



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110016079 B

(45)授权公告日 2019.12.24

(21)申请号 201910240891.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.03.28

C07K 16/10(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 15/13(2006.01)

申请公布号 CN 110016079 A

G01N 33/569(2006.01)

(43)申请公布日 2019.07.16

A61K 39/42(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(66)本国优先权数据

审查员 冯晓亮

201811552563.6 2018.12.18 CN

(73)专利权人 珠海泰诺麦博生物技术有限公司

地址 519090 广东省珠海市金湾区珠海大道6366号6号楼东侧一至三层

(72)发明人 廖化新 郑伟宏 贾振兴 王月明

袁晓辉

(74)专利代理机构 北京开阳星知识产权代理有限公司 11710

代理人 王璐

权利要求书1页 说明书11页

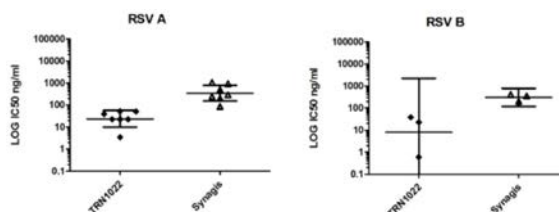
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及医学及免疫学领域,具体公开了抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用。所述中和抗体包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的重链可变区以及包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的轻链可变区(或称可变轻链结构域);其中所述重链可变区中的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1、2、3所示,所述轻链可变区中的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.4、5、6所示。基于此研究成果,本发明还提供了编码所述中和抗体的核酸分子以及所述中和抗体在制备特异性结合呼吸道合胞病毒的融合前蛋白的产品和制备呼吸道合胞病毒疫苗等方面的应用。



1. 抗呼吸道合胞病毒的中和抗体,其特征在于,所述中和抗体包括轻链可变区和重链可变区:

所述重链可变区包括:(1)如SEQ ID NO.1所示的CDR1区,(2)如SEQ ID NO.2所示的CDR2区,(3)如SEQ ID NO.3所示的CDR3区;

所述轻链可变区包括:(1)如SEQ ID NO.4所示的CDR1区,(2)如SEQ ID NO.5所示的CDR2区,(3)如SEQ ID NO.6所示的CDR3区。

2. 根据权利要求1所述的中和抗体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

3. 根据权利要求1或2所述的中和抗体,其特征在于,所述中和抗体是人抗体、单克隆抗体、纯化的抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv。

4. 根据权利要求3所述的中和抗体,其特征在于,所述中和抗体特异性地结合呼吸道合胞病毒的融合前蛋白和/或中和呼吸道合胞病毒;通过表面等离子体激元共振测定,所述中和抗体可以以不高于 1×10^{-5} M的平衡解离常数(KD)与呼吸道合胞病毒的融合前蛋白解离。

5. 根据权利要求3所述的中和抗体,其特征在于,所述中和抗体的恒定区选自IgG、IgA、IgD、IgE或IgM恒定区中的任意一种。

6. 根据权利要求5所述的中和抗体,其特征在于,所述中和抗体的恒定区为IgG恒定区或IgA恒定区。

7. 编码权利要求1~6任一项所述中和抗体的核酸分子。

8. 含有权利要求7所述核酸分子的重组表达载体或表达盒或转基因细胞系或重组菌。

9. 权利要求1~6任一项所述中和抗体在如下a)~e)中任一种中的应用:

a) 制备特异性结合呼吸道合胞病毒的融合前蛋白的药物或试剂;

b) 制备特异性结合呼吸道合胞病毒抗原的药物或试剂;

c) 制备治疗或辅助治疗呼吸道合胞病毒的药物或试剂;

d) 制备呼吸道合胞病毒疫苗;

e) 制备用于检测RSV的检测试剂。

10. 一种治疗或辅助治疗抗呼吸道合胞病毒感染的药物或试剂,其特征在于,其活性成分为权利要求1~6任一项所述的中和抗体。

抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学及免疫学领域,具体地说,涉及一种抗呼吸道合胞病毒的中和抗体。

背景技术

[0002] 呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus,RSV)广泛分布于世界各地,是导致婴幼儿、老年人和免疫力低下的成年人下呼吸道疾病(low respiratory illness,LRI)的最常见的病毒性病原体之一。几乎所有儿童2岁时都经历过1次或多次感染,感染的高峰年龄为2个月至8个月。RSV是婴儿、小龄儿童下呼吸道感染的首要原因,也是年幼儿童因呼吸道疾病住院的首要原因。在婴幼儿住院病例中,有40%~50%的毛细支气管炎和25%的肺炎是RSV感染所致。而且多项研究还表明,婴儿严重感染是以后发生哮喘的高危因素,其严重性远远超出其他微生物病原。严重的RSV感染同样困扰着老年人,然而由于持续缺乏特定的治疗和安全有效的疫苗,仍然难以减少全球RSV感染的发病率和死亡率。

