧光测定及免疫电泳测定等。在一个实施方案中,抗体结合通过检测一抗上的标记而检测。在另一个实施方案中,一抗通过检测二抗或其它试剂与一抗的结合而检测。在进一步的实施方案中,二抗是标记的。检测方式是本领域已知的在免疫测定中检测结合的方式。

[0127] 实施例6:mAb 62是不同H7毒株的有效中和抗体

[0128] 针对不同H7病毒毒株的有效识别筛选流感病毒血凝素的一组Mab。基于HI测定的结果,由于mAb 62针对禽类和人的广泛H7病毒的高HI活性(表1)而选择其做进一步研究。该mAb属于IgG1同种型。进一步证实mAb 62病毒中和活性针对六个代表性H7毒株是阳性的,包括一个人H7N9毒株(表4)。基于此,使用中和逃逸突变体选择分析参与形成mAb 62表位的氨

氨酸。A/chicken/Malaysia/94H7N1病毒用作用于选择的亲代病毒。将分离自多个逃逸变体的完整HA基因的序列与亲代病毒对比。发现mAb 62的突变体携带在氨基酸175(Lys变为Glu)或者氨基酸227(Glu变为Gly)的突变。HA的氨基酸编号从“ATG”开始,且包括信号肽。

[0129] 表4:mAb 62(100ug/ml)针对不同H7病毒的血凝抑制(HI)和病毒中和(VN)滴度

[0130]

病毒	亚型	HI滴度	VN滴度
A/Chicken/Malaysia/94	H7N1	256	640
A/Canada/rv504/04	H7N3	64	160
A/quail/Aichi/4/09	H7N6	128	160
A/duck/Hokkaido/1/10	H7N7	256	640
A/Netherlands/219/03	H7N7	256	1280
A/Shanghai/1/13	H7N9	256	640
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	<8	<20

[0131] HI滴度低于8及VN滴度低于20表示阴性活性。

[0132] 为了确定mAb 62中和表位的显著性,考虑到NCBI数据库中所有H7序列,研究H7的蛋白多态性。在第175位氨基酸,赖氨酸和天冬酰胺出现在99.9%的以上列出的H7AIV毒株中。赖氨酸是最优势的氨基酸,在禽H7毒株中出现频率为97.9%,在人H7中频率为100%,包括最近在中国东部爆发的H7N9毒株。这个发现提示mAb 62用于识别或中和目前鉴别的所有H7人毒株的潜力及进一步配制为有效的H7AIV治疗剂的潜力。

[0133] 实施例7:通过单一剂量mAb 62对H7致死性攻击的有效预防性免疫

[0134] 针对5个MLD₅₀的H7N7病毒(A/Netherlands/219/03)攻击评估mAb 62的预防效力。在病毒攻击前一天,小鼠组(n=5)通过腹膜内或鼻内途径接种不同浓度(2.5mg/kg、5mg/kg和10mg/kg)的mAb 62。阴性对照组小鼠(仅用PBS处理)示出体重最快速的降低(25%以上)及在攻击后第8天死于与感染相关的并发症。通过任一途径用单一剂量mAb 62预处理的所有小鼠均示出针对H7病毒的致死性攻击低于6%(图2A和2C)的体重丧失及100%存活率(图2B和2D)。在粘膜施用途径中,用2.5mg/kg的mAb 62足以提供针对H7攻击的100%保护作用,体重丧失低于5%。腹膜内施用5mg/kg的mAb 62在攻击的小鼠中能防止体重明显丧失,在经IP施用2.5mg/kg较低剂量的小鼠中观测到6%体重降低。

[0135] 实施例8:通过鼻内施用mAb 62的有效治疗性免疫

[0136] 评估mAb 62针对5MLD₅₀的H7N7病毒(A/Netherlands/219/03)攻击的治疗效力。在病毒攻击后一天,小鼠组(n=5)通过腹膜内或鼻内途径接种不同浓度(5mg/kg、10mg/kg和15mg/kg)的mAb 62。阴性对照组小鼠(仅用PBS处理)示出在攻击后第8天体重的最快速降低(25%以上)及死于与感染相关的并发症。经鼻内施用单一剂量mAb 62处理的所有小鼠示出针对致死性H7病毒攻击低于10%(图3A)的体重丧失及100%存活率(图3B)。鼻内施用5mg/kg-15mg/kg剂量在治疗效力方面无明显差异。腹膜内施用5mg/kg的mAb 62在攻击后10天不能保护小鼠免于死亡。在用15mg/kg较高剂量经腹膜内施用的组中,4只小鼠存活,体重丧失15%以上。

[0137] 实施例9:针对较高剂量H7攻击施用单一剂量与两次剂量mAb 62的治疗效力

[0138] 为了检测mAb 62针对较高攻击剂量10MLD₅₀ of H7N7的治疗潜力,将在攻击后一天

经鼻施用单一剂量的效力与经鼻施用两次(每次在不同时间点,1dpi和2dpi;1dpi和7dpi)) 10mg/kg mAb 62处理的小鼠对比。在用10MLD₅₀的H7N7病毒(A/Netherlands/219/03)攻击时,阴性对照组小鼠(仅用PBS处理)与用5MLD₅₀感染相比示出体重更快速地降低(25%以上)及在攻击后第6天死于与感染相关的并发症。如图4A和4B示出,经鼻内用单一剂量10mg/kg的mAb 62处理的所有小鼠在10MLD₅₀感染时均存活,体重丧失大约13%。在感染后一天和两天经鼻施用两次成功地保护所有感染的小鼠,体重丧失低于5%。此外,接受双剂量mAb 62(1dpi和2dpi)的小鼠组当与接受单一剂量的小鼠相比时更迅速地恢复体重(8天内),施用单一剂量的小鼠在病毒感染后10天恢复其体重。观测到在感染后1天和7天经鼻施用双剂量的小鼠中治疗效力无增强。这个组中的小鼠与接受单一剂量的小鼠相比呈现相似的体重丧失和恢复。

[0139] 实施例10:经鼻内途径施用mAb 62比腹膜内治疗更有效

[0140] 由于基于小鼠死亡率和体重观测到鼻内和腹膜内治疗之间的差异,因此进行进一步研究以证实鼻内施用的更好的保护效力。对经鼻内或腹膜内用mAb 62处理的小鼠的肺进行组织病理学研究。如图5C和5D所示,在未处理的H7N7感染的小鼠中在晚期进行性感染发生肺部损害,包括中等至严重的坏死性支气管炎和组织细胞性肺炎及相关肺水肿。同时,未感染的小鼠肺部无损害(图5E)。在感染后第14天从经鼻内用15mg/kg mAb 62处理的小鼠中收集的肺示出无肺病理学改变,与未感染的对照组看起来相似(图5A),而在用15mg/kg of mAb 62经腹膜内处理的小鼠的肺中存在中等支气管炎(图5B)。

