

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03810797.X

A61K 39/00

A61K 39/395

A61K 39/42

A61K 39/145

C12Q 1/70

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1652815A

[22] 申请日 2003.3.13 [21] 申请号 03810797.X

[30] 优先权

[32] 2002.3.13 [33] US [31] 60/364,997

[86] 国际申请 PCT/US2003/008147 2003.3.13

[87] 国际公布 WO2003/078600 英 2003.9.25

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.12

[71] 申请人 麒麟麦酒株式会社

地址 日本东京都

共同申请人 拉霍拉敏感及免疫学研究所

[72] 发明人 三箇山俊文 王荣方 加藤慎一郎

H·切罗特尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 徐雁漪

权利要求书 10 页 说明书 48 页 序列表 11 页
附图 6 页

[54] 发明名称 针对流感病毒 M2 蛋白的人单克隆抗体其制备和使用方法

[57] 摘要

能结合流感病毒 M2 蛋白的人的、人源化的和嵌合的单克隆抗体。所述抗体的用途包括治疗、诊断、纯化和分离 M2 和流感病毒，以及鉴定 M2 或流感病毒在样品或受试者内的存在。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种特异性地结合流感蛋白 M2 的抗体，其中，所述抗体包括人的、人源化的和嵌合的单克隆抗体。
2. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体与 M2 细胞外结构域的至少一部分或 M2 细胞外结构域的亚序列结合。
3. 如权利要求 2 的抗体，其中，所述细胞外结构域包括氨基酸序列 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO : 1)。
4. 如权利要求 3 的抗体，其中，所述亚序列包括以下序列上的四个或四个以上连续的氨基酸： SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO : 1)。
5. 如权利要求 2 的抗体，其中，所述细胞外结构域包括以下氨基酸序列的氨基酸取代，插入，缺失或添加： SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO : 1)。
6. 如权利要求 5 的抗体，其中，所述细胞外结构域包括选自下组的具有氨基酸取代的序列：
SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD, SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD,
SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD, SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD,
SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD, SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD, 或
SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD (分别为 SEQ ID NOS: 2-8)。
7. 如权利要求 5 的抗体，其中，所述亚序列包括以下序列中任意一个上的四个或四个以上连续的氨基酸： SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD, SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD , SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD , SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD , SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD , SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD, 或 SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD (分别为 SEQ ID NOS: 2-8)。
8. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体选自 IgG, IgA, IgM, IgE, 和 IgD 同种型。
9. 如权利要求 8 的抗体，其中，所述同种型选自 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。
10. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体是由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心,

Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

11. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

12. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体具有与由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体相同或基本上相同的结合亲和力: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

13. 如权利要求 12 的抗体, 其中, 所述亲和力在参考抗体的约 5-100 倍内, 或者在参考抗体的约 5-5000 倍内。

14. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体抑制病毒感染细胞, 体外或体内病毒增殖或病毒复制。

15. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体在体外或体内抑制流感病毒与细胞结合。

16. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体抑制病毒滴度增加, 降低病毒滴度, 减弱病毒复制或增殖, 或减轻受试者的与病毒感染相关的一种或多种症状或并发症。

17. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体抑制病毒滴度增加, 降

低病毒滴度，减弱病毒复制或增殖，或在受试者业已暴露于或感染病毒之后减轻受试者的与病毒感染相关的一种或多种症状或并发症。

5 18. 如权利要求 16 或 17 的抗体，其中，所述症状或并发症选自寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染，耳痛和死亡。

10 19. 如权利要求 16 或 17 的抗体，其中，所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或结合亲和力：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

15 20. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体抑制病毒感染受试者，所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或与其具有相同或基本上相同的结合亲和力：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

20 21. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体减弱受试者对病毒感染的易感性。

25 22. 如权利要求 21 的抗体，其中，所述抗体具有与由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体相同或基本上相同的结合亲和力：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC

保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

23. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述流感病毒包括 A 型流感病毒。

5 24. 如权利要求 23 的抗体，其中，所述流感病毒包括 A/PR/34, A/HK8/68, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9, H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 H5N3。

10 25. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体的 EC_{50} 低于 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 以便抑制流感病毒感染 MDCK 细胞，这是通过基于细胞的 ELISA 测定的。

26. 如权利要求 25 的抗体，其中，所述流感病毒包括 A/PR/8/34, A/HK8/68, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9, H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 H5N3。

15 27. 如权利要求 25 的抗体，其中，所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或与其具有相同或基本上相同的结合亲和力：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

25 28. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体的 EC_{50} 低于 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 以便抑制 M2 与 MDCK 细胞结合，这是通过基于细胞的 ELISA 测定的。

29. 如权利要求 28 的抗体，其中，所述抗体具有与由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体相同或基本上相同的结合特异性：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日

为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

30. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体特异性地结合两种或两种以上流感病毒株或分离物。

5 31. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体特异性地结合两种或两种以上具有不同序列的 M2 蛋白。

32. 如权利要求 31 的抗体, 其中, 所述 M2 蛋白包括所述细胞外结构域。

33. 如权利要求 32 的抗体, 其中, 所述 M2 蛋白细胞外结构域选自:
10 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD,
SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD,
SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD, SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD,
SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD, 或 SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD (分别是 SEQ ID NOS: 1-8)。

15 34. 权利要求 1 的抗体的氨基酸亚序列。

35. 如权利要求 34 的抗体, 其中, 所述亚序列具有权利要求 1 的抗体的结合特异性或结合亲和力。

36. 如权利要求 34 的抗体, 其中, 所述亚序列选自重链和轻链可
变区 (V_H 和 V_L), Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, Fd, scFv, 和 sdFv。

20 37. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体包括抗体多聚物。

38. 如权利要求 1 的抗体或它的亚序列, 还包括一种或多种异源结构域。

39. 如权利要求 38 的抗体, 其中, 所述异源结构域包括氨基酸序列。

25 40. 如权利要求 38 的抗体, 其中, 所述异源结构域包括结合蛋白, 酶活性, 药物, 抗病毒剂, 毒素, 免疫调节剂, 可检测的部分或标记。

41. 如权利要求 1 的双特异性或双功能抗体。

42. 一种表达权利要求 1 的抗体的宿主细胞。

30 43. 如权利要求 42 的细胞, 其中, 所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或与其具有相同或基本上相同的结合亲和力: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas,

VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

44. 如权利要求 42 的细胞, 其中, 所述抗体是由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G 1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

45. 如权利要求 42 的细胞, 其中, 所述细胞是细菌, 酵母, 植物或动物。

46. 表达权利要求 1 的抗体的非人转基因动物或植物。

47. 一种编码由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的核酸: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

48. 如权利要求 47 的核酸, 还包括载体。

49. 如权利要求 1 的抗体, 还包括抗病毒剂。

50. 如权利要求 1 的抗体, 还包括抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的试剂。

51. 如权利要求 50 的抗体, 其中, 所述所述症状或并发症选自寒战, 发热, 咳嗽, 咽喉痛, 鼻充血, 鼻窦充血, 鼻感染, 鼻窦感染, 身体疼痛, 头痛, 疲劳, 肺炎, 支气管炎, 耳感染, 耳痛和死亡。

52. 一种药物组合物, 包括权利要求 1 的抗体, 和可以药用的载体

或赋形剂。

53. 一种试剂盒，包括权利要求 1 的抗体，有关用于治疗，抑制，阻止受试者感染一种或多种流感病毒株或分离物，或减弱受试者对一种或多种流感病毒株或分离物感染的易感性的说明书。

5 54. 如权利要求 53 的试剂盒，还包括用于将所述抗体递送到粘膜组织中的制品。

55. 如权利要求 53 的试剂盒，其中，所述制品包括适合受试者吸入或鼻腔施用的吸入器，气溶胶，喷雾剂或塑料挤瓶。

10 56. 如权利要求 53 的试剂盒，其中，所述粘膜组织包括鼻道，鼻窦，口腔，喉，咽或肺。

57. 如权利要求 53 的试剂盒，还抗病毒剂。

58. 如权利要求 53 的试剂盒，还包括抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的试剂。

15 59. 一种治疗受试者的流感病毒感染的方法，包括给所述受试者施用能有效治疗受试者的流感病毒感染的量的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。

60. 如权利要求 59 的方法，其中，所述抗体是在所述受试者感染之前，基本上同时或者在感染之后施用的。

20 61. 如权利要求 59 的方法，其中，所述抗体是在所述受试者感染的基本上同时或者在感染之后施用的。

62. 如权利要求 59 的方法，其中，所述施用产生了治疗效果。

25 63. 如权利要求 59 的方法，其中，所述治疗效果包括抑制病毒滴度增加，降低病毒滴度，抑制病毒复制增强，减弱病毒复制，抑制病毒增殖增强，减弱病毒增殖，或减轻受试者的与病毒感染相关的一种或多种症状或并发症。

64. 如权利要求 63 的方法，其中，所述症状或并发症选自寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染，耳痛和死亡。

30 65. 如权利要求 59 的方法，其中，所述治疗效果包括加速受试者从流感病毒感染恢复。

66. 如权利要求 59 的方法，其中，所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或与其具有相同或基本上相同的结

合亲和力: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), and L 17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA).

67. 如权利要求 59 的方法, 其中, 所述抗体是由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA).

68. 如权利要求 59 的方法, 其中, 所述抗体的 EC_{50} 低于 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 以便抑制流感病毒感染 MDCK 细胞, 是通过基于细胞的 ELISA 测定的。

69. 如权利要求 59 的方法, 其中, 所述流感病毒株包括 A/PR/8/34, A/HK/8/68, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9, H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 H5N3。

70. 一种抑制一种或多种流感病毒株或分离物对受试者的感染的方法, 包括给受试者施用能有效抑制一种或多种流感病毒株或分离物对所述受试者的感染或者减轻所述受试者对流感病毒感染的易感性的量的特异性地结合流感 M2 的人的, 人源化的或嵌合的抗体。

71. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述抗体是在受试者感染之前, 基本上与感染同时或者在感染之后施用的。

72. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述抗体基本上是在受试者感染的同时或者在感染之后施用的。

73. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述施用产生了治疗效果。

74. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述治疗效果包括保护受试者免受病毒感染或减轻受试者对病毒感染的易感性。

75. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述抗体具有由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的结合特异性或与其具有相同或基本上相同的结合亲和力: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

76. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述抗体是由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

77. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述抗体的 EC₅₀ 低于 3.0 μg/ml 以便抑制流感病毒感染 MDCK 细胞, 这是通过基于细胞的 ELISA 测定的。

78. 如权利要求 70 的方法, 其中, 所述流感病毒株包括 A/PR/8/34, A/HK/8/68, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9, H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 H5N3。

79. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体包括由以下杂交瘤或 CHO 细胞系生产的抗体的重链可变序列和轻链可变序列: no. 2074 (ATCC PTA-4025), 161 (ATCC PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), 和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

80. 如权利要求 1 的抗体, 其中, 所述抗体包括由以下核酸序列编

码的重链可变序列和轻链可变序列： SEQ ID NO : 9 和 SEQ ID NO : 10 所示核酸序列，或针对 SEQ ID NO : 9 和 SEQ ID NO : 10 简并的核酸序列。

81. 如权利要求 1 的抗体，其中，所述抗体包括如 SEQ ID NO : 11 和 SEQ ID NO : 12 所示的重链可变序列和轻链可变序列。

82. 如权利要求 79 - 81 中任意一项的抗体，其中，所述抗体包括人 IgG1 亚型。

针对流感病毒 M2 蛋白的人单克隆抗体及其制备和使用方法

优先权申请信息

- 5 本申请要求 2002 年 3 月 13 日提交的美国临时专利申请流水号 60/364,997 的优先权。

技术领域

- 10 本发明涉及抗体，更具体地讲，涉及特异性地结合流感病毒 M2 蛋白的人的、人源化的和嵌合的单克隆抗体。

背景

- A 或 B 型流感病毒几乎每年冬天都会在所有国家造成疾病的流行，并且，是在发达国家导致死亡的主要原因。在美国，这种冬季流感流行可造成 10% - 20% 的人口发病，并且与每年平均 20,000 人死亡和 114,000 人住院相关。控制流感的现有方法是每年用灭活的完整病毒或亚单位疫苗进行接种。流感病毒的主要中和抗原是红细胞凝集素 (HA) (Frace 等, Vaccine 17: 2237(1999))。不过，由于 HA 的经常性的和无法预测的抗原变异，所述疫苗通常不能提供对不同病毒株的最佳保护性免疫。另外，对于诸如老年患者，癌症患者和由于正在进行治疗和/或疾病造成的免疫缺陷的其他患者的免疫受损的个体来说，接种疫苗不能提供有效的保护。

- 红细胞凝集素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 是刺激抗体产生的两种主要抗原。由于这两种蛋白经常发生抗原性变异，它们不是开发治疗药物的最佳目标。A 型流感病毒的第三种跨膜蛋白，基质蛋白 2 (M2)，是由病毒感染过的细胞大量表达的，其中，推测它能提供病毒复制所必须的跨膜质子流 (Ciampor 等, Virus Research 22: 247 (1992); Grambas and Hay, Virology 190: 11 (1992); Sugrue 等, EMBO Journal 9: 3469 (1990))。与 HA 和 NA 不同，M2 是保守的，并且可以作为开发流感患者的基于抗体的被动免疫治疗的目标 (Ito 等, J Virology 65: 5491(1991); Slepishkin 等, Vaccine 13: 1399 (1995); Neiryneck 等, Nature Med. 5: 1157 (1999))。

业已报道了用杆状病毒表达的 M2 蛋白对小鼠进行接种，能增强从小鼠肺中清除病毒，并且保护小鼠免受同源和异源 A 型流感病毒的死亡侵袭 (Slepishkin 等, Vaccine 13: 1399 (1995))。最近的报道业已表明，将 M2 的细胞外结构域与乙型肝炎病毒核心 (HBc) 蛋白融合，产生了编码 M2HBc 的融合基因，在将它用作疫苗时，可以在小鼠中提供抗致死性病毒侵袭的 90-100% 的保护作用 (Neiryneck 等, Nature Med. 5: 1157 (1999))。这种保护作用可以通过使用来自 M2HBc 接种过的小鼠的血清被动转移给未接种过的小鼠。Zebedee 等证实了抗-M2 小鼠单克隆抗体对流感病毒在噬斑测定中的生长具有适当的作用。对于 A/Udorn/72 病毒来说，在培养期间存在抗体时，噬斑的尺寸，而不是噬斑的数量更小。对于 A/WSN/33 株来说，没有发现对噬斑尺寸和数量的影响，表明这种特殊的单克隆抗体不是对不同的流感病毒株普遍有效的 (Zebedee 和 Lamb, J Virol 62 : 27621988)。当在病毒侵袭之前 1 天把这种抗体被动转移到小鼠体内时，在感染之后 3-4 天病毒在肺中的复制水平，比接受不相关抗体的小鼠低大约 100 倍 (Treanor et al., J. Virol 64 : 1375)。不过，当在病毒感染之前 1 天把这种抗体给 SCID 小鼠施用，肺病毒滴度与对照小鼠没有差异 (Palladino 等, J Virol. 69: 2075 (1995))。Mozdzanowska 等 (Virology 254: 138 (1999) 使用相同的鼠抗-M2 单克隆抗体 14C2，能够证实与 Zebedee 等的结果吻合，即在病毒噬斑测定中，抗-M2 单克隆抗体可以降低病毒滴度，但是，不能降低流感病毒株 A/PR/8/34 的病毒滴度，表明 14C2 不能普遍预防流感。

概述

本文所披露的全人的、人源化的和嵌合的 (例如，人/小鼠嵌合体) 抗-M2 单克隆抗体能够识别 A/PR/8/34 和 A/HK/8/68 株，表明了针对 A 型流感病毒的广泛的反应性。另外，在给业已受到 A 型流感病毒感染之后的动物施用抗体时，本文所披露的人的、人源化的和嵌合的抗-M2 单克隆抗体能够保护小鼠免受 A/PR/8/34 A 型流感病毒株的致死性侵袭。

因此，本发明提供了包括结合流感病毒蛋白 M2 的人的、人源化的和嵌合的抗体的组合物，含有人的、人源化的和嵌合的抗体的药物组合物，以及含有所述抗体的试剂盒。本发明的人的、人源化的和嵌合的抗体可

用于治疗患有流感或存在患流感的危险的受试者,包括在感染之前(预防)或感染之后(治疗);流感诊断,包括测定病毒滴度;纯化/分离,包括纯化或分离完整病毒或M2蛋白;以及其他分析系统。因此,本发明还提供了将所述抗体用于治疗(例如,治疗流感病毒感染),诊断(检测样品中流感病毒或M2蛋白的含量)和纯化(纯化或分离流感病毒或M2蛋白)的方法。

在一种实施方案中,提供了特异性地结合M2细胞外结构域的至少一部分的人抗体。在一个特定方面,所述细胞外结构域包括氨基酸序列: SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 1), 它的亚序列或它的氨基酸变体(例如,氨基酸取代,插入,缺失或添加)。另一方面,所述氨基酸取代选自:

SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD, SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD, SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD, SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD, SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD, 或 SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD (分别为 SEQ ID NOS: 2-8)。

本发明的抗体包括多克隆和单克隆抗体以及它们的混合物,它可以是IgG, IgA, IgM, IgE, IgD中的任意一种,以及它们的任何同种型,例如, IgG1, IgG2, IgG3或IgG4。抗体包括完整的人的、人源化的和嵌合的免疫球蛋白分子,具有两个全长的重链和两个全长的轻链,(例如,重链和轻链可变区)以及以及重链或轻链的亚序列,它保留了特异性地结合M2的亲本的完整的人的、人源化的和嵌合的抗体的至少一部分功能(M2结合特异性, M2结合亲和力或抗-流感病毒活性)。典型的亚序列包括 Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, Fd, 单链 Fvs (scFv), 二硫键连接的 Fvs(sdFv)和 VL 或 VH, 或完整的人的或人源化的免疫球蛋白的其他M2蛋白结合片段。因此,本发明的抗体包括通过以下杂交瘤或CHO细胞系生产的重链可变序列和轻链可变序列: no. 2074 (ATCC PTA-4025), 161 (ATCC PTA-4026), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为2003年3月11日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为2003年3月11日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为2003年3月11日)和 L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

在各个方面，所述抗体是通过以下细胞系生产的（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日) 和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

抗体还包括具有本发明人的、人源化的和嵌合的抗体的结合特异性和结合亲和力的人的、人源化的和嵌合的抗体。在一种实施方案中，抗体具有通过以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）生产的抗体的结合特异性： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日) 和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。在另一种实施方案中，抗体具有通过以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）生产的抗体的结合亲和力： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日) 和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。

本发明的抗体还包括人的、人源化的和嵌合的抗体，它具有在体外

或体内抑制病毒感染的能力，或抑制M2结合细胞，例如，由以下细胞系（例如，杂交瘤或CHO细胞系）所生产的抗体：no. 2074（ATCC保藏号PTA-4025；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA），161（ATCC保藏号PTA-4026；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA），
 5 N547（ATCC保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，ATCC收到日为2003年3月11日），L66（ATCC保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，收到日为2003年3月11日），C40G1（ATCC保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA，收到日为2003年3月11日）和L17（ATCC保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA）。在一种实施方案中，通过基于细胞的ELISA
 10 测定而确定的一种抗体抑制流感病毒感染MDCK细胞的 EC_{50} 低于 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 。在各个方面，所述流感病毒是A型流感病毒，如A/PR/8/34或A/HK8/68。

本发明的抗体还包括人的、人源化的和嵌合的抗体，它能够结合具有不同氨基酸序列的两种或两种以上M2蛋白，所述蛋白可任选存在于不同的流感病毒上（例如，病毒株或分离物）。在一种实施方案中，所述抗体结合在M2细胞外结构域序列的至少一部分。在一个特定方面，M2细胞外结构域序列包括以下氨基酸序列：SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD（SEQ ID NO：1），它的亚序列或它的氨基酸变体（例如，氨基酸取代，插入，
 15 缺失或添加），如SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD（SEQ ID NO：2）。在另一个特定方面，M2细胞外结构域序列选自：

SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD ， SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD ，
 SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD ， SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD ，
 SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD ， SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD ， 和
 25 SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD（分别为SEQ ID NOS：2-8）。

本发明的抗体包括业已进行过修饰以便形成寡聚体的形式，例如，通过寡聚化结构域连接（例如，亮氨酸拉链基序）或通过交联剂结合（例如，化学交联）连接。因此，本发明的抗体包括多聚物形式，例如，二聚体，三聚体，四聚体或更高级的人的、人源化的和嵌合的抗体寡聚体。
 30 与单体形式的抗体相比，所述抗体多聚物通常表现出对M2的较高的亲和力。

本发明的抗体还包括一个或多个异源结构域，它赋予能结合M2的人

的或人源化抗体的独特的功能或活性。当一个或多个氨基酸与所述抗体不同时（即，它们不是天然抗体的一部分），抗体就包括氨基酸异源结构域。在一种实施方案中，异源结构域包括结合蛋白（例如，报道物或配体结合），酶活性，药物，抗病毒剂，毒素，免疫调节剂，可检测部分或
5 标记。在一方面，所述结合蛋白包括具有不同于能特异性结合流感病毒蛋白 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体的结合特异性或亲和力的抗体。因此，本发明还提供了多特异性和多功能抗体（例如，双特异性和双功能抗体，如能结合两种或两种以上抗原或分别具有两种或两种以上功能或活性）。

10 本发明的抗体能够结合流感病毒蛋白 M2，它任选存在于一种或多种流感病毒株或分离物上。因此，所述抗体对 M2 或流感病毒的传染性，复制，增殖，滴度，与流感相关的一种或多种症状或并发症的严重性或持续时间，或流感病毒感染的易感性具有一种或多种作用，即，抗-流感病毒活性。在一种实施方案中，人的，人源化的或嵌合的抗体能抑制一种
15 或多种流感病毒株或分离物在体外或体内感染细胞。在另一种实施方案中，人的，人源化的或嵌合的抗体能减弱一种或多种流感病毒株或分离物的流感病毒滴度或流感病毒蛋白的量。在另一种实施方案中，人的，人源化的或嵌合的抗体能抑制或阻止一种或多种流感病毒株或分离物的流感病毒滴度或流感病毒蛋白的量增加。在另一种实施方案中，人的，
20 人源化的或嵌合的抗体能保护受试者免受感染或降低受试者对一种或多种流感病毒株或分离物的易感性。在另一种实施方案中，人的，人源化的或嵌合的抗体能减轻与一种或多种流感病毒株或分离物相关的一种或多种症状或并发症（例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳
25 感染或耳痛）。在各个方面，人的，人源化的或嵌合的抗体是系统性施用的（例如，静脉注射，皮下注射，静脉输液，肌肉注射），或局部用于受试者的粘膜组织（例如，鼻道，鼻窦，喉，咽，食道，耳或耳道）或肺。在各个方面，所述流感病毒株选自 A/PR/8/34 或 A/HK/8/68，或选自下组的其他株 H1N1，H2N2，H3N2，H5N1，H9N2，H2N1，H4N6，H6N2，
30 H7N2，H7N3，H4N8，H5N2，H2N3，H11N9，H3N8，H1N2，H11N2，H11N9，H7N7，H2N3，H6N1，H13N6，H7N1，H11N1，H7N2 和 H5N3。

还提供了表达本发明人的、人源化的和嵌合的抗体的宿主细胞。细

胞包括，但不限于细菌，酵母，植物，动物（例如，哺乳动物细胞如杂交瘤细胞系和 CHO 细胞系），以及完整的生物，如表达本发明人的，人源化的或嵌合的抗体的非人动物和植物。

还提供了编码本发明抗体，包括它的亚序列和变体的核酸。核酸包括用于对所述核酸进行克隆或其他遗传学操作或用于在溶液、细胞或任何生物体中表达的载体。

还提供了包括本发明的抗体的联合组合物。在一种实施方案中，组合物包括结合流感 M2 蛋白和抗病毒剂的人的，人源化的或嵌合的抗体。在另一种实施方案中，组合物包括结合流感 M2 蛋白的人的，人源化的或嵌合的抗体和能抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症（例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，鼻窦感染或耳感染）的试剂。

提供了包括本发明抗体和可以药用的载体或赋形剂的药物组合物。在一种实施方案中，载体适合用于受试者的粘膜组织（例如，鼻道，鼻窦，咽，喉，食道）或肺。

还提供了在一个容器中包括一种或多种本发明抗体的试剂盒。在一种实施方案中，试剂盒包括有关用于治疗（预防或治疗），抑制，阻止，减弱对流感病毒株或分离物感染受试者的易感性，或减轻与一种或多种流感病毒株或分离物对受试者的感染相关的一种或多种症状或并发症的说明书。在另一种实施方案中，所述容器包括适合患者吸入或鼻施用的气溶胶，喷雾剂或塑料挤瓶。在另一种实施方案中，所述试剂盒或容器包括抗病毒剂（例如，抗体或药物）或能抑制与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的试剂。

提供了用于治疗受试者的流感病毒感染的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效治疗患者的流感病毒感染的量的特异地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。在一方面，所述抗体基本上在所述受试者感染的同时或者在感染之后施用的，即，治疗性处理。在另一方面，所述抗体提供了治疗效果。在各个方面，治疗效果包括减弱或减轻流感病毒感染的一种或多种症状或并发症，病毒滴度，病毒复制或一个或多个流感病毒株的病毒蛋白的量。可以减弱或减轻的流感病毒感染的症状或并发症包括，例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲

劳，肺炎，支气管炎，耳感染或耳痛。在另一方面，治疗效果包括加速受试者从流感病毒感染恢复。

还提供了抑制一种或多种流感病毒株或分离物对受试者的感染的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用能有效抑制一种或多种流感病毒株或分离物对所述受试者的感染或者减轻所述受试者对流感病毒感染的易感性的量的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。在各个方面，所述抗体是在受试者感染之前（预防），基本上与感染同时或者在感染之后施用的。在另一方面，所述抗体提供了治疗效果。在各个方面，治疗效果包括减轻或减弱一种或多种流感病毒感染的症状或并发症（例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染或耳痛），一种或多种流感病毒株或分离物病毒滴度或病毒蛋白的量，或受试者对一种或多种流感病毒株或分离物感染的易感性。

还提供了抑制病毒滴度增加，病毒复制，病毒增殖或减少流感病毒蛋白在受试者体内的含量的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用一定量的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体，所述量能有效阻止受试者体内病毒滴度增加，病毒复制或减少一种或多种流感病毒株或分离物的流感病毒蛋白的量。

还提供了用于保护受试者免受一种或多种流感病毒株或分离物感染或减轻受试者对感染的易感性的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给受试者施用能有效保护受试者免受一种或多种流感病毒株或分离物感染或有效减轻受试者对感染的易感性的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。在一方面，所述保护作用包括减轻或减弱与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症（例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染或耳痛）。

本发明的方法可以用具有通过以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）生产的抗体的结合特异性或结合亲和力的抗体实施： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保

藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日) 和 L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。可以在给受
5 试者施用之前将抗体掺入可以药用的载体或赋形剂。

本发明的方法，包括治疗，诊断和纯化/分离可应用于任何流感病毒株/分离物或株/分离物的组合。各种实施方案中，所述流感病毒株选自 A/PR/8/34 或 A/HK/8/68，或选自下组的其他株 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9,
10 H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 H5N3。

附图说明

图 1 表示 C40 抗体的免疫球蛋白轻链 (C40Lv (SEQ ID NO : 10))
15 和重链 (C40Hv (SEQ ID NO : 9)) 可变区的核苷酸和氨基酸序列。

图 2 表示结合在 A) A/PR/8/34 和 B) A/HK/8/68 病毒感染过的 MDCK 细胞上的 M2 上的抗体 nos. 2074, N547, L66 和 C40G1。

图 3 表示 A) C40G1, C40G4 和 L30 的保护效力的比较；和
B) 与对病毒感染过的 MDCK 细胞上的 M2 具有弱的结合亲和力的抗
20 体 (即 F1 和 F2) 相比, no. 2074, F1 和 F2 抗体, 和 IgG1 同种型 M2 抗体能提供对动物的来自致死病毒侵袭的更大的保护作用。

图 4 表示结合在 A) M2 肽/BSA 和 B) 在流感病毒感染过的细胞上表达的 M2 上的 M2 抗体的比较。

图 5 表示施用 M2 抗体 no. 2074 对动物的预防性保护作用。

25 图 6 表示施用 M2 抗体 no. 2074 对动物的治疗性保护作用。

详细说明

本发明至少部分基于人的、人源化的和嵌合的抗-M2 单克隆抗体。若干种本发明的抗体对基于不同 A 型流感病毒株的各种 M2 细胞外结构域
30 序列具有宽的反应性。在预防性 (病毒感染之前) 和治疗性 (病毒感染之后) 小鼠流感模型中, 被动转移本发明的人抗-M2 单克隆抗体, 能保护动物免受流感 A/PR/8/34 的致死剂量的侵袭。因此, 本发明的抗体可用于

治疗多种流感病毒株或分离物。另外，由于本发明的抗体是人的，在反复使用时不大可能诱导超敏性，并且更有可能较长时间地留在受试者（例如，人）体内。

因此，根据本发明，提供了特异性结合流感 M2 蛋白的人的、人源化的和嵌合的抗体。在一种实施方案中，提供了特异性结合流感病毒蛋白 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体细胞外结构域。在一个特定方面，细胞外结构域包括以下氨基酸序列 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 1)，它的一部分或它的氨基酸变体（例如，氨基酸取代，插入，缺失或添加），如 SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (SEQ ID NO: 2)。在特定方面，细胞外结构域具有选自下组的氨基酸取代：
 SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD ， SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD ，
 SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD ， SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD ，
 SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD ， 3LLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD ， 和
 SLLTEVETPIRNGWECRCNDSSD (分别为 SEQ ID NOS: 2-8)。

术语"抗体"表示能分别通过重链和轻链可变结构域，VH 和 VL 与其他分子（抗原）结合的蛋白。"抗体"表示任何免疫球蛋白分子，如 IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, 以及它们的任何亚型。术语"抗体"还表示免疫球蛋白分子的功能性片段，如 Fab, ab', (Fab')₂, Fv, Fd, scFv 和 sdFv, 除非另有说明。

术语"M2 抗体"或"抗-M2 抗体"表示能特异性结合流感 M2 蛋白的抗体。特异性结合表示对存在于 M2 蛋白上的表位具有选择性。就是说，与除了 M2 以外的蛋白结合，以便这种结合不会明显干扰 M2 的检测。可以用本领域公知的分析方法区分选择性结合和非选择性结合。

本发明的代表性的抗体如下： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。典型的重链可变序列

和轻链可变序列是分别如 SEQ ID NO : 11 和 SEQ ID NO : 12 所示的氨基酸序列。

5 在本文中，术语"单克隆"在用于限定抗体时，表示基于、获自或源于单一克隆，包括真核、原核或噬菌体克隆的抗体。因此，"单克隆"抗体在本文中是结构限定的，而不是以生产它的方法定义的。在本文中，赋予杂交瘤或其他细胞系，如 no. 2074, 161, N547, L66 和 C40G1 的具体名称，编号或其他命名，还用于表示抗体的名称。

10 术语"人的"在用于限定抗体时，表示所述抗体的氨基酸序列完全是人的。因此，"人的 M2 抗体"或"人的抗-M2 抗体"表示具有人的免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，即，特异性地结合 M2 的人重链和轻链可变区和恒定区。就是说，所述抗体的所有氨基酸都是人的或存在于人的抗体上。因此，例如，可以通过用存在于人抗体上的氨基酸残基取代非人氨基酸残基，使非人抗体成为全人的抗体。存在于人的抗体上的氨基酸残基，CDR 区图谱和人抗体共有残基为本领域所公知（参见，例如，Kabat, 15 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987) ; 以及 Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 186: 651 (1987))。在以下文献中披露了基于对 22 种已知的人 V_H III 序列的测定的人 V_H 亚基 III 的共有序列，基于对 30 种已知的人 κ I 序列的测定的共有序列：20 Padlan Mol. Immunol. 31: 169 (1994); 和 Padlan Mol. Immunol. 28: 489 (1991)。

25 术语"人源化"在用于限定抗体时，表示所述抗体的氨基酸序列在一个或多个决定区 (CDRs) 上具有非人氨基酸残基（例如，小鼠，大鼠，山羊，兔子，等），它能特异性地结合受体人免疫球蛋白分子上的理想的抗原（例如，M2），以及 Fv 构架区 (FR) 上的一个或多个人氨基酸残基，它们是 CDRs 侧翼的氨基酸残基。所述免疫球蛋白的人构架区残基可以用相应的非人残基取代。因此，例如，所述人构架区上的残基可以用来自非人 CDR 供体抗体上的相应残基取代，以便改变，通常是提高抗原亲和力或特异性。另外，人源化抗体可以包括既不存在于人的抗体上，又不存30 在于所述供体或构架序列上的残基。例如，在人抗体或供体非人抗体上不存在的特定位置上进行的构架取代，预计能够改善人抗体在所述位置上的结合亲和力或特异性。基于分子模拟的抗体构架和 CDR 取代为本领

域所熟知,例如,通过模拟 CDR 和构架残基之间的相互作用,鉴定对抗原结合和序列比较重要的构架残基,从而鉴定位于特定位置上的异常构架残基(参见,例如,美国专利号 5,585,089;和 Riechmann 等, Nature 332: 323 (1988))。在本领域被称作"灵长类化的"抗体包括在本文中的"人源化"的含义内,所不同的是,除了任何人残基之外,所述受体系免疫球蛋白分子和构架区氨基酸残基可以是任何灵长类残基。