[0003] RSV自然感染产生的免疫不充分,不能产生持久免疫力,因此,RSV感染的显著特征是前次感染在体内产生的抗体不能提供永久保护,在同一个流行季节,不同亚型的RSV可引起再次感染,即使发生多次RSV自然感染也不能诱导上呼吸道对病毒感染产生终身的免疫保护,因此重复感染十分常见。

[0004] 目前,已研究预防和治疗RSV感染的几种方法,包括疫苗开发、抗病毒化合物(利巴韦林)、反义药物、RNA干扰技术以及抗体产品,例如免疫球蛋白或静脉注射单克隆抗体。分离自供体的静脉注射免疫球蛋白(RSV-IGIV; **RespiGam®**)和单克隆抗体帕利珠单抗(Synagis)已被批准用于高风险儿童中的RSV预防。然而帕利珠单抗是一种昂贵的人源化单克隆抗体,仅能用作预防性治疗;利巴韦林是一种核苷抗代谢物,有严重毒性,存在致畸作用。更多的抗RSV的药物研发还处于早期阶段。因此,迫切需要开发新的抗RSV药物,尤其是可治疗RSV感染的药物。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种抗呼吸道合胞病毒的中和抗体(命名为TRN1022),所述中和抗体包括轻链可变区和重链可变区:

[0008] 所述重链可变区包括:(1)CDR1区中如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体,(2)CDR2区中如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体,(3)CDR3区中如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体;

[0009] 和/或,

[0010] 所述轻链可变区包括：(1) CDR1区中如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体，(2) CDR2区中如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体，(3) CDR3区中如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或具有同等功能的功能性活性CDR变体。

[0011] 作为优选，所述中和抗体包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的重链可变区(或称可变重链结构域)以及包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的轻链可变区(或称可变轻链结构域)。其中，所述重链可变区中的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1、2、3所示，所述轻链可变区中的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.4、5、6所示。

[0012] 所述具有同等功能的功能性活性CDR变体指保留了原氨基酸序列的生物学特性，同样能够特异性结合呼吸道合胞病毒的相应片段的CDR变体。

[0013] 所述功能性活性CDR变体包括在亲代CDR序列中的至少一个氨基酸被修饰的氨基酸序列，并包括与亲代CDR序列具有至少60%序列一致性，优选具有至少70%、至少80%、至少90%序列一致性的氨基酸序列，或者由与亲代CDR序列具有至少60%序列一致性，优选具有至少70%、至少80%、至少90%序列一致性的氨基酸序列组成。

[0014] 所述修饰可以是氨基酸序列的化学变化或部分更改，所述修饰使变体保留未修饰序列的生物学特性所述部分更改可以是删除或替换一个至几个氨基酸，例如，1、2、3、4或5个氨基酸，或加入或插入一个至几个氨基酸，例如1、2、3、4或5个氨基酸，或通过化学衍生一个至几个氨基酸，例如，1、2、3、4或5个氨基酸，或它们的组合。氨基酸残基的替换可以是保守替换，例如，以一个疏水氨基酸替换一个替代疏水氨基酸。

[0015] 本文使用的术语“变体”指的是通过插入、删除或替换一个或多个氨基酸，或通过化学衍生氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基，或核苷酸序列中的核苷酸，或序列的一个或两个远端来修饰这一序列所得到的序列，还包括天然等位突变，其中，修饰不会影响(特别是不会损失)这一序列的活性。

[0016] 本发明中，术语“CDR区”意指抗体的互补决定区，即决定抗体对特定抗原的特异性的区域。轻链和重链两者上的三个CDR区(CDR1至CDR3)负责抗原结合。

[0017] 更进一步地，所述重链可变区的氨基酸序列具有如SEQ ID NO.7所示的序列，或具有与SEQ ID NO.7所示序列至少70%相同的序列，和/或，所述轻链可变区的氨基酸序列具有如SEQ ID NO.8所示的序列，或具有与SEQ ID NO.8所示序列至少70%相同的序列。

[0018] 本发明经过实验研究发现，本发明所述中和抗体中和呼吸道合胞病毒感染的IC50可达0.42ng/mL。

[0019] 更进一步地，所述的中和抗体以不高于 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，例如 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更小的KD与与呼吸道合胞病毒的融合前蛋白解离。

