

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102292350 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 200880132725. 9

G01N 33/563 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 12. 24

G01N 33/577 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日
2011. 07. 26

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

A61K 39/145 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SG2008/000499 2008. 12. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/074656 EN 2010. 07. 01

(83) 生物保藏信息

PTA-8759 2007. 11. 06

(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 P·木根 N·P·帕杜比德里

S·韦卢马尼 H·S·J·光

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页

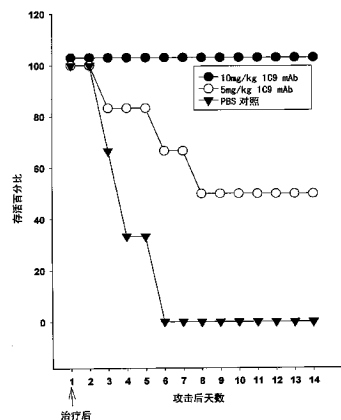
序列表 1 页 附图 14 页

(54) 发明名称

对来自甲型流感病毒血凝素的融合肽特异的单克隆抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及用于动物和人类中甲型流感病毒感染的诊断, 监测, 预防和治疗的方法和产物。更具体的, 本发明涉及用于甲型流感病毒的检测, 预防 and 治疗的抗体和相关结合蛋白。本发明的单克隆抗体和相关结合蛋白可用于治疗禽流感病毒(AIV) 的高致病性 H5 亚型。



1. 一种与甲型流感病毒的糖蛋白的表位特异性结合的结合蛋白,其基本上具有单克隆抗体 1C9 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 1C9 产生的单克隆抗体 1C9,所述杂交瘤 1C9 保藏于美国典型培养物保藏中心,保藏号为 PTA-8759。
5. 一种检测生物学样本中甲型流感病毒的方法,包括将所述样本与特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的第一结合蛋白接触,所述第一结合蛋白基本上具有单克隆抗体 1C9 的免疫学结合特性。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述第一结合蛋白是单克隆抗体,单链抗体,抗体片段,嵌合抗体或人源化抗体。
7. 权利要求 5 的方法,其中所述第一结合蛋白是单克隆抗体。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述单克隆抗体是由杂交瘤 1C9 产生的抗体 1C9,所述杂交瘤 1C9 保藏于美国典型培养物保藏中心,保藏号为 PTA-8759。
9. 权利要求 5 的方法,还包括将所述样本与特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的第二结合蛋白接触,其中所述第一结合蛋白是捕获结合蛋白,所述第二结合蛋白是含有或缀合于可检测成分的检测结合蛋白。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述第一和第二结合蛋白中的至少一个是单克隆抗体。
11. 权利要求 9 的方法,其中所述第一和第二结合蛋白是单克隆抗体。
12. 权利要求 9 的方法,其中所述第一结合蛋白固定在固体表面。
13. 权利要求 9 的方法,其中所述第二结合蛋白含有放射性原子,缀合于荧光分子,或缀合于酶。
14. 一种检测生物学样本中甲型流感病毒的试剂盒,其包括特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的第一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,所述第一结合蛋白基本上具有单克隆抗体 1C9 的免疫学结合特性。
15. 权利要求 14 的试剂盒,其包括特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的第二结合蛋白,其中所述第一结合蛋白是捕获结合蛋白,所述第二结合蛋白是含有或缀合于可检测成分的检测结合蛋白。
16. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述结合蛋白中的至少一种是单克隆抗体。
17. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述第一和第二结合蛋白是单克隆抗体。
18. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述第一结合蛋白固定在固体表面。
19. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述第二结合蛋白含有放射性原子,缀合于荧光分子,或缀合于酶。
20. 一种治疗感染甲型流感病毒的对象的方法,包括给所述对象施用治疗有效量的特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的结合蛋白,其基本上具有单克隆抗体 1C9 的免疫学结合特性。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述结合蛋白是重组单克隆抗体,单链抗体,抗体片段,嵌合抗体或人源化抗体。

22. 权利要求 20 的方法,其中所述结合蛋白是包括 mAb 1C9 可变区的重组单克隆抗体。
23. 权利要求 20 的方法,还包括施用至少一种其他抗体。
24. 权利要求 20 的方法,还包括施用至少一种中和逃逸突变体抗体。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述甲型流感病毒是禽流感病毒的 H5 亚型。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述禽流感病毒是 H5N1 亚型。
27. 一种保护对象免受甲型流感病毒感染的方法,包括给所述对象施用一定量的特异性结合甲型流感病毒糖蛋白的表位的结合蛋白,所述结合蛋白基本上具有单克隆抗体 1C9 的免疫学结合特性,所述量有效保护对象免受甲型流感病毒感染。
28. 权利要求 25 的方法,其中所述结合蛋白是重组单克隆抗体,单链抗体,抗体片段,嵌合抗体或人源化抗体。
29. 权利要求 25 的方法,其中所述结合蛋白是包括 mAb 1C9 可变区的重组单克隆抗体。
30. 权利要求 25 的方法,其中所述甲型流感病毒是禽流感病毒的 H5 亚型。
31. 权利要求 30 的方法,其中所述禽流感病毒是 H5N1 亚型。

对来自甲型流感病毒血凝素的融合肽特异的单克隆抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于动物和人类中甲型流感病毒感染的诊断, 监测, 预防和治疗的方法和产品。更具体地, 本发明涉及用于甲型流感病毒的检测, 预防 and 治疗的抗体和相关结合蛋白。本发明的单克隆抗体和相关结合蛋白可用于治疗禽流感病毒 (AIV) 的高致病性 H5 亚型。

[0002] 发明背景

[0003] 高致病性禽流感 (HPAI) H5 株是当前在跨越亚洲, 欧洲和非洲的家禽种群中造成发病和死亡的主要原因, 已经造成 385 例确认的人感染, 死亡率为 63.11% (1, 2)¹。抗流行性 H5N1 株的预防和治疗措施引起大量兴趣, 全世界范围都在努力来预防另一次大流行的爆发。甲型流感病毒提出一种挑战, 因为它通过抗原漂移 (突变) 和抗原转变 (替换其组分) 改变其对免疫系统的显现 (3)。现有抗流感的抗击策略包括接种和抗病毒药物治疗, 其中接种是优选的选项。每年的流感疫苗目的在于刺激抗血凝素中和抗体的产生, 其提供针对同源株的预防。现有的疫苗经历不同程度的成功 (4)。这些策略针对高度可变的 HA 决定簇的事实和预测带来下次流行性威胁的主要 HA 类型给现有的病毒策略带来限制。在缺乏有效疫苗的情况下, 治疗是控制流感感染的主要依靠。因此, 在由 H5 株引起的大流行病情况下, 抗流感的治疗措施将起重要作用。目前得到许可的抗病毒药物包括 M2 离子通道抑制剂 (Rimantidine 和 Amantidine) 和神经氨酸酶抑制剂 (Oseltamivir 和 Zanamivir)。已知 H5N1 病毒对 M2 离子通道抑制剂有抗性 (5, 6)。正在分离 H5N1 病毒的更新毒株, 它们甚至抗神经氨酸酶抑制剂 (Oseltamivir 和 Zanamivir) (3, 7)。神经氨酸酶抑制剂还可能需高剂量和延长的治疗 (3, 8)。因此, 准许流感治疗的交替性策略。最近, 使用单克隆抗体的被动免疫疗法正被考虑作为有效的治疗选择 (9)。

[0004] 急性呼吸道疾病爆发期间的检验可以确定流感是否是病因。在流感季节期间, 表现与流感一致的呼吸道疾病的所选患者的检验有助于确定流感是否存在于特定患者群中, 并有助于卫生保健提供者确定如何利用他们的临床判断来诊断和治疗呼吸道疾病。快速的流感检验有助于确定是否使用抗病毒药物。一些检验, 诸如病毒培养, 逆转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和血清学检验是常规方法, 但不能以及时的方式提供结果来帮助临床医生。目前, 大部分当前使用的快速诊断检验是基于单克隆抗体的免疫测定。免疫荧光 (荧光抗体染色) 是快速流感诊断检验的可选方式, 其可用于许多医院实验室, 通常在 2-4 小时内产生检验结果。最主要的是, 特异性单克隆抗体产生对于大部分当前使用的快速、灵敏和成本较低的诊断方法非常重要。

[0005] 血凝素 (HA) 是流感病毒变异最大的基因, 并且是用于产生抗体的最有希望的靶。它被合成为前体多肽 HA0, 其被翻译后切割为通过二硫键连接的两条多肽 HA1 和 HA2。已知抗 HA1 的单克隆抗体中和病毒的感染性, 从而提供抗感染的良好保护 (10)。但是, 它们不能有效的抗异源或突变株, 它们由于抗原转变而不断出现。而且, 存在产生逃逸突变体的风险, 这可能引起每年的流行病和偶尔的大流行病。

[0006] 在所有甲型流感亚型中,HA2N 端融合肽是 HA 中最高度保守的区域 (11)。这种 HA2 多肽负责病毒进入细胞期间病毒与宿主胞内体膜的融合 (12)。HA2N 端融合肽的一部分在前体分子中暴露为表面环 (13, 14)。因为大部分 HA 亚型被胞外酶切割,这种表面环能够在受感染宿主细胞的质膜中表达的 HA0 上接近抗体 (15)。

[0007] 具有广泛识别并且能够治疗甲型流感病毒特别是 H5 病毒的可用单克隆抗体将是非常有用的。

[0008] 发明目的

[0009] 本发明的一个目的是提供单克隆抗体 (mAb) 和相关结合蛋白,它们结合甲型流感病毒,尤其结合甲型流感病毒的 HA2 多肽。HA2 多肽在甲流亚型中是高度保守的。因此,特异性识别 HA2 多肽的 mAb 将识别所有甲型流感亚型。这些单克隆抗体的特异性为有效的预防剂和治疗剂提供基础。

[0010] 发明概述

[0011] 根据本发明,提供对甲型流感血凝素糖蛋白的构象表位特异的单克隆抗体。HA2 多肽代表所有甲型流感株中血凝素的高度保守区域。单克隆抗体与抗原性保守的 HA2 融合肽特异性结合,并有效提供抗甲型流感感染的跨分化枝 (cross-clade) 保护。

[0012] 针对保守表位的 mAb 可用于检测还未进行预治疗的组织中的病毒,所述组织诸如冷冻组织样本以及其他生物学组织和液体。具体来说,称为 1C9 的 mAb 靶向甲型流感病毒 (例如 AIV 亚型) HA2 上的表位。

[0013] 因此,本发明包括一种结合蛋白,其基本上具有与 mAb 1C9 一样的对构象型 HA2 表位的免疫学结合特性。

[0014] 在另一个方面,本发明包括一种检测样本中甲型流感病毒的方法,其包括检测 HA2 多肽与基本上具有 mAb 1C9 的免疫学结合特性的 mAb 或结合蛋白的结合。具体来说,本发明涉及利用这类结合蛋白的免疫荧光测定,免疫组化测定和其他方法。

[0015] 在另一个方面,本发明涉及用于检测甲型流感病毒的试剂盒,其包括基本上具有 mAb 1C9 的免疫学结合特性的结合蛋白。

[0016] 本发明还涉及治疗感染甲型流感病毒株的对象的方法,其包括给这类对象施用有效量的一或多种基本上具有 mAb 1C9 的免疫学结合特性的重组单克隆抗体或结合蛋白或其片段。

[0017] 本发明还涉及提供针对 HA2 糖蛋白融合肽的抗感染的跨分化枝保护的方法,其包括给这类对象施用有效量的一或多种基本上具有 mAb 1C9 的免疫学结合特性的重组单克隆抗体或结合蛋白或其片段。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1a-1c 显示单克隆抗体 1C9 的表位作图。

[0020] 图 1a 表示编码 HA2 的片段 1 到 14 的基因片段。进行单克隆抗体的 Western 印迹分析以对它们的相应表位作图 (数字表示 HA0 上的氨基酸编号)。

[0021] 图 1b. 14 个片段的 Western 印迹分析:使用 mAb1C9 作为一抗。第 1 道为蛋白分子量标记。第 2 和 18 道显示重组 HA2gp,第 3 道显示来自全病毒的 HA2,第 4 到 17 到显示 14 个片段。只有片段 1 到 6 显示阳性结果,而片段 7 到 14 显示阴性结果。样品在 3 种不同的凝胶上电泳,但采用相同处理。