[0141] 此外,在H7感染的或处理的小鼠中评估肺中的病毒荷载。病毒复制的动力学通过在感染后第2、4、6和14天测量小鼠肺中病毒滴度而确定(图6)。当在感染的但未处理的小鼠中检测到大于 $10^{7.15}$ 的最高病毒滴度时,病毒滴度在病毒攻击后第6天最高,小鼠在随后的2天内死亡。用单一剂量的15mg/kg的mAb 62经鼻内处理的小鼠示出在感染后第2天病毒荷载降低。然而,用相同抗体剂量经腹膜内处理这些小鼠示出仅在感染后第6天病毒荷载降低。腹膜内处理的小鼠中病毒滴度在每个时间点均高于鼻内处理组,表示鼻内处理从感染开始时降低病毒荷载。所有这些发现证实实用mAb62的鼻内治疗比腹膜内治疗对于H7N7HPAI病毒更有效。

[0142] 实施例11:mAbs 62和11B9识别H7AIV上保守的中和表位

[0143] 筛选针对流感病毒血凝素的一组mAb以有效识别不同的H7病毒毒株。基于HI测定和病毒中和化结果(表5),基于其针对来自禽类和人的广泛H7病毒、包括最近在中国东部爆发的H7N9毒株的高HI活性而选择mAb 62和mAb 11B9进一步研究。这两种mAb均属于IgG1同种型。mAb 62和mAb 11B9的病毒中和活性进一步证实是H7AIV阳性的。基于此,使用中和逃逸突变体选择分析参与形成mAb 62和mAb 11B9的表位的氨基酸。A/chicken/Malaysia/94H7N1病毒用作亲代病毒以进行选择。分离自多个逃逸变体的完整HA基因的序列与亲代病毒对比。发现用mAb 62产生的突变体携带在氨基酸175(Lys突变为Glu)或氨基酸227(Glu突变为Gly)的突变。mAb 11B9携带在氨基酸136(Ser突变为Gly)或氨基酸137(Gly突变为Arg)或氨基酸227(Glu突变为Gly)的突变。HA上氨基酸编号起自“ATG”,并包括信号肽。

[0144] 表5:mAb 62和mAb 11B9(200 μ g/ml)针对不同H7病毒的血凝素抑制(HI)和病毒中和(VN)滴度,与任何其它亚型无任何交叉反应性

[0145]

病毒	亚型	HI 滴度 (mAb 62, 11B9)	VN 滴度 (mAb 62, 11B9)
A/Chicken/Malaysia/94*	H7N1	256, 256	640, 640
A/Canada/rv504/04	H7N3	128, 256	320, 640
A/quail/Aichi/4/09	H7N6	64, 64	80, 80
A/duck/Hokkaido/1/10	H7N7	128, 256	320, 640
A/Netherlands/219/03	H7N7	256, 256	640, 1280
A/Shanghai/1/13*	H7N9	64, 128	160, 320
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	<8, <8	<20, <20
A/TLL51/Singapore/09	H1N1	<8, <8	<20, <20
A/duck/Nanchang/4-184/2000	H2N9	<8, <8	<20, <20
A/Chicken/Malaysia/02*	H3N2	<8, <8	<20, <20
A/Chicken/Malaysia/92*	H4N1	<8, <8	<20, <20
A/Vietnam/VN1203/03	H5N1	<8, <8	<20, <20
A/Shorebird/DE/12/04	H6N8	<8, <8	<20, <20
A/duck/Yangzhou/02/05	H8N4	<8, <8	<20, <20
A/chicken/Malaysia/98*	H9N2	<8, <8	<20, <20
A/mandarin duck/Malaysia/98*	H10N5	<8, <8	<20, <20
A/pintail/Alberta/84/2000	H11N9	<8, <8	<20, <20
A/pintail/Alberta/49/03	H12N5	<8, <8	<20, <20
A/gull/Maryland/704/1977	H13N6	<8, <8	<20, <20

[0146] HI滴度低于8及VN滴度低于20表示阴性活性。*:野生型病毒。

[0147] 为了确定mAb 62和11A9的中和表位的显著性,考虑到NCBI数据库中的所有H7序列,研究H7的蛋白多态性(表6)。在第175位氨基酸,赖氨酸和天冬酰胺出现在99.9%的以上列出的H7AIV毒株中。赖氨酸是最优势的氨基酸,在禽类H7毒株中出现频率为97.9%,在人H7中出现频率为100%。在第136位氨基酸,丝氨酸在96.6%禽类毒株中存在,在人H7毒株中100%存在,而在137位氨基酸的甘氨酸在禽类H7中99.9%存在及在人毒株中100%存在。这个发现表明这两种mAb均能识别或中和目前鉴别的所有H7人毒株,提示其用于通用H7AIV检测的潜力。

[0148] 表6:在人和禽类H7毒株中的表位频率

mAb	氨基酸	人频率	禽类频率
11B9	136 Ser	100%	96.6%
	137 Gly	100%	99.9%
62	175 Lys	100%	97.9%

[0150] 实施例12:双功能ELISA的开发

[0151] 如图7所示运行双功能ELISA。H7抗原可以在基于H7特异性mAb的AC-ELISA中检测。由于其在H7AC-ELISA中可逆应用的等价效能,随机选择mAb 62作为检测抗体,mAb 11B9用作捕获抗体。mAbs 62和11B9的检测和捕获的最佳浓度通过mAb双向滴度确定。提供最高信号-噪音比的组合确定为0.5 μ g/孔的捕获mAb 11B9及0.9 μ g/孔的检测mAb 62。当吸光度比非H7病毒的吸光度高三倍时,认为双功能ELISA中检测的病毒是H7抗原阳性的。

[0152] H7的血清抗体可以通过其在ELISA测定封闭由H7特异性mAb对靶表位的识别的能力而检测。为了将这个测定与AC-ELISA组合,将血清样品与固定量的重组杆状病毒保温,所述重组杆状病毒在病毒表面展示H7,之后加样于用捕获mAb包被的平板。样品中H7抗体滴度基于检测到的H7杆状病毒的降低而确定。检测不同浓度的H7杆状病毒,证实在8HAU的最佳浓度。来自正常或H7免疫的鸡和小鼠的血清组用于确定截断值。首先,使用来自无H7抗体的16只鸡和20只小鼠的一组正常血清样品确定在双功能ELISA中mAb 62结合H7抗原的非特异性降低的基线。对于这组血清,双功能ELISA读数平均降低6.5%,标准差(SD)为7.1。如果针对血清样品设定“截断值” $\geq 30\%$,特异性封闭活性可以以95%置信度确定。截断值通过3SD加上平均6.5%封闭而获得($6.5+21.3=27.8\%$)。在检测中,当呈现 $\geq 30\%$ 信号封闭率时,记录每个血清样品的稀释倍数。此外,记录稀释20倍的每个样品的封闭率进行对比。

