



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103717617 B

(45)授权公告日 2017.06.20

(21)申请号 201180072356.0

(22)申请日 2011.07.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103717617 A

(43)申请公布日 2014.04.09

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2011/002329 2011.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/011347 EN 2013.01.24

(73)专利权人 生物医学学会
地址 瑞士贝林佐纳

(72)发明人 A·兰扎韦基亚

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 黄希贵

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
C07K 14/11(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010010466 A2,2010.01.28,
CN 101541832 A,2009.09.23,
CN 1756562 A,2006.04.05,

审查员 李煦颖

权利要求书3页 说明书33页
序列表14页 附图6页

(54)发明名称

中和抗甲型流感病毒抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及特异性结合甲型流感血凝素三聚物的茎区中的表位并中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及编码所述抗体或抗体片段的核酸、产生所述抗体或抗体片段的永生B细胞和培养的单浆细胞以及涉及结合所述抗体或抗体片段的表位。此外,本发明涉及所述抗体、抗体片段和表位在筛选方法中以及在甲型流感病毒感染的诊断、治疗和预防中的用途。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别在SEQ ID NO:1、41和42中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

2. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别在SEQ ID NO:1、41和43中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

3. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别在SEQ ID NO:1、41和43中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和分别在SEQ ID NO:44、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

4. 根据权利要求1—3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID NO:59或55中示出的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的重链可变区;和与SEQ ID NO:57或61中示出的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的轻链可变区。

5. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包含具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区,并且其中所述抗体中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒。

6. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位,其中所述抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触所述HA三聚体的第一近端单体和第二远端右侧单体中的氨基酸,并且其中所述抗体或其抗原结合片段包含:(i)分别在SEQ ID NO:1、41和42中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;(ii)分别在SEQ ID NO:1、41和43中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(iii)分别在SEQ ID NO:1、41和43中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别在SEQ ID NO:44、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,选自:

a. 这样的抗体或其抗原结合片段:其中所述抗体或其抗原结合片段的重链接触所述近端单体中的氨基酸残基,并且其中所述抗体或其抗原结合片段的轻链接触所述HA三聚体的所述近端单体中的氨基酸残基和所述远端右侧单体中的氨基酸残基;和

b. 这样的抗体或其抗原结合片段:其特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位,并且其中所述HA三聚体中的所述第一或第二单体是未被切割的或被切割的。

8. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,选自:

a. 这样的抗体或其抗原结合片段:其中所述抗体或其抗原结合片段的重链接触所述第一或第二单体的HA1中位置318处的氨基酸和HA2中位置18、19、20、21、38、41、42、45、49、53和57处的氨基酸残基,并且其中所述单体是未被切割的或被切割的;

b. 这样的抗体或其抗原结合片段:其中所述抗体或其抗原结合片段的轻链接触所述近端单体的HA2中位置38、39和43处的氨基酸残基和所述远端右侧单体的HA1中位置327、328和329以及HA2中位置1、2、3和4处的氨基酸残基,并且其中所述近端单体和所述远端右侧单体是未被切割的;

c. 这样的抗体或其抗原结合片段:其中所述抗体或其抗原结合片段的轻链接触所述近端单体的HA2中位置38、39、42和46处的氨基酸残基和所述远端右侧单体的HA1中位置321和323以及HA2中位置7和11处的氨基酸残基,并且其中所述近端单体和所述远端右侧单体是被切割的;

d. 这样的抗体或其抗原结合片段:其特异性结合包含所述近端单体的HA1中位置318处的氨基酸和HA2中位置18、19、20、21、38、39、41、42、43、45、48、49、53、56和57处的氨基酸残基,以及所述远端右侧单体的HA1中位置327、328、329处的氨基酸残基和HA2多肽中位置1、2、3和4处的氨基酸残基的表位,其中所述近端单体和所述远端右侧单体是未被切割的;

e. 这样的抗体或其抗原结合片段:其特异性结合包含所述近端单体的HA1中位置318处的氨基酸和HA2中位置18、19、20、21、38、39、41、42、45、46、49、52、53和57处的氨基酸残基,以及所述远端右侧单体的HA1中位置321和323处的氨基酸残基和HA2中位置7和11处的氨基酸残基的表位,其中所述近端单体和所述远端右侧单体是被切割的;和

f. 这样的抗体或其抗原结合片段:其特异性结合包含HA1中的位置329处的氨基酸和HA2中的位置1、2、3和4处的氨基酸残基的表位,其中所述HA1和HA2存在于所述HA三聚体的未被切割的单体中。

9. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为人抗体。

10. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为单克隆抗体。

11. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为纯化的抗体。

12. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为单链抗体。

13. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为Fab抗体片段。

14. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为Fab'抗体片段。

15. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为F(ab')₂抗体片段。

16. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为Fv抗体片段。

17. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为scFv抗体片段。

18. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合亚型H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15和H16的甲型流感HA。

19. 根据权利要求1-3和5-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其用于治疗甲型流感病毒感染。

20. 一种核酸分子,其包含编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合

片段的多核苷酸。

21. 根据权利要求20所述的核酸分子,其中所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:45-54、56、58、60或62中任一者中所示的核酸序列具有至少75%同一性的序列。

22. 根据权利要求21所述的核酸分子,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:60和58、或SEQ ID NO:60和62、或SEQ ID NO:56和58、或SEQ ID NO:56和62中所示的序列。

23. 一种载体,其包含根据权利要求20、21或22所述的核酸分子。

24. 一种细胞,其表达根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;或者包含根据权利要求23所述的载体。

25. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求20-22中任一项所述的核酸、根据权利要求23所述的载体、或根据权利要求24所述的细胞以及药学上可接受的稀释剂或载体。

26. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求20-22中任一项所述的核酸、根据权利要求23所述的载体、根据权利要求24所述的细胞或根据权利要求25所述的药物组合物在制备下述中的用途,(i) 用来治疗甲型流感病毒感染的药物、(ii) 疫苗或(iii) 用于诊断甲型流感病毒感染的制剂。

27. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的用途,用于通过检查抗甲型流感病毒疫苗的抗原是否含有具有正确构象的特异性表位来监测所述疫苗的质量。

28. 权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于减少甲型流感病毒感染或降低甲型流感病毒感染风险的药物中的用途。

中和抗甲型流感病毒抗体及其用途

背景技术

[0001] 对甲型流感病毒的中和抗体应答对给定病毒亚型通常是特异性的。有16种由它们的血凝素(“HA”)蛋白限定的甲型流感亚型。这16种HA(H1-H16)可被分成两组。组1由H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13和H16亚型组成,组2包括H3、H4、H7、H10、H14和H15亚型。虽然所有的亚型均存在于鸟类中,但主要是H1、H2和H3亚型在人中引起疾病。H5、H7和H9亚型正在人中引起散发性严重感染并且可能会产生新的大流行。H1和H3病毒不断地进化从而产生新的变体,这种现象被称为抗原漂移。因此,响应以前的病毒而产生的抗体针对新的漂移病毒的保护性差或没有保护性。结果是,必须每年产生对抗预计会出现的H1和H3病毒的新疫苗,该过程十分昂贵并且也不总是有效。这同样适用于H5流感疫苗的制备。实际上,还不清楚基于越南或印度尼西亚甲型流感病毒分离株的现有H5疫苗是否将能对抗将来的流行性H5病毒。

[0002] 因为这些原因,将非常期望具有可诱导能够中和所有甲型流感病毒亚型以及它们每年的变体的广谱中和抗体(Gerhard等人2006年进行了综述)。此外,广谱中和亚型抗体可作为药物施用来预防或治疗甲型流感感染。对于这类药物的制造,选择以高滴度产生以降低生产成本的抗体是重要的。

[0003] 已经表征了识别甲型流感病毒的抗体。针对M2(在受感染的细胞上表达但不在感染病毒上表达的一种小蛋白质)的抗体已经显示出一定的体内保护性效果,可能是通过靶向受感染细胞来通过NK细胞或细胞毒性T细胞破坏。还可能用中和抗体靶向HA蛋白。HA作为同型三聚体前提多肽HA0合成。每个单体可独立地在翻译后切割而形成两条多肽即HA1和HA2,通过单个二硫键连接。较大的N末端片段(HA1,320-330个氨基酸)形成含有受体结合位点和大部分被病毒中和抗体识别的决定簇的膜远端球形结构域。HA的HA1多肽负责病毒与细胞表面的吸附。较小的C末端部分(HA2,≈180个氨基酸)形成将该球形结构域锚定至细胞或病毒膜的茎状结构。HA2多肽介导病毒和细胞膜在核内体中融合,从而释放核糖核蛋白复合物释放进细胞质中。

[0004] 亚型之间的序列同源性的程度在HA1多肽(亚型之间34%-59%的同源性)比在HA2多肽(51%-80%同源性)中小。最保守的区域是切割位点周围的序列,特别是HA2N末端11个氨基酸,称为融合肽,其在所有甲型流感病毒亚型中是保守的。部分该区域暴露为HA前体分子(HA0)中的表面环区(loop),但当HA0被切割成HA1/HA2时变成不可接近。概括地说,不同HA亚型中,尤其是在HA1-HA2连接区和在HA2区中都有保守区。然而这些区域对于中和抗体可能是不易接近的。

[0005] 在鉴别中和不止一种亚型的甲型流感病毒的抗体方面仅取得有限的成功。另外,迄今所鉴别的抗体的中和作用的迹象窄并且其效价低。Okuno等人用甲型流感病毒/Okuda/57(H2N2)免疫小鼠并分离了单克隆抗体(C179),该单克隆抗体结合HA2中的保守构象表位并在动物模型中在体外和体内中和组1的H2、H1和H5亚型甲型流感病毒(Okuno等人,1993;Smirnov等人,1999;Smirnov等人,2000)。

[0006] Gioia等人描述了在接受了常规季节性流感疫苗的某些个体的血清中存在H5N1病

毒中和抗体(Gioia等人,2008)。该作者提出,中和活性可能是由于神经氨酸苷酶(N1)的抗体。然而,未分离单克隆抗体并且未表征靶表位。另外,尚未清楚该血清抗体是否中和其他亚型的甲型流感病毒。

[0007] 已经从免疫供体的记忆B细胞和浆细胞分离了可结合HA的茎状区中的表位并且能够中和组1或组2中的一些甲型流感病毒亚型的异亚型人抗体。然而,至今尚未发现靶向在所有16个亚型上保守的HA三聚体中的表位并且能够中和组1和组2亚型二者的病毒的甲型流感特异性中和抗体,并且它们的分离仍是治疗方法和疫苗设计的主要目标。

[0008] 尽管进行了数十年的研究,但还没有投入市场的广谱中和或抑制甲型流感病毒感染或缓解甲型流感病毒引起的疾病的抗体。因而,需要鉴别中和多种亚型的甲型流感病毒并且可作为药物用于预防或治疗甲型流感感染的新抗体。还需要鉴别以高滴度产生以降低生产成本的抗体。

发明内容

[0009] 本发明部分基于从接种了季节性流感疫苗的个体分离出可结合HA并中和不止一种亚型的甲型流感病毒的感染的自然产生的人单克隆抗体以及本发明抗体结合的新表位。因此,在本发明的一个方面,本发明包括中和选自组1和组2亚型的不止一种亚型的甲型流感病毒的感染的抗体及其抗原结合片段。

[0010] 在本发明的一个实施例中,本发明包括中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染的分离的抗体或其抗原结合片段。在本发明的另一个实施例中,其包括中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且特异性结合甲型流感血凝素(HA)三聚体的茎区中的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触HA三聚体的第一近端单体中和第二远端右侧单体中的氨基酸。

[0011] 在本发明的另一个实施例中,本发明包括中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触HA三聚体的第一近端单体中和第二远端右侧单体中的氨基酸,并且其中该抗体或其抗原结合片段以比产生FI6变体2的滴度高至少3倍的滴度在被转染的细胞中产生。

[0012] 在本发明的又一个实施例中,本发明包括中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触HA三聚体的第一近端单体中和第二远端右侧单体中的氨基酸,并且其中该抗体或其抗原结合片段包含:(i)分别在SEQ ID NO:1、41和43中示出的或分别在SEQ ID NO:1、41和42中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和(ii)分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的或分别在SEQ ID NO:44、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0013] 在本发明的另一个实施例中,本发明包括分离的抗体或其抗原结合片段,其包含至少一个与SEQ ID NO:1-6、17-22或41-44中的任一者具有至少95%序列同一性的互补决定区(CDR)序列,其中该抗体中和甲型流感病毒。

[0014] 在本发明的另一个实施例中,其包括分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且包含:(i)分别在

SEQ ID NO:1、41和43中示出的或分别在SEQ ID NO:1、41和42中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和(ii)分别在SEQ ID NO:4、5和6中示出的或分别在SEQ ID NO:44、5和6中示出的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0015] 在本发明的另一个实施例中,本发明包括分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链CDR1;具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链CDR2;和具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43的氨基酸序列的重链CDR3,其中该抗体中和甲型流感病毒。在本发明的另一个实施例中,其包括分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链CDR1;具有SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链CDR2;和具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链CDR3,其中该抗体中和甲型流感病毒。

[0016] 在本发明的又一个实施例中,本发明包括分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区;或具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区并且其中该抗体中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒。本发明还包括抗体或其抗原结合片段,其中该抗体为FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4或FI6变体5。

[0017] 在本发明的另一个实施例中,本发明包括中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其片段由永生B细胞克隆表达。

[0018] 在另一个方面,本发明包括包含编码本发明的抗体或抗体片段的多核苷酸的核酸分子。在又一个方面,本发明包括包含本发明的核酸分子的载体和表达本发明的抗体或其抗原结合片段的细胞。在另一个实施例中,本发明包括包含本发明的载体的细胞。在另一个方面,本发明包括分离的或纯化的免疫原性多肽,该免疫原性多肽包含结合本发明的抗体或抗原结合片段的表位。

[0019] 本发明还包括药物组合物,该药物组合物包含本发明的抗体或其抗原结合片段、本发明的核酸分子、包含本发明的核酸分子的载体、表达本发明的抗体或抗体片段的细胞、包含本发明的载体的细胞、或本发明的免疫原性多肽以及药学上可接受的稀释剂或载体。本发明还包括药物组合物,该药物组合物包含第一抗体或其抗原结合片段和第二抗体或其抗原结合片段,其中第一抗体为本发明的抗体,而第二抗体为中和甲型流感或乙型流感病毒感染感染的任何抗体或其抗原结合片段。

[0020] 本发明的抗体或其抗原结合片段、本发明的核酸、包含本发明的核酸的载体、表达本发明的载体的细胞、包含结合本发明的抗体或抗体片段的表位的分离的或纯化的免疫原

性多肽、或本发明的药物组合物 (i) 在制备用于治疗甲型流感病毒感染的药物中、(ii) 在疫苗中、或 (iii) 在甲型流感病毒感染的诊断中的用途也设想处于本发明的范围内。另外, 本发明的抗体或其抗原结合片段通过检查抗甲型流感病毒疫苗的抗原是否含有具有正确构象的特异性表位来监测所述疫苗的质量的用途也设想处于本发明的范围内。

[0021] 在另一个方面, 本发明提供预防、治疗或减轻甲型流感病毒感染或降低甲型流感病毒感染的风险的方法, 包括给对其有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或抗原结合抗体片段。

[0022] 在另一个方面, 本发明包括特异性结合本发明的抗体或其抗原结合片段的表位, 其 (i) 用于疗法中、(ii) 用于制备治疗甲型流感病毒感染的药物、(iii) 用作疫苗、或 (iv) 用于筛选能够中和甲型流感病毒感染的配体。

附图说明

[0023] 图1示出了已用表达编码FI6变体2、3、4或5的基因的载体瞬时转染的293F细胞的抗体产生的滴度。

[0024] 图2A和2B是分别与FI6变体3(在图中称为FI6)复合的H1HA和H3HA的F亚结构域的表面展示。在HA1和HA2中选定的促成保守性疏水沟槽的侧链用箭头指示, 其近似边界用黑线指示。Thr (40) 和Thr (318) 位于HA1中, 而Ile (45)、Trp (21)、Thr (41)、Leu (38) 和18-21转折(turn) 位于HA2中。

[0025] 图3示出了FI6变体3(在图中称为FI6)与HA三聚体的F亚结构域的结合。图3A示出了以Ribbons表示法表示的结合三个FI6变体3抗体的H3HA的三聚体。HA单体之一的HA1为黑色, HA2为深灰色, 而其他两个HA单体为浅灰色。图3B和3C分别示出了H1/FI6变体3复合物和H3/FI6变体3复合物中LCDR1环区与相邻HA单体的融合肽的相互作用的缩放视图。图3D和3E示出了来自H5HA与CR6261的复合物(pdb ID 2GBM) (D) 和H5HA与F10的复合物(pdb 3FKU) (E) 的单体的结构, 与FI6变体3相比它们结合类似的区域但它们的VH结构域在HA上的位置低**5-10Å**。

[0026] 图4示出了FI6变体3(在图中称为FI6-v3)与H1和H3HA的F亚结构域的相互作用。其描绘了H1 HA和H3 HA的F亚结构域以及具有选定侧链的FI6变体3的HCDR3和LCDR1环区的表面表示。最接近的HA单体以浅灰色描绘; 远端右侧单体以浅灰色描绘; 与H3 HA1的N38结合的聚糖以深灰色球体描绘。

[0027] 图5示出了交叉反应性抗体结合位点处的组特异性差异。图5A和5B示出了Asn-38处的碳水化合物侧链在H3 HA不含配体的结构(apo-structure) (A) 中和在FI6变体3结合结构(B) 中的定位。图5C和5D示出了HA1 Trp-21在不同抗体复合物中的取向。子图C示出了与H1或H3HA的F亚结构域相互作用的FI6变体3(在图中称为FI6)的HCDR3环区的Phe-100D。子图D示出了分别向H5 HA的Trp-21呈送Phe-55和Phe-54的F10和CR6261抗体的HCDR2环区。

[0028] 图6示出了FI6变体3在HA上的接触表面。四个子图示出了FI6变体3、CR6261和F10抗体在HA上的印迹(用黑线描绘轮廓); 三个HA单体以白色、浅灰色或深灰色描绘。图6A: FI6变体3/未切割H1的接触印迹; 图6B: FI6变体3/切割H3; 图6C: CR6261/H5; 图6D: F10/H5。与CR6261和F10不同, FI6变体3与两个HA单体构成接触。对于FI6变体3复合物, 标记了抗体/HA界面处的糖基化位点。