[0022] 图 1c. 点突变体的 Western 印迹分析结果也表明是组氨酸融合肽。使用 ECL 试剂给膜显色。进行分析以确定 mAb 1C9 针对的表位的氨基酸序列。第 1 和 16 道为蛋白分子量标记。第 2 和 17 道显示野生型片段 1。在第 3 到 15, 18 和 19 道上样过表达的点突变体。只在野生型片段 1, 点突变体 I340A (12), E341A (13), G342A (14), G343A (15), W344A (18) 和 Q345A (19) 的泳道中观察到阳性结果, 表明对应氨基酸在结合 HA2gp 中作用的缺失。在点突变体 G331A (3), L332A (4), F333A (5), G334A (6), A335A (7), I336A (8), A337G (9), G338A (10) 和 F339A (11) 的泳道中观察到阴性结果, 表明这些氨基酸在形成 mAb 1C9 的表位中的作用。相应点突变体泳道编号在括号中标明。样品在两种不同的凝胶上电泳, 但采用相同处理。

[0023] 图 2. 表达 HA0 前体的 CHO 细胞的细胞与细胞融合的抑制。(a) 不接受胰蛋白酶处理的细胞, 接着 pH5 处理, (b) 胰蛋白酶处理后和接着 pH5 处理的细胞, (c) 10 μ g/ml mAb 1C9 的存在条件下, 胰蛋白酶处理后和接着 pH5 处理的细胞, (d) 50 μ g/ml mAb 1C9 的存在条件下, (e) 100 μ g/ml mAb 1C9 的存在条件下, (f) 100 μ g/ml 非特异性 mAb 3H5 的存在条件下。

[0024] 图 3. 在攻击后 5 天, 感染分化枝 2. 1H5N1 病毒的小鼠的苏木素和曙红染色的肺切片的显微照片。a) 未感染小鼠中观察到的正常形态, b) 感染和未治疗的小鼠, c) 攻击后 24 小时用 5mg/kg 1C9 治疗的感染小鼠, d) 攻击后 24 小时用 10mg/kg 1C9 治疗的感染小鼠, e) 病毒攻击前 24 小时, 用 5mg/kg 1C9 处理的感染小鼠, f) 病毒攻击前 24 小时, 用 10mg/kg 1C9 处理的感染小鼠。

[0025] 图 4a. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/Vietnam/1203/04- 分化枝 1.0) 病毒攻击后 1 天后, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 腹膜内治疗。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活。结果表示为存活百分比。

[0026] 图 4b 和 4c. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/TLL013/06- 分化枝 2.1) 病毒攻击后 1 天后, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9 mAb 腹膜内治疗。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活 (图 4b) 和体重减轻 (图 4c)。结果分别表示为存活百分比和体重百分比 (在试验开始时) (* 代表组中没有任何动物存活)。

[0027] 图 4d. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/Vietnam/1203/04- 分化枝 1.0) 病毒攻击后 3 天后, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 腹膜内治疗。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活。结果表示为存活百分比。

[0028] 图 4e 和 4f. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/TLL013/06- 分化枝 2.1) 病毒攻击后 3 天后, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 腹膜内治疗。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活 (图 4e) 和体重减轻 (图 4f)。结果分别表示为存活百分比和体重百分比 (在试验开始时) (* 代表组中没有任何动物存活)。

[0029] 图 5a. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。在用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/Vietnam/1203/04- 分化枝 1.0) 病毒攻击前 1 天, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 腹膜内预处理。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活。结果表示为

存活百分比。

[0030] 图 5b 和 5c. 保护小鼠免受致死性 H5N1 病毒攻击。在用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/TLL013/06-分化枝 2.1) 病毒攻击前 1 天, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 预处理。在整个 14 天观察期监测小鼠的存活 (图 5b) 和体重减轻 (图 5c)。结果分别表示为存活百分比和体重百分比 (在试验开始时) (* 代表组中没有任何动物存活)。

[0031] 图 6a 显示在用病毒攻击的预处理的小鼠和小鼠的肺中通过 qPCR 的病毒载荷测量。在用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/TLL013/06-分化枝 2.1) 病毒攻击前 1 天, 每组小鼠用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 预处理。在攻击后 2, 4 和 10 天测量受感染动物的肺中的病毒载荷。结果表示为 $\log(\text{拷贝数})/400\text{ng RNA}$ 的平均值 \pm S. D. (# 代表组中没有任何动物存活, 和 & 代表检测不到的病毒数目; *** $p < 0.01$)。

[0032] 图 6b 显示在受感染动物 (用病毒攻击, 随后接受治疗) 的肺中通过 qPCR 的病毒载荷测量。每组小鼠用小鼠适应的印度尼西亚 HPAI H5N1 (A/TLL013/06-分化枝 2.1) 病毒进行攻击, 并在攻击后 1 天用 10mg/kg, 5mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 1C9mAb 治疗。在攻击后 2, 4 和 10 天测量受感染动物的肺中的病毒载荷。结果表示为 $\log(\text{拷贝数})/400\text{ng RNA}$ 的平均值 \pm S. D. (# 代表组中没有任何动物存活, & 代表检测不到的病毒数目; *** $p < 0.01$)。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明涉及 mAb 和相关抗原结合蛋白, 它们特异性结合甲型流感病毒的 HA2N 端融合肽。具体来说, mAb 或相关抗原结合蛋白具有由杂交瘤 1C9 产生的 mAb 1C9 的免疫学结合特性, 所述杂交瘤 1C9 于 2007 年 11 月 6 日按照布达佩斯条约保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), VA, USA, 其保藏号为 PTA-8759。本发明还包含这种杂交瘤, 其提供本发明 mAb 和结合蛋白的连续来源。本发明还涉及检测和诊断甲型流感感染的方法和包括本发明 mAb 或结合蛋白的测定试剂盒。

[0035] 本发明还涉及治疗感染甲型流感病毒的对象的方法, 通过施用有效量的包括本发明抗体或相关结合蛋白的抗体片段或重组抗体。在一个实施方案中, 对象感染 H5AIV。在可能的流感大流行病来临时, 也可以给对象本发明的抗体作为预防措施。在这种情况下, 将施用的抗体有效量是用于治疗甲型流感病毒感染的量的大约一半。

[0036] 本文使用各种术语, 其具有下列含义:

[0037] 术语 mAb 或相关结合蛋白的“免疫学结合特性”(其全部语法形式) 是指 mAb 或结合蛋白对其抗原的特异性, 亲和力和交叉反应性。

[0038] 术语“结合蛋白”是指一种蛋白, 包括如下所述的那些, 包括本发明 mAb 或具有本发明 mAb 的免疫学结合特性的 mAb 的抗原结合位点。

[0039] 本发明有利地提供制备具有 mAb 1C9 的结合特性的单克隆抗体的方法, 通过用 H5N1 病毒 (A/鹅/广东/97) 免疫动物。任意这类抗原可以用做免疫原来产生具有所需免疫学结合特性的抗体。这类抗体包括但不限于包括 mAb 1C9 的抗原结合序列的单克隆抗体, 嵌合抗体, 单链抗体, Fab 片段和蛋白质。

[0040] 本发明的 mAb 可以通过任意技术产生, 它们通过培养连续细胞系来产生抗体分子。这类方法包括但不限于 1975 年 Kohler 和 Milstein 最早开发的杂交瘤技术 (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) 和产生人单克隆抗体的 EBV- 杂交瘤技术 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。可以使用人抗体, 人抗体可以通过使用人杂交瘤 (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80:2026-2030) 或用 EBV 病毒体外转化人 B 细胞 (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96) 来获得。此外, 可以使用开发用于产生“嵌合抗体”或“人源化抗体”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) 通过引入来自本发明鼠抗体分子 (例如 mAb 1C9) 的序列以及来自具有合适生物学活性的人抗体分子的基因。嵌合抗体是含人 Fc 部分和鼠 (或其他非人) Fv 部分的那些抗体。人源化抗体是其中鼠 (或其他非人) 互补决定区 (CDR) 掺入人抗体中的那些抗体。嵌合和人源化抗体都是单克隆的。这类人或人源化嵌合抗体优选用于人类疾病或病症的体内诊断或治疗。

[0041] 根据本发明, 针对单链抗体产生描述的技术 (美国专利 4, 946, 778) 适合于提供本发明的单链抗体。本发明的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), 能够快速和简便鉴别具有所需的本发明抗体特异性的单克隆 Fab 片段或其衍生物或类似物。

[0042] 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, 这类片段包括但不限于 $F(ab =)_2$ 片段, 其可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生; 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。这类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。

[0043] 在抗体的产生中, 筛选需要的抗体可以利用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), “夹心”免疫测定, 免疫放射测定, 凝胶扩散沉淀素反应, 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), Western 印迹, 沉淀反应, 凝集测定 (例如凝胶凝集测定, 血凝测定), 免疫荧光测定和免疫电泳测定等等。在一个实施方案中, 通过检测一抗上的标记来检测抗体结合。在另一个实施方案中, 通过检测二抗或其他试剂与一抗的结合来检测一抗。在另一个实施方案中, 所述二抗是被标记的。在免疫测定中检测结合的方式是本领域已知的, 并且在本发明范围内。

[0044] 前述抗体可用于本领域已知的有关检测或定位甲型流感病毒的方法, 例如 Western 印迹, ELISA, 放射免疫测定, 免疫荧光测定, 免疫组化测定等等。本文公开的技术可用于定性和定量测定甲型流感病毒的 HA2 肽以及诊断和监测感染甲型流感病毒的动物或人。

[0045] 本发明还包括用于定性和 / 或定量测定甲型流感病毒 HA2 肽的测定法和检验试剂盒。这类测定系统和检测试剂盒包括标记组分, 例如通过用放射性原子, 荧光基团或酶标记, 将标记偶联到本发明的 mAb 或相关结合蛋白或其结合配偶体来制备。这类测定法或检验试剂盒可进一步包括免疫测定技术领域的技术人员公知的试剂, 稀释剂和使用说明书。

[0046] 在本发明的一些实施方案中, 这类试剂盒至少包含本发明的 mAb 或相关结合蛋白, 用于检测所述 mAb 或相关结合蛋白与生物样品中 AIV 的免疫特异性结合的工具, 以及依赖于所选方法例如“竞争性”、“夹心”、“DASP”等的使用说明书。试剂盒还可以包括阳性和

阴性对照。它们可以被配置用于自动分析仪或自动免疫组化载片染色装置。

[0047] 本发明的测定试剂盒还可以包括二抗或结合蛋白,它们被标记或提供为附着于固相支持物(或附着至固相支持物)。这类抗体或结合蛋白可以是例如结合甲型流感病毒尤其是 AIV 的。这类二抗或结合蛋白可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0048] 可以用甲型流感病毒 HA 蛋白或其片段免疫动物来制备针对甲型流感血凝素蛋白的 HA2 肽的单克隆抗体。优选的方法包括扩增 H5N1HA0 和 HA2 基因,随后表达该基因,回收及纯化 H5N1 重组蛋白,并且使用纯化的蛋白作为免疫原。例如,H5N1 AIV 通过可利用的病毒株接种鸡胚而增殖,随后分离所述病毒 RNA。通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增 HA2 基因,然后将其克隆入杆状病毒载体,用于在昆虫细胞中表达 H5N1 蛋白。然后由此产生的蛋白可用于免疫小鼠或其他合适物种以产生杂交瘤。

[0049] 检测流感病毒的其他免疫学方法包括例如斑点印迹和原位杂交形式。

[0050] 作为诊断工具,本发明的甲型流感病毒 mAb 比其他现有方法具有优势。本发明的单克隆抗体可以识别所有或基本上所有包括高感染性 H5AIV 的甲型流感病毒。此外,这种 mAb 为检测包括 H5AIV 的甲型流感病毒提供了安全和便利的诊断方法。