[0153] 实施例13:通过双功能ELISA的H7抗体检测的特异性和灵敏度

[0154] 通过双功能ELISA的H7抗体检测的特异性使用来自不同地区和年份的人和禽类的6个H7毒株及13个代表性非-H7亚型流感病毒毒株进行检测,包括在人中循环的流行性感管和禽流感毒株(图8)。我们实验室没有的H7或HA亚型病毒使用6个A/Puerto Rico/8/34的内部基因通过反向遗传学拯救。在双功能ELISA中的H7抗原检测的反应性和特异性使用100 μ l的含有H7毒株的PBS检验,调节为HA滴度为8。使用HA滴度 ≥ 16 的非H7病毒以消除假阳性结果。针对检测的任何非H7亚型病毒没有观测到交叉反应性。

[0155] 在双功能ELISA中H7抗原检测的分析灵敏度针对四种不同的H7毒株确定,所述毒株的吸光度范围在8HAU是0.7-1.3(图9)。将三个选择的H7病毒系列稀释以基于HA滴度确定检测限。在0.2的截断值,对于具有平均吸光度和高于平均吸光度的病毒,检测限确定为100 μ l样品含有1HA滴度的病毒,而对于具有低于平均吸光度的病毒为2HA滴度。对于流感病毒的HI检测的检测限确定为2HAU(100 μ l),观测到亚型交叉反应性。实施例14:通过双功能ELISA的H7抗体检测的特异性

[0156] 通过双功能ELISA的H7检测的特异性使用来自实验性免疫的鸡、小鼠和豚鼠的一组抗血清研究。在第二次免疫后10天收集动物血清,首先稀释获得对于同源病毒的HI滴度为16,以标准化抗体浓度,之后用于EB-ELISA中。用H7N1流感病毒免疫的鸡的血清(图10)呈现出 $\geq 85\%$ 的mAb 62结合抑制,而用H1-H6和H8-H13免疫的鸡血清示出最大封闭率10%,低于针对含有H7特异性抗体的样品确立的30%阈值。在用野生型杆状病毒免疫的血清中检测到无抑制。在用4种不同H7毒株单独免疫的所有小鼠血清中也观测到阳性抑制,表明该测定特异于检测H7抗体。H7免疫的所有动物血清,包括鸡、小鼠和豚鼠,在双功能ELISA中均示出阳性封闭,表明该测定对于来自任何物种的血清均有效。这些结果表明在双功能ELISA中的抗体检测可以阳性鉴别含有H7抗体的血清样品,而与其它亚型的血清无任何交叉反应。

[0157] 实施例15:通过双功能ELISA的H7抗体检测的灵敏度

[0158] 在双功能ELISA中H7抗体检测灵敏度主要通过对比病毒中和和HI而确定,使用纯化的mAb 62进行。如表7所示,在双功能ELISA中,40ng的mAb 62足以达到相应于封闭率超过30%的终点,而需要至少160ng的相同mAb 62以中和100TCID₅₀的H7N7(A/Netherlands/219/03)病毒或者抑制血凝反应。在抗体检测中进行另外的双功能ELISA与病毒中和对比,使用H7免疫的小鼠血清进行(表8)。在用变体H7AIV毒株仅一次免疫后的小鼠血清针对H7N7(A/Netherlands/219/03)的中和滴度范围是40-320。在双功能ELISA中检测相同批次的血

清,其中终点滴度范围为100-1000。通过任一检测对于预先免疫的血清样品检测到无阳性活性。对比表明双功能ELISA能检测较低浓度的H7特异性抗体及比病毒中和呈现较高的信号滴度。

[0159] 表7:基于中和mAb的抗体检测、HI和微量中和测定中双功能ELISA的检测限
[0160]

EB-ELISA		微量中和		HI	
mAb 量	抑制率	mAb 量	滴度	mAb 量	滴度
5 μg	92.6%	5 μg	640	5 μg	256
1 μg	64.87%	1.25 μg	160	1.25 μg	64
0.2 μg	48.99%	0.313 μg	40	0.313 μg	16
0.04 μg	31.05%	0.16 μg	20	0.16 μg	8
0.008 μg	12.84%	0.08 μg	<20	0.08 μg	<8

[0161] 每种检测的检测限度以粗体字和斜体字表示。

[0162] 表18:在使用单一H7免疫后合并的小鼠血清的抗体检测中双功能ELISA与病毒中和之间的对比

[0163]

病毒免疫	双功能ELISA 抑制, 1:20 稀释度	双功能 ELISA 滴 度, 30%截断值	病毒中和滴度
H7N3/A/Canada/rv504/04	91.47%	500	160
H7N6/A/quail/Aichi/4/09	61.64%	100	40
H7N7/A/duck/Hokkaido/1/10	92.84%	500	160
H7N7/A/Netherlands/219/03	94.68%	1000	320
Pre-immunization sera	4.14%	<20	<20

[0164] 描述本发明的文本中使用的术语“一(a)”、“一(an)”、“所述”(特别是如下权利要求书中),除非特别指出或者在上下文义中矛盾,均解释为包括单数和复数形式。除非特别指出,术语“包含”、“具有”、“包括”及“含有”解释为开放式术语(即是指包括但不限于)。除非特别指出,本文列举的数值范围仅仅是在这个范围内单独的每个单独数值的速记方法,每个单独的数值如单独列举其一样均包含在本说明书中。例如,如果揭示的范围是10-15,则也揭示了11、12、13和14。除非特别指出或在上下文义明显矛盾,本文所述所有方法均可以任何适当顺序进行。除非特别要求,本发明提供的任何和所有实施例或举例的用于(例如“如”)的应用,是为了更好地例证本发明,无限制本发明范围之意。本说明书中没有用语应被解释为表示任何没有要求保护的元素是实施本发明必需的。

[0165] 应意识到本发明的方法和组合物可以掺入各种实施方案形式中,本文只是描述了其中一小部分。本发明的实施方案在本文描述,包括本发明人已知地进行本发明的最佳模式。本领域技术人员在阅读前文描述之后可显然了解这些实施方案的变化。本发明人期望技术人员适当地应用这些变化,及本发明人希望除了如本文特别描述之外实施本发明。因此,本发明包括在所附权利要求书中列举的主题由适用法律允许的的所有修饰和等价物。此外,除非特别指出或者另外在上下文义中显然矛盾之外,在所有可能变化中的上述元件的任何组合均涵盖在本发明中。