[0029] 图7示出了FI6变体3VH和VK链中接触HA的残基(粗体,Kabat编号法)。

[0030] 图8显示FI6变体3在甲型流感病毒感染的小鼠模型中赋予保护作用。图8A示出了在以10MLD50(小鼠中的50%致死剂量)H1N1A/PR/8/34病毒经鼻内感染前三个小时经静脉内(i.v.)接受不同剂量的FI6变体3的BALB/c小鼠(每种实验条件五只)的存活曲线而图8B示出了其体重损失。图8C示出了在以 3×10^5 pfu的H3N2HK-x31病毒感染前三个小时经静脉内接受不同剂量的FI6变体3的小鼠(每种实验条件十只)的体重损失。所示出的是所进行的三个实验中的一个代表性实验。还示出的是在以10MLD50的A/PR/8/34病毒感染后第0天(感染前3小时)或第1、2和3天经静脉内接受15mg/kg FI6变体3的小鼠(每种实验条件五只)的存活曲线(图8D)和体重损失(图8E)。示出了所进行的两个实验中的一个代表性实验。所示出的是平均值 \pm SD。图8F和8G示出了在以A/PR/8/34病毒感染前一天接受10mg/kg (F) 或3mg/kg (G)的FI6变体2 (FI6-v2)、FI6-v2KA(缺少补体结合)、FI6-v2LALA(缺少补体和FcR结合)或对照抗体的小鼠(每种实验条件十只)的存活曲线。

[0031] 图9示出了在H1N1 PR/8/34致死攻击后经FI6变体3处理的小鼠的肺病毒滴度。BALB/c小鼠(每种实验条件四只小鼠)在经10MLD50H1N1 PR/8/34鼻内(i.n.)感染之前三小时(第0天)或之后第1、2或3天接受静脉内注射15mg/kg FI6变体3或对照抗体(HJ16,HIV-1特异性)。在肺部感染后4天测定病毒滴度。在大脑中,病毒无法侦测。数据以箱须图(box-and-whiskers)形式呈现,其中箱从第25百分位延伸至第75百分位,中间为水平线。箱上方和下方的须指示极值。学生t检验统计学分析的结果对于 $p < 0.05$ 而言以*表示,对于 $p < 0.001$ 而言以***表示。

[0032] 图10示出了与HA茎区结合的FI6变体3干扰蛋白酶介导的HA0切割。用FI6变体3、FE17(识别HA球形头部上的Ca²⁺位点的人抗体)或对照抗体温育来自H1NC/99分离株的重组HA。然后使HA-抗体混合物在37°C下暴露于经TPCK处理的胰蛋白酶5、10或20分钟。然后在变性条件下使样品在聚丙烯酰胺凝胶上跑胶并使用可识别所有甲型流感菌株的HA2和HA0的生物素化人mAb (F032)来使蛋白质印迹显影。示出的是HA0带。示出了三个实验中的一个代表性实验。

具体实施方式

[0033] 本发明部分地基于从接种了季节性甲型流感疫苗的个体中发现和分离能广谱中和不同亚型的甲型流感病毒天然产生的人抗体以及本发明抗体所结合的新型表位。希望得到这样的抗体,因为为了中和不同亚型的甲型流感病毒仅需要一种或少数几种抗体。另外,广谱中和异亚型抗体以高滴度产生从而降低生产包含抗体的药物的成本。另外,由这类抗体识别的表位可成为能够诱导针对不同亚型的季节性和候选流行分离株的广谱保护作用的疫苗的一部分。

[0034] 因此,在一个方面,本发明提供分离的抗体和其抗原结合片段,其能中和至少两组1和组2亚型中的甲型流感病毒。在一个实施例中,本发明提供分离的抗体或其抗原结合片段,其能中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒感染。

[0035] 在另一个实施例中,提供分离的抗体或其抗原结合片段,其能中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒感染并且特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位,其中该抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触HA三聚体的第一近端单体和第二远端右侧单体中的

氨基酸。

[0036] 如早前所论述的,HA蛋白作为包含三个相同单体的三聚体前体多肽HA0(同型三聚体)而合成。每个单体可独立于其他两个单体被切割,或可能不如此。每个单体经翻译后切割形成两条多肽,即HA1和HA2,其或者由单个二硫键连接。本发明抗体的重链和轻链接触HA三聚体的三个单体中的两个。本发明抗体所接触的单体可以是切割的或未被切割的。为清晰起见并且出于理解附图中示意性表示的目的,将本发明抗体所接触的两个抗体称作近端单体和远端右侧单体。

[0037] 如本文所用,术语“抗原结合片段”、“片段”和“抗体片段”可互换用来指本发明抗体的保留抗体的抗原结合活性的任何片段。抗体片段的例子包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。此外,本文所用的术语“抗体”包括抗体和其抗原结合片段二者。

[0038] 如本文所用,“中和抗体”是指一种能中和,即防止、抑制、减小、阻碍或干扰病原体引发和/或保持宿主内感染的能力的抗体。术语“中和抗体”和“中和…的抗体”在本文中可互换使用。如本文所述,这些抗体可单独地或以组合形式,在经适当配制后用作预防剂或治疗剂,与活性疫苗接种联合使用,用作诊断工具或用作生产工具。

[0039] 对本领域中已知的与H1和H5HA共结晶的组1特异性异亚型抗体的X射线结晶学研究表明抗体与HA三聚体的仅一个单体相互作用。另外,研究显示这些抗体使HA仅与重链的CDR残基接触而不与轻链的CDR残基接触。相反,本发明的抗体或抗原结合片段并非接触三个HA单体中的一个,而是接触两个。另外,本发明的抗体使HA与来自重链和轻链二者的CDR残基接触。另外,由本发明的抗体或抗原结合片段与HA构成的相互作用的性质与由其他抗体(CR6261和F10)构成的相互作用性质明显不同。最显著的区别在于本发明抗体与HA上的疏水沟槽的相互作用仅由重链的CDR3(HCDR3)介导,而对于CR6261和F10而言,该结合中涉及所有三个HCDR。

[0040] 在一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的重链接触近端单体中的氨基酸残基,且本发明的抗体或抗原结合片段的轻链接触HA三聚体的近端单体和远端右侧单体二者中的氨基酸残基。本发明抗体接触的单体(即,近端单体和远端右侧单体)可未被切割,或其可被切割而形成HA1和HA2多肽。在一个实施例中,近端单体和远端右侧单体被切割。在另一个实施例中,近端单体和远端右侧单体未被切割。

[0041] 本发明的抗体和抗原结合片段特异性结合甲型流感病毒的16种亚型的16种不同HA中保守的表位。在一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段结合包含HA1中位置329处的氨基酸残基和HA2中位置1、2、3和4处的氨基酸残基的表位,其中HA1和HA2存在于HA三聚体的未切割单体中。

[0042] 在另一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的重链接触近端或远端右侧单体的HA1中位置318处的氨基酸残基和HA2中位置18、19、20、21、38、41、42、45、49、53和57处的氨基酸残基。这些单体可以是未被切割的或切割的。

[0043] 在又一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的轻链接触未被切割的近端单体的HA2中位置38、39和43处的氨基酸残基和未被切割的远端右侧单体的HA1中位置327、328和329处和HA2中位置1、2、3和4处的氨基酸残基。

[0044] 在又一个实施例中,本发明的抗体和抗原结合片段特异性结合包含未被切割的近端单体的HA1中位置318处的氨基酸残基和HA2中位置18、19、20、21、38、39、41、42、43、45、

48、49、53、56和57处的氨基酸残基的表位。另外,这些抗体特异性结合包含未被切割的远端右侧单体的HA1中位置327、328、329处的氨基酸残基和HA2多肽中位置1、2、3和4处的氨基酸残基的表位。

[0045] 在另一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段的轻链接触近端单体的HA2中位置38、39、42和46处的氨基酸残基和远端右侧单体的HA1中位置321和323处和HA2中位置7和11处的氨基酸残基。在该实施例中,近端和远端右侧单体二者均被切割。

[0046] 在又一个实施例中,本发明的抗体和抗原结合片段特异性结合包含切割的近端单体的HA1中位置318处的氨基酸残基和HA2中位置18、19、20、21、38、39、41、42、45、46、49、52、53和57处的氨基酸残基,以及被切割的远端右侧单体的HA1中位置321和323处的氨基酸残基和HA2中位置7和11处的氨基酸残基的表位。

[0047] 如本文所示,本发明的抗体或抗原结合片段能够特异性结合所有16种亚型的甲型流感病毒的HA。在一个实施例中,本发明的抗体特异性结合亚型H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15和H16的甲型流感HA。

[0048] 在本发明的另一个实施例中,本发明提供具有高生产滴度的抗体。举例而言,一旦分离本发明的两种极类似的抗体(FI6变体1和FI6变体2),就合成所述抗体的若干种变体(尤其是FI6变体2的变体)来改善在转染细胞中的产生。在一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以比产生FI6变体2的滴度高至少1.5倍的滴度在被转染的细胞中产生。在另一个实施例中,本发明的抗体以比产生FI6变体2的滴度高至少1.8、2、2.2、2.5、2.7、3、3.2、3.4、3.6、3.8、4、4.2、4.4、4.6、4.8、5、5.3、5.6或6倍的滴度产生。在一些实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段以比产生FI6变体2的滴度高至少3倍、至少4倍或至少4.5倍的滴度在被转染的细胞中产生。

[0049] 因此,在一个实施例中,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中和组1亚型和组2亚型的甲型流感病毒的感染并且特异性结合甲型流感HA三聚体的茎区中的表位,其中该抗体或其抗原结合片段的重链和轻链接触HA三聚体的第一近端单体和第二远端右侧单体中的氨基酸,且其中该抗体或其抗原结合片段在转染细胞中以比产生FI6变体2时的滴度高例如至少3倍的滴度产生。

[0050] 如本文所述,转染细胞可为本领域技术人员现在已知或后来发现用于表达编码本发明抗体的核酸序列的任何细胞。这样的细胞的例子包括但不限于哺乳动物宿主细胞,例如CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。此外,这些细胞可被瞬时转染或稳定转染。转染类型以及适用于转染的细胞类型在本领域技术人员的技能范围内。

[0051] 在另一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段特异性结合包含SEQ ID NO: 37、38、39或40中任一者的氨基酸序列的多肽。

[0052] 人单克隆抗体、分泌本发明抗体的永生化B细胞克隆或转染的宿主细胞以及编码本发明抗体的核酸也包括在本发明的范围内。如本文所用,术语“广谱特异性”用来指可结合和/或中和一种或多种组1亚型和一种或多种组2亚型的甲型流感病毒的本发明抗体或抗原结合片段。

[0053] 本发明的抗体或抗原结合片段中和一种或多种组1亚型(H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13和H16以及它们的变体)的甲型流感病毒和一种或多种组2亚型(H3、H4、H7、H10、H14和H15以及它们的变体)的甲型流感病毒。在一个实施例中,示例性的组1亚型包括

H1、H2、H5、H6和H9,示例性的组2亚型包括H3和H7。

[0054] 本发明的抗体和抗体片段能够中和甲型流感病毒亚型的各种组合。在一个实施例中,抗体可中和甲型流感病毒H1和H3亚型、或H2和H3亚型,或H3和H5亚型,或H3和H9亚型,或H1和H7亚型,或H2和H7亚型,或H5和H7亚型,或H7和H9亚型。

[0055] 在另一个实施例中,本发明的抗体和抗体片段可中和甲型流感病毒H1、H2和H3亚型,或H1、H3和H5亚型,或H1、H3和H9亚型,或H2、H3和H5亚型,或H2、H3和H9亚型,或H3、H5和H9亚型,或H1、H2和H7亚型,或H1、H5和H7亚型,或H1、H7和H9亚型,或H2、H5和H7亚型,或H2、H7和H9亚型,或H5、H7和H9亚型,或H1、H3和H7亚型,或H2、H3和H7亚型,或H3、H5和H7亚型,或H3、H7和H9亚型。

[0056] 在又一个实施例中,抗体可中和甲型流感病毒H1、H2、H3和H7亚型,或H1、H3、H5和H7亚型,或H1、H3、H7和H9亚型,或H2、H3、H5和H7亚型,或H2、H3、H7和H9亚型,或H3、H5、H7和H9亚型,或H1、H2、H3和H5亚型,或H1、H2、H3和H9亚型,或H1、H3、H5和H9亚型,或H2、H3、H5和H9亚型,或H1、H2、H5和H7亚型,或H1、H2、H7和H9亚型,或H1、H5、H7和H9亚型,或H2、H5、H7和H9亚型。

[0057] 在又一实施例中,本发明的抗体可中和甲型流感病毒H1、H2、H3、H5和H7亚型,或H1、H2、H3、H7和H9亚型,或H1、H3、H5、H7和H9亚型,或H2、H3、H5、H7和H9亚型,或H1、H2、H3、H5和H9亚型,或H1、H2、H5、H7和H9亚型,或H1、H2、H3、H5、H7和H9亚型。在又一个实施例中,除了中和甲型流感病毒H6亚型外,本发明的抗体和抗原结合片段还中和上述组合中的一者或多者。

[0058] 本发明的抗体和抗原结合片段具有高中和效价。中和50%甲型流感病毒所需要的本发明抗体的浓度可例如为约50 μ g/ml或更低。在一个实施例中,中和50%甲型流感病毒所需要的本发明抗体的浓度为约50、45、40、35、30、25、20、17.5、15、12.5、11、10、9、8、7、6、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5或约1 μ g/ml或更低。在另一个实施例中,中和50%甲型流感病毒所需要的本发明抗体的浓度为约0.9、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.075、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.008、0.006、0.004、0.003、0.002或约0.001 μ g/ml或更低。这意味着中和50%甲型流感病毒仅需低浓度的抗体。可使用本领域技术人员已知的标准中和测定法来测量特异性和效价。

[0059] 本发明提供对于HA具有特定广谱特异性且中和一种或多种组1的甲型流感病毒亚型和一种或多种组2的甲型流感病毒亚型的抗体。本发明的抗体结合HA的在选自组1和组2的两种或更多种甲型流感病毒亚型之间保守的区域中的表位。

[0060] 在一个实施例中,本发明提供抗体,例如分离的抗体或纯化的抗体,其特异性地结合组1和组2甲型流感病毒亚型的HA的茎区中的保守表位并且干扰病毒的复制和传播。本发明还提供抗体,例如分离的抗体或纯化的抗体,其特异性地结合组1和组2亚型的HA的茎区中的保守表位并抑制病毒进入细胞。不受任何理论约束,在一个示例性实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段结合甲型流感病毒的茎区中的保守表位并通过干扰融合步骤来抑制病毒进入细胞。在一个实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段通过募集补体和表达FcR的杀伤细胞并介导抗体依赖细胞毒性(antibody-dependent cell cytotoxicity,ADCC)来限制病毒传播。蛋白的表位或抗原决定簇对应于该分子为抗体的结合位点(或互补位)所特异性识别的那些部分。因此,表位是需要互补性互补位来进行它们的操作性识别的相关实体。

在蛋白的不同变体之间保守的表位是指相同的互补位能通过接触这些分子的相同部分而特异性地识别这些不同的变体。

[0061] 本发明的抗体可以是单克隆的,例如人单克隆抗体,或重组抗体。本发明还提供本发明抗体的片段,尤其是保留抗体的抗原结合活性的片段。尽管本说明书(包括权利要求书)在某些地方,明确是指抗体的抗原结合片段、抗体片段、变体和/或衍生物,但是应当理解,术语“抗体”或“本发明的抗体”包括所有的抗体类别,即抗体的抗原结合片段、抗体片段、变体和衍生物。

[0062] 在一个实施例中,本发明的抗体和抗体片段中和组1和组2的两种或更多种甲型流感病毒亚型的组合。示例性甲型流感病毒亚型包括但不限于H5N1(A/越南/1203/04)、H1N1(A/新喀里多尼亚/20/99)、H1N1(A/所罗门群岛/3/2006)、H3N2(A/怀俄明/3/03)和H9N2(A/鸡/香港/G9/97)。在另一个实施例中,抗体中和3、4、5、6、7或更多种组1和组2甲型流感病毒亚型的组合和/或对3、4、5、6、7或更多种组1和组2甲型流感病毒亚型的组合具特异性。

[0063] 在一个示例性实施例中,本发明包括对甲型流感病毒亚型H1和H3(例如H1N1和H3N2)或H1、H3、H5和H9(例如H1N1、H3N2、H5N1和H9N2)具特异性的抗体或其抗体片段。在又一个实施例中,抗体或其抗体片段对H1、H3、H5、H7和H9(例如H1N1、H3N2、H5N1、H7N1、H7N7、H9N2)具特异性。在本申请的前面部分提供了甲型流感病毒亚型的其他示例性组合。

[0064] 本发明的示例性抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的氨基酸序列的SEQ ID编号以及编码它们的核酸序列的SEQ ID编号列于表1中。

[0065] 表1:示例性甲型流感病毒中和抗体的V_H和V_L多肽和多核苷酸的SEQ ID编号

[0066]

	V _H 和V _L 多肽和多核苷酸的SEQ ID NO.			
	V _H 多肽	V _L 多肽	V _H 多核苷酸	V _L 多核苷酸
FI6 变体 1	13	14	15	16
FI6 变体 2	33	14	34	16
FI6 变体 3	55	57	56	58
FI6 变体 4	59	57	60	58
FI6 变体 5	59	61	60	62
FI28 变体 1	29	30	31	32
FI28 变体 2	35	30	36	32

[0067] 在一个实施例中,本发明的抗体或抗体片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:13、33、55、59、29或35任一者中所列的序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在另一个实施例中,本发明的抗体或抗体片段包含轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:14、57、61或30中所列的序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0068] 在又一个实施例中,本发明抗体的重链可变区可由这样的核酸编码,该核酸具有与SEQ ID NO:15、34、56、60、31或36任一者中所列的序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。在又一个实施例中,本发明抗体的轻链可变区可由这样的核酸编码,该核酸具有与SEQ ID NO:16、58、62或32中所列的序列具有约70%、75%、