[0020] 在一个优选的实施方案中，呼吸道合胞病毒的融合前蛋白为RSV A2株融合(F)蛋白的融合前构象(Pre-F)蛋白。

[0021] 其中，术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数，表示处于平衡状态时抗体和抗原的解离程度。KD越小说明解离越小，代表抗体与抗原间的亲和力越强。通常，抗体(例如，本发明的中和抗体TRN1022)以不高于 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的平衡解离常数(KD)与抗原(例如，RSV的F蛋白)解离，例如，如使用表

面等离子体共振术 (SPR) 在BIACORE仪中测定的。

[0022] 本文使用的术语“抗体”是全长抗体或其抗体片段,其中所述中和抗体片段包括至少一个带有前述结合位点的抗体区。优选地,抗体选自人源化或人抗体和单结构域抗体,如VH、VHH或VL,和/或包含或由VL/VH区域对和抗体恒定域组成的抗体,如重链抗体、Fab、F(ab')、(Fab)2、scFv、Fd、Fv或全长抗体。

[0023] 特别地,本发明所提供的抗呼吸道合胞病毒的中和抗体,为人抗体、单克隆抗体、纯化的抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、或Fv。

[0024] 优选地,本发明的单克隆抗体可以是IgG型(如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)抗体、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗体,其恒定区包括IgG、IgA、IgD、IgE或IgM恒定区中的任意一种,优选为IgG或IgA恒定区。

[0025] 优选地,本发明的单克隆抗体的轻链可以是κ型或λ型的。

[0026] 在一个优选的实施例中,轻链是λ型的。轻链可以是天然存在的链,包括天然重排的、经遗传修饰的或合成的轻链类型。

[0027] 本发明的单克隆抗体的重链可以选自:同种型IgM、IgA、或IgG,优选地IgG。

[0028] 在一个优选的实施例中,单克隆抗体的重链是IgG型的。

[0029] 第二方面,本发明基于前述研究成果,还提供了编码所述中和抗体的核酸分子。所述核酸分子的核苷酸序列依据前述抗体分子的具体氨基酸序列而定,所述核苷酸序列与氨基酸序列的对应关系属于本领域的公知常识。在所述中和抗体氨基酸序列或其特征确定的情况下,本领域技术人员能够根据该氨基酸序列获得相应的、合适且合理的核苷酸序列。

[0030] 编码所述中和抗体的核酸分子可以是自种系或自B细胞中发生的重排衍生的天然存在的核酸,或者,核酸可以是合成的。合成的核酸还包括具有经修饰的核苷间键,包括硫代磷酸酯以提高核酸免于降解的抗性的核酸。核酸可以遗传工程化改造或者通过核苷酸合成完全合成生成。

[0031] 在一个优选的实施例中,本发明提供了包含至少一种编码本发明单克隆抗体的轻链的核酸和/或至少一种编码本发明单克隆抗体的重链的核酸的载体。核酸可以存在于同一载体中或者可以以二元载体的形式存在。优选地,载体包含与核酸可操作连接的启动子以便于编码轻链和/或重链的核酸的表达。优选地,载体还包含用于在宿主细胞中复制和维持的起点。载体还可以包含位于编码轻链或重链的核酸的5'的编码信号序列的核苷酸序列。信号序列可以便于编码的肽链分泌入培养基中。

[0032] 因此,应当理解的是,含有上述核酸分子的重组表达载体或表达盒或转基因细胞系或重组菌等也属于本发明的保护范围。

[0033] 在本领域中,已知许多原核和真核表达系统,其中真核宿主细胞诸如酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞和哺乳动物细胞。优选地,哺乳动物细胞自HEK293细胞、PerC6细胞、CHO细胞、COS细胞或HELA细胞及其衍生物等。特别优选的是人生产细胞系。

[0034] 在一个优选的实施例中,本发明的人单克隆抗体自对RSV融合前蛋白具有高滴度的血浆样本的血液淋巴细胞生成,并且如此生成具有高亲和力的天然精制的且选定的抗体以实现中和和针对感染的有效保护。

[0035] 本发明还提供了用于生成单克隆抗体的方法。在一个实施方案中,通过培养转入信号序列的表达载体的宿主细胞来生成单克隆抗体。生成的单克隆抗体被分泌入上清液

中,并且可以通过应用常规的层析技术来自其纯化。

[0036] 第三方面,本发明还提供了所述中和抗体在如下a)~d)中任一种中的应用:

[0037] a) 制备特异性结合呼吸道合胞病毒的融合前蛋白的产品;

[0038] b) 制备特异性结合呼吸道合胞病毒抗原的产品;

[0039] c) 制备治疗或辅助治疗呼吸道合胞病毒的产品;

[0040] d) 制备呼吸道合胞病毒疫苗;