[0051] 在本发明的另一个实施方案中,可以施用本发明的抗体和相关结合蛋白来治疗患有甲型流感感染的对象,例如来自禽流感病毒(诸如 H5 亚型,尤其是 AIV 的 H5N1 亚型)的感染。在流感大流行病或可能发生大流行病的情况下,还可以给对象施用本发明的抗体和相关结合蛋白作为预防措施。所述抗体和相关结合蛋白可以采用单剂量施用或重复施用,任选采用缓释形式。施用可以采用使得抗体能够到达接受治疗的对象体内作用部位的任何方式实现,例如静脉内,肌内,皮内,口服或鼻内方式。通常,抗体在药学上可接受的稀释剂或载体中施用,诸如无菌水溶液,并且组分还可包括一或多种稳定剂,佐剂,增溶剂,缓冲剂等等。根据对象的个体需要,考虑到以下因素:对象年龄,体重,整体健康状况,他或她症状的性质和程度,以及给予治疗的频率,在治疗时可以确定和调整施用的正确方法,组分和具体剂量。通常,当施用抗体来治疗患有甲型流感感染的患者时,施用抗体的剂量在约 0.1mg/kg 到约 10mg/kg 体重的范围内。通常,当作为预防措施施用时,剂量降低约一半,即在约 0.05mg/kg 到约 5mg/kg 体重的范围内。

[0052] 可以施用本发明的单一重组抗体或结合蛋白用于治疗目的或与一或多种抗体联合施用。具体来说,本发明的抗体可以与抗 HA1 蛋白的中和抗体组合。如果已经制备出针对一代或更多代中和逃逸突变体的抗体,这类抗体和如上所述的 1C9 抗体可以作为治疗抗体混合物施用。

[0053] 提供下列实施例以说明实施本发明的优选方式。本发明不限于实施例的细节,但与所附权利要求的全部范围相称。

[0054] 实施例 1

[0055] 杂交瘤的产生

[0056] CHO-K1 细胞和 MDCK 细胞获自美国典型培养物保藏中心。它们分别在 Ham' s F12-K 培养基和 Dulbecco' s 最低必需培养基中培养,两种培养基均添加 10% 胎牛血清(FBS),100mg/ml 链霉素和 100 单位青霉素,并维持在 37°C,5% CO₂。使用 β-丙内酯灭活禽流感病毒 H5N1(A/鹅/广东/97),将其用于 RNA 提取以扩增 HA0 基因。人 HPAI H5N1 病毒 A/Indonesia/TLL013/06 获自印度尼西亚卫生部(MOH)。通过反向遗传学拯救(rescue)分

化枝 1.0 病毒, A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)。简单来说, 将合成的 HA 和 NA 基因克隆入双启动子质粒用于甲型流感反向遗传学 (16)。双启动子质粒获自 Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA。利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp) 将含 HA 和 NA 的质粒以及源自 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 的剩余 6 种基因质粒转染 293T 和 MDCK 细胞的共培养物, 拯救重配株病毒。转染 72 小时后, 将来自转染细胞的培养基接种 11 天龄的含胚鸡卵或 MDCK 细胞。对重配株病毒的 HA 和 NA 基因进行测序以证实引入的 HA 和 NA 基因的存在。

[0057] 病毒在 11 天龄鸡胚的尿囊腔中增殖, 48 小时后从卵收集尿囊液。使用血凝测定法 (17) 确定病毒滴度。然后将病毒澄清, 保存在 -80°C 。在 3 级生物安全水平防护实验室进行所有活病毒实验, 所有动物试验都按照 CDC/NIH 和 WHO 推荐 (18, 19) 并且得到 Agri-Food and Veterinary Agency (AVA) 和 MOH, Singapore 批准在 3 级动物生物安全水平 (ABSL3) 防护实验室进行。

[0058] 使用 Trizol (Invitrogen, USA) 从 H5N1 (A/ 鹅 / 广东 / 97) 提取总 RNA。从 cDNA 扩增 HA0 基因和 HA2 基因并使用用于在细菌中表达的标准克隆技术将其克隆入 pQE-30 载体 (Qiagen, Germany)。将该克隆转化大肠杆菌 M15pREP4 感受态细胞以表达蛋白。转化的大肠杆菌 M15 细胞在含氨苄青霉素 ($100\ \mu\text{g/ml}$) 的 Luria-Bertani (LB) 培养基中在 37°C 生长到 OD_{600} 为 0.5-0.6, 通过添加 1mmol/L IPTG 振荡 3 小时来诱导蛋白表达。使用标准方案在 Ni-NTA 柱 (Qiagen, Germany) 上纯化组氨酸标记蛋白。

[0059] 用于 0.1ml 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的 $25\ \mu\text{g}$ 重组 H5N1HA0 抗原 (用等体积的佐剂 (SEPPIC, France) 乳化) 按照 2 周的定期间隔给 BALB/c 小鼠皮下免疫两次。此后, 在脾细胞与 SP2/0 细胞融合前 3 天, 用 $25\ \mu\text{g}$ 重组抗原给小鼠静脉内加强 (20)。将融合细胞种于 96 孔板, 并通过如下所述的免疫荧光测定筛选它们的上清液。按照制造商方案描述用 one-minute isotyping 试剂盒 (Amersham Bioscience, England) 检查阳性克隆的同种型。

[0060] 实施例 2

[0061] 通过 IFA 筛选 mAb

[0062] 分别用载有截短的 H5N1 HA1 和 HA0 基因的重组杆状病毒或 AIV H5N1 印度尼西亚株, H5N2 和 H5N3 株感染 96 孔板中的 Sf-9 和 MDCK 细胞。感染后第 36 小时 (对于 Sf-9 细胞) 和 24-48 小时 (对于 MDCK 细胞), 细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 分钟, 再用 PBS, pH 7.4 清洗三次。将固定的细胞与杂交瘤培养液在 37°C 温育 1 小时。用 PBS 清洗细胞三次, 再将其与 1 : 40 稀释的偶联异硫氰酸荧光素 (FITS) 的兔抗小鼠 Ig (Dako, Denmark) 温育。在落射荧光显微镜 (Olympus, Japan) 下利用用于优化的 FITC 显色的合适栅栏和激发滤波器 (21) 来给结果打分前再次用 PBS 清洗细胞。

[0063] 挑选单克隆抗体 1C9 (其是 IFA 和免疫印迹阳性的) 用于表位作图。产生总共 14 个表达 HA2 片段的克隆, 其氨基酸数目顺序增加 (图 1)。在蛋白诱导后, 将来自这些克隆的细胞裂解物在 SDS-PAGE 中进行电泳, 使用抗 HA2mAb 的免疫印迹分析显示 mAb 1C9 对片段编号 1-6 阳性, 对所有其他片段阴性 (图 1b)。据此可以总结得出 mAb 1C9 识别含 HA0 的氨基酸 331 到 345 的表位 (HA2 的 1-15)。为了进一步对 mAb 1C9 的表位作图, 产生数种点突变体, 其在大致作图表位区域改变每一个氨基酸, 即对于 mAb1C9 来说是氨基酸 331-345。进行点突变体的进一步表达和免疫印迹分析。结果显示突变体 I340A, E341A, G342A, G343A,

W344A 和 Q345A 的阳性结果。突变体 G331A, L332A, F333A, G334A, A335G, I336A, A337G, G338A 和 F339A 在 western 印迹中显示阴性结果 (图 1c)。这些数据表明显示阴性结果的氨基酸突变体涉及所述表位,因此在突变后不被 mAb 1C9 识别。尽管有点突变,但其他突变体仍被 mAb 识别。这些数据表明 mAb 1C9 识别包括氨基酸' GLFGAIAGF' (331-339) 的表位。mAb 1C9 抗 HA1/HA2 连接区,具体地,抗融合肽的一部分。

[0064] 实施例 3

[0065] mAb 对 HA0 构象变化的筛选作用

[0066] 甲型流感血凝素的 HA0 前体在 CHO-K1 细胞的表面表达。在用胰蛋白酶和低 pH 处理时,HA0 经历从天然到融合活性形式 (造成多核体形成) 的构象变化。在对照孔中观察到正常的多核体形成。多核体的形成被 100 μ g/ml 浓度的 mAb 1C9 完全抑制,被 50 μ g/ml 浓度的 mAb 1C9 部分抑制。无关单克隆抗体 3H5 不显示多核体形成的任何抑制。

[0067] 实施例 4

[0068] 抗 HA2 mAb 抗 H5N1 感染的治疗功效

[0069] 为了确定 mAb 1C9 的治疗功效,使用 4-6 周龄的近交 SPF BALB/c 小鼠。将每组 6 只小鼠 ($n = 6$) 用氯胺酮 / 赛拉嗪麻醉,并用 5MLD₅₀ (小鼠半致死量) 的两种不同 H5N1 株 (来自分化枝 1 的 A/Vietnam/1203/2004 和来自分化枝 2.1 的 A/Indonesia/TLL013/06) 进行鼻内感染。按照先前描述的 Reed 和 Muench 方法 (Reed and Muench, 1938) 确定 50% 小鼠致死剂量 (MLD₅₀)。在病毒攻击后按照 1 或 3 天的时间点用 5mg/kg, 10mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的各种抗 HA2 mAb 通过腹膜内途径治疗每组小鼠。

[0070] 在用 5MLD₅₀ 来自分化枝 1.0 或分化枝 2.1 的 HPAI H5N1 株攻击后 1 或 3 天,用指定剂量的 mAb 治疗实验小鼠组 ($n = 6$ /组)。通过不同组中体重下降的不同趋势来显示感染进展。在用 H5N1 病毒攻击的小鼠中, PBS 对照组 (未治疗小鼠) 显示体重最快速的下降,在病毒攻击后 5 天内达到 100% 死亡率。第 3 天,来自该组的死亡小鼠体重低于初始体重的 80% (图 4c)。感染后 1 天用 10mg/kg 1C9 mAb 治疗组的小鼠显示至多 15% 的体重减轻,从攻击后 5 天小鼠开始逐渐恢复它们的体重 (图 4c)。在高浓度下,用 H5N1 病毒的两个分化枝攻击时, mAb1C9 完全保护小鼠免遭疾病 (图 4b)。小鼠显示约 23% 的体重减轻,从攻击后 4 天逐渐恢复减轻体重的约 8-10% (图 4c)。用 5mg/kg 1C9 治疗的小鼠组显示低于 22% 的体重减轻。致死研究显示该浓度提供抗 5MLD₅₀ 的两种 H5N1 株 (分化枝 1.0 (图 4a) 和分化枝 2.1 (图 4b)) 的 50% 保护。

[0071] 用两种 H5N1 株攻击后 3 天,用 1C9mAb 治疗各组小鼠。攻击后 3 天 (治疗前), 16.6-33.3% 的小鼠 / 组 (6 只中 1-2 只小鼠 / 组) 死亡,只在存活小鼠中检测 mAb 的治疗功效。10mg/kg 1C9mAb 提供 75% (4 只小鼠中的 3 只存活) 的抗 H5N1 株的保护 (图 4d 和图 4e)。5mg/kg 1C9 mAb 提供抗 5MLD₅₀ H5N1 株的 50% 保护 (4 只小鼠中的 2 只存活) (图 4d 和图 4e)。

[0072] 实施例 5

[0073] 抗 HA2 mAb 抗 H5 感染的预防功效

[0074] 为了测定预防功效,在病毒攻击前,用 5mg/kg, 10mg/kg 或 0mg/kg (PBS) 的 mAb 1C9 预处理各组小鼠 ($n = 6$ /组)。24 小时后,用 5MLD₅₀ 的两种不同 H5N1 株攻击小鼠。每天观察小鼠以监测体重和死亡率。持续监测直至所有动物死亡或直至攻击后 14 天。

[0075] 用10mg/kg 1C9 mAb 预处理的小鼠组提供抗5MLD₅₀的两种H5N1株(分化枝1.0(图5a)和分化枝2.1(图5b))的100%保护。该组小鼠在第5天只显示15%体重减轻,并恢复体重(图5c)。用5mg/kg 1C9mAb的预处理提供分别抗5MLD₅₀来自分化枝1.0(图5a)和分化枝2.1(图5b)的H5N1病毒的50%保护。