80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。

[0069] 抗体重链的CDR分别称为CDRH1(或HCDR1)、CDRH2(或HCDR2)和CDRH3(或HCDR3)。相似地,抗体轻链的CDR分别称为CDRL1(或LCDR1)、CDRL2(或LCDR1)和CDRL3(或LCDR1)。CDR氨基酸的位置根据IMGT编号系统定义为:CDR1 IMGT位置27至38、CDR2 IMGT位置56至65和CDR3 IMGT位置105至117。

[0070] 表2分别提供了本发明的示例性抗体的重链和轻链的六个CDR的氨基酸序列的SEQ ID编号。

[0071] 表2:示例性甲型流感病毒中和抗体的CDR多肽的SEQ ID编号

[0072]

	CDR 多肽的 SEQ ID NO.					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FI6 变体 1	1	2	3	4	5	6
FI6 变体 2	1	2	3	4	5	6
FI6 变体 3	1	41	42	4	5	6
FI6 变体 4	1	41	43	4	5	6
FI6 变体 5	1	41	43	44	5	6
FI28 变体 1	17	18	19	20	21	22
FI28 变体 2	17	18	19	20	21	22

[0073] 在一个实施例中,本发明的抗体或抗体片段包含至少一个具有与SEQ ID NO:1-6、41-44或17-22任一者具有至少95%序列同一性的序列的CDR。

[0074] 在另一个实施例中,本发明提供包含这样的重链的抗体,该重链包含一个或多个(即一个、两个或所有三个)来自FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4、FI6变体5、FI28变体1或FI28变体2的重链CDR。在一个示例性实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链CDR1;具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链CDR2;和具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链CDR3。在某些实施例中,本文所提供的抗体或抗体片段包含这样的重链,该重链包含(i)用于CDRH1的SEQ ID NO:1、用于CDRH2的SEQ ID NO:2和用于CDRH3的SEQ ID NO:3,(ii)用于CDRH1的SEQ ID NO:1、用于CDRH2的SEQ ID NO:41和用于CDRH3的SEQ ID NO:42,(iii)用于CDRH1的SEQ ID NO:1、用于CDRH2的SEQ ID NO:41和用于CDRH3的SEQ ID NO:43,或(iv)用于CDRH1的SEQ ID NO:17、用于CDRH2的SEQ ID NO:18和用于CDRH3的SEQ ID NO:19。

[0075] 本发明还提供包括这样的轻链的抗体,该轻链包含一个或多个(即一个、两个或所有三个)来自FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4、FI6变体5、FI28变体1或FI28变体2的轻链CDR。在一个示例性实施例中,本发明的抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链CDR1;具有SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链CDR2;和具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链CDR3。在某些实施例中,本文所提供的抗体包含这样的轻链,该轻链包含(i)用于CDRL1的SEQ ID NO:4、用于CDRL2的SEQ ID NO:5和用于CDRL3的SEQ ID NO:6,或(ii)用于CDRL1的SEQ ID NO:44、用于CDRL2的SEQ ID NO:5和用于CDRL3的SEQ ID NO:6,或(iii)用于CDRL1

的SEQ ID NO:20、用于CDRL2的SEQ ID NO:21和用于CDRL3的SEQ ID NO:22。

[0076] 在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI6变体1的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI6变体2的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。在又一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI6变体3的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI6变体4的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。在另一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI6变体5的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。

[0077] 在又一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI28变体1的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。在又一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的抗体FI28变体2的所有CDR,并且中和甲型流感病毒感染。

[0078] 本发明抗体的例子包括但不限于FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4、FI6变体5、FI28变体1和FI28变体2。

[0079] 本发明还包括结合与本发明抗体相同的表位的抗体或其片段,或与本发明的抗体或抗原结合片段竞争的抗体。

[0080] 本发明的抗体还包括杂合抗体分子,该杂合抗体分子包含本发明抗体的一个或多个CDR和针对相同表位的另一抗体的一个或多个CDR。在一个实施例中,这样的杂合抗体包含本发明抗体的三个CDR和针对相同表位的另一抗体的三个CDR。示例性的杂合抗体包含i) 本发明抗体的三个轻链CDR和针对相同表位的另一抗体的三个重链CDR;或ii) 本发明抗体的三个重链CDR和针对相同表位的另一抗体的三个轻链CDR。

[0081] 变体抗体也包括在本发明的范围内。因此,在本申请中列举的序列的变体也包括在本发明的范围内。这类变体包括通过在免疫应答期间在体内或在培养永生B细胞克隆时在体外的体细胞突变产生的自然变体。或者,也可能因为遗传密码简并性而产生变体,如上所述,或由于转录或翻译错误而生成变体。

[0082] 抗体序列具有改善的亲合力和/或效价的其他变体可通过采用在本领域已知的方法来获得,并包括在本发明的范围内。例如,氨基酸置换可用于获得具有进一步改善的亲合力的抗体。或者,核苷酸序列的密码子优化也可用来改善用于产生抗体的表达系统中的翻译效率。此外,包含通过对本发明的任何核酸序列应用定向进化法而优化抗体特异性或中和活性的序列的多核苷酸也属于本发明的范围内。

[0083] 在一个实施例中,变体抗体序列可与本申请中所述的序列具有70%或更多(即75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多)的氨基酸序列同一性。在一些实施例中,这样的序列同一性是相对于参考序列(即本申请中所述的序列)的全长来计算的。在另外一些实施例中,本文中所提及的百分比同一性是使用BLAST版本2.1.3采用由NCBI(美国国家生物技术信息中心(the National Center for Biotechnology Information);<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)指定的默认参数[BIOsum62矩阵;缺口开放罚分(gap open penalty)=11和缺口延伸罚分(gap extension penalty)=1]所测定的。

[0084] 在另一方面,本发明还包括编码本发明抗体的轻链和重链以及CDR的部分或全部的核酸序列。本文所提供的是编码本发明的示例性抗体的轻链和重链以及CDR的部分或全

部的核酸序列。表1提供了编码本发明的示例性抗体的重链和轻链可变区的核酸序列的SEQ ID编号。例如,本文提供的核酸序列包括SEQ ID NO:15(编码FI6变体1重链可变区)、SEQ ID NO:16(编码FI6变体1和FI6变体2轻链可变区)、SEQ ID NO:34(编码FI6变体2重链可变区)、SEQ ID NO:56(编码FI6变体3重链可变区)、SEQ ID NO:58(编码FI6变体3和FI6变体4轻链可变区)、SEQ ID NO:60(编码FI6变体4和FI6变体5重链可变区)、SEQ ID NO:62(编码FI6变体5轻链可变区)、SEQ ID NO:31(编码FI28变体1重链可变区)、SEQ ID NO:36(编码FI28变体2重链可变区)和SEQ ID NO:32(编码FI28变体1和变体2轻链可变区)。

[0085] 表3提供了编码本发明的示例性抗体的CDR的核酸序列的SEQ ID 编号。由于遗传密码的冗余,将存在这些序列的编码相同氨基酸序列的变体。

[0086] 表3:示例性的甲型流感病毒中和抗体的CDR多核苷酸的SEQ ID编号:

[0087]

	CDR 多核苷酸的 SEQ ID NO.					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FI6 变体 1	7	8	9	10	11	12
FI6 变体 2	7	8	9	10	11	12
FI6 变体 3	45	46	47	48	49	50
FI6 变体 4	51	52	53	48	49	50
FI6 变体 5	51	52	53	54	49	50
FI28 变体 1	23	24	25	26	27	28
FI28 变体 2	23	24	25	26	27	28

[0088] 在一个实施例中,根据本发明的核酸序列包括与编码本发明抗体的重链或轻链的核酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的核酸序列。在另一个实施例中,本发明的核酸序列具有编码本发明抗体的重链或轻链CDR的核酸序列。例如,根据本发明的核酸序列包含与SEQ ID NO:7-12、15、16、34、23-28、31、32、36、45-54、56、58、60或62的核酸序列具至少75%同一性的序列。

[0089] 在本发明的范围内还包括包含根据本发明的核酸序列的载体,例如表达载体。用这样的载体转化的细胞也包括在本发明的范围内。这样的细胞的例子包括但不限于真核细胞,例如酵母细胞、动物细胞或植物细胞。在一个实施例中,细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0090] 本发明还涉及结合能够结合本发明抗体的表位的单克隆抗体,包括但不限于选自FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4、FI6变体5、FI28变体1和FI28变体2的单克隆抗体。

[0091] 单克隆和重组抗体对于其所针对的个别多肽或其它抗原的鉴定和纯化特别有用。本发明的抗体还有另外的效用,其中它们可用作免疫测定法、放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)中的试剂。在这些应用中,可以用诸如放射性同位素、荧光分子或酶之类的分析上可检测的试剂来标记抗体。这些抗体还可用于抗原的分子鉴定和表征(表位作图)。

[0092] 本发明的抗体可与药物偶联用于递送至治疗位点或与可检测标记偶联以有助于包含所关注细胞(如甲型流感病毒感染的细胞)的位点的成像。使抗体与药物和可检测标记

偶联的方法在本领域中是已知的,同样采用可检测标记进行成像的方法在本领域中也是已知的。经标记的抗体可通过采用各种标记而用于各种测定中。在本发明抗体和所关注表位(甲型流感病毒表位)之间形成的抗体-抗原复合物的检测可以通过将可检测物质附连至抗体来促进。合适的检测手段包括使用诸如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、色原体、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基(prosthetic group)复合物、自由基、粒子、染料等之类的标记。合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、二氯三嗪基氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子是鲁米诺(luminol);生物发光材料的例子包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;合适的放射性材料的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。这样的标记试剂可用于多种已知的测定法中,例如放射免疫测定法、酶免疫测定法(如ELISA)、荧光免疫测定法等。(参见如US 3,766,162、US 3,791,932、US 3,817,837和US 4,233,402)。

[0093] 根据本发明的抗体可以与诸如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子或放射性同位素之类的治疗部分缀合。放射性同位素的例子包括但不限于 I-131 、 I-123 、 I-125 、 Y-90 、 Re-188 、 Re-186 、 At-211 、 Cu-67 、 Bi-212 、 Bi-213 、 Pd-109 、 Tc-99 、 In-111 等。这类抗体缀合物可被用于修饰给定的生物应答;不应将药物部分理解为仅限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质或多肽。例如,这类蛋白质可包括诸如相思豆毒素、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌(pseudomonas)外毒素或白喉毒素之类的毒素。

[0094] 将这类治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的。参见例如Arnon等人(1985)“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Reisfeld等人编辑(Alan R.Liss公司),第243-256页;Hellstrom等人编辑(1987)“Antibodies for Drug Delivery”,载于Controlled Drug Delivery,Robinson等人编辑(第2版;马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker,Inc.)),第623-653页;Thorpe(1985)“Antibodies Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:A Review”,载于Monoclonal Antibodies'84:Biological and Clinical Applications,Pinchera等人编辑,第475-506页(Editrice Kurtis,意大利米兰(Milano,Italy),1985);“Analysis,Results,and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy,Baldwin等人编辑(纽约学术出版社(Academic Press,New York),1985),第303-316;和Thorpe等人(1982)Immunol.Rev.《免疫学评论》62:119-158。

[0095] 或者,抗体或其抗体片段可与第二抗体或其抗体片段缀合以形成如在US 4,676,980中描述的抗体异源缀合物(heteroconjugate)。此外,在标记与本发明抗体之间可使用连接物(例如US 4,831,175)。抗体或其抗原结合片段可直接用放射性碘、铟、钷或本领域中已知的其它放射性粒子来标记(例如US 5,595,721)。治疗可由同时或相继地施用缀合抗体和非缀合抗体的治疗组合组成(例如W000/52031;W000/52473)。

[0096] 本发明的抗体还可被附连至固体支持物。另外,本发明的抗体或其功能性抗体片段可通过与聚合物共价缀合来进行化学修饰以例如增加其循环半衰期。聚合物的例子以及将它们附连至肽的方法在US4,766,106、US 4,179,337、US 4,495,285和US 4,609,546中示

出。在一些实施例中,这些聚合物可选自聚氧乙基化多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG在室温下溶于水且具有通式: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$,其中R可以是氢、或诸如烷基或烷醇基之类的保护基团。在一个实施例中,保护基团可具有1至8个碳原子。在另一个实施例中,保护基团为甲基。符号n为正整数。在一个实施例中,n为1至1,000。在另一个实施例中,n为2至500。在一个实施例中,PEG具有1,000至40,000的平均分子量。在另一个实施例中,PEG具有2,000至20,000的平均分子量。在又一个实施例中,PEG具有3,000至12,000的平均分子量。在一个实施例中,PEG具有至少一个羟基。在另一个实施例中,PEG具有末端羟基。在又一个实施例中,该末端羟基被活化来与抑制剂上的游离氨基反应。然而,应当理解,可以改变反应性基团的种类和数量来获得共价缀合的PEG/本发明抗体。

[0097] 水溶性的聚氧乙基化多元醇也可用于本发明。它们包括聚氧乙基化山梨醇、聚氧乙基化葡萄糖、聚氧乙基化甘油(POG)等。在一个实施例中,使用POG。不受任何理论的约束,由于聚氧乙基化甘油的甘油主链与在例如动物和人中的甘油单酯、二酯和三酯的天然主链相同,因此这种变化不一定在体内被看作外来物质。在一些实施例中,POG具有与PEG相同范围内的分子量。另一种可用于增加循环半衰期的药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法在Gabizon等人(1982)、Cafiso(1981)和Szoka(1980)中有所论述。其它药物递送系统是本领域已知的,并在例如引用的Poznansky等人(1980)和Poznansky(1984)中有所描述。

[0098] 本发明的抗体可以纯化形式提供。通常,抗体将存在于实质上不含其它多肽的组合物中,例如其中少于90重量%、通常少于60重量%以及更常见地少于50重量%的组成是由其它多肽构成的。

[0099] 本发明的抗体可以在非人(或异源)宿主例如小鼠中是免疫原性的。特别是,抗体可具有在非人宿主中是免疫原性的、而在人宿主中是非免疫原性的独特位(idiotope)。用于人的本发明抗体包括不易从诸如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等之类的宿主分离、并通常不能通过人源化或从异种-小鼠(xeno-mice)获得的抗体。

[0100] 本发明的抗体可以是任何同种型(例如IgA、IgG、IgM,即 α 、 γ 或 μ 重链),但一般将为IgG。在IgG同种型中,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。本发明的抗体可具有 κ 或 λ 轻链。

[0101] 抗体的制备

[0102] 根据本发明的抗体可以用本领域中已知的任何方法来制备。例如采用杂交瘤技术制备单克隆抗体的常用方法是已知的(Kohler,G.和Milstein,C,1975;Kozbar等人1983)。在一个实施例中,使用在W02004/076677中描述的备选EBV永生生化方法。

[0103] 使用W02004/076677中描述的方法,可在多克隆B细胞激活物的存在下用EBV转化产生本发明抗体的B细胞。用EBV转化是标准技术,并可容易地适应于包括多克隆B细胞激活物。

[0104] 任选地,在转化步骤中可加入另外的细胞生长和细胞分化的刺激物以进一步提高效率。这些刺激物可以是诸如IL-2和IL-15之类的细胞因子。在一方面,在永生生化步骤期间加入IL-2以进一步改善永生生化效率,但是其使用并非必需的。然后,可采用本领域中已知的方法来培养使用这些方法制备的永生生化B细胞,并将抗体从其中分离。

[0105] 使用英国专利申请0819376.5中描述的方法,可在微孔培养板中培养单浆细胞。可

以从单浆细胞培养物中分离抗体。另外,可以从单浆细胞培养物中提取RNA,并可以采用本领域中已知的方法进行单细胞PCR。可通过RT-PCR扩增抗体的VH和VL区、测序并克隆进表达载体中,随后将该表达载体转染进HEK 293 T细胞或其它宿主细胞中。可以采用本领域技术人员已知的任何方法来完成表达载体中的核酸的克隆、宿主细胞的转染、转染的宿主细胞的培养以及所产生的抗体的分离。

[0106] 如果需要,可采用过滤、离心和各种色谱法(例如HPLC或亲和色谱法)进一步纯化抗体。抗体如单克隆抗体的纯化技术(包括制备药物级抗体的技术)是本领域已知的。

[0107] 本发明的抗体片段可通过包括用诸如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶之类的酶消化和/或通过化学还原切割二硫键的方法从抗体中获得。或者,抗体片段可通过克隆和表达重链或轻链的序列的一部分来获得。抗体“片段”可包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明还涵盖源自本发明抗体的重链和轻链的单链Fv片段(scFv),例如本发明包括含有本发明抗体的CDR的scFv。还包括的是重链或轻链单体和二聚体、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体,例如其中重链和轻链可变域由肽连接物接合的单链Fv。

[0108] 本发明的抗体片段可赋予单价或多价相互作用并且可包含在上述的多种结构中。例如,可以合成scFv分子来产生三价的“三链抗体”或四价的“四链抗体”。scFv分子可包括导致二价微抗体(minibody)的Fc区的结构域。此外,本发明的序列可以是多特异性分子的组分,其中本发明的序列靶向本发明的表位并且分子的其它区结合其它靶标。示例性分子包括但不限于双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、双特异性scFv和双链抗体(Holliger和Hudson,2005,Nature Biotechnology(《自然生物技术》)9:1126-1136)。

[0109] 分子生物学的标准技术可以用于制备编码本发明的抗体或抗体片段的DNA序列。可以采用寡核苷酸合成技术完全地或部分地合成所需的DNA序列。也可以视情况而定使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0110] 任何合适的宿主细胞/载体系统都可以用来表达编码本发明的抗体分子或其片段的DNA序列。细菌(例如大肠杆菌)和其它微生物系统可以部分地用于表达抗体片段如Fab和F(ab')₂片段,以及尤其是Fv片段和单链抗体片段例如单链Fv。真核(如哺乳动物)宿主细胞表达系统可用于制备包括完整抗体分子在内的较大抗体分子。合适的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0111] 本发明还提供用于制备根据本发明的抗体分子的方法,包括在适于导致从编码本发明抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养包含编码本发明核酸的载体的宿主细胞并分离抗体分子。

[0112] 抗体分子可仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下,仅需要将重链或轻链多肽编码序列用于转染宿主细胞。对于包含重链和轻链二者的产物的制备,可以用两种载体转染细胞系,其中第一载体编码轻链多肽而第二载体编码重链多肽。或者,可以使用单种载体,该载体包含编码轻链和重链多肽的序列。