[0041] e) 制备用于检测RSV的检测试剂。

[0042] 作为优选,所述产品为药物。

[0043] 作为一种优选的应用方案,本发明进一步提供一种治疗或辅助治疗抗呼吸道合胞病毒感染的药物,其活性成分为本发明所述的抗呼吸道合胞病毒的中和抗体。

[0044] 本发明的药物在制造和储存条件下必须是无菌和稳定的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备的优选方法是真空干燥和冷冻干燥,真空干燥和冷冻干燥从活性成分和其它期望成分的预先无菌过滤过的溶液产生活性成分和其它期望成分的粉末。可选择地,本发明的药物可在溶液中,且在递送之前或递送时可加入和/或混合适当的药学上可接受的赋形剂以提供可注射的单位剂型。优选地,本发明中使用的药学上可接受的赋形剂适用于高药物浓度,可保持适当的流动性,且如果需要可延迟吸收。

[0045] 作为优选地,本发明所述的抗体可以与一种药学上可接受的载体配制为药物,并且可以通过本领域已知的多种方法来给予。给药途径和/或方式可以取决于所希望的结果而不同。

[0046] 术语“药学上可接受的载体”表示不干扰活性成分的生物活性的有效性的一种或多种非毒性材料,包括但不限于缓冲液、防腐剂、相容的载体、以及任选地其他添加剂或包封物质。术语“载体”表示天然的或合成的有机或无机成分,活性成分与该载体组合以促进应用。

[0047] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可以相互组合,得到具体实施方式。

附图说明

[0048] 图1是本发明实施例1中表达蛋白的Blue Native PAGE检测。

[0049] 图2是本发明实施例1中RSV Pre-F蛋白结合能力。

[0050] 图3是本发明实施例1中记忆性B细胞的分选结果。

[0051] 图4是本发明实施例1中纯化后非还原性和还原性的抗体蛋白的SDS-PAGE图谱;其中,泳道1为非还原抗体蛋白,泳道2为Marker,泳道3为还原性抗体蛋白。

[0052] 图5是本发明实施例2中所述中和抗体与纯化的RSV Pre-F蛋白特异性结合的活性。

[0053] 图6为本发明实施例2中所述中和抗体对RSV病毒的A型和B型亚型的中和活性。

[0054] 图7为本发明实施例2中所述中和抗体与不同浓度RSV Pre-F蛋白的结合亲和力。

具体实施方式

[0055] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实

实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0056] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0057] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0058] 实施例1抗呼吸道合胞病毒中和抗体的筛选、表达与纯化

[0059] 1、RSV Pre-F蛋白的制备与鉴定

[0060] 根据NCBI数据库内的RSV A2株融合(F)蛋白的融合前构象(Pre-F)蛋白的基因序列,加入His标签后与pcDNA3.3表达载体构建RSV Pre-F蛋白的表达质粒,转染293T细胞后,培养并收集细胞表达的上清液,浓缩后经镍柱纯化,得到RSV Pre-F蛋白,并进行了检测鉴定。

[0061] 1)表达的RSV Pre-F蛋白的检测

[0062] 表达的RSV Pre-F蛋白的经SDS-PAGE检测,结果显示其相对分子量约70kDa,与理论值一致。

[0063] 表达的RSV Pre-F蛋白通过Native PAGE检测,结果如图1,其主要是多聚体形式存在,与天然存在的RSV F蛋白为三聚体的形式存在类似。

[0064] 2)RSV Pre-F蛋白结合能力鉴定

[0065] 将RSV Pre-F蛋白分别用碳酸盐包被缓冲液包被、4℃过夜。PBST缓冲液洗涤,加入封闭液37℃封闭2h或4℃过夜。加入100μL Mouse Anti-Respiratory Syncytial Virus Fusion protein antibody (Abcam,1:7500),阳性对照为RSV阳性血浆样本,阴性对照为无关抗体0.5μg/mL,每孔100μL,空白孔加封闭液,37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,每孔加100μL用封闭液按1:10000稀释的Goat-Anti-Human IgG-Fab-HRP、Goat-Anti-Mouse IgG-Fab-HRP(二抗),37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,避光,每孔加TMB 100μL,37℃放置5min,2M硫酸终止。双波长450~630nm检测OD值并计算。

[0066] 结果如图2所示,RSV Pre-F蛋白与Mouse Anti-Respiratory Syncytial Virus Fusion protein antibody单抗结合阳性,并且不与其他无关抗体结合。综上可知,所表达的RSV Pre-F蛋白均是具有特异性结合活性的三聚体结构蛋白。

[0067] 2、分离PBMC和阳性血浆样本筛选

[0068] 采集健康成人志愿者的外周血血液样本置于含有EDTA的抗凝管中,经生理盐水等体积稀释后,用Ficoll经离心法,400g、离心35min。分离上清的血浆层,分装后-80℃保存备用;中间的单个核细胞(PBMC)层悬液,用RPMI1640(含10%FBS)洗涤3次,吸弃上清,用细胞冻存保护剂重悬分装后,在液氮罐中保存备用。