在本文中,术语"嵌合的"以及它的语法变化形式,在用于限定抗体时,表示所述抗体的氨基酸序列包括源于、获自或分离自两种或两种以上不同物种的一个或多个部分。就是说,例如,抗体的一部分可以是人的(例如,恒定区)而所述抗体的另一部分是非人的(例如,鼠可变区)。因此,嵌合抗体是这样的分子,其中,抗体的不同部分源于不同物种。与人源化抗体不同,嵌合抗体可以在所述抗体的任何部分具有不同的物种序列。嵌合抗体的一种例子是抗体 no. 2074,它具有小鼠 λ 轻链和人 γ 重链。

在本文中,术语"M2", "M2 蛋白", "M2 序列"和"M2 结构域"表示 M2 蛋白序列(例如,诸如所述细胞外结构域的亚序列)的全部或一部分,它分离于、基于或存在于任何天然存在的或人工产生的流感病毒株或分离物中。因此,术语 M2 等,包括在病毒生活周期中通过突变产生的,或反应于选择压力(例如,药物治疗,宿主细胞亲嗜性或感染性扩增等)产生的天然存在的 M2 序列变体,以及重组或合成产生的 M2 序列。

本发明的 M2 抗体包括具有 κ 或 λ 轻链序列的抗体,天然存在的全长的抗体,它的混合物(即, κ 和 λ 链序列的融合体),以及它的亚序列,正如下文详细披露的。天然存在的抗体分子包括两个 κ 和两个 λ 轻链。 κ 和 λ 轻链之间的主要差别在于恒定区的序列上。

本发明的 M2 抗体包括具有本文所举例的 M2 抗体的结合特异性的抗体,例如,具有以下抗体的结合特异性: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心,

Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。在一方面, M2 抗体具有重(H) 或轻(L) 链序列, 或它的亚序列, 如下面的任意一个: nos. 2074 (ATCC 保藏号 PTA- 4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号 ; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 其前提是所述抗体的重链或轻链序列, 或亚序列具有以下抗体的结合特异性: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号 ; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号 ; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

术语"结合特异性", 在用于限定抗体时表示所述抗体能特异性地结合与参考抗体相同的抗原表位的全部或一部分。因此, 具有被称为 no. 2074 的抗体的结合特异性的 M2 抗体, 能特异性地结合与被称为 no. 2074 的抗体相同的表位的全部或一部分的结合特异性; 具有被称为 161 的抗体的结合特异性的 M2 抗体, 能特异性地结合与被称为 161 的抗体相同的表位的全部或一部分的结合特异性; 具有被称为 N547 的抗体的结合特异性的 M2 抗体, 能特异性地结合与被称为 N547 的抗体相同的表位的全部或一部分的结合特异性; 具有被称为 L66 的抗体的结合特异性的 M2 抗体, 能特异性地结合与被称为 L66 的抗体相同的表位的全部或一部分的结合特异性; 具有被称为 C40G1 的抗体的结合特异性的 M2 抗体, 能特异性地结合与被称为 C40G1 的抗体相同的表位的全部或一部分的结合特

异性；如此等等。

抗原表位的一部分表示所述表位的亚序列或一部分。例如，如果表位包括 8 个连续氨基酸，因此，表位的亚序列和一部分可能是这 8 个氨基酸序列表位上的 7 个或更少的氨基酸。另外，如果表位包括不连续的氨基酸序列，如彼此不连续的 5 个氨基酸序列和 8 个氨基酸序列，但是，由于蛋白折叠能够形成表位，那么表位的亚序列以及它的一部分，可以是那 5 个氨基酸序列或那 8 个氨基酸序列自身。

具有本文所述 M2 抗体的结合特异性的抗体，能竞争以下抗体的结合：no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025)，161 (ATCC 保藏号 PTA-4026；)，N547 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L66 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，C40G1 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日)，L17 (ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)，and C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号；美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA, USA)。具有本文所述 M2 抗体的结合特异性的本发明的抗体可以通过本领域公知的任何方法表征，以便测定竞争结合，例如，本文所披露的免疫测定。由于结合亲和力可能与作为例子的抗体不同，所述抗体会改变它们竞争结合 M2 的能力。在特定实施方案中，所述抗体能竞争性抑制至少 95%，至少 90%，至少 85%，至少 80%，至少 75%，至少 70%，至少 65%，至少 60%，至少 55%，至少 50%，至少 45%，至少 40%，至少 35%，或至少 30%，或更低的结合。

表位通常是短的氨基酸序列，例如，长度大约为 5- 15 个氨基酸。鉴定表位的系统技术为本领域所公知，并且披露于例如，美国专利号 4, 708, 871 的文献中。简单地讲，可以合成源于 M2 抗原的一系列重叠的寡肽，并且结合在针的固相阵列上，在每个针上有一种独特的寡肽。所述针的阵列可以包括 96-孔微量滴定板，使得人们可以同时排列所有 96 种寡肽，例如，用于结合抗-M2 单克隆抗体。另外，噬菌体展示肽文库试剂盒(New England BioLabs)现在可商业化用于表位作图。采用上述方法，可以确定连续氨基酸的每一种可能的亚型的结合亲和力，以便鉴定特定抗体结合的表位。当表位长度肽序列被用于免疫获得了与所述肽

序列结合的抗体的动物时，还可以通过推断鉴定表位。

本发明的M2抗体还包括与本文所披露的M2抗体具有相同的结合亲和力和具有基本上相同的结合亲和力的人的、人源化的和嵌合的抗体。例如，本发明的M2抗体的亲和力可以高于或低于参考抗体的2-5, 5-10, 10-100, 100-100或1000-10,000倍。因此，本发明的其他实施方案提供了与以下抗体具有相同的结合亲和力和具有基本上相同的结合亲和力的M2抗体：no. 2074 (ATCC保藏号PTA-4025), 161 (ATCC保藏号PTA-4026;), N547 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日为2003年3月11日), L66 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日为2003年3月11日), C40G1 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日为2003年3月11日), L17 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), and C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 其前提是重链或轻链序列, 或它的亚序列具有以下抗体的结合特异性：no. 2074 (ATCC保藏号PTA-4025), 161 (ATCC保藏号PTA-4026;), N547 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, received by ATCC on March 11, 2003), L66 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日为2003年3月11日), C40G1 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日为2003年3月11日), L17 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), and C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

在本文中，术语“相同的”在用于限定抗体结合亲和力时，表示解离常数(K_D) 在参考抗体的约5-100倍内(比参考抗体的亲和力高或低5-100倍)。术语“基本上相同”在用于限定抗体结合亲和力时，表示解离常数(K_D) 在参考抗体的约5-5000倍内(比参考抗体的亲和力高或低5-5000倍)。

本发明所包括的其他抗体具有以下抗体的结合特异性：no. 2074 (ATCC保藏号PTA-4025), 161 (ATCC保藏号PTA-1026;), N547 (ATCC保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC收到日

为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 并且对 M2 的结合亲和力的解离常数 (Kd) 低于 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, 和 10^{-15} M.

本发明的人 M2 抗体包括具有本文所述 M2 抗体的一种或多种抗-流感病毒活性的至少一部分的抗体(例如, 抑制流感病毒在体外或体内对细胞的感染, 抑制流感病毒增殖或复制, 减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症, 减弱对流感病毒感染的易感性等)。因此, 本发明的其他实施方案提供了具有以下抗体的一种或多种抗流感病毒活性的至少一部分的 M2 抗体: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日 3), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA).

术语"活性"在用于比较抗体和参考抗体时, 表示所述抗体至少具有参考抗体的一部分活性, 例如, 结合亲和力, 结合特异性或抗流感病毒活性。因此, 具有被称为 N547 的 M2 抗体活性的抗体, 具有被称为 N547 的 M2 抗体的一种或多种活性的至少一部分; 具有被称为 L66 的 M2 抗体活性的抗体, 具有被称为 L66 的 M2 抗体的一种或多种活性的至少一部分; 具有被称为 C40G1 的 M2 抗体活性的抗体, 具有被称为 C40G1 的 M2 抗体的一种或多种活性的至少一部分; 如此等等。术语"至少一部分"表示

所述抗体具有较弱的活性，但是，所述抗体至少保留了参考 M2 抗体的某些活性，例如，对 M2 的至少部分结合亲和力，至少部分抗流感病毒活性等。

具有举例说明的人 M2 抗体活性的抗体可以用平板结合的 M2 肽作为包被抗原通过结合测定 (ELISA)，对病毒感染的 MDCK 细胞上的 M2 蛋白的结合测定 (基于细胞的 ELISA)，以及通过 M2 肽特异性抑制抗体与病毒感染的 MDCK 细胞上的 M2 的结合 (M2 细胞外蛋白) 而鉴定。其他测定包括流感病毒的体外细胞感染性测定 (Zebedee 等 *J Virology* 62: 2762 (1988)) 以及体内动物测定，如在实施例 1, 3 和 4 中所披露的。

在本文中披露了人抗体生产方法，并且为本领域所熟知。例如，正如本文所披露的，将与 KLH 或 BSA 偶联的 M2 蛋白用于对人转染色体 KM 小鼠 (WO 02/43478) 或 HAC 小鼠 (WO 02/092812) 进行接种。KM 小鼠或 HAC 小鼠表达人免疫球蛋白基因。采用常规杂交瘤技术，分离了来自对 M2 抗原高度敏感的免疫过的小鼠的脾细胞，并且与骨髓瘤细胞融合。获得了 12 种单克隆抗体，它们是：no. 2074, C40, L17, L30, L40, L66, N547, S212, S80, S900, F1, 和 F2，它们能与 M2 肽和/或 M2-BSA 偶联物反应，但是不能结合 BSA 或 KLH 载体。在以下文献中披露了用于生产人抗体的技术的概述：Lonberg 和 Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65 (1995)。披露了不能表达内源免疫球蛋白的具有一个或多个免疫球蛋白基因 (κ 或 λ) 的转基因动物，例如，参见美国专利号 5, 939, 598。人抗体还可以从商业供应商那里获得，如 Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 和 Genpharm (San Jose, CA)。披露了用于生产人抗体和人单克隆抗体的其他方法 (参见，例如，WO 98/24893; WO 92/01047 ; WO 96/34096; WO 96/33735; 美国专利号 5, 413, 923; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 569, 825; 5, 661, 016; 5, 545, 806; 5, 814, 318; 5, 885, 793; 5, 916, 771; 和 5, 939, 598)。

还可以用其他技术方便地制备 M2 单克隆抗体，这些技术包括杂交瘤，重组，噬菌体展示技术，或它们的组合 (参见美国专利号 4, 902, 614, 4, 543, 439, 和 4, 411, 993; 还可参见，*Monoclonal antibodies, Hybridomas : A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, 和 Bechtol (eds.), 1980, 和 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 2nd ed. 1988)。还可以在所述方法中使用的合适技术包括M2亲和纯化, 非变性凝胶纯化, HPLC或RP-HPLC, 在蛋白A柱上纯化, 或这些技术的任意组合。抗体同种型可以通过ELISA测定而确定, 例如, 可以用小鼠Ig-吸附的抗-人Ig鉴定人Ig。

5 可以通过本领域已知的多种技术将抗体人源化, 例如, CDR-嫁接 (EP 239, 400; W091/09967; 美国专利号 5, 225, 539; 5, 530, 101; 和 5, 585, 089), 镶面或再涂层 (EP 592, 106; EP519, 596; Padlan, *Molecular Immunol.* 28 : 489 (1991); Studnicka 等, *Protein Engineering* 7: 805 (1994); Roguska. 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* USA 91: 969 (1994)), 和链混排(美国专利号 5, 565, 332)。人的共有序列 (Padlan *Mol. Immunol.* 31: 169 (1994); 和 Padlan *Mol. Immunol.* 28: 489 (1991)) 以前业已被用于将抗体人源化 (Carter 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992); 和 Presta 等 *J. Immunol.* 151: 2623 (1993))。

15 用于生产嵌合抗体的方法为本领域所公知 (例如, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi 等, *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies 等, (1989) *J. Immunol. Methods* 125: 191; 和美国专利号 5, 807, 715; 4, 816, 567; 和 4, 816, 397)。在以下文献中披露了这样的嵌合抗体, 其中, 来自一个物种的抗体的可变区被来自另一个物种的抗体的可变区所取代, 例如, 参见 Munro, *Nature* 312: 597 (1984); Neuberger 等, *Nature* 312: 604 (1984); Sharon 等, *Nature* 309: 364 (1984); Morrison 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984); Boulianne 等, *Nature* 312: 643 (1984); Capon 等, *Nature* 337: 525 (1989); 和 Traunecker 等, *Nature* 339: 68 (1989)。

25 适合制备抗体的 M2 蛋白可以通过本领域已知的多种标准蛋白纯化或重组表达技术中的任意一种生产。例如, M2 可以通过标准肽合成技术生产, 如固相合成。所述蛋白的一部分可以包括氨基酸序列, 如 T7 标记或多组氨酸序列, 以便有利于表达或合成的 M2 的纯化。M2 肽可以在细胞中表达, 并且可以纯化由所述细胞产生的蛋白。M2 蛋白可以作为较大蛋白的一部分, 通过重组方法表达。

30 适合产生免疫应答的 M2 的形式包括全长 M2 的肽亚序列 (例如, 长度通常为 4-5 个氨基酸或更多)。其他形式的 M2 包括含有制剂或提取物

的 M2，部分纯化的 M2 以及能表达 M2 的细胞或病毒或所述表达细胞或病毒的制剂。

可以免疫的动物包括小鼠，兔，大鼠，绵羊，山羊，或豚鼠；这些动物可以进行遗传学修饰，以便包括人 IgG 基因座。另外，为了增强免疫应答，可以将 M2 与另一种蛋白偶联，如卵白蛋白或匙孔血蓝蛋白 (KLH)，甲状腺球蛋白和破伤风类毒素，或与诸如弗氏完全或不完全佐剂的佐剂混合。最初的以及任何随后的选择性免疫可以通过腹膜内，肌内，眼内，或皮下途径施用。随后的施用可以与 M2 抗原制剂的浓度相同或不同，并且能够以规则的或不规则的间隔施用。

因此，在另一种实施方案中，本发明提供了生产人 M2 抗体，包括具有一种或多种抗流感病毒活性的抗体的方法，所述活性如抑制流感病毒感染，复制，增殖，或滴度，或抑制病毒复制的增强，增殖或滴度，或减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的严重性或持续时间，或对感染的易感性或具有抗各种流感病毒株或分离物的宽的反应性。在一种实施方案中，一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物（例如，小鼠）施用 M2 或它的免疫原性片段；筛选表达人 M2 抗体的动物；选择产生人 M2 抗体的动物；从产生人 M2 抗体的动物分离抗体；并且确定所述人 M2 抗体是否与 M2 结合。在另一种实施方案中，一种方法包括给能表达人免疫球蛋白的动物（例如，小鼠）施用 M2 或它的免疫原性片段；从产生人 M2 抗体的小鼠体内分离脾细胞；让所述脾细胞与骨髓瘤细胞融合以便产生杂交瘤；并且筛选能够表达具有抗流感病毒活性的人 M2 抗体的杂交瘤。

本发明还提供了业已修饰过的人 M2 抗体。修饰的例子包括所述抗体的一个或多个氨基酸取代，添加或缺失，其前提是所述修饰过的抗体具有未修饰过的 M2 抗体全部或至少一部分活性，例如，抗流感病毒活性。

修饰的一种特殊例子是将本发明的抗体改变为具有不同的同种型或亚型，例如，通过取代重链恒定区（参见，例如，实施例 2）。将 M2 抗体 C40 的 Ig 亚型从 IgG4 改变成 IgG1，导致了抗流感病毒活性的提高。因此，修饰包括从本发明的抗体上缺失大区域的氨基酸序列，以及用另一种氨基酸序列取代所述区域，无论所述序列的长度比缺失的区域长还是短

本发明包括的其他 M2 抗体的修饰是抗体衍生物，即，任何类型的分子与抗体的共价连接。抗体衍生物的具体例子包括糖基化的，乙酰化的，磷酸化的，酰胺化的，甲酰化的，遍在化的抗体，以及通过保护/封闭基团衍生化和多种化学修饰中的任意一种。

5 各个氨基酸取代可以用相同氨基酸进行，所不同的是，天然存在的 L-氨基酸被 D-型氨基酸取代。氨基酸取代可以是保守性的或非保守性的，并且可能位于所述抗体的恒定区或可变区。在恒定区或可变区的一个或几个保守性氨基酸取代可能是能够耐受的。保守性氨基酸取代的具体例子有： Ile, Val, Leu 或 Ala 彼此取代； Lys 和 Arg 彼此取代；
10 Glu 和 Asp 彼此取代；以及 Gln 和 Asn 彼此取代。在超变区发生的多个氨基酸的非保守性取代有可能影响结合活性，特异性或抗体功能或活性。因此，可以分析超变区的取代作用，以便鉴定保留了未取代过的抗体的结合活性，特异性或抗体功能或活性的至少一部分的抗体。所述具有氨基酸取代的抗体包括在内，只要取代过的抗体保留了未修饰过的人
15 M2 抗体的结合特异性，结合亲和力，或抗流感病毒活性的至少一部分。