[0113] 或者,本发明的抗体可以通过如下步骤来制备:i)在宿主细胞中表达根据本发明的核酸序列,以及ii)分离所表达的抗体产物。另外,该方法还可包括iii)纯化抗体。

[0114] 转化的B细胞、培养的单浆细胞和转染的HEK293T细胞的筛选

[0115] 可从转化的B细胞和培养的单浆细胞筛选产生具有所需特异性或功能的抗体的那些。

[0116] 筛选步骤可通过如下方法来完成：任何免疫测定例如ELISA；对组织或细胞（包括转染的细胞）染色；中和测定法；或本领域已知的用于鉴定所需特异性或功能的多种其它方法中的一种。测定法可基于一种或多种抗原的简单识别来选取；或者还可以基于所需的功能来选取，例如用以选择中和抗体而不仅仅是抗原结合抗体，用以选择可改变被靶向细胞的特性的抗体，所述特性为了让它们的信号级联、它们的形状、它们的生长速率、它们影响其它细胞的能力、它们对来自其它细胞或其它试剂或条件改变的影响的响应、它们的分化状态等。

[0117] 然后可从阳性的转化B细胞培养物产生单独的转化B细胞克隆。用于从阳性细胞的混合物分离单独的克隆的克隆步骤可通过使用有限稀释、显微操作术、通过细胞分选的单细胞沉积或本领域已知的另一种方法来进行。

[0118] 可使用本领域已知的方法将来自培养的单浆细胞的核酸进行分离、克隆并在HEK293T细胞或其它宿主细胞中表达。

[0119] 本发明的永生化B细胞克隆或转染的HEK293T细胞可以多种方式使用，例如作为单克隆抗体的来源、作为编码所关注的单克隆抗体的核酸（DNA或mRNA）的来源、用于科研等。

[0120] 本发明提供组合物，该组合物包含产生中和选自组1和组2亚型的至少两种不同的甲型流感病毒亚型的抗体的永生化B记忆细胞或转染的宿主细胞。

[0121] 表位

[0122] 如上所述，本发明的抗体可用于对该抗体结合的表位进行作图。本发明人已经发现，中和甲型流感病毒感染的抗体针对在HA上发现的表位。在一个实施例中，抗体针对HA的茎区中的一个或多个表位，所述表位在一种或多种甲型流感病毒组1和组2亚型中是保守的。本发明抗体结合的表位可以是线性的（连续的）或构象性的（不连续的）。在一个实施例中，如本文所论述的，本发明的抗体和抗体片段结合包含SEQ ID NO:37、38、39或40的多肽区。

[0123] 在另一个实施例中，本发明抗体结合的表位包含如上所述的一个或两个HA单体的HA1和HA2多肽中的氨基酸残基。HA单体可以是未被切割或被切割的。

[0124] 由本发明抗体识别的表位可具有多种用途。纯化或合成形式的表位及其模拟表位可用于引起免疫应答（即作为疫苗、或用于制备其它用途的抗体）或用于从血清筛选与表位或其模拟表位发生免疫反应的抗体。在一个实施例中，这样的表位或模拟表位、或包含这样的表位或模拟表位的抗原可以被用作疫苗用于引起免疫应答。本发明的抗体或抗体片段还可以用于监测疫苗质量的方法。具体地讲，该抗体可用于检测疫苗中的抗原是否含有具有正确构象的正确免疫原性表位。

[0125] 该表位还可以用于筛选结合所述表位的配体。这类配体包括但不限于抗体（包括来自骆驼、鲨鱼和其它物种的那些抗体）、抗体片段、肽、噬菌体展示技术产物、适体、adnectin或其它病毒或细胞蛋白的片段，可以封闭表位并因此预防感染。这些配体涵盖在本发明的范围内。

[0126] 重组表达

[0127] 本发明的永生化B细胞克隆或培养的浆细胞还可以用作核酸来源，该核酸来源用于克隆抗体基因以用于随后的重组表达。用于药物目的时，从重组来源表达比从B细胞或杂交瘤表达更常见，例如因为稳定性、再现性、培养容易度等原因。

[0128] 因此,本发明提供制备重组细胞的方法,包括如下步骤:(i)从B细胞克隆或培养的单浆细胞获得一种或多种编码所关注抗体的核酸(例如,重链和/或轻链mRNA);(ii)将该核酸插入表达载体中以及(iii)将该载体转染入宿主细胞中以允许在该宿主细胞中表达所关注的抗体。

[0129] 相似地,本发明提供制备重组细胞的方法,包括如下步骤:(i)对来自B细胞克隆或培养的单浆细胞的编码所关注抗体的核酸测序;以及(ii)使用来自步骤(i)的序列信息制备用于插入进宿主细胞中以允许在该宿主细胞中表达所关注抗体的核酸。可以(但不是必需)在步骤(i)和步骤(ii)之间操纵该核酸以引入限制位点、改变密码子使用和/或优化转录和/或翻译调节序列。

[0130] 本发明还提供制备转染宿主细胞的方法,包括用一种或多种编码所关注抗体的核酸转染宿主细胞的步骤,其中该核酸是源自本发明的永生化的B细胞克隆或培养的单浆细胞的核酸。因此,先制备核酸并然后用其转染宿主细胞的程序可以在不同的时间、由不同的人员、在不同的地点(例如,在不同的国家)来进行。

[0131] 然后本发明的这些重组细胞可用于表达和培养目的。它们尤其可用于表达用于大规模药物制备的抗体。它们还可以用作药物组合物的活性成分。可以使用任何合适的培养技术,包括但不限于静置培养、滚瓶培养、腹水、中空纤维型生物反应器盒、模块化微型发酵器、搅拌槽、微载体培养、陶瓷芯灌注等。

[0132] 从B细胞或浆细胞中获得免疫球蛋白基因并对其进行测序的方法是本领域已知的(例如,参见Kuby Immunology,第4版的第4章,2000)。

[0133] 转染的宿主细胞可以是真核细胞,包括酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(例如CHO细胞、NS0细胞、诸如PER.C6(Jones等人2003)或HKB-11(Cho等人2001;Cho等人2003)之类的人细胞、骨髓瘤细胞(US 5,807,715;US 6,300,104等))以及植物细胞。优选的表达宿主可使本发明的抗体糖基化,特别是用在人体内其本身并非免疫原性的碳水化合物结构进行糖基化。在一个实施例中,转染的宿主细胞可以能够在没有血清的培养基中生长。在另一个实施例中,转染的宿主细胞可以能够在不存在动物衍生的产物的培养物中生长。可培养转染的宿主细胞以产生细胞系。

[0134] 本发明提供制备一种或多种编码所关注的抗体的核酸分子(例如,重链和轻链基因)的方法,包括如下步骤:(i)制备根据本发明的永生化的B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)从B细胞克隆或培养的单浆细胞获得编码所关注的抗体的核酸。本发明还提供获得编码所关注的抗体的核酸序列的方法,包括如下步骤:(i)制备根据本发明的永生化的B细胞克隆或培养单浆细胞;(ii)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码所关注的抗体的核酸进行测序。

[0135] 本发明还提供制备编码所关注的抗体的核酸分子的方法,包括获得从本发明的转化B细胞克隆或培养浆细胞中获得的核酸的步骤。因此,先获得B细胞克隆或培养的浆细胞,然后从B细胞克隆或培养的浆细胞获得核酸的程序可以在不同的时间、由不同的人员、在不同的地点(例如在不同的国家)来进行。

[0136] 本发明提供制备抗体(例如,用于药物用途)的方法,包括如下步骤:(i)从表达所关注的抗体的选定B细胞克隆或培养的浆细胞获得一种或多种核酸(例如,重链和轻链基因)和/或对其测序;(ii)将该核酸插入表达载体中或使用该核酸序列来制备表达载体;(iii)转染可表达所关注的抗体的宿主细胞;(iv)在所关注的抗体被表达的条件下培养或

传代培养转染的宿主细胞;以及任选地,(v)纯化所关注的抗体。

[0137] 本发明还提供制备抗体的方法,包括如下步骤:在所关注的抗体被表达的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞群体;以及任选地,纯化所关注的抗体,其中所述转染的宿主细胞群体通过如下制备:(i)提供编码所选择的所关注抗体的核酸,该核酸由如上所述制备的B细胞克隆或培养的浆细胞产生,(ii)将该核酸插入进表达载体中,(iii)在可表达所关注的抗体的宿主细胞中转染载体,以及(iv)培养或传代培养包含插入的核酸的转染宿主细胞以产生所关注的抗体。因此,先制备重组宿主细胞、然后培养重组宿主细胞以表达抗体的程序可在不同的时间、由不同的人员、在不同的地点(例如在不同的国家)来进行。

[0138] 药物组合物

[0139] 本发明提供药物组合物,其含有本发明的抗体和/或抗体片段和/或编码这类抗体的核酸和/或由本发明抗体识别的表位。药物组合物还可含有药学上可接受的载体以允许施用。载体本身不应该诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体且不应有毒。合适的载体可以是大的、代谢缓慢的大分子如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物和非活性病毒粒子。

[0140] 可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐(如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐),或有机酸盐(如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐)。

[0141] 治疗组合物中的药学上可接受的载体可以另外含有液体如水、盐水、甘油和乙醇。此外,这样的组合物中也可以存在辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质。这样的载体使得药物组合物能被制成供受试者摄取的片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂和混悬剂。

[0142] 在本发明的范围内,施用形式可包括适用于非肠道施用(例如通过注射或输注,例如弹丸注射或持续灌注)的形式。当产物用于注射或输注时,可以采用在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以含有调配剂,如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体分子可以是干粉形式,用于在使用前与适当的无菌液体复配。

[0143] 一旦配制好,本发明的组合物就可以直接施用给受试者。在一个实施例中,使组合物适合施用给人受试者。

[0144] 本发明的药物组合物可以通过多种途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、腹腔内、鞘内、心室内、透皮、经皮、局部、皮下、鼻内、肠道、舌下、阴道内或直肠途径。无针注射剂(Hyposprays)也可以用来施用本发明的药物组合物。通常,治疗组合物可被制成液体溶液或悬浮液形式的可注射剂。也可以制备适合在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。

[0145] 组合物的直接递送一般通过皮下、腹腔内、静脉内或肌内注射来完成,或递送至组织的细胞间隙。也可以将组合物施用进病变部位。剂量治疗可以是单剂量给药方案或多剂量给药方案。已知的基于抗体的药物可提供关于例如是否应该每天、每周、每月等递送药物的施用频率的指导。频率和剂量还取决于症状的严重程度。

[0146] 本发明的组合物可以制成各种形式。例如,组合物可以制成液体溶液或悬浮液形式的可注射剂。也可以制备适合在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式(例如冻干的组合物,如Synagis 和Herceptin,以供与含有防腐剂的无菌水复配)。组合物可以制成例如软膏、乳膏或粉末形式以供局部施用。组合物可以制成例如片剂或胶囊剂、喷雾剂或糖

浆剂(任选经调味的)形式以供口服施用。使用细粉末或喷雾剂,可以将组合物制成例如吸入剂形式以供肺部施用。组合物可以制成栓剂或阴道栓剂形式。组合物可以制成例如滴剂形式以供鼻部、耳部或眼部施用。组合物可以采用试剂盒的形式,对其进行设计从而使得可以在临向受试者施用前复配组合的组合物。例如,冻干的抗体可以与无菌水或无菌缓冲液一起以试剂盒的形式提供。

[0147] 应当理解,组合物中的活性成分将会是抗体分子、抗体片段或其变体和衍生物。因此,组合物将易于在胃肠道中降解。因此,如果组合物是通过使用胃肠道的途径来施用,则组合物将需要含有保护抗体免于降解、但一旦抗体从肠胃道中被吸收就释放抗体的物质。

[0148] 关于药学上可接受的载体的深入论述请参见Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy (《雷明顿: 药学科学与实践》), 第20版, ISBN: 0683306472。

[0149] 本发明的药物组合物一般具有5.5至8.5的pH, 在一些实施例中, 该pH可以为6至8, 在其他实施例中约为7。可以通过使用缓冲液来维持pH。组合物可以是无菌的和/或不含热原的。对于人而言, 组合物可以是等渗的。在一个实施例中, 本发明的药物组合物是在密闭的容器中提供的。

[0150] 药物组合物将包含有效量的一种或多种本发明的抗体和/或包含结合本发明抗体的表位的多肽, 即足以治疗、改善或预防期望的疾病或病症或足以显示出可检测的疗效的量。疗效还包括身体症状的缓解。对于任何特定受试者而言, 精确的有效量将取决于他们的体重与健康状况、症状的性质和严重程度以及选择施用的治疗剂或治疗剂组合。给定情形下的有效量由常规实验来确定并在临床医生的判断能力之内。为本发明的目的, 对个体所施用的本发明组合物的有效剂量一般为约0.01mg/kg至约50mg/kg或约0.05mg/kg至约10mg/kg。已知的基于抗体的药物提供关于这方面的指导, 例如Herceptin是通过静脉输注21mg/ml的溶液来施用, 初始给药剂量为4mg/kg体重, 每周维持剂量为2mg/kg体重; Rituxan是每周以375mg/m²施用等。

[0151] 在一个实施例中, 组合物可包括不止一种(如, 2种、3种等)本发明的抗体以提供累加或协同疗效。在另一个实施例中, 组合物可包含一种或多种(如, 2种、3种等)本发明的抗体和一种或多种(如, 2种、3种等)对抗甲型流感病毒或乙型流感病毒的另外的抗体。例如, 一种抗体可结合HA表位, 而另一种抗体可结合HA上的不同表位, 或者结合神经氨酸酶和/或基质蛋白上的表位。此外, 本发明的抗体与甲型流感疫苗或与对非甲型流感病毒的病毒(例如乙型流感病毒)具特异性的抗体一起施用都在本发明的范围内。本发明的抗体可以与流感疫苗或与对非甲型流感病毒具特异性的抗体组合/同时或在不同时间施用。

[0152] 在另一个实施例中, 本发明提供包含两种或更多种抗体的药物组合物, 其中第一抗体是本发明的抗体且对HA表位具有特异性, 而第二抗体对于神经氨酸酶表位、第二HA表位和/或基质表位具有特异性。例如, 本发明提供包含两种或更多种抗体的药物组合物, 其中第一抗体对于甲型流感病毒HA的茎区中的表位具有特异性, 而第二抗体对于神经氨酸酶表位、第二HA表位(例如, HA的球形头部中的表位、HA的茎区中的第二表位)和/或基质表位具有特异性。甲型流感病毒HA的茎区中的第二表位或球形头部中的表位可以(但不必需)在一种以上的甲型流感病毒亚型中是保守的。

[0153] 在又一个实施例中, 本发明提供包含两种或更多种抗体的药物组合物, 其中第一

抗体对于神经氨酸酶表位具有特异性,而第二抗体对于第二神经氨酸酶表位、HA表位和/或基质表位具有特异性。

[0154] 在又一个实施例中,本发明提供包含两种或更多种抗体的药物组合物,其中第一抗体对于基质表位具有特异性,而第二抗体对于第二基质表位、HA上的表位和/或神经氨酸酶上的表位具有特异性。

[0155] 对于甲型流感病毒靶标蛋白具有特异性的本发明的示例性抗体包括但不限于FI6变体1、FI6变体2、FI6变体3、FI6变体4、FI6变体5、FI28变体1或FI28变体2。

[0156] 在一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI6变体1或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在另一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI6变体2或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在另一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI6变体3或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在另一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI6变体4或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在另一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI6变体5或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在又一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI28变体1或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在又一个实施例中,本发明提供药物组合物,其包含抗体FI28变体2或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0157] 本发明的抗体可以与其它治疗剂如化疗化合物、放疗等一起施用(组合施用或独立地施用)。在一个实施例中,治疗化合物包括诸如Tamiflu之类的抗病毒化合物。相对于单独施用的单一治疗剂而言,这样的组合疗法可提供累加或协同改善的疗效。术语“协同”用来描述两种或更多种活性剂的组合效果比每一各自活性剂单独效果的总和要大。因此,如果两种或更多种作用剂的组合效果导致活性或过程的“协同抑制”,则是指对活性或过程的抑制要比每一各自活性剂的抑制效果的总和要大。术语“协同疗效”是指两种或更多种疗法组合时所观察到的疗效,其中该疗效(如通过多个参数中的任一个所测量的)要比各单独疗法时所观察到的单独疗效的总和要大。

[0158] 抗体可施用给先前对于甲型流感病毒感染的治疗没有应答(即对于抗流感治疗显示具耐受性)的那些受试者。这种治疗可包括先前用抗病毒剂进行的治疗。这可能是因为例如感染了甲型流感病毒的抗病毒抗性菌株。

[0159] 在一个实施例中,本发明的组合物可以包括本发明的抗体,其中抗体可以占组合物中总蛋白质的至少50重量%(例如60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%、95重量%、97重量%、98重量%、99重量%或更多)。在这样的组合物中,抗体是纯化形式。

[0160] 本发明提供制备药物的方法,包括如下步骤:(i)制备本发明的抗体;以及(ii)将纯化的抗体与一种或多种药学上可接受的载体混合。

[0161] 本发明还提供制备药物的方法,包括将抗体与一种或多种药学上可接受的载体混合的步骤,其中所述抗体是从本发明的转化B细胞或培养的浆细胞获得的单克隆抗体。因此,先获得单克隆抗体、然后制备药物的程序可在不同的时间、由不同的人员、在不同的地点(如在不同的国家)来进行。

[0162] 作为递送抗体或B细胞以用于治疗目的的备选,可以向受试者递送编码源自B细胞或培养的浆细胞的所关注的单克隆抗体(或其活性片段)的核酸(通常为DNA),以使得核酸可以在受试者体内进行原位表达从而提供所需要的疗效。合适的基因疗法和核酸递送载体

是本领域已知的。

[0163] 本发明的组合物可以是免疫原性组合物,并且在一些实施例中可以是包含含有由本发明的抗体所识别的表位的抗原的疫苗组合物。根据本发明的疫苗可以是预防性的(即预防感染)或者是治疗性的(即治疗感染)。在一个实施例中,本发明提供包含具有SEQ ID NO:37、38、39或40的氨基酸序列的多肽的疫苗。在另一个实施例中,本发明提供包含具有一种或两种如上所述的HA单体的HA1和HA2多肽中的氨基酸残基的多肽的疫苗。HA单体可以是未被切割的或被切割的。