[0166] 参考文献

- [0167] Abbas MA, Spackman E, Fouchier R, Smith D, Ahmed Z, et al. (2011) H7 avian influenza virus vaccines protect chickens against challenge with antigenically diverse isolates. *Vaccine* 29:7424–7429.
- [0168] Brown, E.G. (1990). Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8. *J Virol* 64(9), 4523–33.
- [0169] Chothia C and Lesk AM (1987). “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins.”, *J Mol Biol* 196:901–917.
- [0170] Gambaryan AS, Matrosovich TY, Philipp J, Munster VJ, Fouchier RA, et al. (2012) Receptor-binding profiles of H7 subtype influenza viruses in different host species. *J Virol* 86:4370–4379.
- [0171] He, F., and Kwang, J. (2013). Monoclonal Antibody Targeting Neutralizing Epitope on H5N1 Influenza Virus of Clade 1 and 0 for Specific H5 Quantification. *Influenza Res Treat* 2013, 360675.
- [0172] He, F., Du, Q., Ho, Y., and Kwang, J. (2009). Immunohistochemical detection of Influenza virus infection in formalin-fixed tissues with anti-H5 monoclonal antibody recognizing FFWTILKP. *J Virol Methods* 155(1), 25–33.
- [0173] He, F., Soejoedono, R.D., Murtini, S., Goutama, M., and Kwang, J. (2010). Complementary monoclonal antibody-based dot ELISA for universal detection of H5 avian influenza virus. *BMC Microbiol* 10, 330.
- [0174] Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P (1980). “Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments.” *Cell* 22:197–207.
- [0175] Ho, H.T., Qian, H.L., He, F., Meng, T., Szyporta, M., Prabhu, N., Prabakaran, M., Chan, K.P., and Kwang, J. (2009). Rapid detection of H5N1 subtype influenza viruses by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5- and N1-specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 16(5), 726–32.
- [0176] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al. (1988). “Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*.” *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879–5883.
- [0177] Jadhao SJ, Achenbach J, Swayne DE, Donis R, Cox N, et al. (2008) Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Vaccine* 26:1742–1750.
- [0178] Johnson G and Wu TT (2001). “Kabat Database and its applications: future directions.” *Nucleic Acids Res* 29:205–206.
- [0179] Kabat EA et al. (1991). *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.

- [0180] Kaverin NV,Rudneva IA,Govorkova EA,Timofeeva TA,Shilov AA,et al. (2007).Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies.J Virol 81:12911-12917.
- [0181] Khaw,B.A.,Strauss,H.W.,Carvalho,A.,Locke,E.,Gold,H.K.,Haber,E.(1982). “Technetium-99m labeling of antibodies to cardiac myosin Fab and to human fibrinogen.”J Nucl Med 23:1011-1019.
- [0182] Min JY,Vogel L,Matsuoka Y,Lu B,Swayne D,et al.(2010)A live attenuated H7N7candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice,ferrets,and monkeys.J Virol 84:11950-11960.
- [0183] Prabakaran M,Prabhu N,He F,Hongliang Q,Ho HT,et al.(2009)Combination therapy using chimeric monoclonal antibodies protects mice from lethal H5N1 infection and prevents formation of escape mutants.PLoS One 4:e5672.
- [0184] Prabakaran M,He F,Meng T,Madhan S,Yunrui T,et al.(2010).:Neutralizing epitopes of influenza virus hemagglutinin:target for the development of a universal vaccine against H5N1 lineages.J Virol 84:11822-11830.
- [0185] Prabhu,N.,Prabakaran,M.,Hongliang,Q.,He,F.,Ho,H.T.,Qiang,J.,Goutama,M.,Lim,A.P.,Hanson,B.J.,and Kwang,J.(2009).Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 haemagglutinin against lethal H5N1 influenza.Antivir Ther 14(7),911-21.
- [0186] Rader C,Cheresh DA,Barbas CF 3rd(1998).“A phage display approach for rapid antibody humanization:designed combinatorial V gene libraries.”Proc Natl Acad Sci USA95:8910-8915.
- [0187] Reed,L.J.and Muench,H.(1938).“A simple method of estimating fifty percent endpoints”.The American Journal of Hygiene 27:493-497.
- [0188] Riechmann L,Clark M,Waldmann H,Winter G(1988).“Reshaping human antibodies for therapy.”Nature 332:323-327.
- [0189] Rousseaux J,Rousseaux-Prevost R,Bazin H(1986).“Optimal conditions for the preparation of proteolytic fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses.”Methods Enzymology 121:663-69,Academic Press.

序列表

- <110> 淡马锡生命科学研究院有限公司
- <120> 靶向 H7 流感病毒上中和表位的单克隆抗体
- <130> 2577-226PCT
- <150> US 61/727, 927
- <151> 2012-12-19
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1689
- <212> DNA
- <213> Influenza virus

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).. (1689)

<400> 1

[0001]	atg aac act caa atc ctg gta ttc gct ctg gtg gcg agc att ccg aca Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ser Ile Pro Thr 1 5 10 15	48
	aat gca gac aag atc tgc ctt ggg cat cat gcc gtg tca aac ggg act Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr 20 25 30	96
	aaa gta aac aca tta act gag aga gga gtg gaa gtc gtt aat gca act Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr 35 40 45	144
	gaa acg gtg gaa cga aca aac gtt ccc agg atc tgc tca aaa ggg aaa Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys 50 55 60	192
	agg aca gtt gac ctc ggt caa tgt gga ctt ctg gga aca atc act ggg Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly 65 70 75 80	240
	cca ccc caa tgt gac caa ttc cta gaa ttt teg gcc gac tta att att Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile 85 90 95	288
	gag agg cga gaa gga agt gat gtc tgt tat cct ggg aaa ttc gtg aat Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn 100 105 110	336
	gaa gaa gct ctg agg caa att ctc aga gag tca ggc gga att gac aag Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys	384

	115	120	125	
	gag aca atg gga ttc acc tac agc gga ata aga act aat gga aca acc			432
	Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr			
	130	135	140	
	agt gca tgt agg aga tca gga tct tca ttc tat gca gag atg aaa tgg			480
	Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp			
	145	150	155	160
	ctc ctg tca aac aca gac aat gct gct ttc ccg caa atg act aag tca			528
	Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser			
	165	170	175	
	tac aag aac aca agg aaa gac cca gct ctg ata ata tgg ggg atc cac			576
	Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His			
	180	185	190	
	cat tcc gga tca act aca gaa cag acc aag cta tat ggg agt gga aac			624
	His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn			
	195	200	205	
	aaa ctg ata aca gtt ggg agt tct aat tac caa cag tcc ttt gta ccg			672
	Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro			
	210	215	220	
[0002]	agt cca gga gcg aga cca caa gtg aat ggc caa tct gga aga att gac			720
	Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp			
	225	230	235	240
	ttt cat tgg ctg ata cta aac cct aat gac acg gtc act ttc agt ttc			768
	Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe			
	245	250	255	
	aat ggg gcc ttc ata gct cca gac cgt gca agc ttt ctg aga ggg aag			816
	Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys			
	260	265	270	
	tcc atg gga att cag agt gaa gta cag gtt gat gcc aat tgt gaa gga			864
	Ser Met Gly Ile Gln Ser Glu Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly			
	275	280	285	
	gat tgc tat cat agt gga ggg aca ata ata agt aat ttg ccc ttt cag			912
	Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln			
	290	295	300	
	aac ata aat agc agg gca gta gga aaa tgt ccg aga tat gtt aag caa			960
	Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln			
	305	310	315	320
	gag agt ctg ctg ttg gca aca gga atg aag aat gtt ccc gaa atc cca			1008
	Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro			
	325	330	335	
	aag agg agg agg aga ggc cta ttt ggt gct ata gcg ggt ttc att gaa			1056
	Lys Arg Arg Arg Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu			