[0069] ELISA方法筛选针对RSV F蛋白具有高滴度的血浆样本。将RSV Pre-F蛋白用碳酸盐包被缓冲液稀释至2μg/mL,4℃包被酶标版过夜。PBST缓冲液洗涤,血浆样本1:50倍稀释后作为起始浓度,3倍倍比稀释,37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,每孔加100μL用封闭液按1:10000进行稀释的Goat-Anti-IgG-Fab-HRP(二抗),37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,每孔加TMB 100μL,37℃放置5~10min,立即用2M H₂SO₄终止。双波长450/630nm检测OD值,判定结果。

[0070] 3、分离记忆性B细胞

[0071] 用40μm滤膜过滤经37℃水浴复苏后的PBMC,先利用BD FACSRia按照CD3-PE-Cy5-/

CD16-PE-Cy5-/CD235a-PE-Cy5-/CD14-FITC-/IgD-PE-/CD20-APC+/CD27-APC-H7+/的方案从PBMC中分选特异性细胞群,再分选针对RSV F蛋白特异性的记忆B细胞细胞群,挑选形态完好的单个细胞置于96孔PCR板中(每孔20 μ L单细胞裂解液),使每个孔含有一个记忆性B细胞,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0072] 分选结果如图3所示,流式细胞术分选候选样本中的记忆性B细胞,筛选能特异性结合RSV F蛋白的记忆B细胞。

[0073] 4、分离抗体可变区基因

[0074] 向含有单个B细胞的96孔板中加入0.5 μ M不同亚型重链与轻链的恒定区引物(引物采用常规方法在特定位点设计)和Superscript III反转录酶,37 $^{\circ}$ C孵育1小时,按以下条件进行PCR扩增:95 $^{\circ}$ C 15min;95 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min;4 $^{\circ}$ C 5min;获得的产物cDNA于-20 $^{\circ}$ C保存;

[0075] 通过从B细胞第一链cDNA合成反应产生IgG重链以及k和 λ 轻链,然后利用、巢式PCR方法扩增。50 μ L体系中含有5 μ L反转录产物、HotStarTaq Plus酶、dNTPs、和0.5 μ M的不同亚型重链与轻链可变区的特异性引物(引物采用常规方法在特定位点设计),按以下条件进行PCR扩增:预变性94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 50s,35个循环;72 $^{\circ}$ C 7min。

[0076] 获得的PCR产物用在1%琼脂糖凝胶上测定大小,并且将剩余的PCR产物通过Qiagen PCR Purification Kit(Qiagen)纯化。

[0077] 5、构建重组抗体的表达载体与表达

[0078] 将凝胶电泳鉴定为阳性、且重链与轻链可匹配成对的抗体可变区基因的PCR产物利用TA克隆的方法连接到pcDNA3.3载体上,构建抗呼吸道合胞病毒全人源中和抗体的表达载体,然后将表达载体转化DH5 α 感受态细菌,在含有氨苄青霉素的平板上37 $^{\circ}$ C培养过夜,挑取10个单菌落用特异性引物进行PCR,反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸100s,28个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。取5 μ L PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,在阳性转化子中鉴定出了含有抗体重链和轻链基因的转化子。

[0079] 将具有RSV F蛋白抗原结合阳性的抗体重链与轻链的表达载体共转染293细胞,转染后6~8小时换大量新鲜培养基,并在37 $^{\circ}$ C、8%CO₂培养箱中培养。

[0080] 6、抗体蛋白纯化与分析

[0081] 培养96小时后收集转染上清,4 $^{\circ}$ C、4000rpm离心1小时,除去细胞碎片。Protein A Agarose亲和层柱结合过夜,使结合的上清液缓慢通过Protein A Agarose亲和层柱,充分使得抗体结合。用60mL PBS洗涤后,将结合的抗体用洗脱缓冲液(0.1M Gly-HCl缓冲液,pH2.5)洗脱,并收集于包含1mL的1M Tris-HC缓冲液(pH9.0)的Amicon Ultra-30Centrifugal Filters(MerckMillipore)中,5000G、4 $^{\circ}$ C离心20min,浓缩蛋白,再向Amicon Ultra-30Centrifugal Filters中加入上述PBS,3500G、4 $^{\circ}$ C离心20min,更换新的平衡缓冲液,重复3次,获得浓缩至1ML的抗体蛋白。采用Mini-Protein cell III系统(Bio-Rad)进行不连续垂直电泳。抗体样品与上样缓冲液的混合比例为5:1,混合后还原性样品煮沸5min,每孔上样10 μ L,电泳时间约60min。考马斯亮蓝R-250染色30min以上,再用脱色液脱色至背景干净。观察SDS-PAGE蛋白电泳分析的纯化效果。