[0164] 组合物可以包含抗微生物剂,特别是在以多剂量形式包装时。它们可以包含去垢剂,例如Tween(聚山梨醇酯),例如Tween 80。去垢剂通常以低水平存在,如<0.01%。组合物还可以包含钠盐(如氯化钠)以提供张度。NaCl的典型浓度为10+2mg/ml。

[0165] 此外,组合物可包含例如15-30mg/ml左右(如25mg/ml)的糖醇(如甘露醇)或二糖(如蔗糖或海藻糖),特别是这些组合物要被冻干或者它们包含已经由冻干材料复配的材料时。可将用于冻干的组合物的pH在冻干之前调节至约6.1。

[0166] 本发明的组合物还可以包含一种或多种免疫调节剂。在一个实施例中,一种或多种免疫调节剂包括佐剂。

[0167] 本发明的表位组合物可引发细胞介导的免疫应答以及体液免疫应答以有效地对抗甲型流感病毒感染。这种免疫应答可以诱导持久的(如中和)抗体和在暴露于甲型流感病毒时可以迅速应答的细胞介导的免疫性。

[0168] 医学治疗和用途

[0169] 本发明的抗体和抗体片段或其衍生物和变体可用于甲型流感病毒感染的治疗、甲型流感病毒感染的预防或甲型流感病毒感染的诊断。

[0170] 诊断方法可以包括使抗体或抗体片段与样品接触。这些样品可以从例如鼻腔通道、鼻窦腔、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾、耳、眼、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、大脑或皮肤提取的组织样品。诊断的方法还可包括抗原/抗体复合物的检测。

[0171] 因此,本发明提供(i)根据本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物;(ii)根据本发明的永生B细胞克隆;(iii)能够结合本发明抗体的表位或(iv)配体,优选为能够结合这样的表位的抗体,该表位结合用于疗法中的本发明抗体。

[0172] 本发明还提供治疗受试者的方法,包括向受试者施用根据本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物,或配体,优选能够结合这样的表位的抗体,该表位结合本发明的抗体。在一个实施例中,该方法使得受试者中甲型流感病毒的感染减少。在另一个实施例中,该方法预防、减少受试者中的甲型流感病毒感染的风险或延迟受试者中的甲型流感病毒感染。

[0173] 本发明还提供(i)根据本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物;(ii)根据本发明的永生B细胞克隆;(iii)能够结合本发明抗体的表位;或(iv)配体,优选结合能够结合本发明抗体的表位的抗体,在制造用于预防或治疗甲型流感病毒感染的药物中的用途。

[0174] 本发明提供用作预防或治疗甲型流感病毒感染的药物的本发明的组合物。本发明还提供本发明的抗体和/或包含该抗体结合的表位的蛋白质在制备用于治疗受试者和/或诊断受试者的药物中的用途。本发明还提供治疗受试者的方法,包括向受试者施用本发明组合物的步骤。在一些实施例中,受试者可以是人。一种检查治疗处理的功效的方法包括在

施用本发明组合物之后监测疾病症状。治疗可以采用单剂量给药方案或多剂量给药方案。

[0175] 在一个实施例中,向需要这种治疗的受试者施用根据本发明的抗体、抗体片段、永生B细胞克隆、表位或组合物。这样的受试者包括但不限于尤其是存在甲型流感病毒感染风险或易于被甲型流感病毒感染的受试者,包括例如免疫功能低下的受试者。本发明的抗体或抗体片段也可用于被动免疫或主动免疫。

[0176] 本发明中所述的抗体及其片段也可以用于诊断甲型流感病毒感染的试剂盒中。此外,能够结合本发明抗体的表位可用于试剂盒中用以通过检测保护性抗甲型流感病毒抗体的存在来监测疫苗接种程序的功效。本发明所述的抗体、抗体片段或其变体和衍生物也可用于试剂盒中用以监测具有所需免疫原性的疫苗生产。

[0177] 本发明还提供制备药物的方法,包括将单克隆抗体与一种或多种药学上可接受的载体混合的步骤,其中所述单克隆抗体是从本发明的转染宿主细胞中获得的单克隆抗体。因此,先获得(例如,通过表达和/或纯化)单克隆抗体、然后将单克隆抗体与药物载体混合的程序可在不同的时间、由不同的人、在不同的地点(例如,在不同的国家)来进行。

[0178] 从本发明的转化B细胞或培养的浆细胞开始,可进行培养、传代培养、克隆、亚克隆、测序、核酸制备等的多个步骤以使由转化B细胞或培养的浆细胞表达的抗体永生,其中在每个步骤任选进行优化。在一个优选实施例中,上述方法还包括应用于编码抗体的核酸的优化技术(例如,亲和力成熟或优化)。本发明涵盖在这些步骤期间使用和制备的所有细胞、核酸、载体、序列、抗体等。

[0179] 在所有这些方法中,可操纵表达宿主中所用的核酸以插入、缺失或修饰某些核酸序列。这种操纵引起的变化包括但不限于引入限制位点、修改密码子使用、增加或优化转录和/或翻译调控序列等的变化。也有可能改变核酸来改变所编码的氨基酸。例如,可能有用的是在抗体的氨基酸酸序列中引入一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)氨基酸置换、缺失和/或插入。这样的点突变可修饰效应物功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等;可引入氨基酸以附连共价基团(如标记)或可引入标签(如用于纯化目的)。突变可被引入特定位点或可以随机引入,然而进行选择(如分子进化)。例如,可以使一种或多种编码本发明抗体的CDR区、重链可变区或轻链可变区中任一者的核酸随机或定向突变以在所编码的氨基酸中引入不同的特性。这些变化可以是迭代过程的结果,其中保留初始变化并在其它核苷酸位置引入新变化。此外,可以组合在单独步骤中实现的变化。引入所编码的氨基酸中的不同特性可包括但不限于增强的亲和力。

[0180] 一般概念

[0181] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”,例如“包含”X的组合物可仅仅由X组成或可以包括另外某些东西,例如X+Y。

[0182] 词“实质上”不排除“完全”,例如“实质上不含”Y的组合物可以是完全不含Y。必要时,词“实质上”可以从本发明的定义中略去。

[0183] 关于数值x的术语“约”意指例如x+10%。

[0184] 本文所用的术语“疾病”在一般意义上是同义的,并可与术语“失调”和“病症”(如在医学状况中)互换使用,其中所有都反映了损害正常功能的人或动物身体或其一个部位的异常状况,通常通过区分病征和症状来表现,并使人或动物的寿命缩短或生存质量下降。

[0185] 如本文所用,提及受试者或患者的“治疗”旨在包括预防、防治和疗法。术语“受试

者”或“患者”在本文中可互换使用来指包括人在内的所有哺乳动物。受试者的例子包括人、奶牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。在一个实施例中，患者是人。

[0186] 实例

[0187] 在如下实例中提供本发明的示例性实施例。以下实例仅通过示例方式给出且有助于普通技术人员使用本发明。所述实例并非旨在以任何方式来另外限制本发明的范围。

[0188] 实例1: 来自浆细胞的甲型流感病毒广谱中和抗体的生成与表征

[0189] 为了确定可以产生响应季节性流感疫苗(含有H1和H3HA)的异亚型抗体的个体,我们对在加强接种(boost)后第7天收集的循环浆细胞针对其分泌结合疫苗或无关的H5HA(A/VN/1203/04)的抗体的能力,通过ELISPOT对其进行筛选。然而令人惊讶的是,在受测的5个供体中的4个中没有检测到H5-特异性浆细胞,在一个供体中14%的IgG分泌性浆细胞产生了对抗H5的抗体,而57%产生了对抗疫苗的抗体。通过使用磁微珠,然后使用FACS Aria仪进行细胞分选,从接种疫苗后第7天收集的外周血单核细胞(PBMC)分离了CD138+浆细胞。将有限数目的浆细胞接种与微孔培养板中。利用重组H5或H9HA和不相关的抗原破伤风类毒素作为抗原在三个平行的ELISA中测试了培养物上清液。在4,928份筛选的培养物上清液中,有12份结合H5而不结合H9HA、25份结合H9而不结合H5HA,54份既结合H5又结合H9。对54份具有最高OD信号的培养物中的一些进行RT-PCR,获得了两个配对的VH和VL基因。

[0190] 将VH和VL基因克隆进表达载体中并通过转染HEK293T细胞产生重组抗体。两种单克隆抗体FI6变体2和FI28共有大部分的V、D和J基因片段(IGHV3-30*01、IGHD3-9*01、IGHJ4*02和IGKV4-1*01),但N区、IGKJ使用和体细胞突变模式方面有差别并因此在克隆上是不相关的。

[0191] 使用属于不同亚型的一组HA通过ELISA来研究重组抗体的特异性。明显地,FI6结合包括组1(H1、H5和H9)和组2(H3和H7)的所有被测试的甲型流感HA亚型,而不结合来自乙型流感病毒的HA。相比之下,FI28仅结合3个组1的HA(H1、H5和H9)。

[0192] 表4

[0193]

	通过 ELISA 测定的与 HA 的结合 (占亚型特异性对照抗体的%)				
	H1	H3	H5	H7	H9
	A/NC/ 20/99	A/BR/ 10/07	A/VN/ 1203/04	A/NL/ 219/03	A/HK/ 1073/99
FI6 变体 2	85.9	68.5	73.7	87.9	98.7
FI28 变体 1	59.4	1.3	46.3	-0.5	87.7

[0194] 考虑到这两种抗体的VH和VL序列的同源性,利用FI6变体2、FI28变体1和7I13的H和L链来进行改组实验,7I13为使用H链的相同V、D和J元件的hCMV特异性抗体。尽管与H7结合需要FI6变体2的H链和L链配对,但当FI6变体2和FI28变体1的L链改组时,保持与H5结合。此外,当FI6变体2的H链与不相关的7I13L链配对时,也观察到H5结合。相比之下,当同源的7I13H链与FI6变体2L链配对时,没有观察到H5结合。不受任何特定理论的约束,这些结果表明H5结合的主要贡献来自H链,而H7结合则需要FI6变体2的H链和L链之间的精确配对。

[0195] 然后使用假型病毒(表5)以及感染性病毒(表6)来测试FI6变体2和FI28变体1的中

和组1和组2甲型流感病毒亚型的能力。明显地,FI6变体2中和了所有被测试的假型病毒,包括六个属于抗原趋异分支(clade)0、1、2.1、2.2和2.3的H5分离株和两个H7禽分离株。此外,FI6变体2中和了所有被测试的传染性病毒,包括已存在数十年的两种H3N2病毒和四种H1N1病毒以及一直到最近的H1N1大流行分离株A/CA/04/09(表6)。FI28变体1中和了所有的H5假型病毒,但却没有中和H7假型病毒以及所有被测试的传染性病毒。对假型病毒的中和滴度比对传染性病毒的滴度高。

[0196] 表5

[0197]

	HA-假型的中和 (IC90, $\mu\text{g}/\text{ml}$)							
	H5N1						H7N1	
	A/HK/ 491/97	A/HK/ 213/ 03	A/VN/ 1203/ 04	A/INDO /5/05	A/WS/ MONG/ 05	A/AH/ 1/05	A/ck/IT/ 13474/ 99	A/ck/FP V/ Ro/34
FI6 变体 2	0.07	0.02	0.02	0.31	0.03	0.05	1.87	0.09
FI28 变体 1	0.05	0.33	0.02	0.35	0.04	0.05	>100	>100

[0198] 表6

[0199]

	传染性病毒的中和 (IC50, $\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	H1N1			H3N2		
	A/PR/ 8/34	A/NC/ 20/99	A/SI/ 3/06	A/CA/ 4/09	A/CA/ 7/04	A/WI/ 67/05
FI6 变体 2	2.2	6.3	8.8	12.5	7.9	12.5

[0200]

FI28 变体 1	>100	>100	>100	nd	>100	>100
-----------	------	------	------	----	------	------

[0201] nd,未进行

[0202] 实例2:FI6变体2和FI28变体1抗原结合位点

[0203] 为了鉴定抗体FI6变体2和FI28变体1结合的抗原位点,我们首先测试了其抑制C179结合的能力,C179是一种被作图到HA茎区的保守区的小鼠单克隆抗体(Y.Okuno等人,J Viro1(《病毒学杂志》)67,2552(1993))。FI6变体2和FI28变体1二者都完全抑制了C179与重组H5VN/1203/04HA的结合,从而表明它们识别重叠表位。相反,FI6变体2和FI28变体1不与一组从H5N1免疫供体分离的、识别HA的球形头部中不同表位的H5特异性抗体竞争(C.P.Simmons等人,PLoS Med4,e178(2007);S.Khurana等人,PLoS Med 6,e1000049(2009))。通过选择逃逸突变株(escape mutant)来对FI6变体2表位进行作图的尝试失败了,从而表明在不危害病毒适应性的情况下,其表位不会轻易突变。

[0204] 随后,我们使用HA A/VN/1194/04的线形和环化肽的文库进行了基于肽的作图以及使用Pepsan Presto BV(荷兰莱利斯塔德(Lelystad,The Netherlands))的系统进行螺旋扫描。该分析确定了FI6变体2的结合区,该结合区包括HA2融合肽FGAIAG(氨基酸3-8,根据H3编号方式;SEQ ID NO:37)、HA2螺旋A肽DGVTNKVNS(氨基酸46-54;SEQ ID NO:38)、HA2

螺旋B肽MENERTLDFHDSNVK(氨基酸102-116;SEQ ID NO:39)和HA1C-末端肽LVLATGLRNSP(氨基酸315-325;SEQ ID NO:40)。由于FI28变体1不与HA1C-末端肽和HA2螺旋B肽反应,所以FI28变体1的结合区与FI6的结合区不同。

[0205] 实例3:具有改善生产率的FI6变体3、4和5的生成和表征

[0206] 合成FI6变体2VH和VL的若干变体来改善在哺乳动物细胞中的生产以及除去不必要的体细胞突变和不利的特征。将VH和VL基因分别克隆进编码IgG1的恒定区和C κ 的表达载体中。根据IMGT数据库确定FI6变体2的种系序列。通过合成(新泽西州皮斯卡特维的金斯瑞公司(Genscript,Piscataway,NJ))或通过定点突变普洛麦格公司(Promega)产生其中单个或多个种系突变被恢复至种系的抗体变体并通过测序来证实。所有变体序列都使用金斯瑞公司的OptimumGene™系统进行密码子优化以在人细胞中表达。通过用PEI瞬时转染悬浮培养的293Freestyle细胞(英杰公司(Invitrogen))来产生单克隆抗体。在培养7天后从转染细胞收集上清液并通过蛋白A色谱法(通用电气医疗公司(GE Healthcare))亲和力纯化IgG且用PBS脱盐。以若干个独立的实验评价在瞬时表达系统中的生产率。平均值在图1中示出。如图1中所示,FI6变体2以13.5 μ g/ml的滴度产生;FI6变体3以46.3 μ g/ml的滴度产生;FI6变体4以60.7 μ g/ml的滴度产生;且FI6变体5以61.6 μ g/ml的滴度产生。因此,与FI6变体2相比,我们可以使FI6变体3、4和5生产的滴度分别增加3.4倍、4.5倍和4.6倍。

[0207] 与初始FI6变体2IgG相比,还通过ELISA针对与H5和H7HA的结合以及对H5和H7假病毒的中和(表7)对该重组抗体进行表征。用5 μ l在PBS中的1 μ g/ml源自杆状病毒的重组HA(蛋白质科学公司(Protein Sciences Corp.))包被Half-area ELISA板(康宁公司(Corning))。在用1%PBS/BSA封闭之后,加入抗体并利用碱性磷酸酶缀合的F(ab')₂山羊抗人IgG(南部生物技术公司(Southern Biotech))来揭示结合。然后洗涤板,加入底物(p-NPP,西格玛公司(Sigma))并在405nm下读板。通过测量实现50%最大结合所需要的抗体浓度(EC50),用ELISA来测定抗体与HA结合的相对亲和力。对于假病毒中和测定法,将抗体的连续稀释物与固定浓度的含假病毒的培养物上清液在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。然后将混合物添加至HEK 293T/17细胞并在37 $^{\circ}$ C下温育3天。然后用Britelite试剂(Perkin Elmer)溶解细胞,并在光度计微板读数器(Veritas,Turner Biosystems)上测定细胞溶解物中的相对光单位(RLU)。通过比较存在和不存在抗体时的RLU来测定感染性的减小,并表示为中和百分比。50%抑制剂量(IC50)定义为在扣除仅有对照的孔中的细胞中的背景RLU之后与病毒对照孔相比RLU减少50%时的样品浓度。表7示出了基于改善的序列特性结合保留或改善的结合活性而选择的FI6变体3-5。

[0208] 表7

[0209]

mAb ID	结合		中和	
	H5-HA EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H7-HA EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H5 A/VN/1194/04 IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H7 A/ck/FPV Rostock/34 IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
FI6 变体 2	0.0145	0.0314	0.0054	0.0200
FI6 变体 3	0.0235	0.0573	0.0035	0.0274
FI6 变体 4	0.0137	0.0267	0.0035	0.0093
FI6 变体 5	0.0165	0.0473	0.0054	0.0220

[0210] FI6变体2和FI6变体3结合被测试的属于组1(H1、H2、H5、H6、H8和H9)和组2(H3、H4、H7和H10)的所有重组或纯化的HA,其中EC50值在10至270ng/ml的范围内(表8)。另外,FI6变体2和FI6变体3染色细胞转染有属于组1(H11、H12、H13和H16)和组2(H4、H10、H14和H15)的HA基因(表8)。

[0211] 表8

[0212]

HA 蛋白	mAb ID		
	FI6 变体 2	FI6 变体 3	ctr
H1N1 A/所罗门群岛/3/06	18 ⁽¹⁾	19 ⁽¹⁾	>20000 ⁽¹⁾
H1N1 A/新喀里多尼亚/20/99	15	17	>20000
H1N1 A/加利福尼亚/04/09	17	17	>20000
H1N1 A/布里斯班/59/07	15	17	>20000
H3N2 A/怀俄明/3/03	19	23	>20000
H3N2 A/纽约/55/04	32	38	>20000
H3N2 A/布里斯班/10/07	41	37	>20000
H5N1 A/越南/1203/04	14	14	>20000
H5N1 A/越南/1/05	10	11	>20000
H7N7 A/荷兰/219/03	26	29	>20000
H9N2 A/香港/1073/03	14	15	>20000
H4N6 A/鸭/捷克斯洛伐克/56	273	185	>20000
H6N5 A/海鸥/澳大利亚/1/72	41	34	>20000
H7N3 A/加拿大/444/04	33	25	>20000