[0076] 实施例6

[0077] 病毒载荷的确定

[0078] 用1ml Trizol 试剂处理约200 μl 肺匀浆来提取RNA。通过20U AMV 逆转录酶(Roche)利用总RNA(400ng/样品)进行cDNA合成。在定量实时PCR反应中使用cDNA悬液进行扩增。在PCR测定中使用DyNAmo™ Capillary SYBR Green qPCR试剂盒(Finnzymes)。简单来说,在20 μl(含0.25 μmol 正向引物(5' -GAAATCAAACAGATTAGTCCTTGC-3')(SEQ ID NO :1),和0.25 μmol 反向引物(5' -CCTGCCATCCTCCCTCTATAAA-3')(SEQ ID NO :2)以及1×DyNAmo master mix)中扩增cDNA。反应在Light Cycler(Roche, Indiana, USA)中进行,条件如下:95°C 10分钟,继之以50个循环:95°C 10秒,57°C 5秒,和72°C 9秒。在每个循环的延伸步骤结束时捕捉来自这些反应的荧光信号。为了确定测定法的特异性,在测定结束时将PCR产物进行解链曲线分析(65到95°C;0.1°C/秒)。含靶序列的质粒被用作阳性对照。为了确定实时定量PCR的动态范围,制备含靶序列的质粒DNA的系列稀释物并用于实时定量PCR测定。所述测定能够在1000到10⁹拷贝的范围内区分10倍浓度差,在水对照中没有观察到信号。通过使用标准曲线法获得各个实验样品一式三份的相对定量。

[0079] 使用实时聚合酶链式反应测定来评估感染分化枝2.1的动物的肺样品中甲型流感病毒载荷的动力学。用mAb 1C9治疗的小鼠的肺中的病毒滴度在攻击前24小时与未治疗小鼠的进行比较(图6a)。用mAb 1C9治疗的小鼠的肺中的病毒滴度在攻击后24小时与未治疗小鼠的进行比较(图6b)。第4天与未治疗小鼠相比时,接受10mg/kg 1C9的小鼠显示显著更少的病毒载荷,在攻击后10天检测不到病毒滴度。此外,与接受10mg/kg 1C9的小鼠相比,接受5mg/kg 相同mAb的小鼠按照剂量依赖性方式显示更低的病毒清除率。

[0080] 实施例7

[0081] 组织病理学

[0082] 为了组织病理学,将肺样品收集到10%(重量/体积)缓冲的福尔马林溶液中,包埋入石蜡并切片。用苏木素和曙红(H/E)对切片染色并分析病理学。

[0083] 在病毒攻击之前或之后,对用mAb 1C9治疗的小鼠进行组织病理学研究。免疫后(p. i.)第5天,用分化枝2.1 H5N1病毒感染的小鼠具有肺部病变,包括中度到重度坏死性支气管炎,具有相关肺水肿的中度到重度组织细胞肺炎(图3b)。未感染的小鼠没有肺部病变(图3a),用5mg/kg 1C9治疗的小鼠(攻击之前或之后24小时)具有轻度到中度支气管炎(图3c和3e),用10mg/kg 1C9治疗的小鼠(攻击之前或之后24小时)具有轻度支气管炎。

[0084] 参考文献

[0085] 1. WHO(World Health Organization).Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1)Reported to WHO 10 September 2007. Available at :http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_01_03/en/index.html. 2008年1月3日访问。

- [0086] 2. No authors listed. 2006. Epidemiology of WHO confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) infection. *Wkly Epidemiol. Rec.* 81 :249-257.
- [0087] 3. de Jong, M. D, and T. T. Hien. 2006. Avian influenza A(H5N1)-Review. *J. Clin. Virol.* 35 :2-13.
- [0088] 4. Veits. J. , A. Romer-Oberdorfer, D. Helferich. , M. Durban. M. and et al. 2008. Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions. *Vaccine* 26 :1688-1696.
- [0089] 5. Beigel, J. H. , J. Farrar, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, and et al. 2005. Avian influenza A(H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.* 353 :1374-85.
- [0090] 6. Bright, R. A. , D. K. Shay, B. Shu, N. J. Cox, and A. I. Klimov. 2006. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295 :891-894.
- [0091] 7. Le, Q. M. , M. Kiso, K. Someya, Y. T. Sakai, T. H. Nguyen, and et al. 2005. Avian flu :Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437 :1108.
- [0092] 8. Yen, H. L. , A. S. Monto, R. G. Webster, an E. A. Govorkova. 2005. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J. Infect. Dis.* 192 :665-672.
- [0093] 9. Sawyer, L. A. 2000. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. *Antiviral. Res.* 47 :57-77
- [0094] 10. Hanson, J. H. , C. M. Boon, P. C. Lim, A. Webb, E. E. Ooi, and R. J. Webb. 2006. Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Respir. Res.* 7 :126
- [0095] 11. Gerhard, W. , K. Mozdzanowska, and D. Zharikova 2006. Prospects for Universal Influenza Virus Vaccine. *Emerging Infect. Dis.* 12 :569-574.
- [0096] 12. Lakadamyali, M. , M. J. Rust, and X. Zhuang. 2004. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect.* 6 :929-936.
- [0097] 13. Chen, J. , K. H. Lee, D. A. Steinhauer, D. J. Stevens, J. J. Skehel, and D. .Wiley. 1998. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95 :409-417.
- [0098] 14. Wilson, I. A. , J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289 :366-373.
- [0099] 15. Atassi, M. Z. , and R. G. Webster. 1983. Location, synthesis and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin. *PNAS* 180 :840-844.
- [0100] 16. Horimota, T. , A. Takada, K. Fujii, H. Goto, M. Hatta, and et al. 2006. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 24 :3669-3676.
- [0101] 17. Anonymous. 1995. Laboratory biosafety manual. World Health

Organization. Ann Ist Super Sanita,31,1-121.

[0102] 18. NIH(National Institutes of Health,U. S.)and CDCP(Centers for Disease Control and Prevention, U. S.)1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories,4th ed. U. S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention ;National Institutes of Health ;For sale by the Supt. of Docs. U. S. G. P. O. , Washington, D. C.

[0103] 19. WHO(World Health Organization). 2004. Laboratory biosafety manual,3rd ed. World Health Organization, Geneva.

[0104] 20. Yokoyama,W. M. 2001. Production of monoclonal antibody,p. 2. 5. 1-2. 5. 17. In J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober(eds.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons. Inc. , Newcastle, United Kingdom.

[0105] 21. Velumani,S. ,Q. Du,B. J. Fenner,M. Prabakaran, and et al. 2008. Development of an antigen-capture ELISA for detection of H7 subtype avian influenza from experimentally infected chickens. J. Virol. Methods 147 :219-225.

[0001]

序列表

- <110> 淡马锡生命科学研究院有限公司
- <120> 对来自甲型流感病毒血凝素的融合肽特异的单克隆抗体及其用途
- <130> FP4477
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Forward Primer
- <400> 1
- gaaatcaaac agattagtcc ttgc 24
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Reverse Primer
- <400> 2
- cctgccatcc tcctctata aa 22