因此，本发明的人单克隆 M2 抗体包括本文所披露的亚序列（例如，片段）和修饰形式（例如，序列变体）。在特定实施方案中，人 M2 抗体亚序列包括 Fab, Fab' 和 F (ab')₂, Fd, 单链 Fvs (scFv), 单链抗体，
20 二硫键连接的 Fvs (sdFv) 和 V_L 或 V_H 结构域片段。在特定方面， Fab, Fab', 和 F (ab')₂, Fd, 单链 Fvs (scFv), 单链抗体，二硫键连接的 Fvs (sdFv) 和 V_L 或 V_H 结构域亚序列具有相同的结合亲和力，基本上相同的结合亲和力，相同的结合特异性，或一种或多种抗流感病毒活性，
25 例如，与参考 M2 抗体（例如，全长的或未修饰过的 M2 抗体）相同的体外或体内抑制流感病毒感染细胞的效力。包括单链抗体在内的 M2 结合抗体亚序列，包括可变区本身或与下列成分的一个或多个的全部或一部分的组合：铰链区，CH1, CH2, 和 CH3 结构域。还包括可变区与铰链区，CH1, CH2, 和 CH3 结构域的任意组合的抗原结合亚序列。

本发明的 M2 抗体亚序列（例如，Fab, Fab', F (ab')₂, Fd, scFv, sdFv 和 V_L 或 V_H）可以通过抗体的蛋白水解制备的，例如，通过用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整的抗体。术语“功能性亚序列”和“功能性片段”
30 在用于限定本发明的抗体时，表示保留了完整参考抗体的一种或多种功能或活性的至少一部分的抗体的一部分。

抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶促裂解产生的，提供被称为 F(ab')₂ 的 5S 片段。该片段可以用硫醇还原剂进一步裂解，以便产生 3.5S 的 Fab' 单价片段。另外，用胃蛋白酶进行的酶促裂解，直接产生了两种单价 Fab' 片段和 Fc 片段（参见，例如，Goldenberg，美国专利号 4, 036, 945 和 4, 331, 647；以及 Edelman 等 *Methods in Enzymology* 1: 422 (1967)）。还可以使用裂解抗体的其他方法，如分离重链，以便形成单价轻-重链片段，进一步裂解片段，或其他酶促或化学方法。遗传学技术包括在诸如 Cos 细胞或大肠杆菌的宿主细胞中表达 M2 抗体的全部或一部分。所述重组宿主细胞能合成完整的或单链抗体，如 scFv（参见，例如，Whitlow 等，In: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 97 (1991)，Bird 等，*Science* 242: 423 (1988)；和美国专利号 4, 946, 778）。单链 Fvs 和抗体可以按照披露于以下文献中的方法生产：美国专利号 4, 946, 778 和 5, 258, 498；Huston 等，*Methods Enzymol.* 203: 46 (1991)；Shu 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7995 (1993)；和 Skerra 等，*Science* 240: 1038 (1988)。

具有氨基酸添加的修饰过的 M2 抗体另外一个具体例子是这样的抗体，其中，连接了第二个异源序列，即，异源功能性结构域，它能够赋予所述抗体独特的或互补的功能。例如，氨基酸标记如 T7 或多组氨酸可以与 M2 抗体连接，以便有利于 M2 或流感病毒的纯化或检测。另一个例子是与 M2 抗体连接的抗病毒剂，以便靶定受到流感病毒感染的细胞，实现病毒杀伤，增殖抑制，复制抑制，等。因此，在其他实施方案中，本发明提供了 M2 抗体和异源结构域，其中，所述结构域能够赋予独特功能，即，抗体上的异源功能性结构域。

异源功能性结构域不局限于氨基酸残基。因此，异源功能性结构域可以由多种不同类型的小的或大的功能性部分的任何一个组成。所述部分包括核酸，肽，碳水化合物，脂类或小的有机化合物，如药物（例如，抗病毒剂）。

可以将接头序列插在抗体序列和异源功能性结构域之间，以便这两个实体至少能部分保持独特的功能或活性。接头序列可具有一种或多种特性，包括柔性构象，不能形成有序的二级结构或疏水性或带电荷的特征，这些特征能够促进任意结构域或与之相互作用。通常出现在柔性蛋白区的氨基酸包括 Gly, Asn 和 Ser。其他接近中性的氨基酸，如 Thr

和 Ala, 也可用于接头序列。接头序列的长度可以改变, 而不明显影响融合蛋白的功能或活性 (参见, 例如, 美国专利号 6, 087, 329)。

异源功能性结构域的其他例子是可检测的标记。因此, 在另一种实施方案中, 本发明提供了可检测的标记过的人 M2 抗体。

5 可检测标记的具体例子包括荧光团, 生色团, 放射性同位素 (例如, S^{35} , P^{32} , I^{125}), 电子密集试剂, 酶, 配体和受体。酶通常是通过其活性检测的。例如, 辣根过氧化物酶通常是通过其将诸如 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 的底物转化成蓝色色素的能力检测的, 可以对所述色素进行定量。配体可以结合其他分子, 如生物素, 它能够结合抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素, 以及 IgG, 它能够结合蛋白 A。

10 可以理解的是 M2 抗体可能具有两种或两种以上变异, 修饰或标记。例如, 单克隆抗体可以与生物素偶联, 以便通过抗生物素蛋白检测它的存在, 以及用 I^{125} 标记, 以便提供可检测信号。本领域普通技术人员能够方便地理解其他改变和可能性, 并且被视为属于本发明的范围。

15 本发明还提供了编码本发明人 M2 抗体的核酸, 包括修饰过的形式, 片段, 嵌合体等。在特定实施方案中, 核酸编码如下的完整或单链 M2 抗体: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, TCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

25 术语"核酸"或"多核苷酸"可交互用于表示所有形式的核酸, 包括脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。所述核酸可以是双链, 单链, 或三链, 线性或环状的。核酸包括基因组 DNA, cDNA, 或反义核酸。RNA 核酸可以是剪接过的或未剪接过的 mRNA, rRNA, tRNA 或反义的。本发明的核酸包括天然存在的, 合成的, 以及核苷酸类似物和衍生物。例如, 所述改变过的或修饰过的多核苷酸包括能提供核酸酶抗性的类似物。

30 核酸可以具有任意长度, 例如, 一下任意序列的亚序列: no. 2074

(ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 它们编码具有一种或多种抗流感病毒活性的蛋白。在具体实施方案中, 核酸包括 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示出的重链可变序列和轻链可变序列, SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示出的重链可变序列和轻链可变序列。

由于遗传密码的简并性, 核酸包括针对编码以下抗体的序列而进行了简并的序列: no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA-4025), 161 (ATCC 保藏号 PTA-4026;), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 和 C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 它的亚序列, 和本文所阐述的修饰过的形式。

核酸可以通过多种众所周知的标准克隆和化学合成方法生产的, 并且可以通过本领域技术人员所公知的定点诱变或其他重组技术有意地加以改变。多核苷酸的纯度可以通过测序, 和凝胶电泳等确定。

可以将本发明的核酸插入核酸构建体, 其中, 核酸的表达是受"表达控制元件"影响或调控的, 在这里它被称为"表达盒"。术语"表达控制元件"表示一个或多个核酸序列元件, 它能够调控或影响可操作地与它连接的核酸序列的表达。如果合适的话, 表达控制元件可以包括启动子, 增强子, 转录终止子, 基因沉默子, 位于蛋白编码基因前面的起始密码子(例如, ATG)等。

可操作地连接在核酸序列上的表达控制元件能够控制转录, 并且,

如果合适，能够控制核酸序列的翻译。术语"可操作地连接"表示并列，其中，有关成分的关系使得它们能够以预期的方式起作用。典型的表达控制元件是在所述基因的5'或3'末端并列的，不过，还可以是内含的。

表达控制元件包括能够组成型地激活转录的元件，它是诱导型的
5 (即，需要外部信号激活)，或解除阻抑的(即，需要信号结束转录；当所述信号不再存在时，转录被激活或"解除阻抑")。本发明的表达盒中还包
括足以将基因表达控制在特定细胞类型或组织的控制元件(即，组织特
异性控制元件)。通常，所述元件位于编码序列的上游或下游(即，5'
和3')。启动子通常位于编码序列的5'末端。通过重组DNA或合成技
10 术生产的启动子，可用于提供本发明多核苷酸的转录。"启动子"表示足
以指导转录的最小序列元件。

可以将本发明的核酸插入质粒，用于在宿主细胞中繁殖，并且，如
果需要，用于随后的遗传学操作。质粒是能够在宿主细胞中稳定繁殖的
核酸，质粒可任选包括表达控制元件，以便驱动编码M2抗体的核酸在宿
15 主中表达。本文所用的载体与质粒是同义词，并且还可以包括用于在宿
主细胞中表达的表达控制元件。质粒和载体通常包括至少一个用于在细
胞中繁殖的复制起点和启动子。因此，质粒和载体可用于M2抗体编码核
酸的遗传学操作，例如，生产M2抗体或反义形式，以及在宿主细胞或
生物体中表达M2抗体。

20 编码抗体重链和轻链，或编码全长的抗体重链和轻链可变区的核酸
可以从杂交瘤中分离的。可以将分离的核酸插入合适的表达载体，并
且导入合适的宿主细胞，如酵母或CHO细胞，它可以进行培养以便生产
重组M2抗体。

细菌系统启动子包括T7和诱导型启动子，如噬菌体λ的pL，plac，
25 ptrp，ptac(ptrp-lac杂交启动子)和四环素反应性启动子。昆虫细
胞系统启动子包括组成型或诱导型启动子(例如，蜕皮激素)。哺乳动
物细胞组成型启动子包括SV40，RSV，牛乳头瘤病毒(BPV)和其他病毒
启动子，或源于哺乳动物细胞基因组(例如，金属硫蛋白IIA启动子；
热激启动子)或源于哺乳动物病毒(例如，腺病毒晚期启动子；诱导型
30 小鼠乳腺癌病毒长末端重复)的诱导型启动子。另外，逆转录病毒基因组
可以是遗传学修饰过的，以便导入并且指导M2抗体在合适宿主细胞中的
表达。

表达系统还包括为了体内使用而设计的载体。具体的非限定性例子包括腺病毒载体 (美国专利号 5, 700, 470 和 5, 731, 172), 腺伴随病毒载体 (美国专利号 5, 604, 090), 单纯疱疹病毒载体 (美国专利号 5, 501, 979), 逆转录病毒载体 (美国专利号 5, 624, 820, 5, 693, 5 508 和 5, 674, 703), BPV 载体 (美国专利号 5, 719, 054) 和 CMV 载体 (美国专利号 5, 561, 063)。

酵母载体包括组成型和诱导型启动子 (参见, 例如, Ausubel 等, In: Current Protocols in Molecular Biology Vol. 2, Ch. 13, ed. , Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant 等 10 Methods in Enzymology, 153 : 516 (1987), eds. Wu & Grossman; Bitter Methods in Enzymology. 152: 673 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y.; 和, Strathern 等, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I 和 II)。可以使用诸如 ADH 或 LEU2 的组成型酵母启动子或诸如 GAL 的诱导型启动子 (R. Rothstein In: DNA Cloning. A 15 Practical Approach, Vol. 11, Ch. 3, ed. D. M. Glover, IRL Press, Wash. , D. C. , 1986)。能够促进外源核酸序列通过诸如同源重组的方式整合到酵母染色体上的载体, 为本领域所公知。当插入的多核酸对于更常见的载体来说太大时 (例如, 超过大约 12 kb), 通常使用酵母人工染色体 (YAC)。

还提供了包括编码人 M2 抗体的核酸的宿主细胞。在一种实施方案中, 所述宿主细胞是原核细胞。在另一种实施方案中, 所述宿主细胞是真核细胞。在多个方面, 所述真核细胞是酵母或哺乳动物 (例如, 人, 灵长类等的) 细胞。

25 在本文中, "宿主细胞"是导入了一种核酸的细胞, 所述核酸可以繁殖, 转录, 或编码表达的 M2 抗体。该术语还包括所述宿主细胞的任何后代或亚克隆。后代细胞和亚克隆不一定与亲代细胞相同, 因为在复制和增殖期间可能发生了突变。不过, 这样的细胞被视为本发明的宿主细胞。

30 宿主细胞包括, 但不局限于微生物, 如细菌和酵母; 以及植物, 昆虫和哺乳动物细胞。例如, 用重组噬菌体核酸, 质粒核酸或粘粒核酸表达载体转化过的细菌; 用重组酵母表达载体转化过的酵母; 用重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒 CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 感染过

的或用重组质粒表达载体（例如，Ti质粒）转化过的植物细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染过的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，逆转录病毒，腺病毒，牛痘病毒）感染过的动物细胞系统，或为了稳定表达而工程改造过的转化的动物细胞系统。

- 5 表达载体还可以包括赋予对选择压力的抗性的选择标记或可识别标记（例如， β -半乳糖苷酶），以便使得具有待选择的载体的细胞能够生长和扩增。另外，选择标记可以存在于第二种载体上，所述载体是与含有本发明多核苷酸的第一种载体共同转染到宿主细胞中的。

选择系统包括但不局限于单纯疱疹病毒胸苷激酶基因（Wigler 等，
10 Cell 11: 223 (1977)），次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因（Szybalska 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026 (1962)），
和腺嘌呤磷酸核糖转移酶（Lowy 等，Cell 22: 817 (1980)）基因，
它们分别可应用于 tk-，hgp^rt-或 ap^rt-细胞。另外，可以将抗代谢物抗性
15 用做选择 hfr 的基础，它能够赋予对氨基蝶呤的抗性（O'Hare 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)）；gpt 基因，它能赋予对霉酚
酸的抗性（Mulligan 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)）；
新霉素基因，它能赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性（Colberre-Garapin
等，J. Mol. Biol. 150: 1 (1981)）；嘌呤霉素；以及潮霉素基因，
20 它能赋予对潮霉素的抗性（Santerre 等，Gene 30: 147 (1984)）。其他选择基因包括 trpB，它使得细胞能够利用吲哚以取代色氨酸；hisD，
它使得细胞能够利用组胺醇以取代组氨酸（Hartman 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047 (1988)）；和 ODC（鸟氨酸脱羧酶），它能
赋予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂 2-（二氟甲基）-DL-鸟氨酸，即 DFMO 的抗
25 性（McConlogue (1987) In: Current Communication in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory）。

用于治疗流感病毒的方法包括给受试者施用能有效治疗受试者的流感病毒感染的量的特异性结合流感病毒 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。所述抗体可以在受试者感染之前（预防），基本上与感染同时或在感染之后（治疗）施用的。

- 30 本发明的方法包括给受试者提供治疗效果，例如减轻或减弱流感病毒感染的一种或多种症状或并发症，减少或抑制病毒滴度的增加，病毒复制，病毒增殖，或一种或多种流感病毒株或分离物的病毒蛋白的量。

可以减轻或减弱与流感病毒感染相关的症状或并发症包括，例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染或耳痛。治疗效果还可以包括减弱受试者对流感病毒感染的易感性，或加速受试者从流感病毒感染恢复。

5 在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用一定量的特异性结合流感病毒 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体，以便有效抑制病毒感染所述受试者，或减弱所述受试者对一种或多种流感病毒株或分离物的易感性。在多个方面，所述抗体是在所述受试者感染之前（预防），
10 或基本上同时或在感染之后（治疗）施用的。所述抗体能够提供治疗效果，其中包括，例如，减轻或减弱流感病毒感染的一种或多种症状或并发症（例如，寒战，发热，咳嗽，咽喉痛，鼻充血，鼻窦充血，鼻感染，鼻窦感染，身体疼痛，头痛，疲劳，肺炎，支气管炎，耳感染或耳痛）的严重性或持续时间，病毒滴度或一种或多种流感病毒株或分离物的病毒蛋白的量，受试者对一种或多种流感病毒株或分离物的易感性。

因此，还提供了治疗效果，以及用于预防或抑制病毒滴度增加，病毒复制，病毒增殖或流感病毒蛋白在受试者体内的含量的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效抑制受试者体内病毒滴度的增加，病毒复制或一种或多种流感病毒株或分离物的流感病毒蛋白的量的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。

另外，还提供了用于保护受试者免受感染，减轻受试者对感染的易感性和加速受试者从一种或多种流感病毒株或分离物的感染恢复的方法。在一种实施方案中，一种方法包括给所述受试者施用能有效保护所述受试者免受感染，有效减弱所述受试者对感染的易感性和加速受试者
25 从一种或多种流感病毒株或分离物的感染中恢复的量的特异性地结合流感 M2 的人的，人源化的或嵌合的抗体。

本发明的方法可以用具有通过以下细胞系（例如，杂交瘤或 CHO 细胞系）生产的抗体的结合特异性或相同或基本上相同的结合亲和力的抗体实施： no. 2074 (ATCC 保藏号 PTA- 4025; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 161 (ATCC 保藏号 PTA- 4026; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), N547 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11

日), L66 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), C40G1 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA, ATCC 收到日为 2003 年 3 月 11 日), L17 (ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), and C40, L30, L40, S212, S80, S900 (分别为 ATCC 保藏号; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA)。