	340	345	350	
	aat gga tgg gaa ggt ttg att gat ggg tgg tat ggc ttc agg cat caa			1104
	Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln			
	355	360	365	
	aat gca caa ggg gag gga act gct gca gat tac aaa agc acc caa tca			1152
	Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser			
	370	375	380	
	gca att gat caa ata aca ggg aaa tta aat cgg ctt ata gaa aaa act			1200
	Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr			
	385	390	395	400
	aac caa cag ttt gag tta ata gac aac gaa ttc act gag gtt gaa agg			1248
	Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Arg			
	405	410	415	
	caa att ggc aat gtg ata aac tgg acc aga gat tcc atg aca gaa gtg			1296
	Gln Ile Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val			
	420	425	430	
	tgg tcc tat aac gct gaa ctc tta gta gca atg gag aat cag cac aca			1344
	Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr			
	435	440	445	
[0003]	att gat ctg gcc gac tca gaa atg aac aaa ctg tac gaa cga gtg aag			1392
	Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys			
	450	455	460	
	aga caa ctg aga gag aat gcc gaa gaa gat ggc act ggt tgc ttc gaa			1440
	Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu			
	465	470	475	480
	ata ttt cac aag tgt gat gac gac tgc atg gcc agt att aga aac aac			1488
	Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn			
	485	490	495	
	acc tat gat cac agc aag tac agg gaa gaa gca ata caa aat aga ata			1536
	Thr Tyr Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Gln Asn Arg Ile			
	500	505	510	
	cag att gac cca gtc aaa cta agc agc ggc tac aaa gat gtg ata ctt			1584
	Gln Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu			
	515	520	525	
	tgg ttt age ttc ggg gca tca tgt ttc ata ctt ctg gcc att gca atg			1632
	Trp Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met			
	530	535	540	
	ggc ctt gtc ttc ata tgt gtg aag aat gga aac atg cgg tgc act att			1680
	Gly Leu Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile			
	545	550	555	560
	tgt ata taa			1689
	Cys Ile			

<210> 2
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> Influenza virus

 <400> 2

 Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ser Ile Pro Thr
 1 5 10 15

 Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
 20 25 30

 Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
 35 40 45

 Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
 50 55 60

 Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
 65 70 75 80

 [0004]
 Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
 85 90 95

 Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
 100 105 110

 Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
 115 120 125

 Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr
 130 135 140

 Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
 145 150 155 160

 Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
 165 170 175

 Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His
 180 185 190

His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
195 200 205

Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro
210 215 220

Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
225 230 235 240

Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe
245 250 255

Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
260 265 270

Ser Met Gly Ile Gln Ser Glu Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
275 280 285

Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
290 295 300

[0005]

Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
305 310 315 320

Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
325 330 335

Lys Arg Arg Arg Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
340 345 350

Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln
355 360 365

Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser
370 375 380

Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr
385 390 395 400

Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Arg
405 410 415

Gln Ile Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val
420 425 430

Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr
435 440 445

Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys
450 455 460

Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu
465 470 475 480

Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn
485 490 495

[0006]

Thr Tyr Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Gln Asn Arg Ile
500 505 510