[0082] 结果如图4所示,纯化后非还原性和还原性的抗体蛋白在SDS-PAGE图谱上都出现了清晰条带,非还原性条带(即抗体)大小为180KD,还原性样品裂解,分别为重链约65KD和

轻链约25KD,几乎没有其它杂带。然后通过ELISA等再证实纯化后的抗体的活性及功能。

[0083] 实施例2中和抗体的结合活性、体外微量中和活性及亲和力实验

[0084] 1、抗体的结合活性

[0085] 用前文提到的相同的ELISA方法对表达纯化的抗体的结合活性进行检测:

[0086] 将RSV Pre-F蛋白用碳酸盐包被缓冲液包被、4℃过夜。PBST缓冲液洗涤,加入封闭液37℃封闭2h或4℃过夜。使用封闭液倍比稀释RSV抗体样品,1μg/孔起始,稀释12个梯度。阳性对照为阳性血浆样本原液和RSV单抗,每孔100μL。阴性对照为阴性血浆样本原液和无关抗体(TRN006)0.5μg/mL,每孔100μL,空白加100μL封闭液,37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,每孔加100μL用封闭液按1:10000稀释的Goat-Anti-Human IgG-Fab-HRP、Goat-Anti-Mouse IgG-Fab-HRP,37℃孵育1h。PBST缓冲液洗涤,避光,每孔加TMB 100μL,37℃放置5min,2M硫酸终止。双波长450/630nm检测OD值并计算。

[0087] 由图5可知,表达纯化后的全人源抗RSV单克隆抗体TRN1022与RSV Pre-F蛋白的结合具有剂量依赖性,阴性血浆样本原液和无关抗体(TRN006)不与RSV Pre-F蛋白特异性结合,说明抗体TRN1022与RSV Pre-F的结合是特异性的。

[0088] 2、抗体的体外微量中和活性

[0089] 以50μL/孔的体积,将抗体TRN1022的3倍连续稀释液加入96孔微量滴定板的HEp-2细胞培养基中。随后,分别添加按一定比例稀释后的含RSV病毒的样本(包括RSV A2、RSV Long和RSV 9320等3株病毒株;以及临床检测RSV阳性、Hep-2细胞培养典型合胞病变、RSV特异性PCR检测阳性且能被RSV抗体中和CPE反应的临床样本9325、8879、9133、9574、6477、8938、6495等7份样本),每孔50μL,并设置以未加抗体的病毒为阳性对照,未加病毒的抗体为阴性对照,37℃,5%CO₂培养箱孵育2h。将制备的Hep-2细胞悬液(2×10⁵个/mL)每孔分别加入0.1mL,并且将这些板在37℃下在5%、CO₂孵箱中孵育培养。用倒置显微镜每天观察细胞病变(CPE),以抑制50%细胞病变的抗体最高稀释度的倒数为终点效价。测定中和抗体滴度,中和抗体滴度定义为有50%以上完整HEP2细胞的最后一个抗体稀释度。

[0090] 使用酶标仪通过检测450nm下的吸光度来测量底物转化。使用log(抑制剂)对应答与可变斜率曲线拟合,在Graphpad Prism中使用非线性拟合算法计算IC₅₀值,并且IC₅₀值表示在450nm下所测量的吸光度减少50%所需要的抗体浓度。

[0091] 结果显示,等量TRN1022抗体的中和效价不仅比等量的Synagis(帕利珠单抗,呼吸道合胞病毒融合蛋白(F蛋白)的人单克隆抗体,对A亚型及B亚型等呼吸道合胞病毒临床分离株具有活性)高十几倍,其体外微量中和活性检测到的最低中和浓度仅为0.42ng/mL。表明与现有上市药物Synagis相比,使用更少量的TRN1022抗体就能中和等量的病毒,具有明显的优势。而且,TRN1022抗体能中和RSV A2、RSV Long和RSV 9320等3株病毒株,即对A亚型和B亚型RSV病毒均有中和活性(图6),即说明其为广谱中和抗体。另外,临床样本9325、8879、9133、9574、6477、8938、6495等7份来源不同RSV患者的临床样本(临床检测RSV阳性、Hep-2细胞培养典型合胞病变、RSV特异性PCR检测阳性且能被RSV抗体中和CPE反应,A、B亚型病毒),经培养后与TRN1022抗体进行中和试验。结果表明Synagis、TRN1022抗体针对临床上不同患者来源的RSV攻击均能够提供良好的保护能力,TRN1022抗体比Synagis效果更佳。