本发明的方法, 包括可应用于任何流感病毒株/分离物或株/分离物的组合的治疗, 诊断和纯化/分离方法。流感病毒株的具体的非限定性例子是 A/PR/8/34 或 A/HK/8/68, 或选自下组的其他株: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H9N2, H2N1, H4N6, H6N2, H7N2, H7N3, H4N8, H5N2, H2N3, H11N9, H3N8, H1N2, H11N2, H11N9, H7N7, H2N3, H6N1, H13N6, H7N1, H11N1, H7N2 和 HSN3。

本发明的人的、人源化的和嵌合的 M2 抗体可以单独使用, 或与具有抗流感病毒活性的治疗剂, 例如, 能够抑制流感病毒感染, 复制, 增殖, 或减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的严重性或持续时间的试剂组合使用。所述组合的例子包括含有两种或两种以上不同的 M2 抗体的合并的单克隆抗体, 所述抗体具有不同的结合特异性, 结合亲和力, 或抑制流感病毒体外或体内感染细胞的效力。因此, 提供了包括 M2 抗体的组合的组合物, 以及在本发明的方法中使用所述组合的方法。

本发明的方法, 包括治疗流感或与流感病毒感染相关的疾病或并发症, 有可能导致受试者状况的改善, 减轻与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的严重性或持续时间, 或降低所述受试者出现症状或接触所述感染的危险, 例如, 对流感病毒感染的易感性。因此, 所述改善包括减弱或减轻的病毒增殖, 复制, 或滴度, 或与流感病毒感染相关的症状或并发症中的一个或多个。改善还包括减少用于治疗患有或具有患流感病毒感染的危险, 或与流感病毒感染相关的症状或并发症的抗病毒药物或其他试剂的用药频率或用量。

所述改善不必完全消除与流感病毒感染相关的任何或所有症状或并发症。相反, 治疗可以是本文所述的任何可测定的或可检测的抗流感病毒效果或改善。因此, 当短期或长时间使改善有所增强或受试者的状况或相关的症状或并发症部分减轻, 或抑制了状况的恶化时, 就获得了令

人满意的临床结果。

适合治疗的受试者包括患有流感病毒感染或具有流感病毒感染危险的受试者。目标受试者还包括具有出现流感相关的症状或并发症的危险的受试者。因此，本发明的方法可应用于治疗具有流感病毒感染或具有与流感病毒感染相关的并发症的危险性的受试者。因此，包括预防方法。

适合治疗的有危险的受试者包括暴露于其他具有流感病毒的患者，或由于病毒感染性或细胞亲嗜性，免疫学易感性(例如，免疫受损的受试者)或环境因子的改变而导致流感病毒感染的危险性增强的受试者。

M2 抗体可以作为一个或多个剂量施用，例如，每周一次，持续约1-10周，或者长到，例如，适合实现与流感病毒感染相关的一种或多种症状或并发症的严重性的减轻。剂量可以根据所述治疗是预防性的或治疗性的，接受治疗的相关疾病或并发症的严重性，希望的临床结果，以前的或同时进行治疗，所述受试者的一般健康状况，年龄，性别或种族，以及本领域技术人员能够理解的其他因素而改变。本领域技术人员能够理解可能影响提供足以产生治疗效果所需的剂量和时间的因素。

术语"受试者"表示动物，通常是哺乳动物，如非人灵长类(类人猿，长臂猿，黑猩猩，猩猩，短尾猿)，家畜(狗和猫)，农畜(马，牛，山羊，绵羊，猪)，实验动物(小鼠，大鼠，兔，豚鼠)和人。受试者包括动物疾病模型，例如，本文所举例说明的流感病毒感染的小鼠动物模型。

本发明的 M2 抗体，包括修饰过的形式，它的变体和亚序列，以及编码 M2 抗体的核酸，可以掺入药物组合物。所述药物组合物可用于给受试者体内或离体施用。

在给受试者施用之前，抗体可以包含在可以药用的载体或赋形剂中。在本文中，术语"可以药用的"和"生理学上可接受的"包括与药物施用相容的溶剂(含水或无水)，溶液，乳液，分散介质，包衣，等渗的和吸收促进或延缓剂。所述制剂可以包含在片剂(包衣的或未包衣的)，胶囊(硬的或软的)，微珠，乳液，粉末，颗粒，晶体，悬浮液，糖浆或酏剂。还可将补充性活性化合物(例如，防腐剂，抗菌剂，抗病毒剂和抗真菌剂)掺入所述组合物中。

药物组合物可以配制成与特定施用途径兼容。因此，药物组合物包括适合通过各种途径施用的载体，稀释剂，或赋形剂。

为了经粘膜或经真皮施用，将适合渗透屏障的渗透剂用于所述制剂。所述渗透剂为本领域普遍公知，并且包括，例如，对于经粘膜施用来说，去污剂，胆盐和梭链孢酸衍生物。为了经皮施用，可以将活性化合物配制成本领域技术人员普遍公知的气溶胶，喷雾剂，油膏，药膏，
5 凝胶，或霜剂。

适用于本发明的组合物和方法的药用制剂和递送系统为本领域所公知（参见，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical
10 Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993); 和 Poznansky 等, Drug Delivery Systems. R. L. Juliano, ed., Oxford, N. Y. (1980), pp. 253-315)。

所述药用制剂可以包装成单位剂型以便于施用和剂量的统一性。在
15 本文中，单位剂型表示适合作为接受治疗的受试者的单元剂量的物理上独立的单位；每个单位包括预定量的活性化合物，该用量是计算出来的与可以药用的载体或赋形剂结合后能产生需要的治疗效果的数量。

本发明提供了包装在合适的包装材料中的包括 M2 抗体，编码 M2 抗体的核酸以及它的药用制剂的试剂盒。试剂盒通常包括标签或包装插
20 页，其中包括对成分的说明或有关其中的成分在体外，体内，或离体的使用的说明。试剂盒可以包括所述成分的组合，例如，两种或两种以上人 M2 抗体本身或与抗病毒剂或药物组合。

术语“包装材料”表示将所述试剂盒的成分包在里面的物理结构。所述包装材料可以保持所述成分的无菌性，并且可以用常用于这种目的
25 的材料制造（例如，纸，波纹纤维，玻璃，塑料，金属薄片，安培瓶等）。所述标签或包装插页可以包括合适的文字说明。

因此，本发明的试剂盒还可以包括将所述试剂盒的成分用于本发明方法的标签或说明。说明可以包括有关实施本文所披露的本发明的任意方法的说明，包括治疗，检测，监测或诊断方法。因此，例如，试剂盒
30 可以包括具有本文所披露的一种或多种抗流感病毒活性的人 M2 抗体，以及有关在本发明的治疗方法中使用所述抗体的说明。

所述说明可以印刷在“印刷品”上，例如，印刷在所述试剂盒内的或

附在所述试剂盒上的纸或纸板上，或印刷在附在所述试剂盒或包装材料上的标签上，或附在容纳所述试剂盒成分的小瓶或试管上。说明还可以包含在计算机可读介质上，如磁盘(软盘或硬盘)，光学 CD 如 CD-或 DVD-ROM/RAM，磁带，电储存介质，如 RAM 和 ROM 以及所述方式的组合，
5 如磁/光储存介质。

本发明的试剂盒还可以在含有人 M2 抗体的药用制剂中包括生长介质(例如，用于 M2 抗体生产细胞系)，缓冲剂，或防腐剂或稳定剂。所述试剂盒的每一种成分可以分别包装在独立的容器中，并且将所有容器包装在一个包装中。可以将本发明的试剂盒设计成适合冷储存。还可以
10 将本发明的试剂盒设计成包括人 M2 抗体生产杂交瘤或其他宿主细胞(例如，CHO 细胞)。所述试剂盒中的细胞可以在合适的储存条件下保存，直至准备使用所述细胞。例如，包括一个或多个杂交瘤或其他细胞的试剂盒可以包括合适的细胞储存介质(例如，在组织培养生长培养基，如 DMEM, α -MEM 等中的 10-20% DMSO)，以便所述细胞可以解冻并且生长。

本发明的人 M2 抗体可用于分离，检测或纯化 M2 多肽。所述方法包括让被怀疑含有 M2 的样品(存在于溶液，固相，体外或体内，或存在于完整的细胞或生物体中)与 M2 抗体在允许结合的条件下接触，并且检测
15 M2 的存在，或纯化结合的 M2 蛋白。

因此，本发明还提供了用于检测测试样品中的 M2 或流感病毒的方法。在一种实施方案中，一种方法包括让具有或被怀疑具有 M2 或流感病毒的样品与人 M2 抗体在允许检测所述样品中的 M2 的条件下接触，并且
20 确定 M2 是否存在于测试样品中。M2 或流感病毒的检测可以通过常规方法进行，如，免疫沉淀，Western 印迹，免疫组织化学染色或或流式细胞术。

M2 和流感病毒检测方法可用于检测 M2 和流感病毒的诊断方法中。例如，当升高或降低水平的流感病毒与流感病毒感染的发展或消退相关时，可以将本发明的抗体用于检测 M2 或流感病毒的任何增加或减少。另外，当进行能够降低 M2 或流感病毒水平的治疗之后，需要监测 M2 或流感病毒水平时，可以将本发明的抗体用于在治疗之前，期间，或治疗之
30 后，长期或短期检测 M2 或流感病毒水平的这种提高或降低。

因此，本发明还提供了用于检测 M2 或流感病毒在受试者的测试样品(包括生物学流体，细胞，或组织或器官样品，如活组织切片)中的存在

的方法。在一种实施方案中，一种方法包括让来自患者的具有或被怀疑具有 M2 或流感病毒的样品与人 M2 抗体在允许检测所述样品中的 M2 的条件下接触，并且确定 M2 是否存在于来自所述患者的样品中。

5 为了诊断或对患者进行治疗，还可以将人 M2 抗体用于监测 M2 或流感病毒的存在，或测定受试者体内的 M2 含量。例如，在允许结合的条件下，按照上述方法将被怀疑含有 M2 或流感病毒的痰与 M2 抗体一起温育，检测 M2 或流感病毒的存在。

除非另有说明，本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员所普遍理解的相同含义。尽管可以将与本文所披露的方法和材料类似或相同的方法和材料用于本发明的实施或检测，10 合适的方法和材料是本文所披露的。

本文所引用的所有申请，公开文件，专利和其他参考文献，GenBank 引用和本文引用的 ATCC 保藏号，被以它们的全文形式收作本文参考。在发生冲突的情况下，将对包括定义在内的说明进行控制。

15 在本文中，单数形式“一个”，和“一种”以及“所述”包括多个指示物，除非文章中明确排除了这种情况。因此，例如，在提到“一种 M2 抗体”时，包括多种这样的抗体，并且在提到“一种抗流感病毒活性或功能”包括一种或多种活性或活性，如此等等。

20 业已披露了本发明的多种实施方案。不过，可以理解的是，在不超出本发明范围的前提下可以进行各种改进。因此，以下实施例是用于说明而不是限定权利要求书所披露的范围。

实施例

实施例 1

25 本实施例披露了各种材料和方法。

肽合成和肽-KLH 偶联：通过多肽系统 (San Diego, CA) 合成 M2 肽。在 HPLC 之后，肽纯度 > 95%。然后，由同一家公司将 M2 肽与 KLH (M2-KLH) 和 BSA (M2-BSA) 偶联。细胞外 23 个氨基酸的 M2 肽的序列如下：SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO : 1)。

30 小鼠：获得了包括人免疫球蛋白区的人染色体片段的人转染色体小鼠 (Ishida 和 Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, Abstract (2000) ; 和 Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering

Meeting. Abstract (2002)) 是从 Kirin Brewery 有限公司 (日本) 获得的, 并且圈养在 La Jolla Institute for Allergy and Immunology 的动物饲养设施中. C57BL/6J 小鼠是从位于 Bar Harbor, ME 的 Jackson 实验室购买的, 并且圈养在 La Jolla Institute for Allergy and Immunology 的动物饲养设施中.

5 免疫: 将溶于 PBS 的 M2-KLH 或 M2-BSA (GIBCO BRL, Rockville, MD) 与等体积的完全弗氏佐剂 (CFA) (Sigma, St. Louis, MO) 混合, 并且制备乳液. 用溶解在 CFA 中的 20 μ g 的 M2-KLH 或 M2-KLH 通过皮下途径对小鼠进行免疫, 并且, 在 21 天之后, 用溶解在不完全弗氏佐剂 (IFA) (Sigma, St. Louis, MO) 中的 20 μ g 的 M2-KLH 或 M2-BSA 进行皮下加强接种, 或 21 天之后用 RIBI (Corixa, Hamilton MT) 进行腹膜内注射. 在融合之前 3 天最后腹膜内和静脉注射 10 μ g 没有佐剂的 M2 肽.

15 ELISA: 通过 ELISA 测定抗体滴度和抗体特异性以及杂交瘤的抗体生产. 简单地讲, 将 50 μ l 的 M2-BSA 或 M2 肽涂敷在 96-孔平底平板 (Nunc, Denmark) 上, 浓度为在碳酸缓冲液 (pH 9.6) 的 1 μ g/ml, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜, 或在 37 $^{\circ}$ C 下 1 小时. 在用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤两次之后, 在 37 $^{\circ}$ C 下, 用 PBS/1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) 封闭平板 30 分钟, 将所述抗体或血清添加到孔中, 并且在 37 $^{\circ}$ C 下温育所述平板 1 小时. 在洗涤四次之后, 将稀释过的 HRP 偶联的山羊抗-人免疫球蛋白 γ 链特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) 添加到孔中, 并且在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时. 在洗涤四次之后, 添加 TMB 底物溶液 (DAKO, CA), 并且在室温下温育 30 分钟. 通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度.

25 同种型 ELISA: 通过 ELISA 测定由杂交瘤产生的抗体的同种型. 简单地讲, 将 50 μ l 的 M2-BSA 或 M2 肽涂敷在 96-孔平底平板 (Nunc, Denmark) (Nunc, Denmark) 上, 浓度为碳酸缓冲液 (pH 9.6) 中的 1 μ g/ml, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜, 或在 37 $^{\circ}$ C 下 1 小时. 在用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤 2 次之后, 用 PBS/1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) 在室温下封闭平板 1 小时, 将所述抗体添加到所述孔中, 并且在室温下温育所述平板 1 小时. 在洗涤 3 次之后, 将稀释过的 HRP-偶联的小鼠抗-人 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4 重链检测抗体 (Zymed, San Francisco, CA) 中的任意

一种添加到所述孔中，并且在室温下温育 1 小时。在洗涤 3 次之后，添加 TMB 底物溶液 (DAKO, CA) 并且在室温下温育 30 分钟。通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度。

基于 A 型流感病毒感染过的细胞的 ELISA: 以 1.5×10^5 细胞/mL 和
5 150 μ l /孔的密度将 MDCK 细胞 (Madin-Darby 犬肾上皮细胞; ATCC, Rockville, MD) 铺平板到 96-孔平底平板 (Falcon®) 上, 并且在 7%CO₂ 中培养 48 小时。在 48 小时之后, 用 PBS 洗涤所述平板 2 次, 并且在室温下用 30 μ l 的 100-倍 TCID₅₀ A 型流感病毒 (A/PR/8/34 或 A/HK/8/68; ATCC, Rockville, MD) 感染 30 分钟, 该过程中进行定期
10 搅拌。在感染之后, 用 PBS 洗涤平板一次, 添加 150 μ l 的溶解在基本必须培养基 (Invitrogen Corp, CA) 中的 1 μ g/mL 胰蛋白酶 (TPCK-处理过的, Worthington, Biochem. Corp.), 并且将所述平板温育 27 小时。在感染之后, 用 PBS/1% FCS (GIBCO BRL, Rockville, MD) 洗涤所述细胞单层 3 次, 并且, 在室温下用 PBS/1% BSA/ 5% FCS 封闭 30 分钟。
15 稀释所述抗体, 并且将 50 μ l 添加到每个孔中, 并且在室温下温育 45 分钟。在洗涤 4 次之后, 以 1: 3000 的比例稀释 HRP 偶联的兔抗-人免疫球蛋白 γ 链抗体 (DAKO, Denmark), 并且将 50 μ l 添加到每个孔中, 并且在室温下温育平板 30 分钟。在洗涤 5 次之后, 添加 100 μ l 的含有 1mM 左旋咪唑溶液 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA) 的
20 TMB 底物 (DAKO, Denmark), 并且在室温下温育平板 15 分钟。将 50 μ l 上清液转移到装有 100 μ l 终止溶液 (1N H₂SO₄) 的新的 96-孔平板 (Nunc, Denmark) 上, 并且通过通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度 (OD)。按照以前披露的方法计算每种抗体的 EC₅₀ (Sette 等 Nature 328: 395 (1987))。将 no. 2074 抗体在 10 μ g/ml 的浓度下的 OD 数据
25 据作为内部对照, 设定为 100%。