[0213]

H8N4 A/亚伯达/357/84	33	27	>20000
H10N4 A/貂/瑞典/3900/84	90	85	>20000
H13N6 A/鸥/马里兰/704/77	88	62	>20000
H2N2 A/新加坡/1/57	29	21	>20000
H11N9 A/鸭/孟菲斯/546/74	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H12N5 A/鸭/亚伯达/60/76	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H13N6 A/鸥/马里兰/704/77	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H16N3 A/棕头鸥/瑞典/2/99	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H4N6 A/鸭/捷克斯洛伐克/56	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H10N7 A/鸡/德国/N49	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H14N5 A/野鸭/阿斯特拉罕/263/82	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
H15N9 A/海鸥/西澳大利亚	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾	-
B/Ohio/1/05	>20000	>20000	>20000

[0214] (1) 通过ELISA测量的EC50值 (ng/ml)

[0215] (2) +是指HA转染的293细胞的阳性染色

[0216] 实例4: H1和H3HA上的FI6变体3表位的结构表征

[0217] 为了鉴别组1和组2HA上的FI6变体3识别的表位以及未来描述抗体及其靶标抗原之间的分子相互作用,我们使FI6变体3Fab片段与H1(组1)和H3(组2)HA同型三聚体的复合物结晶。为使FI6变体3/H1同型三聚体HA复合物结晶,在Sf9昆虫细胞中表达H1HA0的胞外结构域。将对应于残基11-329(HA1)和1-176(HA2)(基于H3编号方式)的cDNA克隆进掺有GP67分泌信号的BioFocus表达载体中,该分泌信号使得所表达的蛋白质能分泌进培养基中。克隆的cDNA与C末端三聚化折叠子(foldon)序列融合以使得能形成三聚体形式的H1HA0。在折叠子序列与HA2的C末端之间包括凝血酶切割序列以使得可以在结晶之前除去折叠子标签,并在所表达的多肽序列的C-最末端掺入6-His标签以用于亲和纯化。

[0218] 用重组杆状病毒感染Sf9昆虫细胞,并通过穿过Ni-NTA树脂(Qiagen)和凝胶过滤(S200柱)从培养基回收带6-His标签的H1HA0。将对应于三聚体H1HA0的洗脱蛋白质浓缩至1mg/ml,然后通过用凝血酶(每mg HA0使用5单位的凝血酶)在20℃下处理两小时来除去C末端标签。最后将经纯化的切割的蛋白H1 HA0在Mono Q阴离子交换柱上分级分离。为了形成其与Fab-FI6变体3的复合物,将0.5至1mg/ml之间的纯化H1 HA0与两倍摩尔过量的纯化Fab-FI6变体3混合。通过在4℃下温育三小时来形成复合物,然后通过S200凝胶过滤柱上分级分离而从过量Fab-FI6变体3分离复合物。

[0219] 将Fab-FI6变体3与未加工的三聚体H1 HA0的纯化复合物浓缩至12mg/ml用于结晶。通过在由0.1M Bis Tris丙烷pH 7.0、2.2M硫酸铵组成的孔溶液(well solution)上蒸气扩散,使Fab-FI6变体3与H1 HA0的复合物的晶体以悬滴生长。晶体在20℃下生长四周并从液滴收获进孔溶液与3.4M丙二酸钠pH 7.0的1:1混合物中进行低温保护,然后在液氮中闪冻。在Diamond Light Source光束线I03下收集数据集,并分别使用MOSFLM和SCALA进行指标化(indexed)、积分和归一化(scaled)。

[0220] 对单位晶胞参数和蛋白分子量的统计分析表明每个不对称单位有一个血凝素单

体和一个Fab片段;因此使用单体状态的搜索模型进行分子置换。使用单体H1 HA (PDB ID 1RD8) 的坐标作为搜索模型,用CCP4程序PHASER获得初始相位。使用自动模型拟合程序FFFEAR,重链的可变域与密度成功拟合,且随后与HA-抗体结构3FKU和3GBN比较使得可放置轻链可变结构域。分别使用COOT和REFMAC5进行模型建立和精修的交替循环。重复此操作直到拟合尽可能多的电子密度图且使R-work值和R-free趋平。

[0221] 根据Kabat惯例对最终的PDB文件中的氨基酸进行编号。最终模型含有全部H1HA和重链与轻链可变域。对于FI6变体3/H3异型三聚体HA复合物的结晶,纯化X-31 (H3N2) 病毒和菠萝蛋白酶释放的HA (BHA),并通过木瓜蛋白酶消化制备Fab片段。使用蛋白A琼脂糖亲和色谱法(HiTrap Protein A HP, 1ml)、然后使用S-200尺寸排阻柱纯化FI6变体3Fab。将3.5mg Fab与3mg X-31 BHA混合并在4℃下温育过夜以形成复合物,使用superose 6 SEC柱纯化复合物。汇集对应于Fab-HA复合物的峰值级分并浓缩用于结晶。

[0222] 通过在由来自Douglas Instruments公司的Oryx-6结晶机器人分配的坐滴中蒸气扩散使FI6变体3-H3复合物晶体生长。通过向储槽溶液中加入25%甘油对晶体进行低温保护。在Diamond Light Source光束线I03中收集数据集,使用Denzo和Scalepack进行指标化、积分和归一化。使用Amore通过分子置换解析不对称单位中含有一个与三个FI6变体3Fab复合的H3HA三聚体的晶体。使用H3HA三聚体的**2.8 Å**结构的坐标、来自FI6变体3/H1复合物的FI6变体3的重链和轻链可变域以及恒定域的坐标(PDB ID 3HC0.pdb)作为独立的搜索目标来进行分子置换计算。使用Refmac5和Phoenix以及加以数轮的用Coot进行的手动调整来精修分子置换解析结构。使用DM通过非晶体平均基本上改善了电子密度图。

[0223] X射线结晶学显示,FI6变体3结合F亚结构域中的保守表位。尽管这两种HA在系统发育上和结构上不同,而且复合物以不同的堆积排列方式结晶,但发现相互作用表面极为相似(图2,A和B)。在两种情况中,HA三聚体的每个单体都结合FI6变体3的一个分子(图3)。FI6变体3的HCDR3环区结合进HA的F亚结构域上的浅沟槽中,其中沟槽的侧面由来自HA2的A螺旋的残基和两股HA1的部分(38-42和318-320)形成,而底部由包含残基18-21的HA2转折形成(图2,A和B)。

[0224] HCDR3环区以约45°的角度与螺旋A交叉,使得Leu-100A、Tyr-100C、Phe-100D和Trp-100F与沟槽中的残基产生疏水接触(图4)。Tyr-100C和Trp-100F也分别与HA1的Thr-318的侧链和HA1的残基19的主链羰基形成潜在的氢键。由HCDR3的残基98和99处的主链羰基与螺旋A上的Asn-53和Thr-49形成两个额外的极性相互作用。HCDR3与HA(H1和H3)的相互作用一起包埋了约**750 Å²**的抗体表面,并且该相互作用的约2/3是由与HA2链的相互作用引起的。

[0225] 总之,FI6变体3与H1和H3上的疏水沟槽产生的相互作用明显相似。FI6变体3的LCDR1环区与螺旋A上与促成疏水沟槽的侧面相对的侧面形成两个接触;Phe-27D与Lys-39的脂族部分形成疏水接触并且Asn-28与Asn-43形成氢键,一起对于H1和H3二者产生约**190 Å²**的包埋表面积。通过以未切割形式共结晶的H1HA,LCDR1还与相邻的远端右侧HA单体的未切割“融合肽”形成广泛接触(图3,B和C以及图4,A和B),造成另外的**320 Å²**的FI6变体3包埋表面。

[0226] LCDR1的残基28和29与HA1残基329以及相邻第二个残基HA2的Leu-2的主链羰基形

成主链酰胺氢键,因此跨越切割位点。LCDR1的Phe-27D与相邻的远端右侧HA2的Leu-2形成疏水接触,而Tyr-29的侧链羟基与相邻的远端右侧HA1链的残基325的主链羰基形成氢键。相比于H1和H3HA二者与HCDR3之间的极相似的相互作用,LCDR1与来自相邻的切割的远端右侧H3HA单体的“融合肽”的相互作用显著不及与未被切割的H1HA形成的相互作用广泛(图3,插图B)。尽管Phe-27D再次与HA2的Lys-39的脂族部分接触,但Tyr-29与相邻的远端右侧HA2的A1a-7的主链羰基形成潜在的氢键接触(与未被切割的H1HA中的残基329相反)。

[0227] 相反,LCDR1环区与切割的H3HA的“融合肽”之间无主链接触,导致**114Å**的较小接触面积(参比于H1 HA中的**320Å**)。还似乎HA前体切割产生H3HA,导致FI6变体3/H3复合物和FI6变体3/H1复合物中FI6变体3相对于HA的取向略微不同。位于FI6变体3VH和VL链与切割的H3同型三聚体HA之间界面处的接触残基在表9中给出。位于FI6变体3VH和VL链与未被切割的H1同型三聚体HA之间界面处的接触残基在表10中给出。

[0228] 表9

[0229] 位于FI6变体3VH和VL与切割的H3-HA三聚体之间的界面处的接触残基

[0230]

	HA1						HA2									
	切割位点-融合肽						Trp-21 环区									
H3 HK68	T318	R321'	V323'	Q327'	S328'	R329'	G1'	L2'	F3'	G4'	A7'	E11'	I18	D19	G20	W21
FI6 v3 VH	Y100c										F100d	F100d	F100d	F100d	W100f	
FI6 v3 VK	N28		Y29				Y29		Y29							
	Y29						Y32									

[0231] 表9(续)

[0232] 位于FI6变体3VH和VL与切割的H3-HA三聚体之间的界面处的接触残基

[0233]

	HA2												
	螺旋 A												
H3 HK68	L38	K39	T41	Q42	A43	I45	D46	I48	N49	L52	N53	I56	E57
FI6 v3 VH	W100f		W100f	W100f	L100b			L98	Y52a	L98	R99		
	L100g			Y100c		R99			S100				
	S100h			L100g		S100			L100a				
FI6 v3 VK	R93	F27d		F27d		F27d							
	Y32												

[0234] 表10

[0235] 位于FI6变体3VH和VL与未被切割的H1-HA三聚体之间的界面处的接触残基

[0236]

	HA1						HA2									
	切割位点-融合肽						Trp-21 环区									
H1 CA09	T318	R321'	I323'	Q327'	S328'	R329'	G1'	L2'	F3'	G4'	A7	E11	V18	D19	G20	W21
FI6 v3 VH	Y100c												F100d	F100d	F100d	Y100c
													W100f		F100d	
FI6 v3 VK	Y29 Y29 T27c						T27 c	S27a F27d F27d								
	F27d						T27c									
	N28						F27d									
	Y29						N28									
							Y92									

[0237] 表10(续)

[0238] 位于FI6变体3VH和VL与未被切割的H1-HA三聚体之间的界面处的接触残基

[0239]

	HA2												
	螺旋 A												
H1 CA09	L38	K39	T41	Q42	N43	I45	D46	I48	T49	V52	N53	I56	B57
FI6 v3 VH	W100f		W100f	W100f	L100a		L100a	R99	L98 R99		L98	L98	
				L100g	Y100c		L100a		R99		R99		R99
				S100h	L100g								
FI6 v3VK	R93	F27d			F27d								
							N28						

[0240] 具组1特异性的两种交叉反应性抗体CR6261和F10的结构先前已作为与H5和H1 HA的复合物形式报道。与HA结合的CR6261和F10抗体仅由其VH结构域介导,这些VH结构域相对于HA大致彼此相同取向,但两种抗体相对于FI6变体3明显旋转且更接近HA的膜近端5-10Å(图3,D和E)。

[0241] 本文给出的FI6变体3/H1和FI6变体3/H3的结构还揭示,尽管三种抗体的HA上的结合位点广泛重叠,但由FI6变体3产生的相互作用性质与CR6261和F10抗体产生的那些相互作用性质明显不同。最显著的区别在于FI6变体3与HA上的疏水沟槽的相互作用仅由长的HCDR3介导,而对于CR6261和F10而言,结合涉及所有三个HCDR。

[0242] FI6变体3/H1复合物和FI6变体3/H3复合物之间的重要区别在于H3HA如同组2的H7、H10和H15HA一样在Asn-38(HA1)处被糖基化,而H1同所有组1HA一样未糖基化。在H3的未结合结构中,该碳水化合物侧链自含有Asn-38残基的HA1 β股突出,朝向相同HA亚基的HA2

的螺旋A,使得其与FI6变体3的印迹重叠(图5A)。已知碳水化合物侧链能影响病毒糖蛋白的抗原性,因此已提出该重叠导致与靶向HA的膜近端区的其他组1交叉反应性抗体缺乏与组2HA的结合。然而,通过寡糖的重新取向(从HA表面旋转开约80°)使得FI6变体3与H3HA结合,从而与HCDR2环区的Asp-53和Asn-55形成新的接触(图5B)。

[0243] 考虑到Asn-38处碳水化合物侧链的柔性使其可适应FI6变体3与H3HA结合,因此我们怀疑该糖基化位点是否可能是H3HA不结合CR6261或F10的原因。简单建模表明,碳水化合物侧链取向的相同变化将与CR6261的结合相容,但并不与F10(交叉反应性抗体)的结合相容。包含F10的VH残基73-77的 β 转折将会与处于在FI6变体3/H3复合物中所采去的取向的Asn-38连接的碳水化合物发生冲突,但该碳水化合物是否会自由地进一步旋转出结合位点以适应F10结合尚不明确。然而,CR6261或F10都不能中和其中移除了糖基化位点(Asn-38)的H7假病毒(A/鸡/意大利/99)(IC₅₀>50 μ g/ml),表明该聚糖的位阻并非阻止CR6261和F10抗体与组2HA结合的唯一结构限制。

[0244] 除了Asn-38的糖基化以外,组1和组2HA之间F亚结构域结构中的最显著区别涉及组间不同的环境和HA2Trp-21的取向。在组1HA中,Trp-21与F亚结构域表面大致平行,而在组2HA中,其粗略垂直于表面定向(图5,C和D)。所有三种抗体(FI6变体3、CR6261和F10)主要通过苯丙氨酸侧链(FI6变体3上的Phe-100D、CR6261上的Phe-54和F10上的Phe-55)与Trp-21形成接触(图5,C和D)。就FI6变体3而言,HCDR3环区中的局部重排意味着Phe-100D位点在H1复合物中的疏水沟槽中比在H3复合物中大致深**2Å**;因此在两种情况下与Trp-21保持相似的接触距离。

[0245] 两种组1特异性抗体的Phe-54(CR6261)和Phe-55(F10)的位置类似于与H1HA复合的FI6变体3。然而,由于Phe-54(CR6261)和Phe-55(F10)位于连接两个相邻的反向平行股的短环区HCDR2上,看上去比在FI6变体3中用于苯丙氨酸进一步移出疏水沟槽来适应Trp-21的组2取向的灵活性小。因此,CR6261和F10与组2HA的结合可能受到HCDR2苯丙氨酸与Trp-21之间的空间冲突的阻碍。

[0246] 总而言之,所获得的结构数据表明,尽管螺旋A上的核心表位与CR6261和F10识别的表位相似,但在切割和未切割形式中,FI6变体3以不同角度、距离膜远端远**5-10Å**结合且接触涵盖螺旋A并且延伸至相邻的远端右侧单体的融合肽的更大面积(图6)。FI6变体3结合由VH和VL CDR介导,主要贡献在于长的HCDR3(其适应组特异性Trp-21环区的不同构象)和严重突变的LCDR1。使用VH和VK链以及长的HCDR3是天然选择的抗体的特征,且与仅用VH链结合的源自噬菌体的抗体(如CR6261和F10)的特性截然不同。FI6变体3VH和VK中的接触残基在图7中描绘。

[0247] 实例5:FI6变体3的体内预防作用

[0248] 在甲型流感病毒感染的小鼠模型中体内测试了FI6变体3的保护性功效。对6到8周大的雌性BALB/c小鼠组静脉内(i.v.)注射浓度在1至16mg/kg范围内的纯化抗体。三小时后,使小鼠深度麻醉且以10MLD₅₀(50%小鼠致死剂量)的H1N1 A/PR/8/34经鼻内(i.n.)攻击。在一种治疗设定中,小鼠在注射后1、2或3天接受抗体。每天监测小鼠的存活情况和体重损失直到感染后(p.i.)第14天。根据动物研究方案,将损失初始体重的25%以上的动物安乐死。

[0249] 为评估FI6变体3对病毒复制的影响,用10MLD50的H1N1A/PR/8/34攻击的小鼠在不同的时间点接受抗体并在四天后处死来收集肺和大脑。在补充有抗生素-抗霉菌溶液(英杰公司)的LeibovitzL-15培养基(英杰公司)中均化组织以获得10%w/v的器官悬浮液。在MDCK细胞上滴定器官匀浆并测定病毒滴度。在预防性设定中,FI6变体3在以4mg/kg施用于受组1 H1N1 A/PR/8/34病毒感染的小鼠时具完全保护性,在以2mg/kg施用器具部分保护性(80%存活率)(图8)。在感染后第0天或第1天以FI6变体3处理的小鼠中,感染后第4天的肺病毒滴度降低约100倍(图9)。另外,FI6变体3防止了用组2H3N2 HK-x31病毒感染的小鼠的体重损失(图8)。

[0250] 实例6:FI6变体3的病毒中和机制

[0251] 对于旨在确定FI6抗体的保护性功效的体内实验,我们生产了缺少补体结合的FI6变体2的Fc突变体(FI6-v2 KA)或缺失补体和FcR结合的FI6变体2的Fc突变体(FI6-v2 LALA)。这些抗体显示出与FI6变体2相同的结合和体外中和特性以及相当的体内半衰期(FI6-v2、FI6-v2 KA和FI6-v2 LALA的平均值分别为3.3、3.4和3.5天)。在用A/Puerto Rico/8/34(H1N1)病毒致命感染的小鼠中测试了它们的保护性功效。FI6.v2在以4mg/kg施用器具完全保护小鼠免于死亡,在以2mg/kg施用器具保护80%的小鼠(图8F)。在以10mg/kg施用器具,FI6-v2和FI6-v2 KA具完全保护性,而FI6-v2 LALA显示活性大量丧失,仅能够保护40%的动物(图8F)。在突变抗体以3mg/kg的有限浓度施用器具,该减小的功效尤其明显(图8G)。