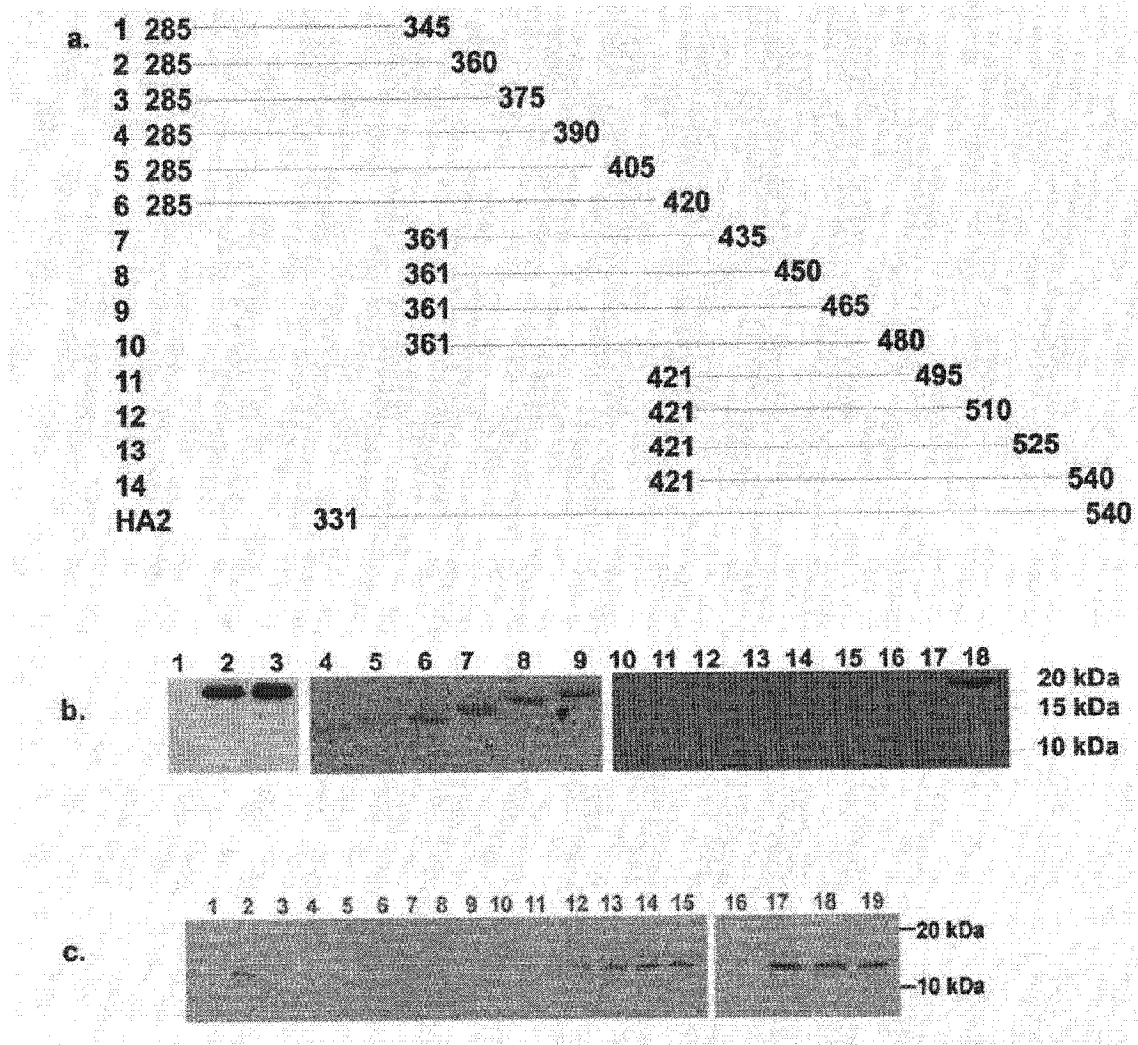


图 1

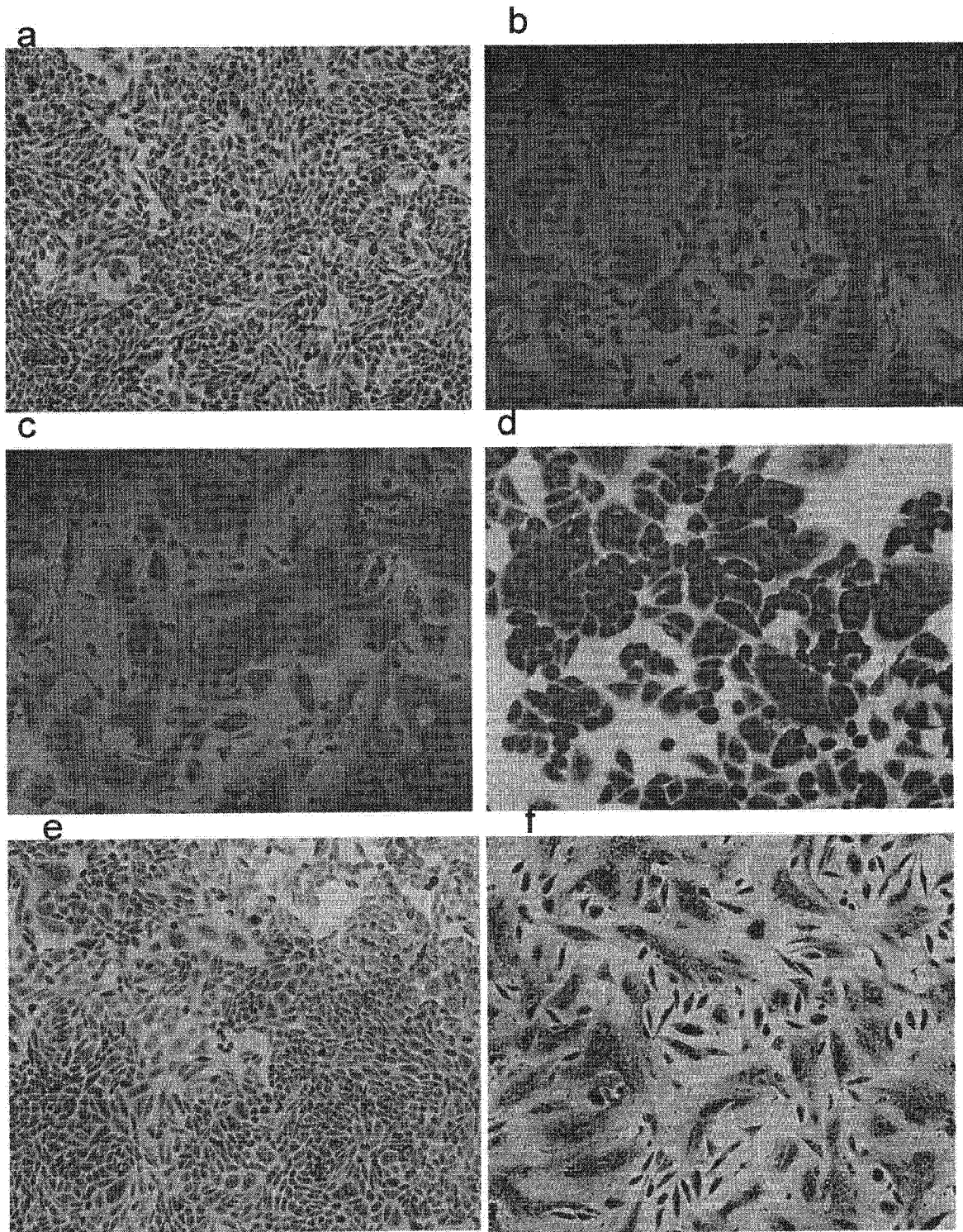


图 2

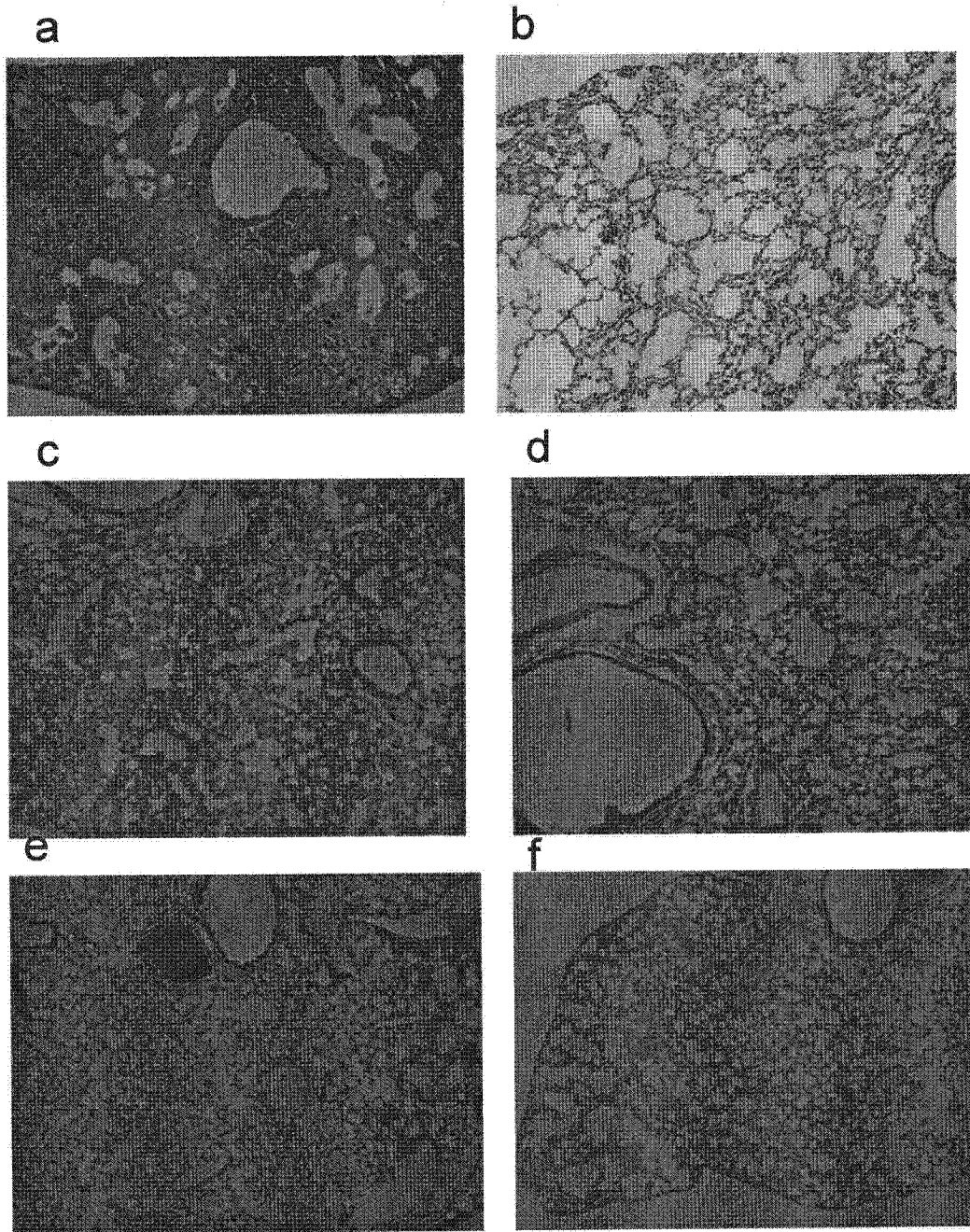


图 3

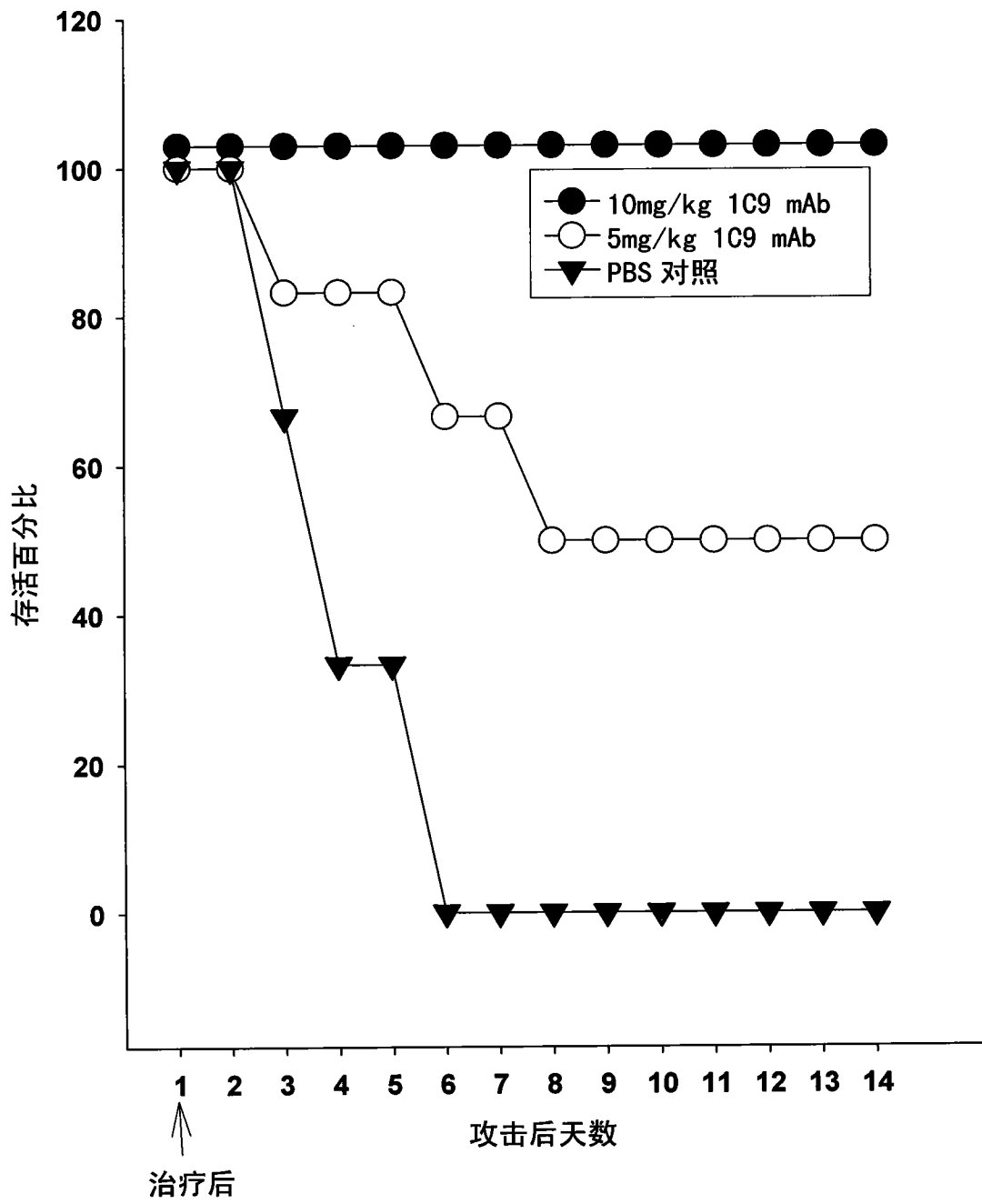


图 4a

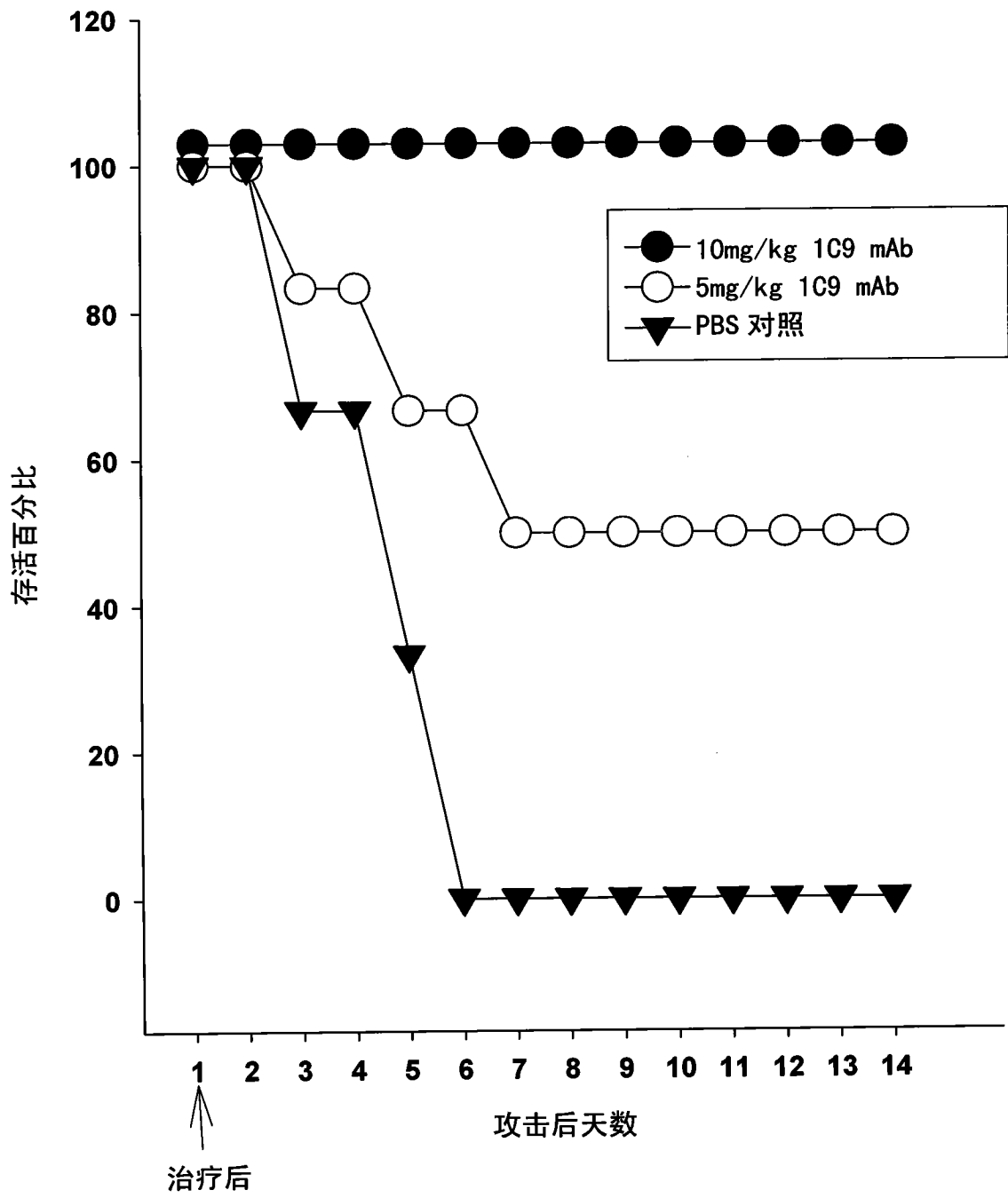


图 4b

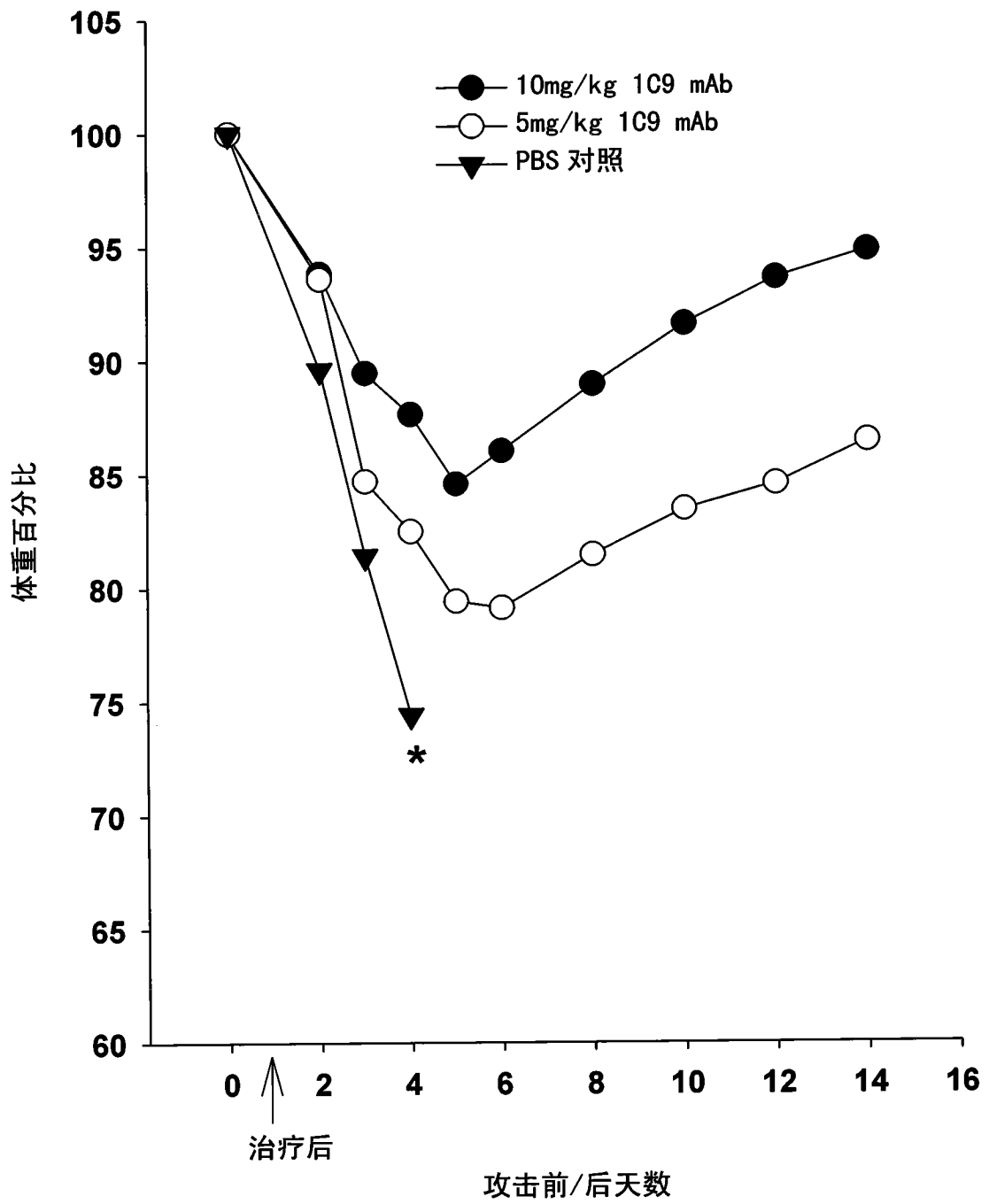


图 4c

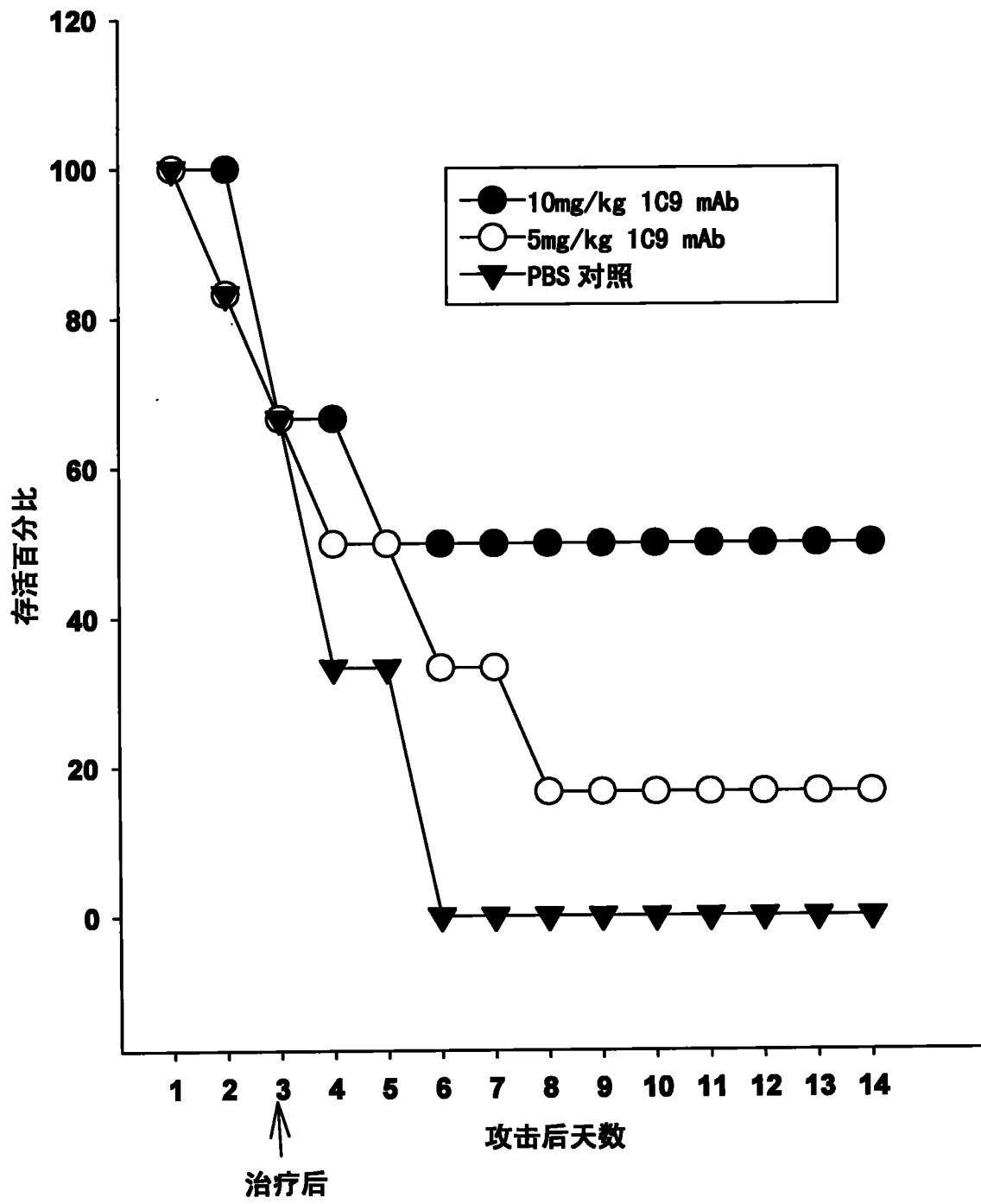


图 4d