在基于 A 型流感病毒感染的细胞的 ELISA 中的肽竞争: 按照上述方法制备病毒感染的 MDCK 细胞。混合 M2 肽和抗 M2 抗体, 并且在室温下温育 30 分钟。在温育之后, 添加 50 μ l 肽和抗体的混合物, 以便封闭细胞, 并且在室温下温育 30 分钟。在洗涤四次之后, 以 1: 3000 的
30 比例稀释 HRP 偶联的兔抗-人免疫球蛋白 γ 链抗体 (DAKO, Denmark), 并且将 50 μ l 的样品添加到每个孔中, 并且在室温下温育平板 30 分钟。在洗涤五次之后, 添加 100 μ l 含有 1mM 左旋咪唑溶液 (Vector

Laboratories Inc. Burlingame, CA) 的 TMB 底物 (DAKO, Denmark), 并且在室温下温育平板 15 分钟。将 50 μ l 上清液转移到装有 100 μ l 终止溶液 (1N H_2SO_4) 的新的 96-孔平板 (Nunc, Denmark) 上, 并且通过微量滴定板读数器在 450nm 波长下测定光密度。

- 5 杂交瘤生产。选择具有最高抗体滴度的小鼠, 用于克隆抗体生产。收获脾细胞, 并且使用 50% PEG (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 将单细胞悬浮液与骨髓瘤细胞系 (SP2/O-Ag14) (ATCC, Rockville, MD) 以 3:1 的比例融合。以一定的光密度将所述融合物铺平板到 96-孔平板上, 并且在完全 RPMI-10 培养基 (RPMI 1640, 含有 10% FCS, 1% 非必须氨基酸, 2mM-谷氨酰胺, 50 μ M 2-ME, 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 硫酸链霉素) 中, 在 5%CO₂ 中, 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中温育。
- 10 通过 ELISA 筛选每种融合物的大约 2000 个杂交瘤生长孔。将 M2 肽结合阳性细胞转移到 24 孔平板上, 并且进行 4 轮限制稀释, 以便获得单克隆抗体。通过基于 A 型流感病毒感染过的细胞的 ELISA 进一步证实抗-M2
- 15 单克隆抗体。

- 抗体纯化: 为了进行抗体纯化, 在 Integra 系统 (INTEGRA Bioscience, Inc. Ijamsville, MD) 中, 将所述杂交瘤与杂交瘤-SFM (GIBCO BRL, Rockville, MD) 一起培养。使用蛋白 A-Sepharose Fast Flow 凝胶 (Amersham Pharmacia Cat#17-0618-02, Uppsala, Sweden)
- 20 从培养基中纯化人单克隆抗体。简单地讲, 用 0.22 μ m 的膜过滤器 (Minisarto-plus, Sartorius Cat#17822, Gettingen, Germany) 对含有适合柱容量的量的抗体的条件培养基进行过滤, 并且加样到用磷酸缓冲的盐溶液 (PBS) 平衡的 2.0 ml 蛋白 A-Sepharose Fast Flow 柱上。用超过 40 ml 的 PBS 洗涤所述柱, 并且用 0.1 M Gly-HCl, pH3.6, 0.15
- 25 M NaCl 洗脱所述抗体。在最初的 1.0 ml 洗脱缓冲液通过之后, 以每管 5.0 ml 的体积收集 3 个独立的级份并且立即用 250 μ l 的 1 M Tris-HCl, pH8.0 中和。重复该纯化过程, 直到所有条件培养基都处理过。用 IgG-特异性 ELISA 测定抗体浓度, 并且合并所有含有抗体的级份, 并且通过离心浓缩仪 (Vivaspin 20, 30,000MWC0: Sartorius Cat#VS2022,
- 30 Gettingen, Germany) 浓缩。

为了消除热原, 将浓缩的样品通过缓冲液交换进入 20 mM 磷酸钠, pH6.6 中, 并且加样到用相同的缓冲液平衡的 0.5 ml SP-Sepharose HP

柱 (Amersham Pharmacia, Cat#17-1087-01, Uppsala, Sweden) 上。通过让所述样品首先通过与一系列 SP- Sepharose HP 柱连接的 2ml Q-Sepharose Fast Flow 柱 (Amersham Pharmacia, Cat#17-0510-01, Uppsala, Sweden) 消除所述热原。在加样之后, 去掉所述 Q-Sepharose Fast Flow 柱, 并且用 0-0.5M 的氯化钠线性梯度洗脱抗体。在 280 nm 波长下检测所述抗体, 并且合并含有抗体的级份。通过离心浓缩仪浓缩所述样品, 并且通过使用 NAP25 脱盐柱 (Amersham Pharmacia, Cat#17-0852-02, Uppsala, Sweden), 通过缓冲液交换进入 PBS。通过人 IgG 特异性 ELISA 对抗体浓度进行定量。按照 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 测定 (Associates of Cape Cod, Inc. , Falmouth, MA) 确定样品的热原含量低于 0.13 EU/mg 蛋白。

人抗-M2 抗体 (C40) 基因的分离:

通过离心收集能产生 C40 抗体 (同种型: IgG4) 的培养的杂交瘤细胞 (113C-40-H-22)。使用 ISOGEN (NIPPONGENE, Co., Ltd.) 从所述细胞中纯化 240 μ g 总 RNA, 然后使用 OligotexTM-dT30 < Super > (Takara Shuzo, CO., Ltd. , Japan) 从 120 μ g 总 RNA 中纯化 3 μ g polyA⁺ RNA。将 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, Co., Ltd. , CA) 用于克隆来自杂交瘤细胞 polyA⁺ RNA 的免疫球蛋白基因可变区的 cDNA。简单地讲, 通过逆转录酶由 2 μ g polyA⁺ RNA 制备第一条 cDNA 链。将该 cDNA 用做聚合酶链反应 (PCR) 的模板, 以便扩增包括前导序列的重链和轻链可变区 (分别是 HV 和 LV)。所述反应如下: 2.5 U TaKaRa LA TaqTM DNA 聚合酶 (Takara Shuzo, Co.,); 0.2 μ M 引物用于一侧 (对于重链来说: IgG1p, 对于轻链来说: hk-2, 参见表 1); 0.2 μ M 引物用于另一侧 (与 SMART RACE 试剂盒连接的 UMP 引物); 400 μ M 每种 dNTP 混合物; LA PCR 缓冲液 II (Mg²⁺ plus) (最终浓度为 1x); 和 cDNA 模板。

热循环程序为 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 然后进行 30 轮 94 $^{\circ}$ C 10 秒, 和 68 $^{\circ}$ C 1 分钟, 在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 分钟。在乙醇沉淀之后收集扩增的 DNA 片段, 然后进行琼脂糖凝胶电泳, 并且通过 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen Co., Ltd. , Germany) 纯化。用特定引物 (HV: hh-4, LV: hk-5 和 hk-6, 有关引物的序列参见表 1) 证实两种 PCR-扩增产物 (HV 和 LV) 的核苷酸序列。将 HV 和 LV 的纯化的 DNA 片段整合到 pGEM[®]-T Easy

Vector System (Promega Co.) 中, 并且使每一种构建体质粒电穿孔进入大肠杆菌, 然后克隆。用特定引物 (SP6 和 T7, 参见表 1) 分析构建体质粒中每种插入片段 (HV 和 LV) 的核苷酸序列。来自构建体质粒的 HV 和 LV 的核苷酸序列与 PCR 产物完全一致。下面示出了 HV 和 LV 的核苷酸序列, 及其氨基酸序列。

5 C40 重链可变区 (HV) 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区的末端) -

```

ATGAAGCACC TGTGTTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG 60
CTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC 120
TGCAGTGTCT CTGGTGGTTC CATCAGCAGT AGTTTTTACT ACTGTGGCTG GATCCGCCAG 180
CCCCCAGGGA AGGGGCTGGA GTGGATTGGG AGTATCTATT ATCGTGGGAG CACCTACTAC 240
AACCCGTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCCGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC 300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCAGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACGGGTT 360
ACTATGGTTC GGGGAGTTAA GGGGGACTAC TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTC 420
ACCGTCTCCT CA 432 (SEQ ID NO:9)

```

10 C40 轻链可变区 (LV) 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区的末端) -

```

ATGAGGGTCC TCGCTCAGCT CCTGGGGCTC CTGCTGCTCT GTTCCAGG TGCCAGATGT 60
SACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCA CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC 120
ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTGGTTAG CCTGGTATCA GCAGAAACCA 180
SAGAAAGTCC CTAAGTCCCT GATCTATGCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA 240
AGGTTCAAGC GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT 300
SAAGATTTTG CAACTTATTA CTGCCAACAG TATAATTATT ACCCGCTCAC TTTCGGCGGA 360
JGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGA 384 (SEQ ID NO:10)

```


C40 重链可变区 (HV) 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (下划线) 和可变区) -

MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ LQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGGSISS SFYYCGWIRQ 60
 PPGKGLEWIG SIYYRGSTYY NPSLKSRVTI SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVVYCARRV 120
 TMVRGVKGDY FDYWGQGLV TVSS 144 (SEQ ID NO:11)

5 C40 轻链可变区 (LV) 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (下划线) 和可变区)

MRVLAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQRP 60
 EKVPKSLIYA ASSLQSGVPS RPSGSGSGTD FILTISLQP EDFATYYCQQ YNYYPLTFGG 120
 GTKVEIKR 128 (SEQ ID NO:12)

制备同种型改变的人抗-M2 抗体 (C40-IgG1 型) 的表达载体:

10 为了制备 IgG1 型同种型转换的 C40 抗体 (原始同种型是 IgG4), 构建了新的 DNA 载体。简单地讲, 将用于 LV 的 PCR 的引物组设计成在 LV 的两侧具有对限制酶敏感的区域。所使用的引物对是 M240L5BGL 和 M240L3BSI (表 1), 并且, 将 LV 的构建体质粒用作模板。将纯化的 LV 的 PCR-扩增产物亚克隆到 Pgem®-T Easy Vector System (Promega, Co., Ltd.) 中。证实插入片段的核苷酸序列。用两种限制酶 BglIII 和
 15 BsiWI 消化质粒 DNA, 分离 0.4 kb 的 DNA 插入片段 (片段 A, 参见图 1), 并且通过琼脂糖凝胶电泳纯化。

将质粒载体 (IDEC Pharmaceuticals, CA, N5KG1-Val Lark (修饰过的 N5KG1 载体, 参见美国专利 6, 001, 358)) 用作 IgG1 生产的表达载体, 它包括 IgG1 轻链和重链的恒定区。用两种酶 BglIII 和 BsiWI
 20 消化所述载体 DNA, 然后用碱性磷酸酶 (Takara Shuzo, Co., Ltd., Japan) 处理, 以便将所述 DNA 的末端脱磷酸化。通过琼脂糖凝胶电泳和 DNA 纯化试剂盒分离 8.9 kb 的 DNA 片段 (片段 B)。

用 T4 DNA 连接酶 (Takara Shuzo, Co., Ltd., Japan) 连接两种 DNA 片段, A 和 B 片段, 并且将连接的构建体 (N5KG1_C40Lv) 电穿

孔到大肠杆菌 DH5a 株中，以便制备转化体。选择阳性大肠杆菌转化体。

作为第二步，按照以下方法将 HV 插入 N5KG1_C40Lv DNA 载体：用两种限制酶 *Nhe*I 和 *Sa*I 消化所述 DNA 载体，并且，随后进行脱磷酸化。分离 9.2 kb 的 DNA 片段（片段 C）。与轻链构建体类似，将用于 HV 的 PCR 的引物组设计成在 HV 的两侧具有对限制酶敏感的区域。所使用的引物组是 M240H5SAL 和 M240H3NHE（表 1），并且将 HV 的构建体质粒用作模板。将纯化的 PCR-扩增的 HV 产物亚克隆到 pGEM®-T Easy 载体系统中。证实亚克隆构建体中的插入片段的核苷酸序列。用两种限制酶 *Nhe*I 和 *Sa*I 消化所述质粒 DNA，并且分离 0.44 kb 的 DNA 插入片段（片段 D，参见图 1），并且在琼脂糖凝胶电泳之后纯化。

用 T4 DNA 连接酶连接两种 DNA 片段，C 和 D 片段，并且将连接的构建体 (N5KG1 M2C40) 电穿孔到大肠杆菌 DH5a 株中，以便制备转化体。选择阳性大肠杆菌转化体。纯化该表达载体，并且证实 LV 和 HV 区的核苷酸序列。在该过程中，没有导入突变。

表 1. 合成的 DNA 引物 (SEQ ID NOS: 13-30)

编号	名称	序列 5' → 3'	长度
13	IgG1	TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31- 聚体
14	hk-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC	26- 聚体
15	hh-4	GGTCCAGGGGGAAGACCGATGG	23- 聚体
16	hk-5	AGGCACACAACAGAGGCAGTCCAGATTC	30- 聚体
17	hh-6	GGTCCGGGAGATCATGAGGGTGTCTT	27- 聚体
18	SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	19- 聚体
19	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20- 聚体
20	M240L3BGL	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGAAGGTCCTCGCTCAGCTCCTG	44- 聚体
21	M240L3BSI	CTCTCTCTCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCC	34- 聚体
22	M240H3SAL	AGAGAGAGGTCGACACCATGAAGCACTGTGGTTCTTCCT	40- 聚体
23	M240H3NHE	CTCTCTCTGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGG	33- 聚体
24	SEQU1783	GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA	27- 聚体
25	SEQU4618	TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC	27- 聚体
26	hh-1	CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC	30- 聚体
27	CMVH903F	GACACCCTCATGATCTCCCGACC	24- 聚体
28	CMVHF1283	CGACATC0CCGTGGAGTGGGAGAG	24- 聚体
29	CMVHR1303	TGTTCTCCGGCTGCCCATTTGCTCT	24- 聚体
30	hk-1	TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC	26- 聚体

5

同种型改变的人抗-M2 抗体 (IgG4-型 C40) 的表达载体的制备:

为了制备 IgG4 型 C40 的 DNA 构建体, 用 N5KG4PE DNA 载体取代 N5KG1-Val Lark 载体。该 DNA 载体包括 IgG4 轻链和重链的恒定区。制备 C40 的 IgG4 载体的方法与 IgG1-型 C40 的方法相同。

10

来自 CHO 细胞的重组人抗-M2 抗体的生产:

为了生产重组抗体, 将制备的 DNA 载体转染到宿主细胞中, 并且,

从转染细胞的上清液中分离重组抗体。简单地讲，通过电穿孔将 DNA 载体转染到中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞, ATCC# CRL-9096)的宿主细胞 dhfr-缺陷株中。用 DNA 限制酶 AscI 将 20 μ g 纯化的 DNA 表达载体 N5KG1 M2C40 线性化, 并且使用 Bio Rad 电穿孔仪 (350V, 500pF), 将所述 DNA

5 转染到 4×10^6 个 CHO 细胞中。将转染过的细胞接种到 96-孔培养平板上, 并且在含有遗传霉素 (Gibco-BRL) 的培养基中培养细胞, 以便选择含有 DNA 载体的 CHO 细胞。在选择若干稳定的转染体株之后, 通过 ELISA 筛选高的人 IgG 生产者, 并且用于生产重组抗体。

10 重组抗体蛋白的分离和纯化:

用 EX-CELL 培养基 325- PE (JRH Bioscience, Co., Ltd.) 培养表达重组抗体的 CHO 细胞。按照以下方法, 将 10 升用过的培养上清液用于纯化抗体蛋白: 将所述上清液加样到 MabSelect 蛋白 A 柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.) 上。为了将抗体吸附到蛋白 A 上,

15 使用了磷酸缓冲的盐溶液 (PBS), 而为了洗脱, 使用了 20 mM 柠檬酸钠缓冲液和 50 mM 氯化钠 (pH 2.7)。通过添加 50 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 将洗脱级份的 pH 调整到 5.5。抗体的进一步纯化是用 SP Sepharose 柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.) 进行的, 并且将 PBS 用作洗脱缓冲液。

20 通过用 Super Cup 100 囊膜过滤器 (0.22 μ m 直径孔径) 过滤, 对纯化的抗体进行消毒。通过在 280nm 波长下进行分光光度测定, 测定纯化抗体的浓度, 其中, 1 mg/ml 的蛋白在 280nm 波长下表现出 1.4 的 OD。从 10 升 CHO 细胞培养上清液中纯化 17 mg 的重组 C40-IgG1 抗体。

25

实施例 2

本实施例披露了人的和嵌合的 M2 单克隆抗体的生产和表征。

用合成的 M2 肽对 KM 小鼠 或 HAC 小鼠进行免疫, 所述肽基于来自与作为载体的 KLH 或 BSA 偶联的 M2 细胞外结构域的序列。通过用 M2 肽

30 作为包被抗原进行的 ELISA 检测发现, 大部分小鼠以高的滴度对 M2 抗原反应。通过融合来自 6 个高反应小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞, 制备了若干种抗-M2 人单克隆抗体。如表 2 所示, 获得了 12 种单克隆抗体(分

别是 nos. 2074, C40, L17, L30, L40, L66, N547, S212, S80, S900, F1, 和 F2), 它们能够与 M2 肽和/或 M2-BSA 偶联物反应, 但是, 不能反应于 BSA, KLH (用于免疫的载体), mGAD (源于小鼠谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的合成的不相关的肽, 氨基酸 246-266). C40G1 (IgG1) 和 C40G4 (IgG4) 的编码序列是从原始 C40 基因克隆的, 并且在 CHO 细胞中表达 (实施例 1)。