[0092] 3、抗体的亲和力

[0093] 通过氨基偶联方式偶联anti-human IgG(Fc)到CM5芯片的两个通道上,最终通道1

偶联5485.4RU,通道2偶联5622.4RU。捕获的RSV047浓度为1 μ g/mL,结合时间为130s。结合的RSV F蛋白浓度为2.5 μ g/mL,5 μ g/mL,10 μ g/mL,20 μ g/mL,40 μ g/mL,结合时间为90s,解离时间为600s。再生溶液为3M MgCl₂,再生时间为30s。结果如图7所示。

[0094] RSV Pre-F蛋白通过表面等离子体共振 (SPR) 来测试,结果如下表所示,抗体TRN1022以高亲和力结合融合前F蛋白。

[0095]	配位体	分析物	缔合速率 (1/Ms)	解离速率 (1/s)	平衡解离常数 (M)
	TRN1022	RSV Pre-F	2.54E+04	7.61E-05	2.99E-09

[0096] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 珠海泰诺麦博生物技术有限公司
 <120> 抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用
 <160> 8
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Ala
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 [0097] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 2
 Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asp Pro
 1 5
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 3
 Ala Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Asp Trp Leu Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 4
 Thr Ser Asp Val Gly Asp Tyr Asn Phe

1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5
 Asp Val Ser
 1

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6
 Thr Ser Tyr Arg Ser Ser Thr Thr Tyr Val
 1 5 10

[0098] <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ser Glu Leu Lys Glu Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asp Pro Thr Tyr Gly Gln Gly Ser
 50 55 60
 Thr Gly Arg Val Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Glu Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Asp Trp Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 珠海泰诺麦博生物技术有限公司
- [0003] <120> 抗呼吸道合胞病毒的中和抗体及其应用
- [0004] <160> 8
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 8
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Ala
- [0012] 1 5
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 8
- [0015] <212> PRT
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asp Pro
- [0019] 1 5
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 11
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] Ala Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Asp Trp Leu Tyr
- [0026] 1 5 10
- [0027] <210> 4
- [0028] <211> 9
- [0029] <212> PRT
- [0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0031] <400> 4
- [0032] Thr Ser Asp Val Gly Asp Tyr Asn Phe
- [0033] 1 5
- [0034] <210> 5
- [0035] <211> 3
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0038] <400> 5