[0252] 为研究产生FI6变体3的中和活性的机制,将源自NC/99杆状病毒的HA(蛋白质科学公司(Protein Sciences Corporation))与高15倍摩尔量的FI6变体3、FE17、非特异性mAb(HBD85)或无mAb的PBS溶液在37°C下温育40分钟。向每份样品添加经TPCK处理的胰蛋白酶至2.5µg/ml的最终浓度,并在37°C下进行消化5、10和20分钟。在每个时间点,通过加入含有SDS和DTT的缓冲液以及通过使其在95°C下沸腾5分钟来停止消化。然后将样品上样至12% Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶上。用来自英杰公司的iBlot印迹系统在PVDF膜上进行蛋白转移。用TBS-Tween中的10%脱脂奶粉将PVDF膜封闭30分钟。在4°C下在TBS-Tween中以0.5µg/ml用对抗HA0的一抗(内部制备的生物素化标记的F032)温育过夜。用TBS-Tween将PVDF洗涤三次并在室温(RT)下用HRP缀合的抗生物素链菌素(西格玛公司)温育1小时。

[0253] 用TBS-Tween将PVDF膜洗涤三次并使用ECL Plus蛋白质印迹检测试剂(通用电气医疗公司)和LAS4000CCD摄像系统检测阳性条带。图10中的数据显示,FI6变体3可抑制TPCK-胰蛋白酶切割HA0,从而表明与未加工的HA0结合的抗体轻链可阻碍感染性,至少对于在细胞外发生切割的那些病毒而言。

[0254] 参考文献

[0255] Okuno等人(1993) Journal of Virology(《病毒学杂志》)67:2552

[0256] Gerhard等人(2006) Emerging Infectious Diseases(《新发传染病》)12:569

[0257] Gioia等人(2008) Emerging Infectious Diseases(《新发传染病》)14:121

[0258] US 3,766,162

[0259] US 3,791,932

[0260] US 3,817,837

[0261] US 4,233,402

- [0262] US 4,676,980
- [0263] US 4,831,175
- [0264] US 5,595,721
- [0265] W000/52031
- [0266] W000/52473
- [0267] US 4,766,106
- [0268] US 4,179,337
- [0269] US 4,495,285
- [0270] US 4,609,546
- [0271] Gabizon等人(1982) Cancer Research(《癌症研究》)42:4734
- [0272] Cafiso(1981) Biochem Biophys Acta(《生物化学与生物物理学学报》)649:129
- [0273] Szoka(1980) Ann.Rev.Biophys.Eng.(《生物物理与生物工程年评》)9:467
- [0274] Poznansky等人(1980) Drug Delivery Systems(《药物递送系统》)(R.L.Juliano编辑,纽约牛津(Oxford,N.Y.))第253-315页
- [0275] Poznansky(1984) Pharm Revs《药理学评论》)36:277
- [0276] Kohler,G.和Milstein,C,.1975,Nature(《自然》)256:495-497.
- [0277] Kozbar等人1983, Immunology Today(《当代免疫学》)4:72.
- [0278] W02004/076677
- [0279] Kuby Immunology的第四章(第4版,2000;ASIN:0716733315)
- [0280] Jones等人,Biotechnol Prog(《生物技术进展》)2003,19(1):163-8
- [0281] Cho等人,Cytotechnology(《细胞技术》)2001,37:23-30
- [0282] Cho等人,Biotechnol Prog(《生物技术进展》)2003,19:229-32
- [0283] US 5,807,715
- [0284] US 6,300,104
- [0285] Rowe等人(1999) J Clin Microbiol(《临床微生物学杂志》)37(4):937-43.
- [0286] Temperton等人(2005).Emerg Infect Dis(《新发传染病》)11,411-416.
- [0287] Smirnov等人(2000).Arch Virol(《病毒学文献》)145,1733-1741.
- [0288] Smirnov等人(1999).Acta Virol(《病毒学学报》)43,237-244.
- [0289] Simmons等人(2007).PLoS Med 4,e178.
- [0290] Traggiari等人(2004).Nat Med(《自然-医学》)10,871-875.

序列表

<110> 生物医学研究所

<120> 中和抗甲型流感病毒抗体及其用途

<130> HMB0012-401-PC

<150> 61/083,838

<151> 2008-07-25

<150> 61/181,582

<151> 2009-05-27

<150> 12/509,731

<151> 2009-07-27

<160> 62

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

[0001]

<400> 2

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Tyr Lys
1 5

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gln Gly Tyr Phe Asp Pro
20

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Ser Val Thr Phe Asn Tyr Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

	Trp Ala Ser 1	
	<210> 6 <211> 9 <212> PRT <213> 智人	
	<400> 6	
	Gln Gln His Tyr Arg Thr Pro Pro Thr 1 5	
	<210> 7 <211> 24 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 7 ggattcacgt tcagtaccta tgcc	24
	<210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 8 atctcatacg atggaaatta taaa	24
[0002]	<210> 9 <211> 66 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 9 gcgaaagact cccaactgcg atcactctctc tattttgaat ggttatccca gggatatttt gaccce	60 66
	<210> 10 <211> 30 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 10 cagagtgtca ccttcaacta taagaactac	30
	<210> 11 <211> 9 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 11 tgggcatct	9
	<210> 12 <211> 27 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 12 cagcaacatt ataggactcc tccgacg	27
	<210> 13 <211> 129 <212> PRT <213> 智人	

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Ser Thr Leu His
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
 100 105 110
 Gln Gly Tyr Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr
 115 120 125
 Ser

[0003]

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 14
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Thr Phe Asn
 20 25 30
 Tyr Lys Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 85 90 95
 Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 15
 <211> 388
 <212> DNA

<213> 智人
 <400> 15
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagcc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt cactgtcagt acctatgccg tgcactgggt cctgcaggct 120
 ccaggcaggg ggcctggagtg ggtggcagtt atctcatacg atggaaatta taaatactat 180
 gcagactctg tgaagggccg attctcctc tcagagaca attccaacag cactctgcat 240
 ctgaaaaatg acaccctgag aactgaggac acggctttat attactgtgc gaaagactcc 300
 caactgcgat cactctctta tttgaaatgg ttatcccagg gatattttga cccctggggc 360
 cagggaaacc ttgtaccctg cactctcag 388

<210> 16
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 16
 gacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtat ctctggggcc gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgcacc tccaactata agaactactt agcttggtae 120
 cagcagaaac caggacagcc tcctaaagtg ctcaattact ggcatctgc ccgggaatca 180
 ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcaactc caccatcagc 240
 agcctgcagg ctgaagatgt ggcctgttat tactgtcagc aacattatag gactcctccg 300
 acgttcggcc aagggaacca ggiggagatc aaac 334

[0004]

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 17
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 18
 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 19
 Ala Lys Glu Arg Pro Leu Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Asn Asp Tyr
 20

<210> 20
 <211> 12

	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 20	
	Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr	
	1 5 10	
	<210> 21	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 21	
	Trp Ala Ser	
	1	
	<210> 22	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 22	
	Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser	
	1 5	
	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
<400> 23	ggattcacct tcagtaacta tggc	24
[0005]		
	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 24	
	atatcatalg atggatctaa taag	24
	<210> 25	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 25	
	gcgaaagaga gacccttcg cetattacga tattitgact gttatcggg gggggcgaat	60
	gactac	66
	<210> 26	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 26	
	cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac	36
	<210> 27	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 27	
	tgggcactct	9

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 28
 cagcagtatt atagaagtcc gtcc

24

<210> 29
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ala Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0006]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Arg Pro Leu Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Ser
 100 105 110

Gly Gly Ala Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 30
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Asp Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Leu Gln Val Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 388
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31
gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gcggtccagc ctggggagtc cctgaaacte 60
tccctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccagget 120
ccaggcaagg gactggagtg ggtggcagtc atatcatatg atggatctaa taagtactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
ctgcaaaiga acagcctgag agctgaggac acggctctgt tttactgtgc gaaagagaga 300
cccttcgcc tattacgata tttgactgg ttatcggggg gggcgaatga ctactggggc 360
cagggaaccc tggtcaccgt ctctctcag 388

[0007]

<210> 32
<211> 337
<212> DNA
<213> 智人

<400> 32
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccageca gagtgttita tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaaccagc agaaaccagg acagectcct aagttgctca ttgactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcaatc tgcaggttga agatgtggcc gtttattact gtcagcagta ttatagaagt 300
ccgtcctttg gccaggggac caagctggag atcaaac 337

<210> 33
<211> 129
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu His
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
100 105 110

Gln Gly Tyr Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr
115 120 125

Ser

<210> 34
<211> 388
<212> DNA
<213> 智人

<400> 34
caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtggtccage ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cacgltcagt acctatgcca tgcactgggt ccgtcaggct 120
ccaggcaggg ggctggagtg ggtggcagtt atctcatacg atggaaatta taaatactat 180
gcagactctg tgaagggceg attctccatc tccagagaca attccaacaa cacgetgcat 240
ctagaaatga acaccctgag aactgaggac acggctttat attactgtgc gaaagactcc 300
caactgcat cactctcteta ttttgaatgg ttateccagg gatattttga cccctggggc 360
cagggaaacc tggtaaccgt cacctcag 388

[0008]

<210> 35
<211> 129
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Arg Pro Leu Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Ser
100 105 110

Gly Gly Ala Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 36
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 36
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gcggtccagc ctggggagtc cetgaaactc 60
 ccctgtgcag ccctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt cegccaggct 120
 ccaggcaagg gactggagtg gctggcagtc atatcatatg atggatctaa taagtactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccata tccagagaca attccaagga cacgetgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt tttaactgtgc gaaagagaga 300
 ccccttcgcc taitacgata ttttgactgg itatcggggg gggcgaatga ctactggggc 360
 cagggaaacc tggtcaccgt ctctcag 388

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37

[0009]

Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38

Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 40

Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro
 1 5 10

<210> 41
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 智人
 <400> 41
 He Ser Tyr Asp Ala Asn Tyr Lys
 1 5

<210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 42
 Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gln Gly Tyr Phe Asp Tyr
 20

<210> 43
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 43
 Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gln Gly Tyr Phe Glu Pro
 20

[0010]

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44
 Gln Ser Val Thr Phe Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 45
 ggattcacct ttctacata cgct 24

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 46
 atctcatag acgetaacta taag 24

<210> 47
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 47
 gccaaagatt ctcagctgag gactcigtg tatttccaat gcctgagcca ggggtacttt 60

gattat 66

	<210> 48	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 48	
	cagtctgtga ctttcaacta caaaaattat	30
	<210> 49	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 49	
	tgggcttca	9
	<210> 50	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 50	
	cagcagcaact aceggactcc acccacc	27
	<210> 51	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 51	
	ggattcactt tttccaccta cgca	24
[0011]	<210> 52	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 52	
	atctcatacg acgccaacta taag	24
	<210> 53	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 53	
	gctaaggatt ctcagctgag aagtctgctg tattttgaat ggctgctca ggggtatttt	60
	gaacct	66
	<210> 54	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 54	
	cagtctgtga ctttcaacaa caaaaattat	30
	<210> 55	
	<211> 129	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 55	
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Ala Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
 100 105 110
 Gln Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 56
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 智人

[0012]

<400> 56
 caggtagcagc tggtagagtc cggaggagga gtggtgcagc cagggcggte tetgagactg 60
 agttgcgcgc cttcaggatt caccctttct acatacgeta tgcactgggt gcggcaggct 120
 cctggcaagg gaetggaatg ggtggcctgt atctcatacg acgctaacta taagtactat 180
 gccgatagcg tgaaggcag gttcacaatt agcecgaca actccaagaa tactctgtac 240
 ctgcagatga attccctgag ggctgaggac accgcegtgt actattgtgc caaagattct 300
 cagctgagga gtctctgta ttfcgaatgg ctgagccagg ggtactttga ttattgggga 360
 cagggcaactc tggtagacct gagctcc 387

<210> 57
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Thr Phe Asn
 20 25 30
 Tyr Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
85 90 95

Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58
<211> 333
<212> DNA
<213> 智人

<400> 58
gacatcgtga tgactcagtc tccgatagtc ctgccctgt ccctgggcga gagggctaca 60
attaactgca agagctceca gtcgtgact tteaactaca aaaattatct ggccctggtac 120
cagcagaagc ctggacagcc cctaaactg ctgatctatt gggctcaac ccgggaaagc 180
ggcgtgccag acagattctc aggcagcggg tccggaacag acttcaccct gacaatttct 240
agtctgcagg ccgaggacgt ggcctgttac tattgtcagc agcactaccg gactecaccc 300
acctttggcc aggggacaaa ggtggaatc aaa 333

<210> 59
<211> 129
<212> PRT
<213> 智人

[0013]

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Ala Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu His
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Gln Leu Arg Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Trp Leu Ser
100 105 110

Gln Gly Tyr Phe Glu Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr
115 120 125

Ser

<210> 60
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 60
 caggtccagc tggtcagag cgcgcgccgc gtggtccagc caggaggtc actgagactg 60
 tcatgcgtcg cttcaggatt cactttttcc acctacgcaa tgcactgggt gcgcaggca 120
 cctggaagag gactggagtg ggtggcagtc atctcatacg acgccaacta taagtactat 180
 gctgatagcg tcaaaggcag gttcagcatt tcccgcgaca acagtcagaa tacactgcat 240
 ctggagatga ataccttgcg aacagaagac actgccctgt actattgcgc taaggattct 300
 cagctgagaa gtctgctgta ttttgaatgg ctgtctcagg ggtattttga accttggggg 360
 cagggcactc tggtcaccgt cacttcc 387

<210> 61
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 I 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Thr Phe Asn
 20 25 30

[0014] Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 85 90 95

Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 62
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 62
 gacatcgtga tgactcagtc tcccgatagt ctggccgtgt ccttgggcca gaggctaca 60
 attaactgca agagctecca gtctgtgact ttaacaaca aaaattatct ggcctggtac 120
 cagcagaagc ctggacagcc cctaaactg ctgatctatt gggettcaac ccgggaaagc 180
 ggctgcccag acagattctc aggcagcggg tccggaacag acttcacct gacaatttct 240
 agtctgcagg ccgaggacgt ggcctgtgac tattgtcagc agcactaccg gactccaccc 300
 acctttggcc aggggacaaa ggtggaatc aaa 333