人/小鼠嵌合体单克隆抗体 no. 2074 和全人抗体 C40G1, S212, S80, S900, N547, L66, F1, 和 F2 是 IgG1 同种型。C40 是 IgG4 同种型, L40 是 IgG3 同种型, 而抗体 L17 和 L30 是 IgG2 同种型 (表 2)。

10

表 2. 源于转染染色体小鼠的抗-M2 人单克隆抗体的特征。

mAbs	同种型	轻链	M2 肽*	感染细胞上的 M2 **	BAS	OVA	KLH	mGAD***
C40	IgG4	Kappa	+ ¹	+	-	-	-	-
C40G1	IgG1	Kappa	+	+	-	-	-	-
L17	IgG2	Lambda	+	+	-	-	-	-
L30	IgG2	Lambda	+	+	-	-	-	-
L40	IgG3	Lambda	+	+	-	-	-	-
L66	IgG1	Lambda	+	+	-	-	-	-
N547	IgG1	Lambda	+	+	-	-	-	-
S212	IgG1	Lambda	+	+	-	-	-	-
S80	IgG1	Lambda	+	+	-	-	-	-
S900	IgG1	Lambda	+	+	-	-	-	-
F1	IgG1	Kappa	+	+	-	-	-	-
F2	IgG1	Kappa	+	+	-	-	-	-

* : M2 蛋白的最常见的细胞外部分 ; 它的序列是:

15 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO : 1)

** : 与在 A/PR/8/34 和 A/HK/8/68 感染的 MDCK 细胞上表达的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 M2 结合。

*** : 源于小鼠谷氨酸脱羧酶 (mGAD) 的合成肽, 位于 246- 266 号位置

1: 在 OD_{450nm} , 阳性对照比阴性对照高 2 倍

2: 在 OD_{450nm} , 阴性对照低于 0.1

5 所有抗体都能够识别在用流感 A/PR/8/34 或 A/HK/8/68 株感染的 MDCK 细胞上表达的 M2, 表明所述抗体能够识别由两种不同的株表达的天然形式的 M2, 尽管所述细胞外结构域的序列略微不同 (图 2)。另外, 在存在 M2 肽时, 与受感染的细胞结合的抗体受到特异性抑制 (典型数据如表 3 所示)。

10 这两种病毒株之间的 M2 序列的细胞外部分存在一个氨基酸的差别: 天冬氨酸对 A/PR/8/34 株的 M2 的细胞外部分的 20 号位置上的甘氨酸的取代。源于 A/HK/8/68 的序列, 即所谓的通用 M2 细胞外部分, 是大部分流感病毒株所共有的 (Neiryneck 等, *Nature Med.* 5: 1157 (1999))。不过, 这样一种突变破坏了不同小鼠抗-M2 单克隆抗体, 14C2 的结合 (Gerhard 等, *Immunological Rev.* 159: 95 (1997))。

15 抗体 nos. 2074, N547, L66, L17, C40G1 的反应性是相当的, 并且, 比抗体 C40G4, S212, 和 S80 大约高 3-5 倍, 并且比针对 A/PR/8/34 病毒株的 F1 和 F2 高出约 100 倍 (图 2 and 表 4)。

20 就对 A/HK/8/68 感染过的细胞上的 M2 的反应而言, S212, S80, S900, F1 和 F2 低于其他抗体约 100 倍 (表 4)。正如所预料的, 同种型匹配的不相关的人抗-HSA 抗体 (除非另有说明, 是人血清白蛋白) 没有表现出任何反应性。

表 3: 在存在 20 $\mu\text{g/ml}$ M2 肽的条件下, 对结合在病毒感染的 MDCK 细胞上的 M2 的 mAbs 的特异性抑制。

MAbs*	A/PR/8/34	M2	OD ₄₅₀
2074	-	-	0.051
	+	-	0.904
	+	+	0.142
N547	-	-	0.065
	+	-	0.504
	+	+	0.062
L66	-	-	0.051
	+	-	0.931
	+	+	0.113
C40G1	-	-	0.051
	+	-	0.799
	+	+	0.195

*: 所有抗体都是以 1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度使用的

5

表 4: 抗-M2 抗体与用两种 A 型流感病毒株感染的 MDCK 细胞上的天然 M2 的结合能力。

mAbs	Abs*与由以下成分感染的MDCK细胞上的M2的 EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	
	A/PR/8/34	A/HK/8/68
2074	0.0891	0.1873
C40G1	0.1826	0.0971
C40G4	0.3007	0.8414
S212	0.5001	>10**
S80	0.2176	>10**
S900	0.2063	>10**
N547	0.1042	0.4661
L17	0.1511	0.5968
L30	0.1747	3.4914
L66	0.1169	0.2289
F1	>10**	>10**
F2	>10**	>10**

10

*: 将 no. 2074 在 10 $\mu\text{g/ml}$ 剂量下的 OD₄₅₀ 设定为 100% , 用

于 EC₅₀ 计算, 背景低于 0.1.

**：所述 Abs 是非常弱的结合物, 并且, 在 10 μg/ml 下的 OD₄₅₀ 甚至低于 no. 2074 抗体在相同浓度下的 OD₄₅₀ 的 1/2.

5 通过 ELISA 测定, 用在 A 型流感病毒上报道过的 8 种不同的 M2 肽 (SEQ ID NO: 1-8, 表 5), 分析了抗-M2 抗体与突变的 M2 肽的结合活性. 抗-M2 抗体 nos. 2074, C40, C40G1, L66 和 N547 具有对 M2 肽的结合活性以及对原始 M2 肽的结合活性 (表 6). 特别是, 在本研究在中使用了与所有 8 种 M2 肽结合的 C40G1 和 N547.

10 A/HK/8/68 和 A/PR/8/34 病毒株在 M2 蛋白上具有分别在 SEQ ID NO: 1 和 9 中示出的肽序列. 由于在受这两种病毒株中的任意一个感染的 MDCK 细胞中, 上述抗-M2 抗体与细胞表面 M2 蛋白结合, 这些抗体还能够结合 SEQ ID NO: 9 所示出的 M2 肽 (即 M2G, 表 5).

15 以上结果表明, 本发明的抗-M2 抗体对结合出现在突变型 A 型流感病毒株中的各种 M2 突变型肽具有广泛的特异性.

表 5. M2 类似物的序列

12 类似物	序列	SEQ ID NO
12	S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D	1
12K	S L L T E V E T P I R N E W G C <u>K</u> C N D S S D	2
12P	S L <u>P</u> T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D	3
12SG	S L L T E V E T P I R <u>S</u> E W G C R C N D S <u>G</u> D	4
12FG	S <u>F</u> L T E V E T P I R N E W G C R C N <u>G</u> S S D	5
12EG	S L L T E V E T P I R N E W <u>E</u> C R C N <u>G</u> S S D	6
12TGS	S L L T E V E T P <u>T</u> R N <u>G</u> W G C R C <u>S</u> D S S D	7
12TGE	S L L T E V E T <u>T</u> P T R N <u>G</u> W <u>E</u> C R C N D S S D	8
12G	S L L T E V E T P I R N E W G C R C N <u>G</u> S S D	9

20

加下划线的粗体字符是相对原始 M2 序列 (SEQ ID NO: 1) 发生突变的区域.

表 6. 抗-M2 抗体对 M2 类似物的广泛结合活性

mAbs	M2*	M2TGE	M2EG	M2TSG	M2K	M2SG	M2P	M2FG
2074	+ ¹	+	+	+	+	+	- ²	+
C40	+	+	+	+	+	+	+	+
C40G1	+	+	+	+	+	+	+	+
C66	+	+	+	+	+	+	-	-
N547	+	+	+	+	+	+	+	+

*: M2 蛋白的最常见的细胞外部分是:

5 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 1)

1: 在 OD_{450nm} 下, 阳性对照比阴性对照高 2 倍

2: 在 OD_{450nm} 下, 阴性对照低于 0.1

实施例 3

10 本实施例披露了动物模型研究, 表明在用流感病毒感染动物之前和之后, 施用本发明的 M2 单克隆抗体能够免受致死的病毒侵袭。

在小鼠 A 型流感病毒模型中抗-M2 mAb 用于预防性处理 (在病毒感染之前) 的体内效力:

15 为了评估抗-M2 人/小鼠嵌合单克隆抗体在动物模型中的效力, 以 200 μg/小鼠的剂量, 给雌性 C57BL/6J 小鼠 (8-10 周龄) 腹膜内施用抗体 no. 2074。在治疗开始之后一天, 通过鼻内途径用 30 μl (300 pfU/30 μl) 的致死剂量的流感 A/PR/8/34 (ATCC) 感染麻醉 (15 μl/g 的阿佛丁 (1: 1 w/v 的 2, 2, 2 三溴乙醇: 叔-戊基-OH, Sigma, St. Louis, MO)) 的小鼠。感染 2 天之后, 所述小鼠通过腹膜内途径接受另一个剂量的 no. 20 2074 抗体 (200 μg/小鼠)。每天观察小鼠, 一共观察 27 天, 以便进行存活分析。在经过所述时间之后, 处死存活的小鼠, 并且将肺取出, 以便检测病毒, 和进行组织学分析。存活分析如图 5 所示。作为对照, 使用了用 KM 小鼠制备的同种型匹配的人单克隆抗-HSA IgG1 抗体 (Kirin, Japan)。结果如图 5 所示。

25 在对照组中, 12 只小鼠中的 11 只在感染之后 18 天内死亡。相反, 抗-M2 抗体 no. 2074 处理的小鼠明显受到了保护。12 只小鼠中的 10

只在过了 27 天的观察期之后仍然存活。在感染之后的第 27 天处死存活的小鼠（10 只来自抗-M2 处理组，1 只来自对照组），并且将肺取出，以便检测病毒滴度，并且进行组织分析。通过病毒噬斑测定没有发现来自任何组的小鼠的肺的可检测的病毒，而对于阳性对照来说，A/HK/8/68 病毒的滴度是 5.95×10^3 pfu/ml（表 5）。该数据表明，施用抗-M2 抗体能够防止小鼠肺中的病毒滴度增加，并最终促进病毒从小鼠体内清除。

表 5: 在 A/PR/8/34 感染之后第 27 天来自小鼠肺的病毒滴度

10

样品	稀释	噬斑数量	pfu/ml
1-L1*	10^{-1}	0	<50**
1-L2	10^{-1}	0	<50
1-L3	10^{-1}	0	<50
1-L4	10^{-1}	0	<50
1-L5	10^{-1}	0	<50
1-L11	10^{-1}	0	<50
A/HK/8/68***	10^{-3}	59.5	5.95×10^3

* : 来自 A/PR/8/68 感染的小鼠的肺匀浆物。

LI - L5: 来自抗-M2 抗体处理组的样品。

L11 : 来自同种型匹配抗体处理组（对照）的样品。

15

** : 病毒检测阈值为 50 pfu/ml。

*** : 用作所述测定的阳性对照的病毒。

在小鼠 A 型流感病毒模型中将抗-M2 mAb 用于治疗性处理（在病毒感染之后）的体内效力:

20

通过鼻内途径用 30 μ l 的致死剂量的流感 A/PR/8/34 (ATCC) 感染麻醉的雌性 C57BL/6J 小鼠(8-10 周龄)。麻醉是按照上述方法，用阿佛丁实施的。每天观察小鼠，一共观察 24 天，以便进行存活分析。

为了评估抗-M2 单克隆抗体用于治疗性处理流感病毒的效力，在病毒感染之后施用所述抗体。在用流感 A/PR/8/34 对 C57BL/6J 小鼠进行

致死剂量的病毒侵袭之后 2 天和 4 天，每次以 200 μ g/小鼠的剂量，通过腹膜内注射施用抗-M2 抗体 no. 2074 (一共 12 只小鼠)。对照组 (一共 12 只小鼠) 接受同种型匹配的不相关的人单克隆抗体 (除非另有说明，是 HSA (IgG1)，购自 Kirin Brewery Co., Ltd., Japan)。

- 5 在对照组中，12 只小鼠中的 11 只在感染之后 18 天内死亡 (图 6)。在抗体 no. 2074 组中，12 只小鼠中的 9 只在病毒侵袭的第 24 天仍然存活。因此，抗-M2 人/小鼠嵌合单克隆抗体 no. 2074 能显著提高受 A/PR/8/34 病毒感染的小鼠的存活率。

- 以上结果表明，即使在病毒感染之后施用抗-M2 抗体也是有效的。
10 这提示，抗体可以用于预防和治疗用途。

- 进行了另外两组评估研究。在 1, 2, 和 3 天之后，对 C57BL/6J 小鼠进行流感 A/PR/8/34 的致死剂量的病毒侵袭，抗-M2 抗体 C40G1, C40G4, L30, F1, F2 和 no. 2074 (作为阳性对照) 每次是以 200 μ g/小鼠的用量通过腹膜内注射施用的 (在每个组中，n=8 或 12 只小鼠)。
15 对照组 (一共 8 或 12 只小鼠) 接受抗-HSA 特异性人 IgG1 抗体注射。与对照组相比，L30, C40G4, F1 和 F2 抗体不能延长病毒感染过的小鼠的存活时间 (图 3A, B)。相反，C40G1 抗体表现出对病毒侵袭的明显的保护作用，并且，该组的所有小鼠即使在感染 30 天之后仍然存活 (图 3A)。

- 20 C40G1, L30 和 C40G4 抗体对在 A/PR/8/34 感染的细胞上表达的 M2 (图 4B, 表 4) 或 M2-BSA 偶联物 (图 4A) 的结合亲和力，彼此之间没有明显差别。C40G1 和 C40G4 具有相同的结合位点，因为它们都来自相同的 C40 抗体。由于 L30 (IgG2) 和 C40G4 (IgG4) 表现出对病毒侵袭的保护作用，而 C40G1 没有明显保护，IgG1 型抗体可能是体内使用的更好的候选物。
25 相反，F1 和 F2 抗体与病毒感染过的细胞上的 M2 结合较差，不过这些抗体与 M2-BSA 偶联物结合良好 (图 4A, B, 表 4)。F1 和 F2 抗体与病毒感染过的细胞上的 M2 较差的结合，可以解释体内保护作用的缺乏。

- <110> 麒麟麦酒株式会社和拉霍拉敏感及免疫学研究所
三箇山俊文
王荣芳
加藤慎一郎
H. 切罗特尔
- <120> 针对流感病毒 M2 蛋白的人单克隆抗体及其制备和使用方法
- <130> 021286-0311004
- <140> PCT/US03/08147
<141> 2003-03-13
- <150> 60/364, 997
<151> 2002-03-13
- <160> 30
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒
- <400> 1

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

- <210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 流感病毒
- <400> 2

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 3

Ser Leu Pro Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 4

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Gly Asp
20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 5

Ser Phe Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 6

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp
 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 7

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 8

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Gly Trp Glu Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 9
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

```

atgaagcacc tgtggttett cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcccag    60
ctgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtcctcacc    120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt agtttttact actgtggctg gatccgccag    180
ccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctatt atcgtgggag cacctactac    240
aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc    300
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacggggt    360
actatggctc ggggagttaa gggggactac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc    420
accgtctcct ca                                                                432

```

<210> 10
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 10

```

atgagggtcc togctcagct cctggggctc ctgctgctct gtttcccagg tgccagatgt    60
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc    120
atcaottgtc gggcgagtea gggattatgc agctggttag cctggtatca gcagaaacca    180
gagaaagtcc ctaagtcctt gatctatgct gcattcagtt tgcaaagtgg ggtcccatca    240
aggttcagcg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct    300
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataattatt acccgtcac tttcggcgga    360
gggaccaagg tggagatcaa acga                                                                384

```

<210> 11
 <211> 144

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Ser Phe Tyr Tyr Cys Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Thr Met Val Arg Gly Val Lys Gly
 115 120 125

Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 35 40 45

Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Val Pro
 50 55 60

Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 引物

<400> 13

tcttgccac cttggtgttg ctgggcttgt g

31

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 14

gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc

26

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 15

ggtgccaggg ggaagacoga tgg

23

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 16

aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc

30

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 17

ggtccgggag atcatgaggg tgtcctt

27

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 引物

<400> 18

gatttaggtg acactatag

19

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 引物

<400> 19

taatacgact cactataggg

20

<210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 引物

<400> 20

agagagagag atctctcacc atgagggtcc tegetcagct cctg

44

<210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列说明: 引物

<400> 21

ctctctctcg tacgtttgat ctccacctg gtcc 34

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 22

agagagaggt cgacaccatg aagcacctgt ggttcttct 40

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 23

ctctctctgc tagctgagga gacggtgacc agg 33

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 24

ggtacgtgaa ccgtcagate gcctgga 27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 25

tctatataag cagagctggg tacgtcc

27

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 26

ccaagggecc atcggtcttc cccctggcac

30

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 27

gacacctca tgatctccg gacc

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 28

cgacatcgcc gtggagtggg agag

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 29

tgtttctcgg ctgccattg ctct

24

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 30

tggtgcacc atctgtcttc atcttc

26

C40Lv (片段A是在 BglII+BsiW1 消化之后获得的)