Gln Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu
515 520 525

Trp Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met
530 535 540

Gly Leu Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile
545 550 555 560

Cys Ile

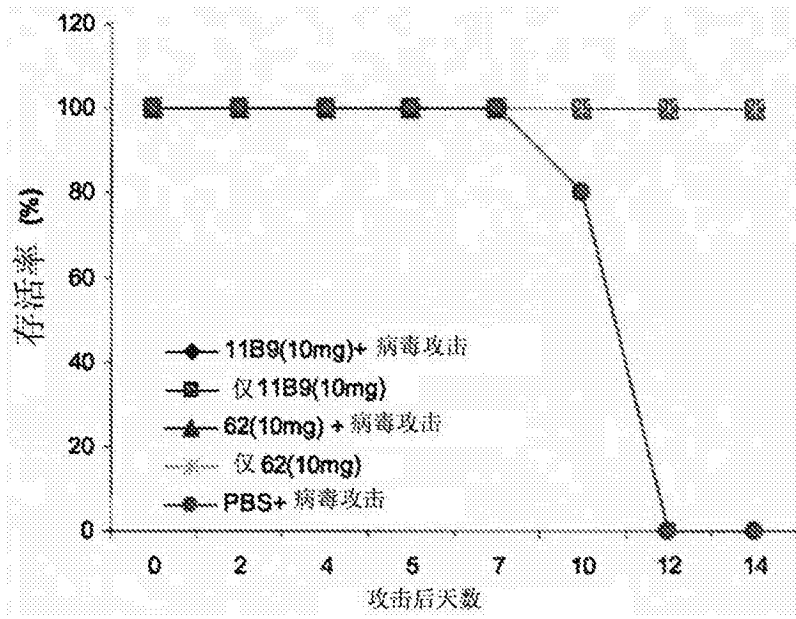


图1A

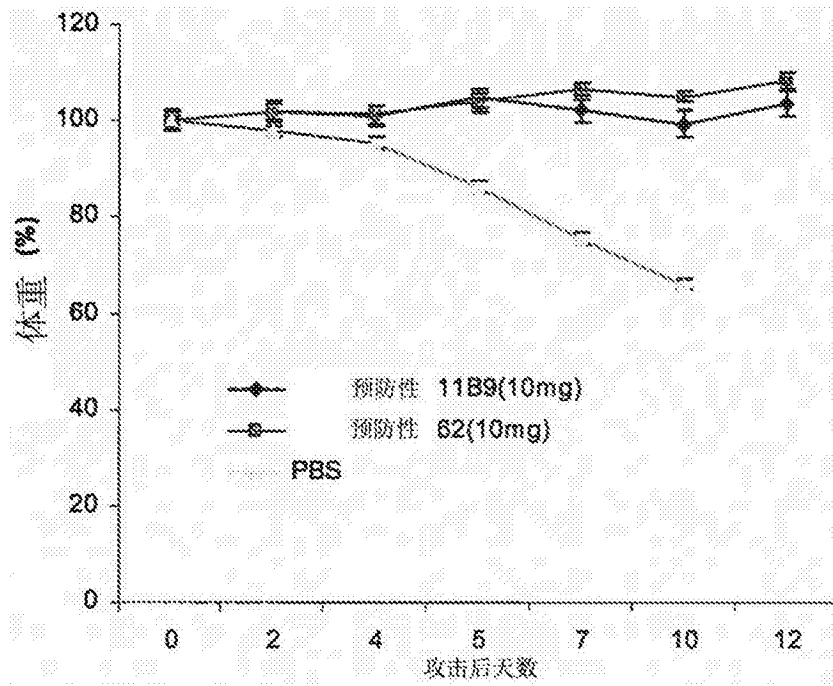


图1B

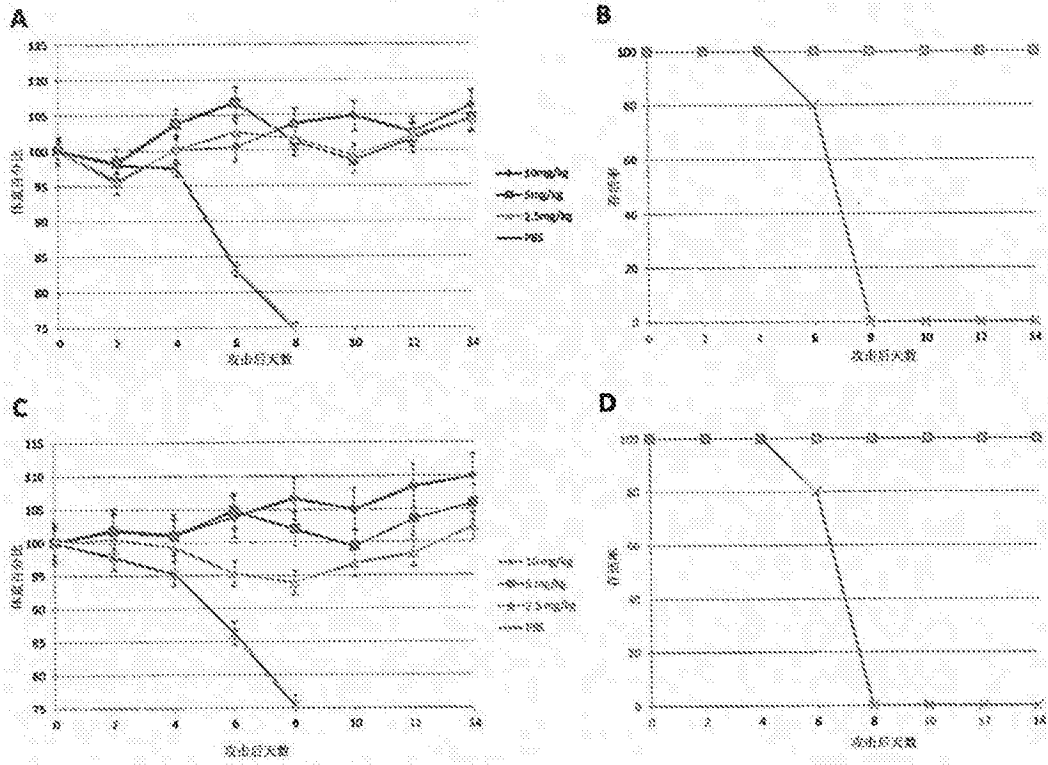


图2

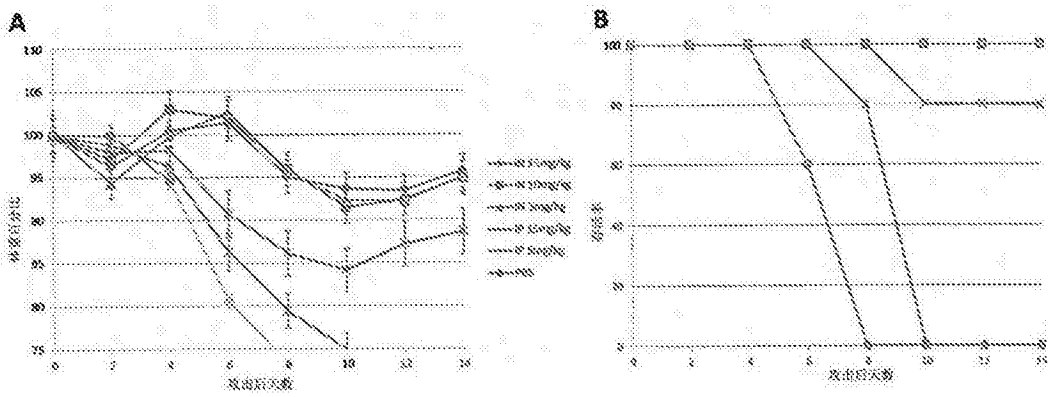


图3

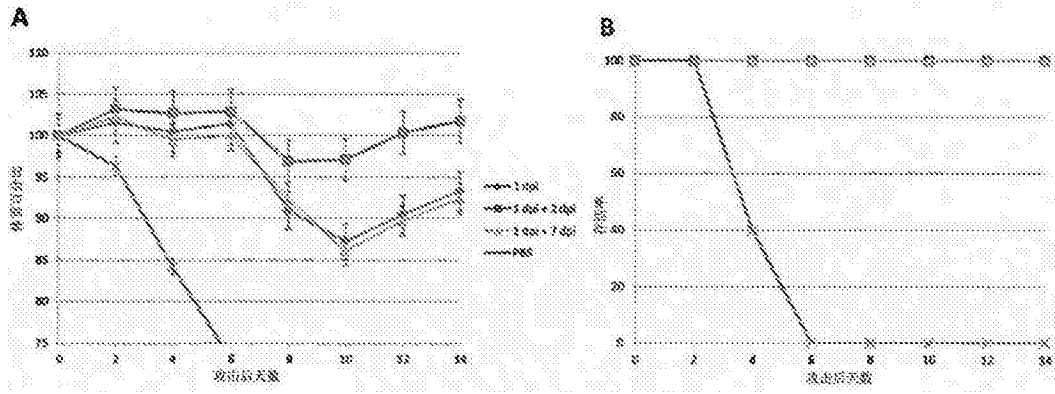


图4

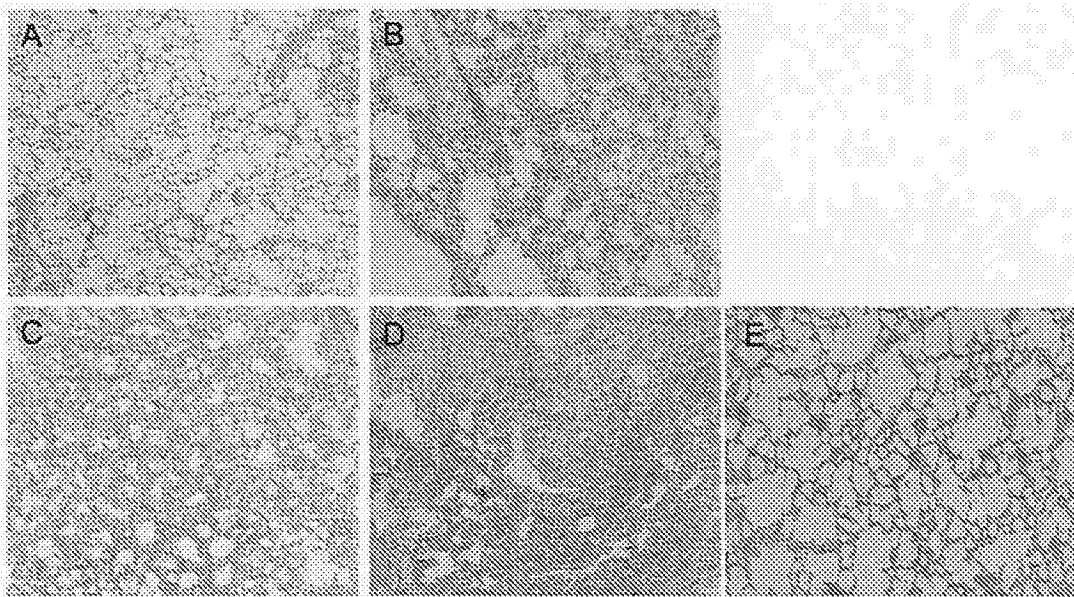


图5