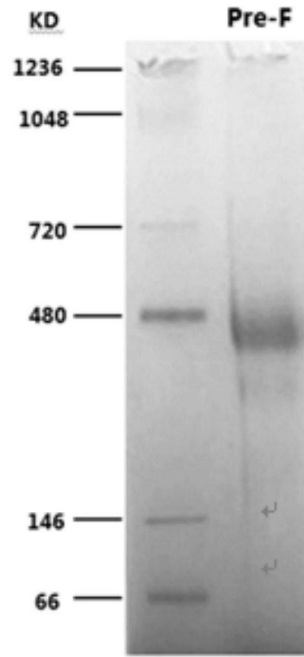


图1

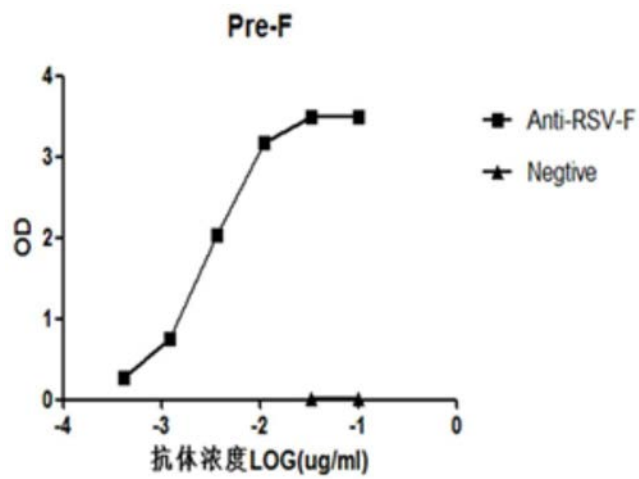


图2

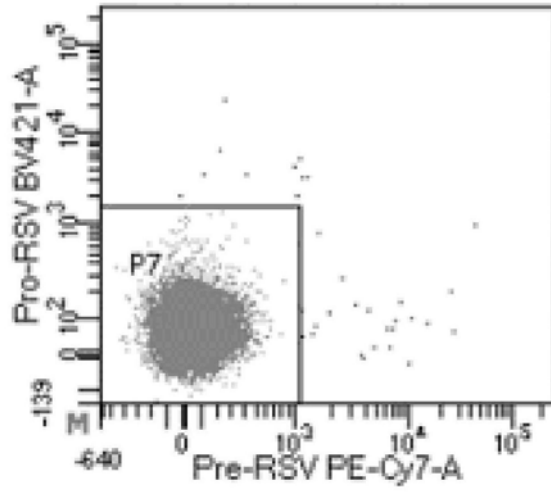


图3

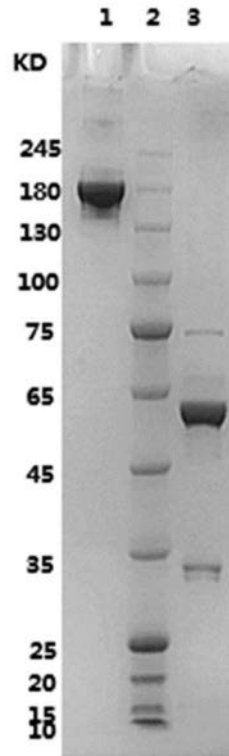


图4

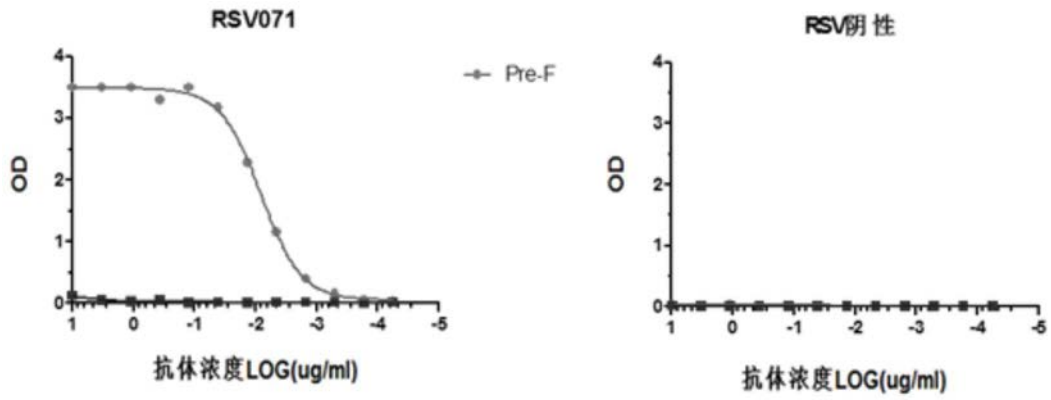


图5

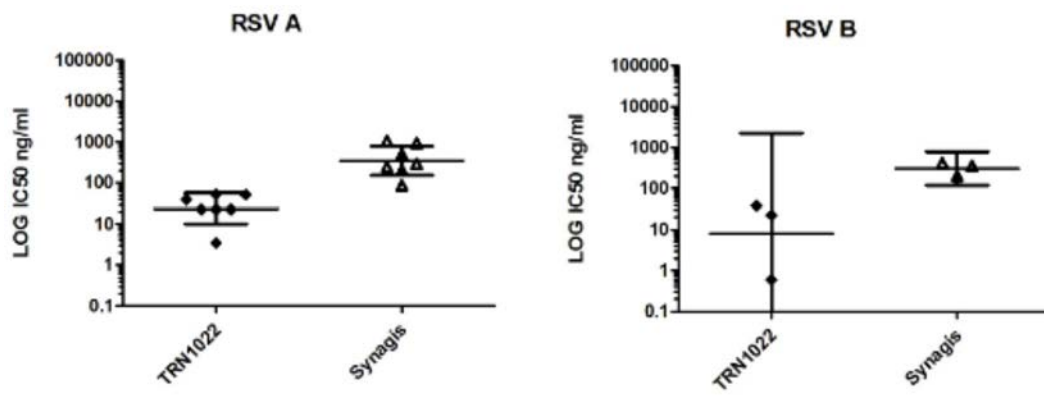


图6

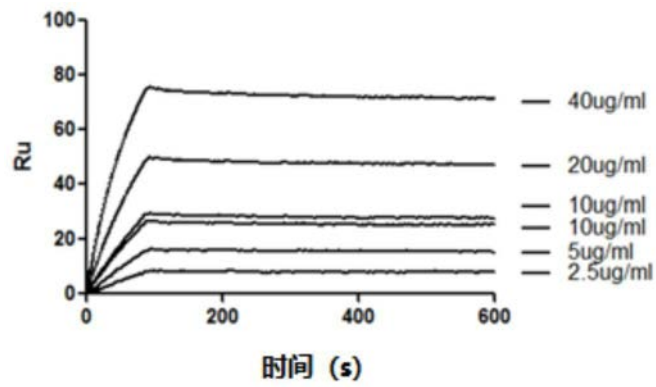


图7