BglII

```

1  AGAGAGAGAGATCTCTCCCATGAGGTCCTCCCTCAGCTCCTGGGCTC
  TCTCTCTCTAGAGAGTGTACTCCCGAGCCAGTCCAGAGCCCGAG
      1▷HRAVLAQLLGL
51  CTCTCCTCTGTTTCCAGTCCAGTGTGACATCCAGTACCCAGTC
  GACGACBAGACAAAGGTCACCGTCTACACTGTAGTCTACTGGGTCA
11▷L L L C F P G A A C D I Q H T Q S
181  TCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGACAGATCAGCATCACTTGT
  AAGTAGGAGTACAGACGTACATCCTCTGTCTCAGTGTAGTACAG
27▷P S S L S A S V G D A V T I T C
151  GGGCAGTCAAGGATTACAGCTGTTAGCCTGATCAGAGAACCA
  CCCCTCAGTCCCATATGCTCCAGCATCCAGCATATGCTCTTGT
44▷A A S Q G I S S M L A W V Q Q K P
281  GAGAAATCCCTAGTCCCTGTCTATGCTGCATCCAGTTTCCAAAGT
  CTCTTCCAGATTCAGGACTGATACAGCTAGGTCAAGGTTTCACC
61▷E K V P K S L I V A A S S L Q S D
251  GGTCCATCAAGTTCAGGCGAGTGTCTGAGACAGATTTCACTCTCA
  CAGGTTAGTTCAGAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
77▷V P S R F S S S S S S T D F T L
381  CCATCAGCAGCTCCAGCCTAAGATTTTCACTTATTTCTGCCAGAG
  GATAGTCCAGCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
94▷T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
351  TATATTTATTTACCCCTCACTTTCCAGGAGGAGCCAGGTTGAGATCA
  ATATTTATTTAGCCAGTATAGCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
111▷V H V Y P L T F G G G T K V E I K
      BsiW1
481  AGTACGAGAGAGAG
  TGCATGCTCTCTCTC
127▷R T R E

```

C40Hv (片段D是在 Sall+NheI 消化之后获得的)

Sall

```

1  AGAGAGAGGTCACACCATGAGACAGCTGTGTCTCTCCTCCTGCTGTGCG
  TCTCTCTCCAGCTGTGTACTTCTGAGACCCAGAGAGAGAGACAGCAGCC
      1▷MKHLWFLLLV A
54  GCTCCAGATGGTCCCTGTCCAGCTCCAGTCCAGGATCCAGCCAGACT
  CAGAGTCTACCCAGAGAGGTCAGCTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
13▷A P R V V L S Q L Q L Q E S D P O L
187  GGTAGAGCTTCCAGAGCCCTGTCCCTCAGCTCCAGTGTCTGTGTGTTCA
  CCACTCCAGAGCTCTCCAGAGGATGAGCTGAGCAGAGCAGCAGCAGGAT
38▷V K P S E T L S L T C T V S G S
      BamHI
188  TACAGTAGTTTTTACTACTGTGCTGATCCAGCAGCCAGAGAGAGAG
  AGTCCATCAAAATATGACCCAGCTAGCCAGTCCAGGATCCCTTCCC
48▷I S S S F Y Y C G V I R Q P P O K G
213  CTGAGTGGATTCAGATATCTATTTCTGAGAGCAGCTACTACAGCCCTC
  GACCTCAGCTTACCCCTCATGATATAGCAGCCCTCAGTCCAGTCCAGT
66▷L E V I G S I Y Y R O S T Y Y N P S
268  CCTCAGAGTCCAGTCCAGTATCCATGAGCAGTCCAGAGCAGTTCCTCC
  GAGTCTCAGCTCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAG
83▷L K S R Y T I S V D T S K M O F S
318  TACAGTCCAGTCTGTGACCCAGCAGCAGCAGTGTATTTACTGTGAG
  ACTTCCAGTCCAGCAGTCCAGCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAG
181▷L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
372  CGGTTACTATGTTCCAGGATTAAGGAGACTTCTTACTAGTGGGCA
  GCCAGTATACAGCCCTCATTTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
118▷R V T H V R G V K S D Y F D Y W G Q
      NheI
425  GGGAGCCCTGTCCAGCTCTCCTCAGCTAGCTCTCTCT
  CCCTTCCAGCAGTCCAGAGAGTCCAGTCCAGAGAG
138▷G T L V T V S S A S

```

图 1

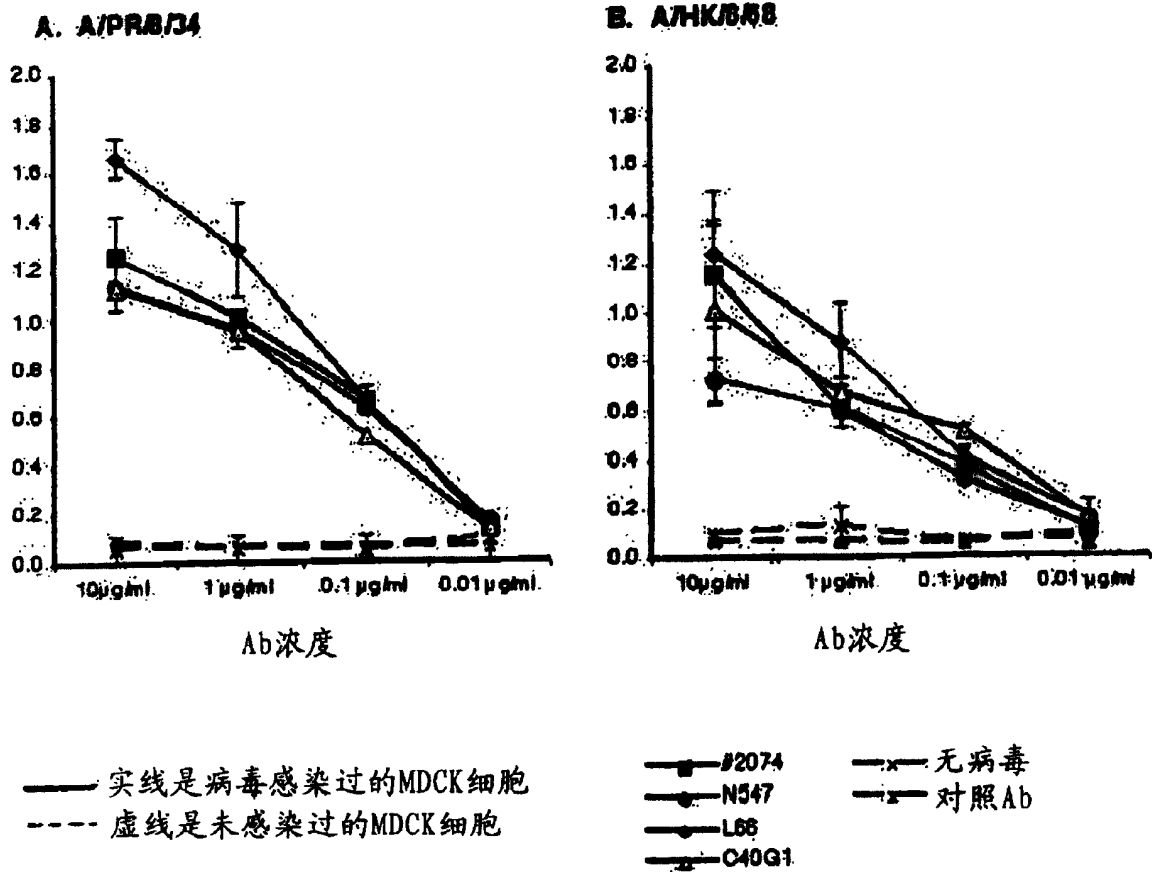


图 2

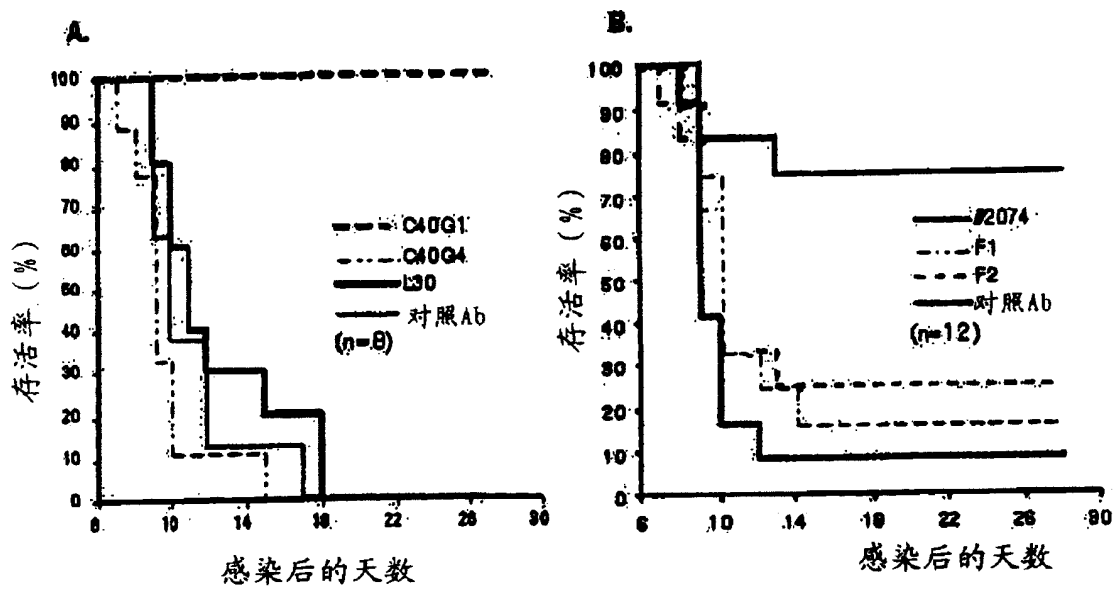


图 3

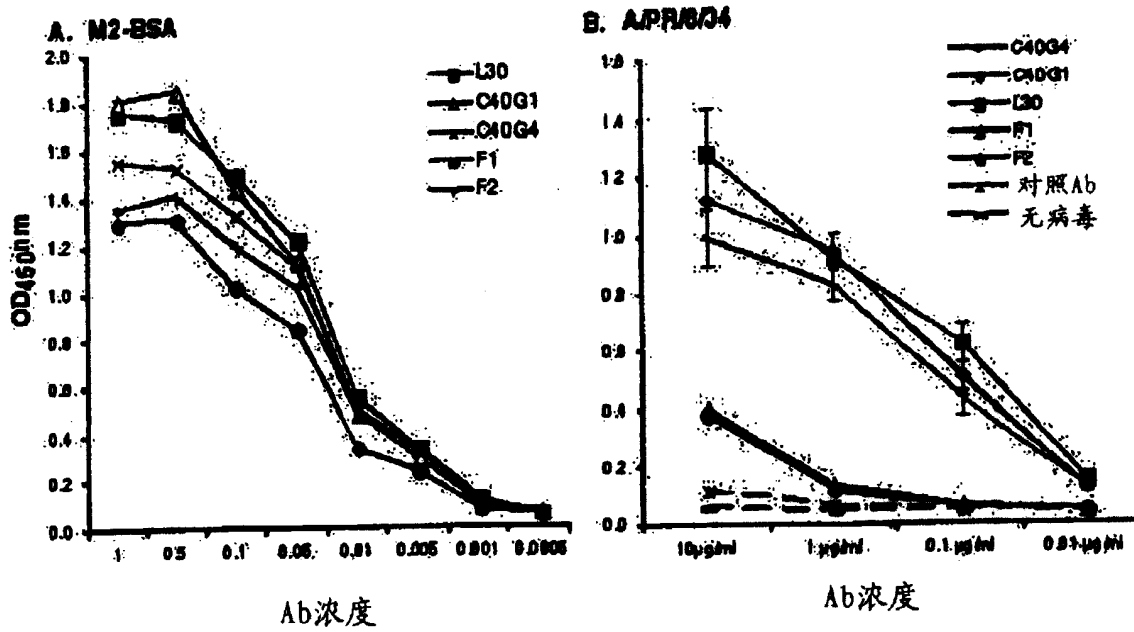


图 4

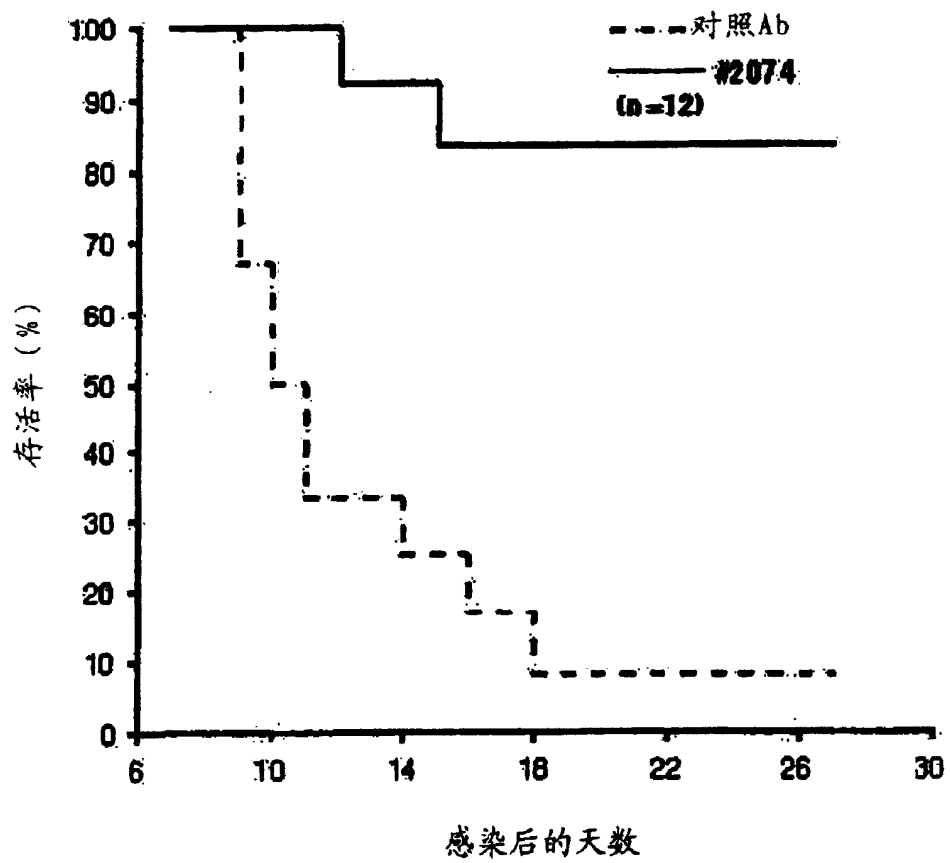


图 5

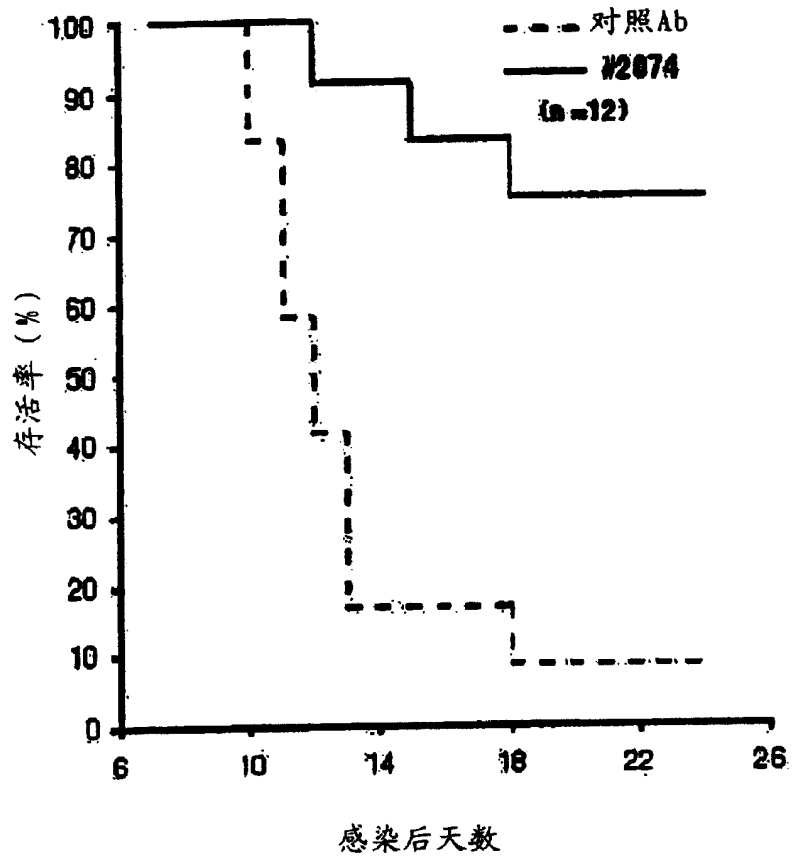


图 6