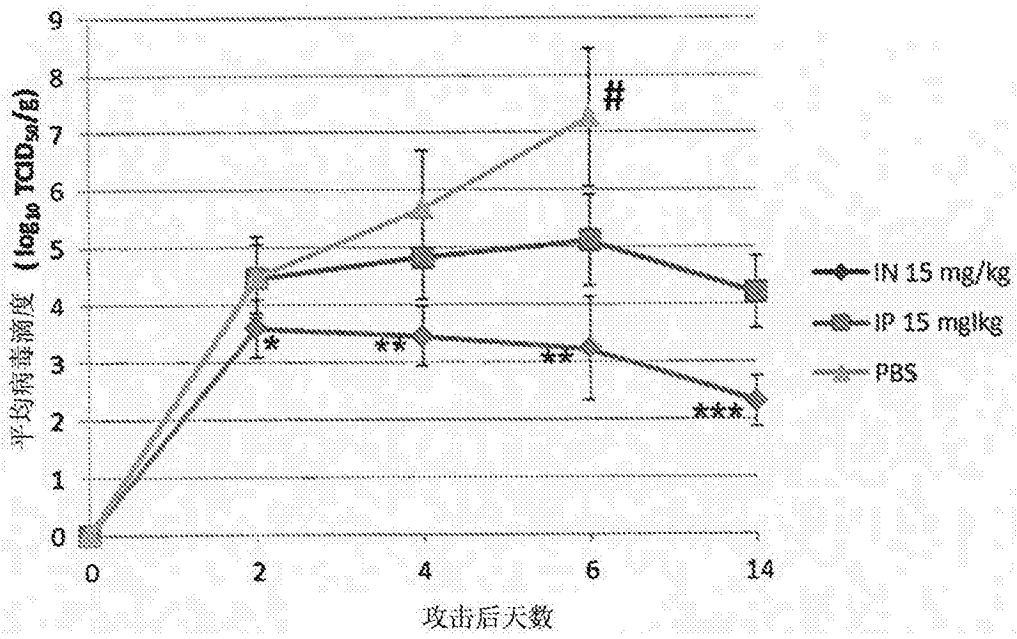


图6

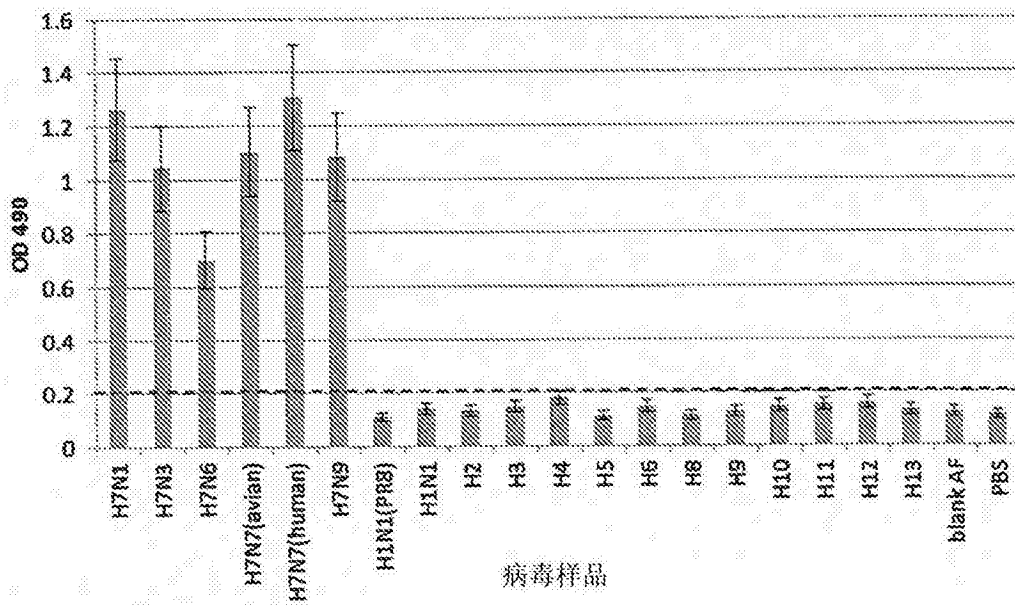


图8

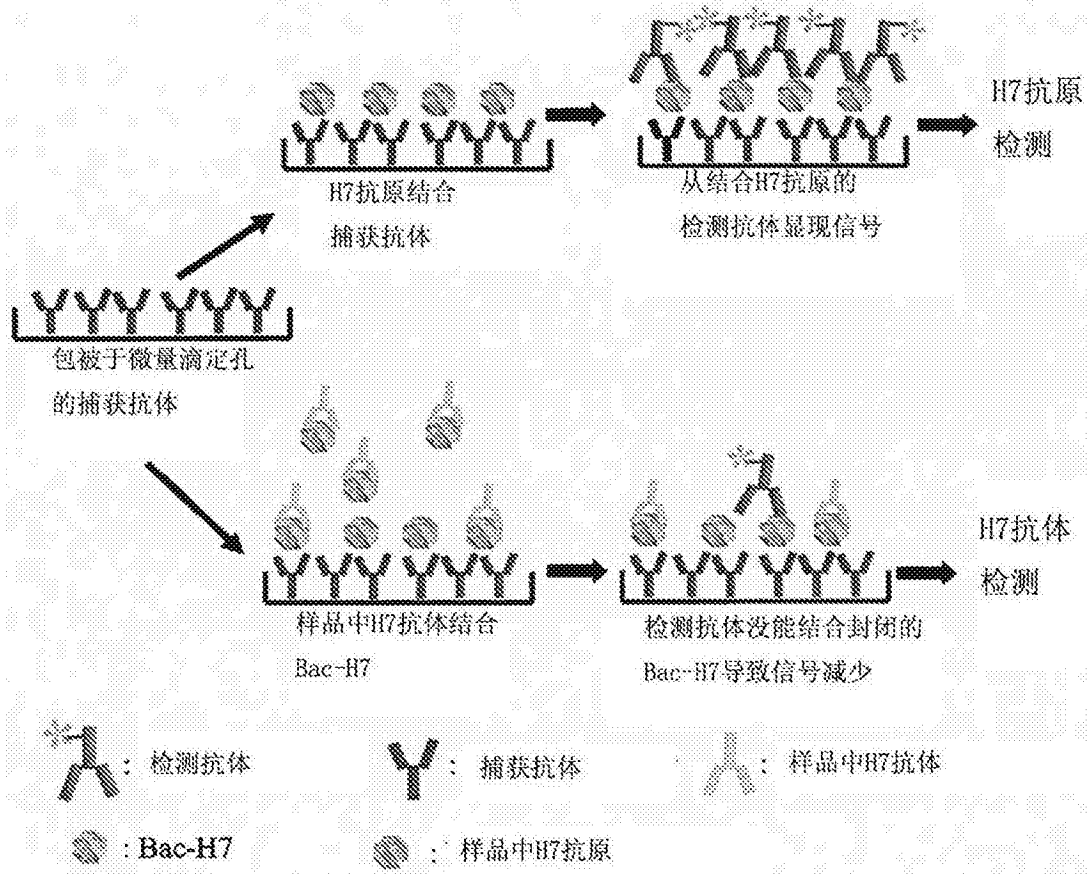


图7

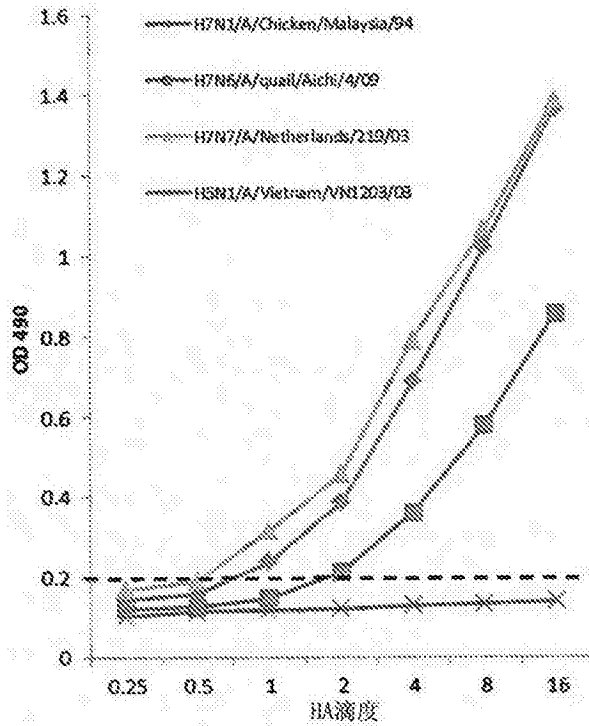


图9

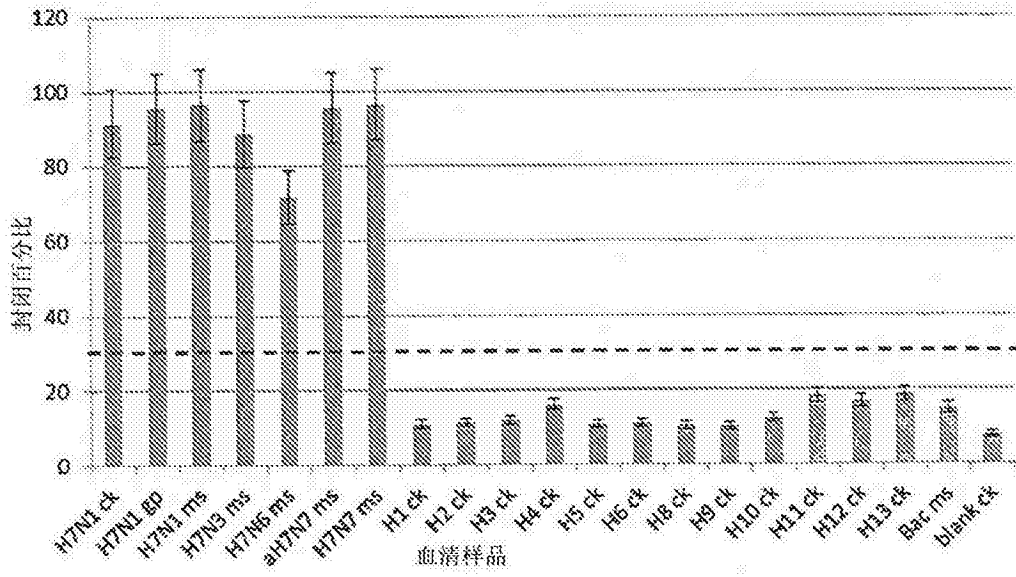


图10

专利名称(译)	靶向H7流感病毒上中和表位的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN105555802A	公开(公告)日	2016-05-04
申请号	CN201380070832.4	申请日	2013-08-23
[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	H S J光 F何 RK苏巴尚达拉沃塞		
发明人	H-S·J·光 F·何 R·K·苏巴尚达拉沃塞		