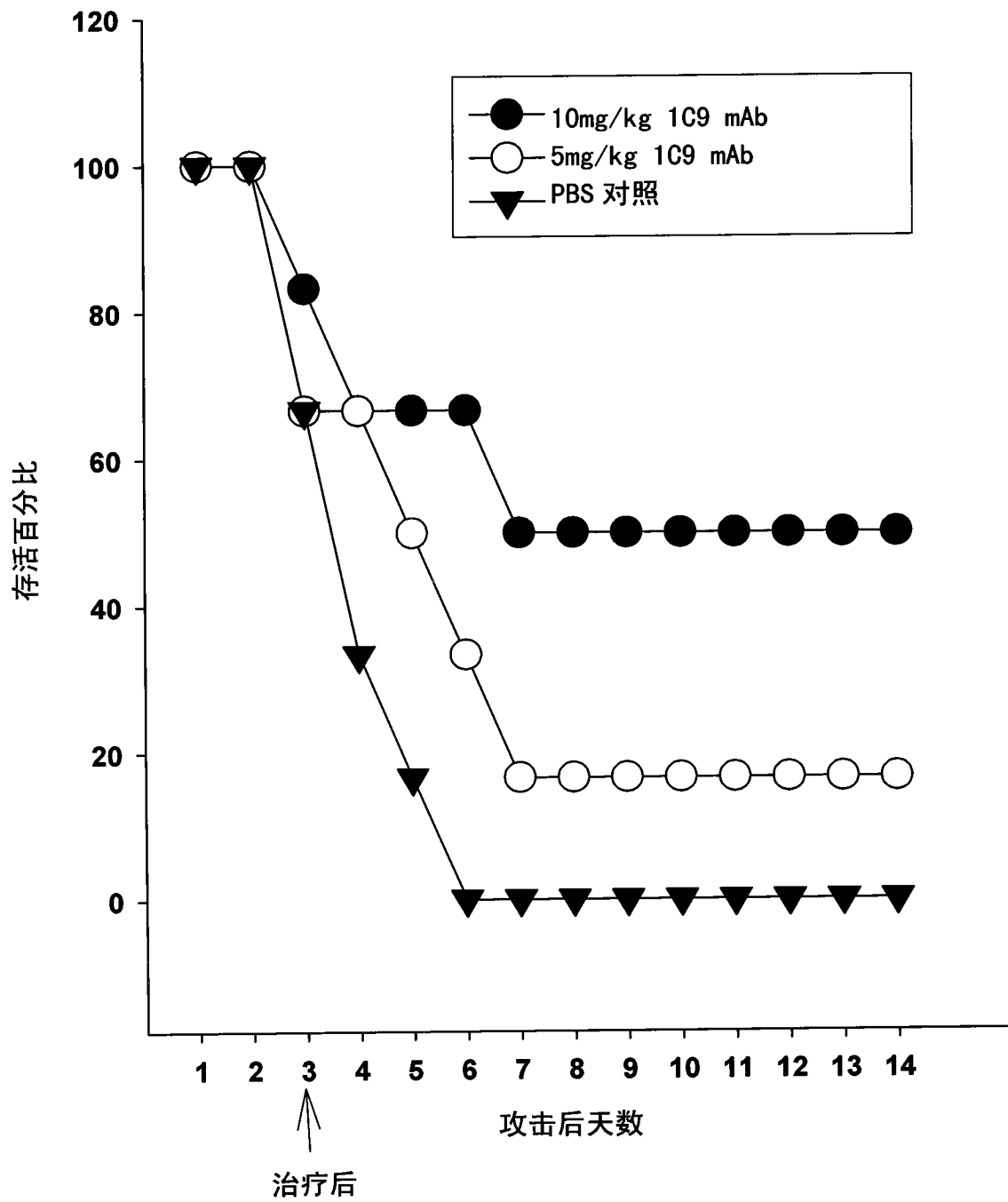


图 4e

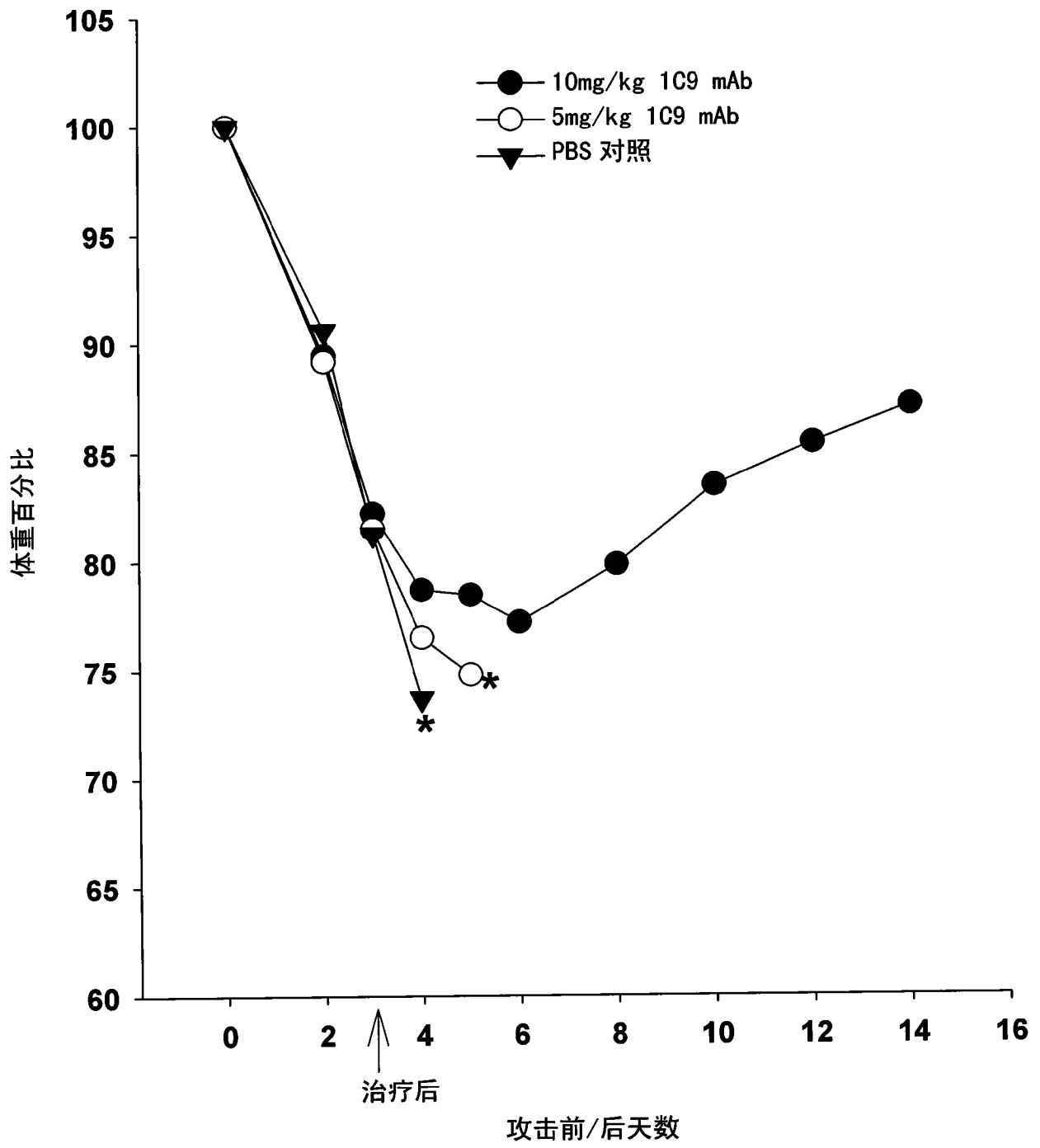


图 4f

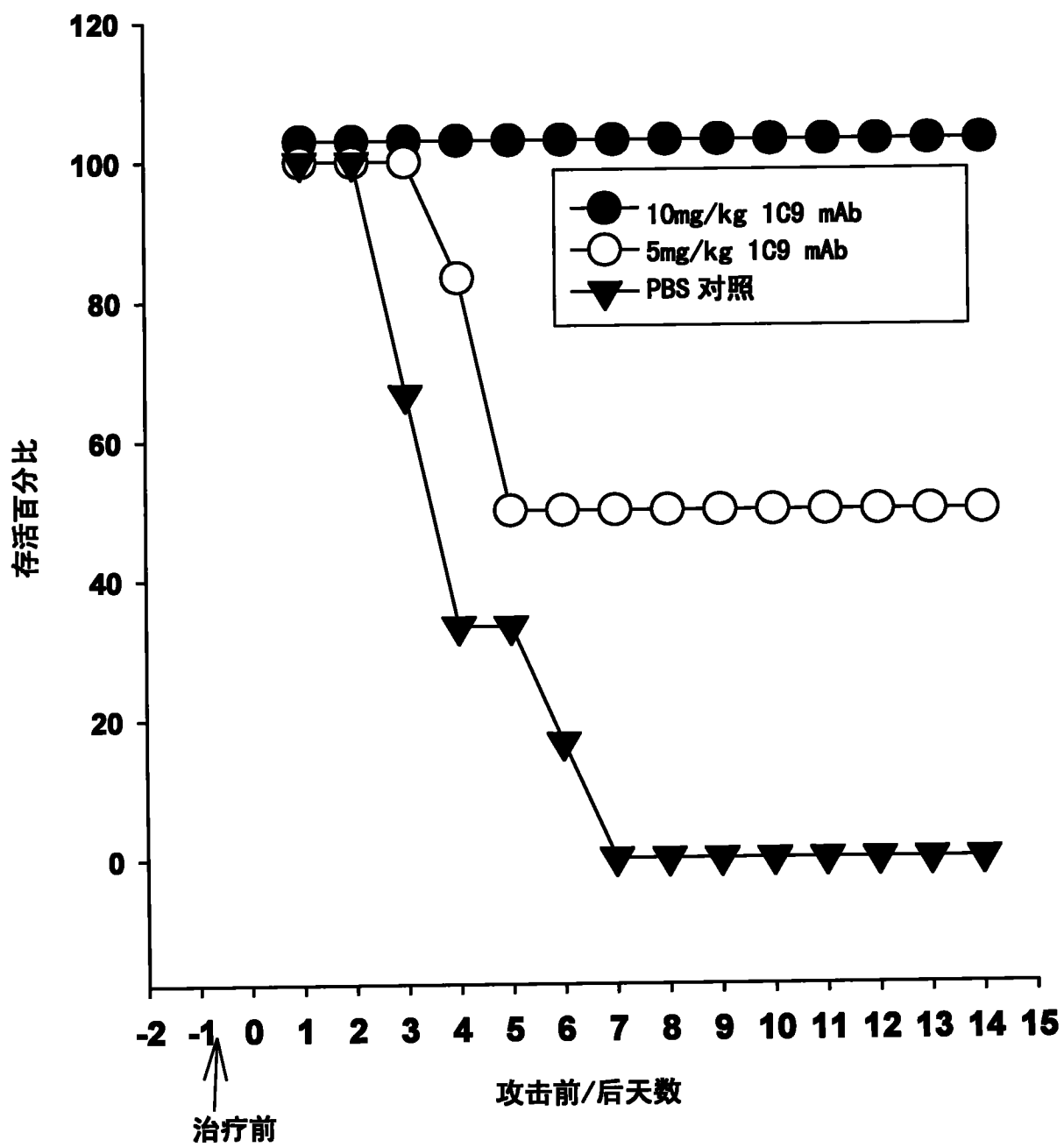


图 5a

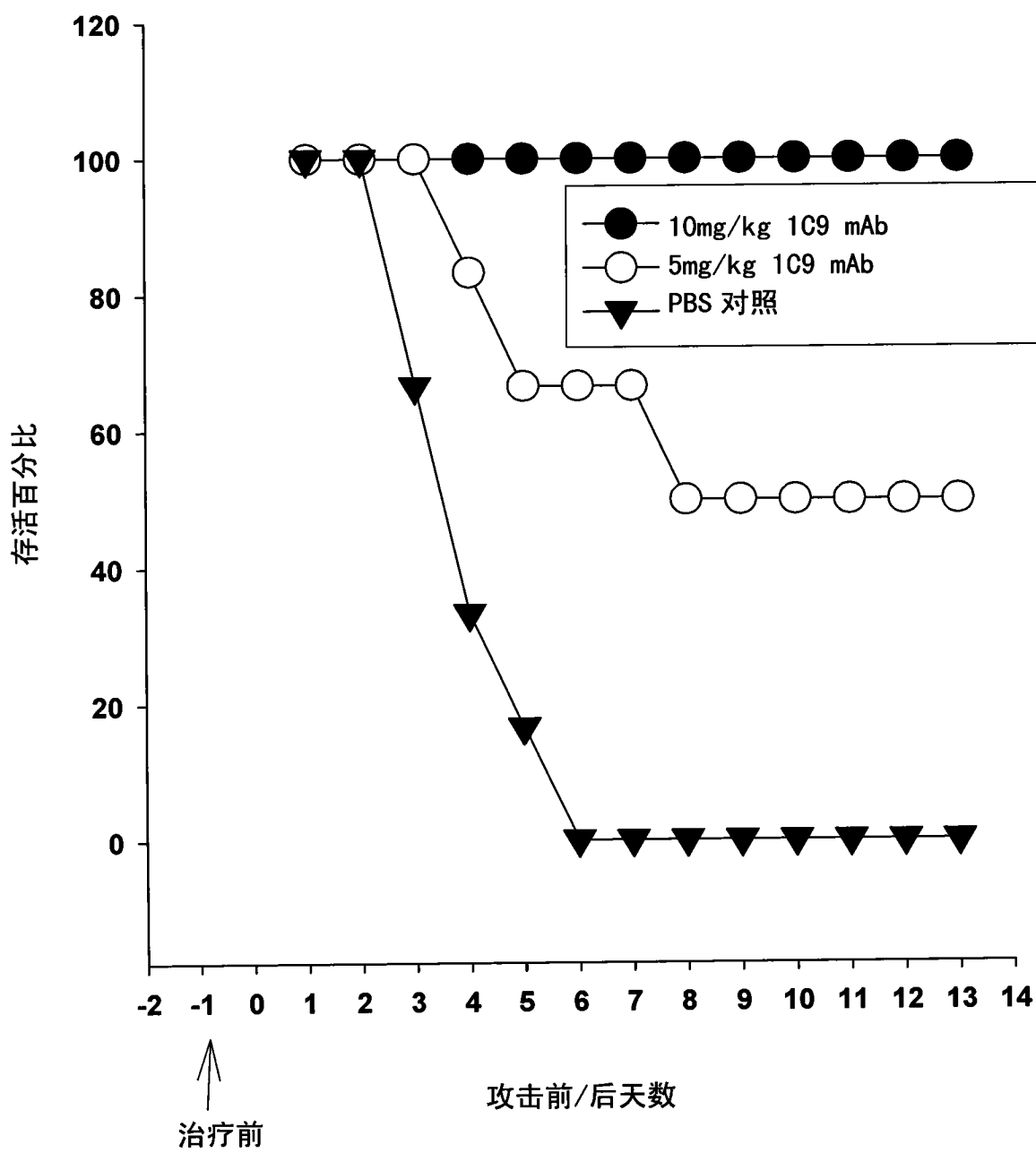


图 5b

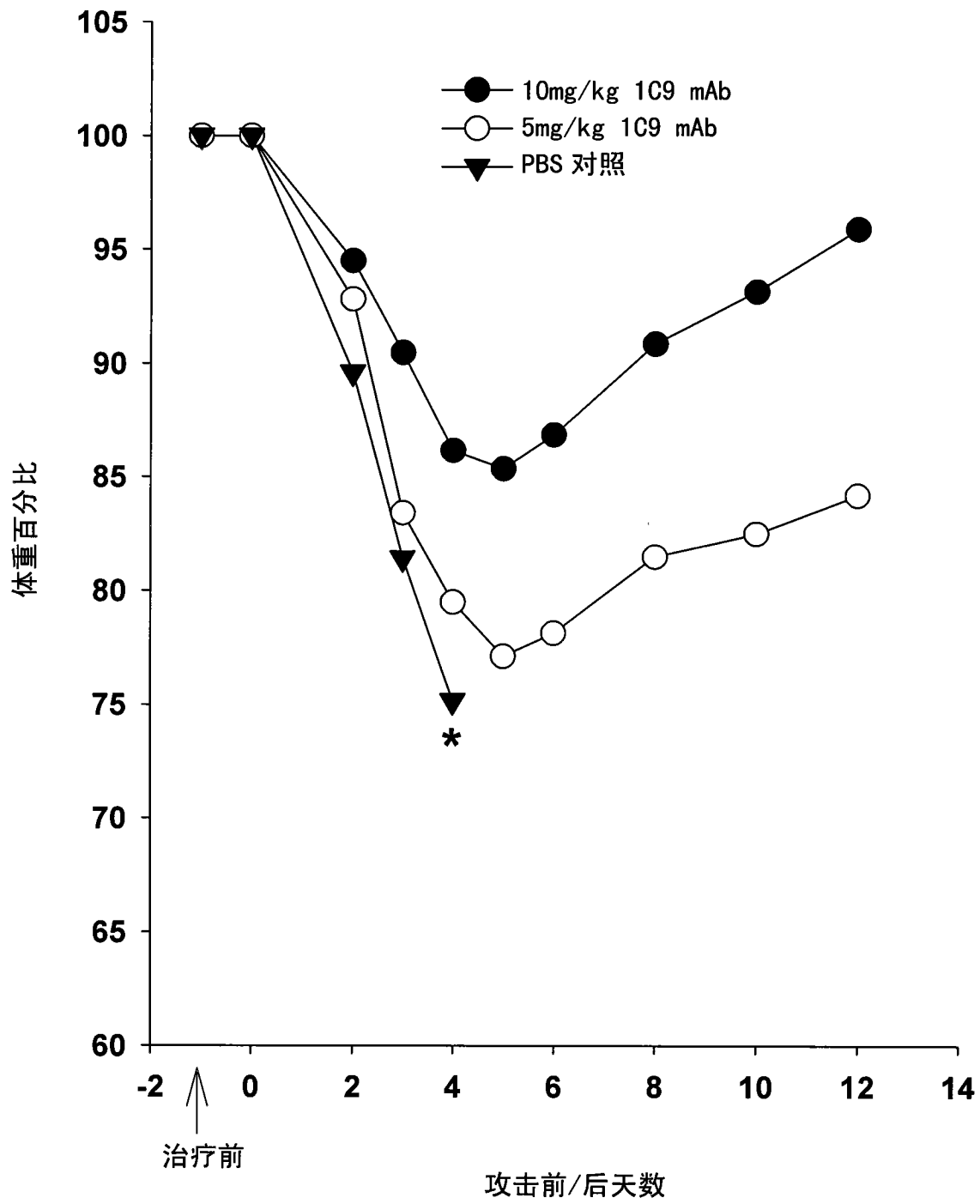


图 5c

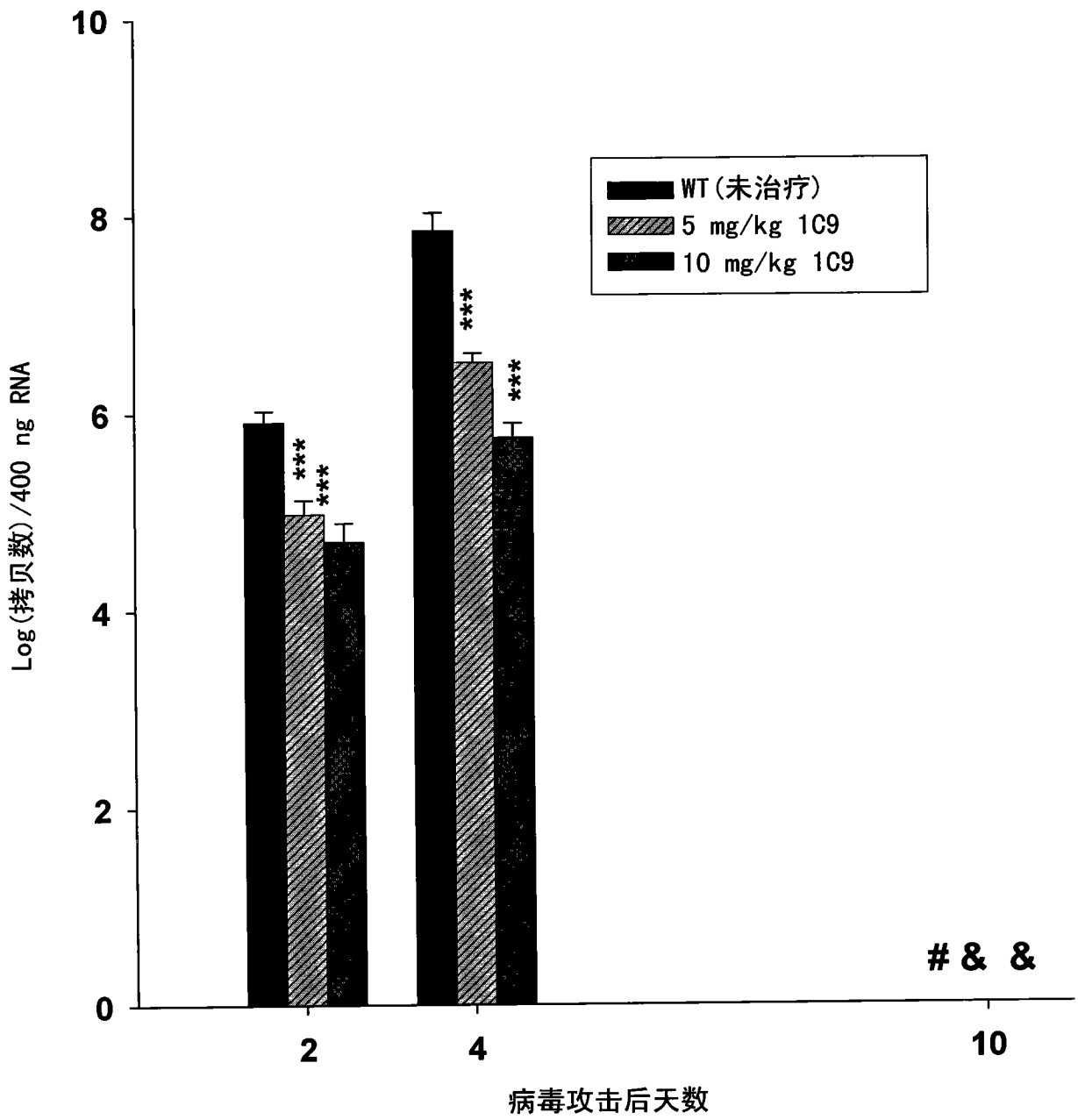


图 6a

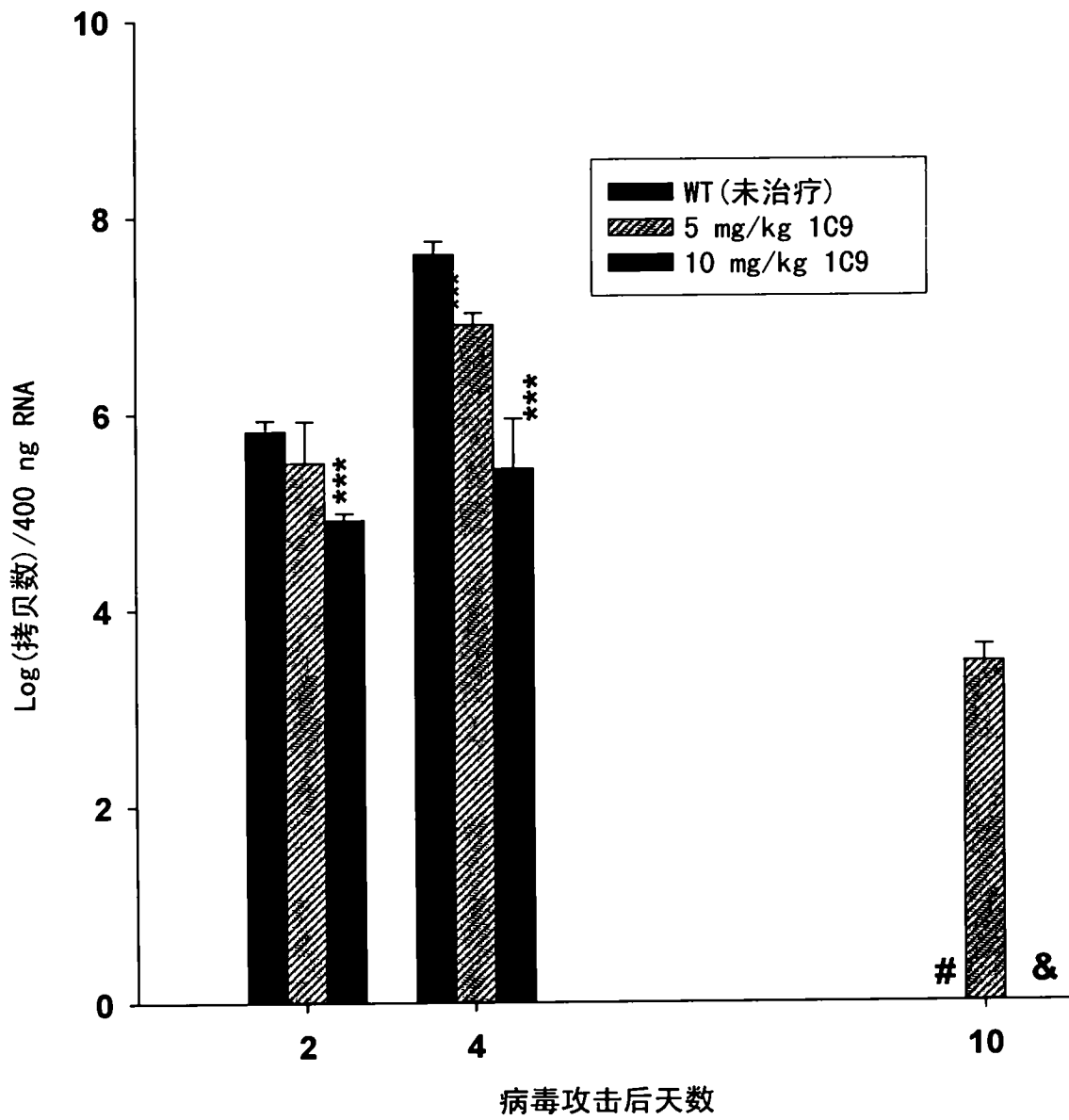


图 6b

专利名称(译)	对来自甲型流感病毒血凝素的融合肽特异的单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102292350A	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN200880132725.9	申请日	2008-12-24
[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	P木根 NP帕杜比德里 S韦卢马尼 H SJ光		
发明人	P· 木根 N· P· 帕杜比德里 S· 韦卢马尼 H-S· J· 光		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/563 G01N33/577 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/145		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K16/1018 A61K2039/505 G01N33/56983 G01N2333/11		
代理人(译)	王健		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于动物和人类中甲型流感病毒感染的诊断，监测，预防和治疗的 方法和产品。更具体的，本发明涉及用于甲型流感病毒的检测，预防和治疗的抗体和相关结合蛋白。本发明的单克隆抗体和相关结合蛋白可用于治疗禽流感病毒(AIV)的高致病性H5亚型。