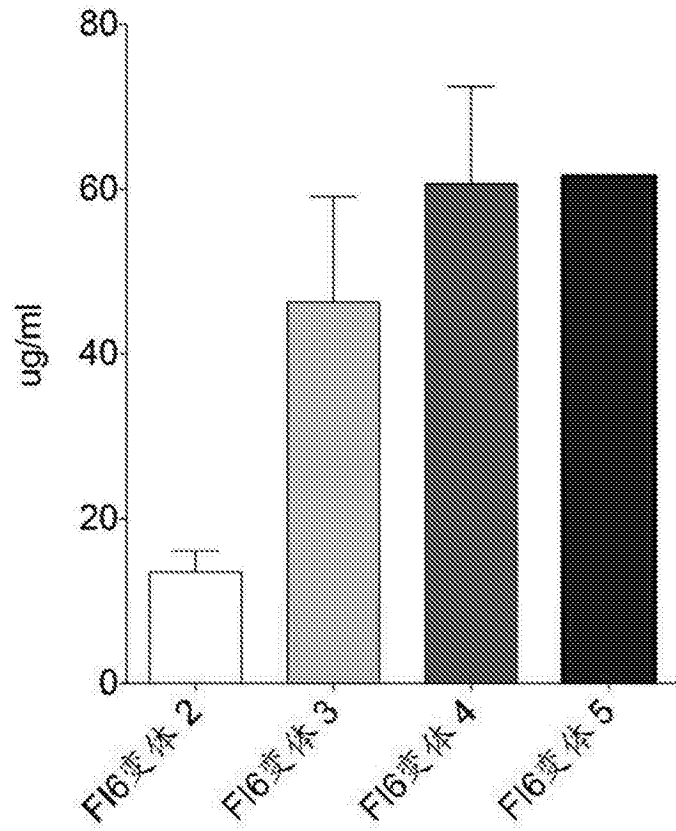


图1

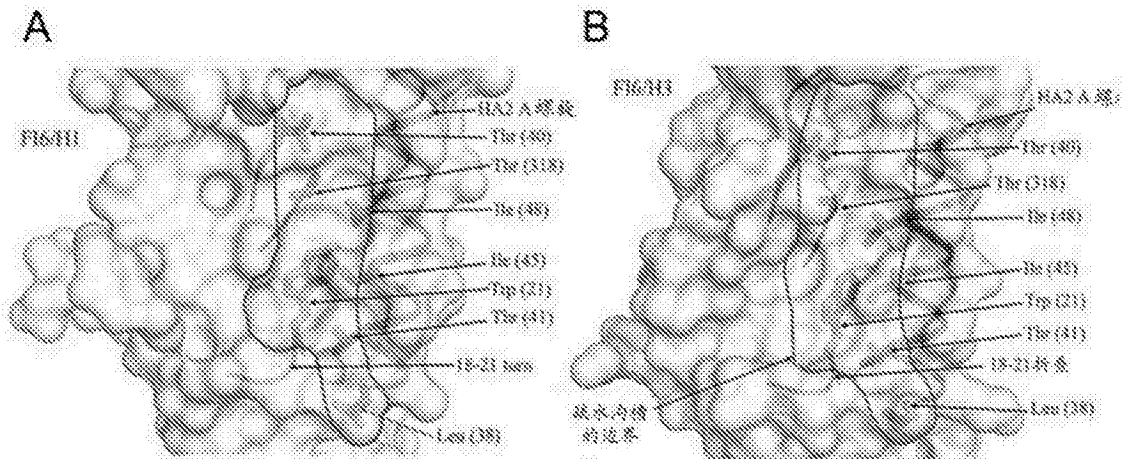


图2

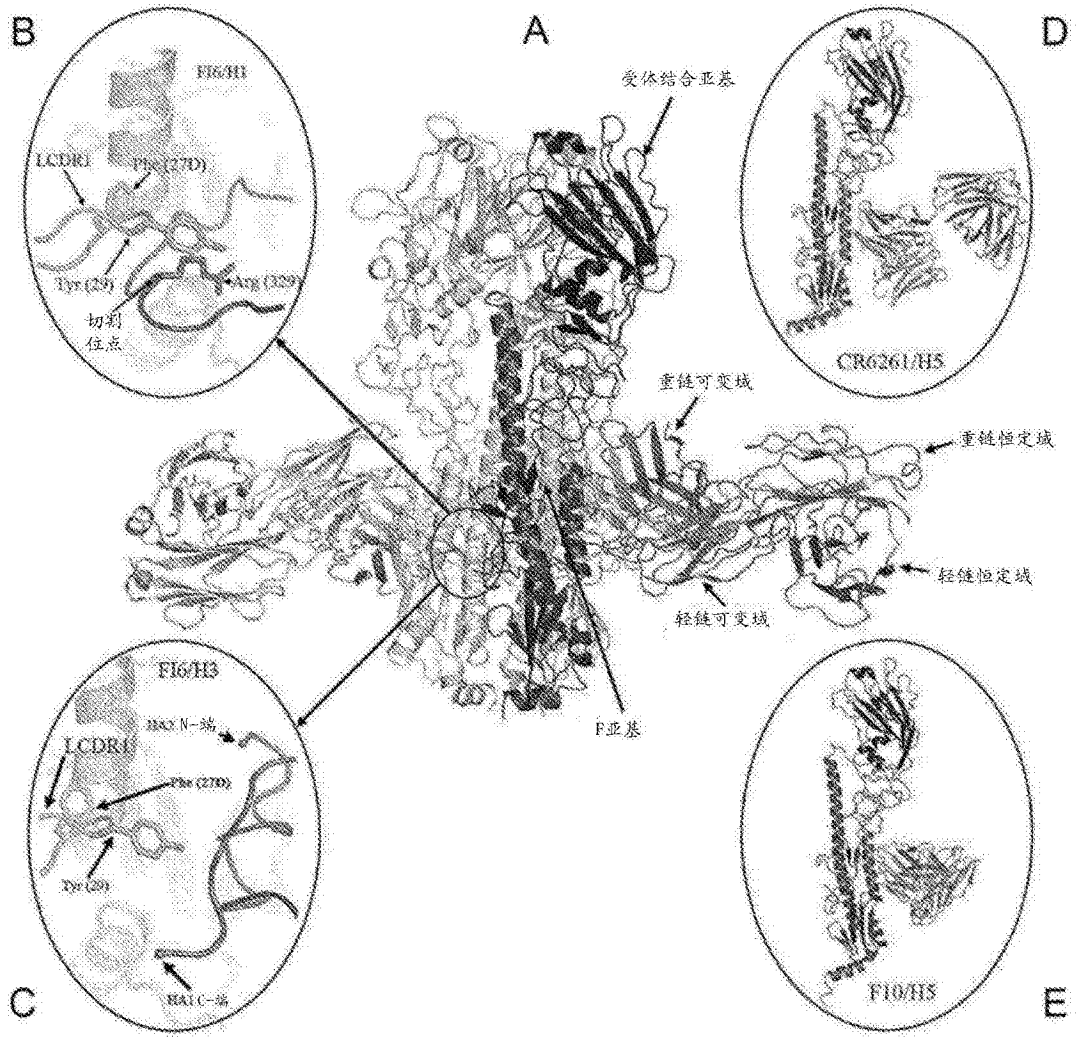


图3

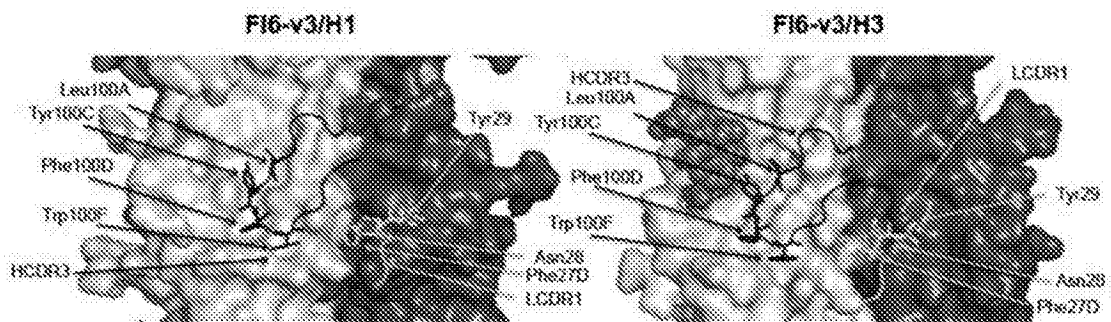


图4

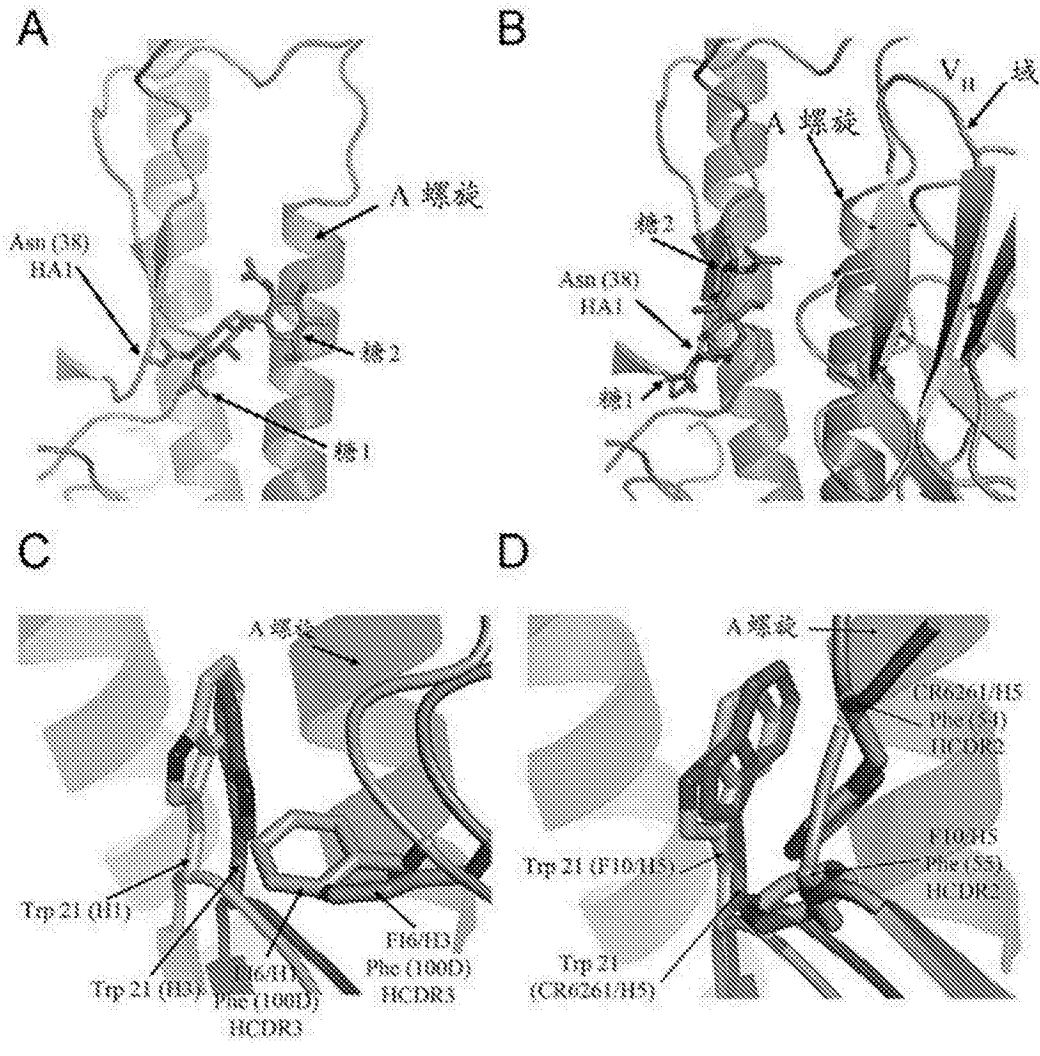


图5

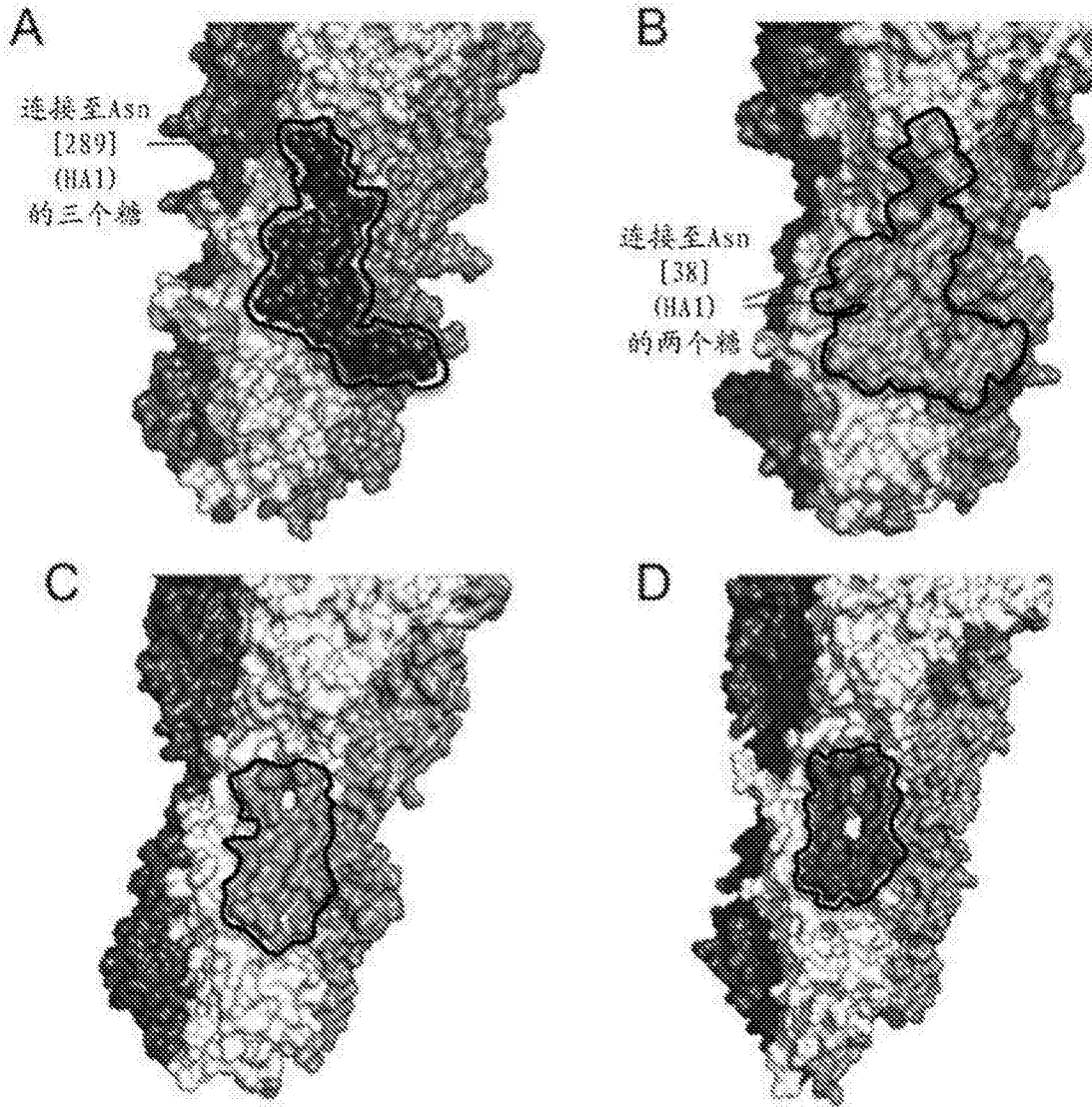


图6

```

      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000
  
```

图7

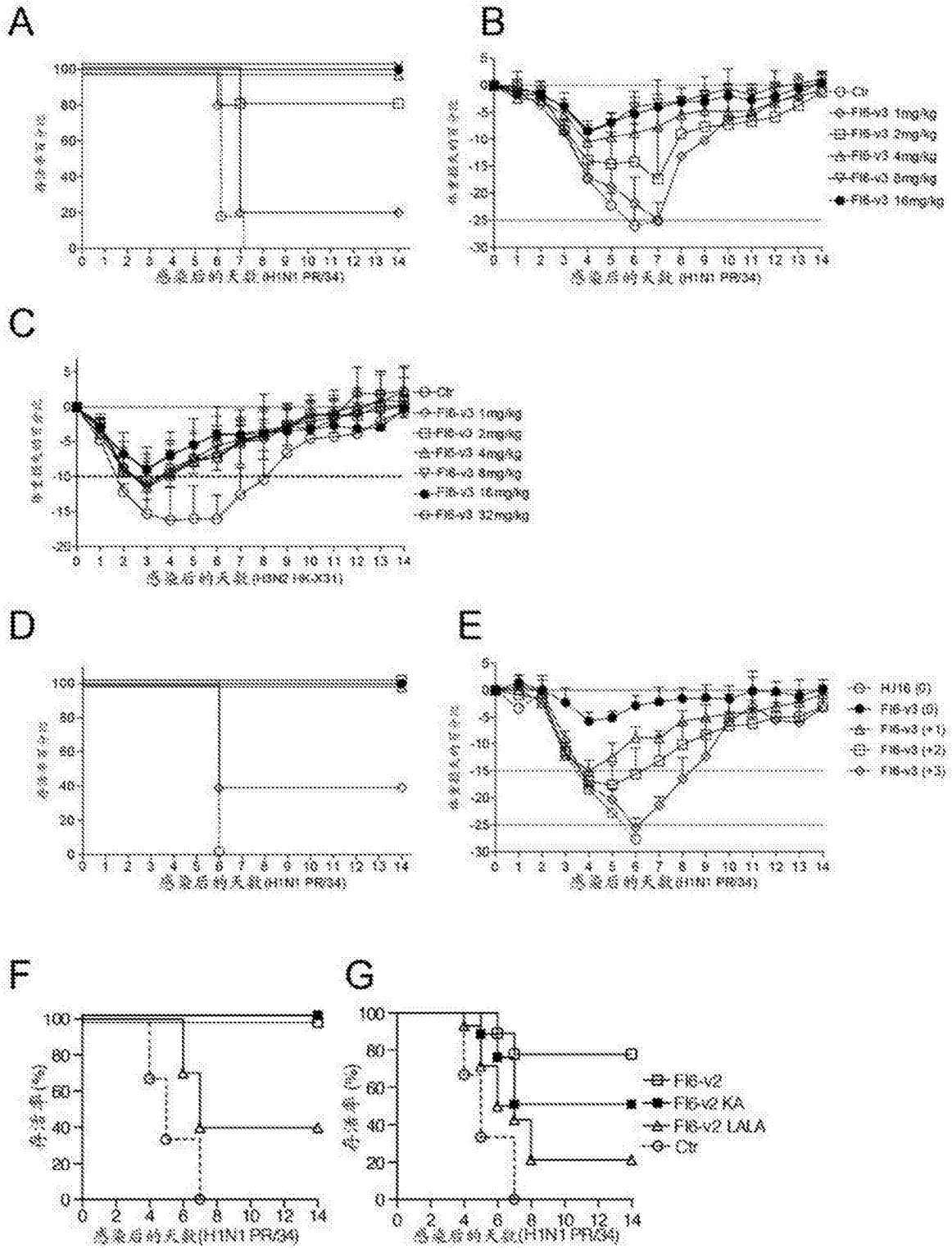


图8

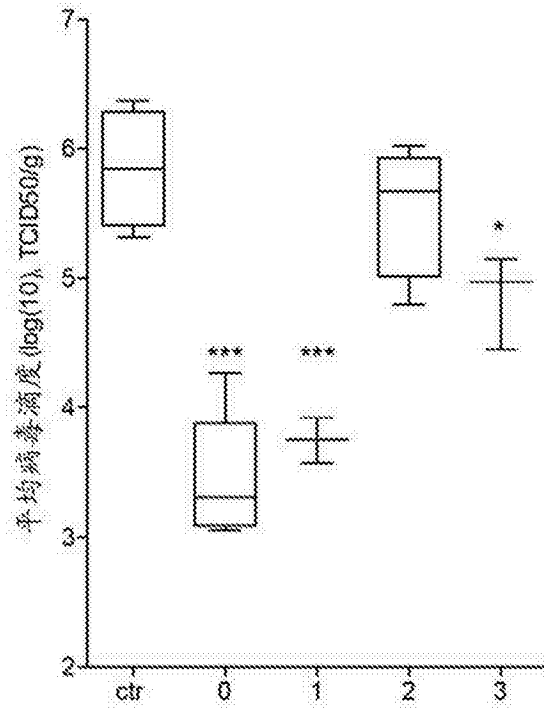


图9

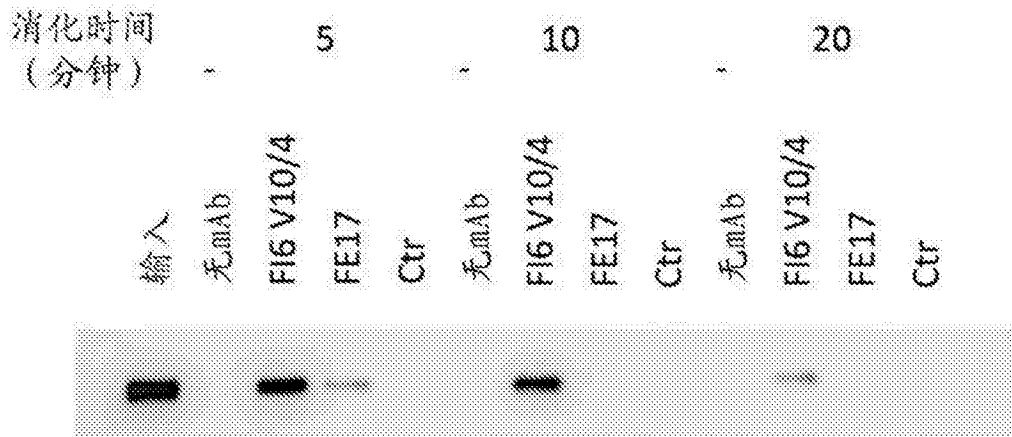


图10