IPC分类号	C07K16/10 A61K39/42 A61P31/16 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/544 A61K2039/545 A61P31/16 C07K16/1018 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 G01N33/56983 G01N2333/11 C07K2317/21		
代理人(译)	林晓红		
优先权	61/727927 2012-11-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及鼠单克隆抗体(mAb)11B9和mAb ? 62及其活性片段, 其各自靶向甲型流感H7血凝素的主要中和表位。本发明还涉及使用鼠mAb11B9、mAb ? 62或其片段预防和治疗H7流感的方法和组合物。本发明进一步涉及确定、鉴别和/定量(a)样品或疫苗中甲型流感血凝素或者(b)针对甲型流感血凝素的抗体的方法和试剂盒。

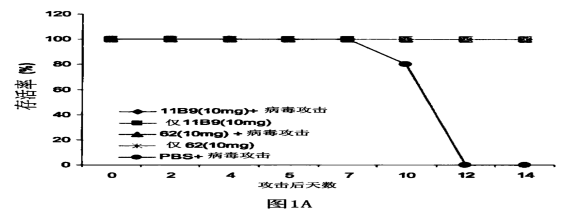


图1A

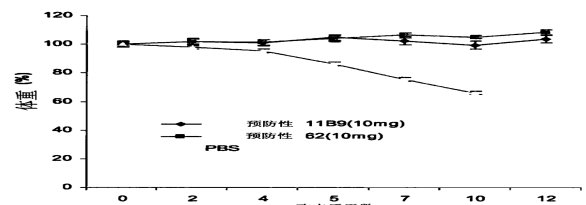


图1B