

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/08



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/577 C12N 15/02

C12N 15/33 C12N 5/00

A61K 39/12 A61P 31/12

[21] 申请号 03164909.2

[43] 公开日 2004 年 9 月 15 日

[11] 公开号 CN 1528791A

[22] 申请日 2003.9.11 [21] 申请号 03164909.2

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 12 [33] US [31] 60/410246

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·M·黄

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白的表位的特异性单克隆抗体

[57] 摘要

本发明提供一种对对于灭活猫免疫缺陷病毒(FIV)被膜糖蛋白的表面蛋白成分独特表位有特异性的单克隆抗体。该抗体可用于灭活的 FIV 的定量或灭活的 FIV 疫苗的效价的测定。

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

1. 灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体。
2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体，其中灭活的FIV是FIV-Shiz或FIV-5 Petaluma。
3. 根据权利要求1或2所述的单克隆抗体，其中所述糖蛋白是gp95或gp130。
4. 根据前述权利要求任一项所述的单克隆抗体，该抗体产自保藏为ATCC号PTA-4837的细胞系。
5. 根据前述权利要求任一项所述的单克隆抗体，其中单克隆抗体为mAb 10 ID9。
6. 根据权利要求3所述的单克隆抗体，其中所述糖蛋白为gp95。
7. 根据权利要求2所述的单克隆抗体，其中所述FIV为FIV-Shiz。
8. 根据前述权利要求任一项所述的单克隆抗体，其中所述FIV已通过福尔马林处理灭活。
- 15 9. 检测样品中灭活的FIV编码糖的蛋白独特表位的方法，该方法包括：将该样品与灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体相接触，以形成复合物；并且检测所述复合物。
10. 测定样品中灭活的FIV量的方法，该方法包括：将所述样品与灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体相接触，以形成复合物；并且检测 20 所述复合物。
11. 测定样品中灭活的FIV效价的方法，该方法包括：将所述样品与灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体相接触，以形成复合物；并且检测所述复合物。
12. 根据权利要求9至11任一项所述的方法，其中单克隆抗体是权利要求1 25 至8之一中所定义的单克隆抗体。
13. 一种制备灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体的方法，该方法包括用部分纯化的灭活的FIV免疫接种适宜的宿主，筛选高FIV特异性抗体应答的宿主，将来自该宿主的脾细胞与适宜的骨髓瘤细胞系融合形成杂交瘤细胞，筛选该杂交瘤细胞与灭活的FIV的特异反应性，然后挑选稳定的 30 克隆，使该稳定克隆生长并收获想要的单克隆抗体。

14. 根据权利要求13所述的方法，其中灭活的FIV为FIV-Shiz或FIV-Petaluma。
15. 根据权利要求13或14所述的方法，其中该FIV是FIV-Shiz。
16. 根据权利要求13至15任一项所述的方法，其中细胞系保藏为ATCC号
5 PTA-4837。
17. 根据权利要求13至16任一项所述的方法，其中该FIV已用福尔马林处理而灭活。
18. 一种适于获得灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系，该杂交瘤细胞系是通过用部分纯化的灭活的FIV免疫接种适宜的宿主，筛选高FIV特异性抗体应答的宿主，将来自该宿主的脾细胞与适宜的骨髓瘤细胞系融合，并筛选杂交瘤与灭活的FIV的特异反应性而制备的。
10
19. 根据权利要求18的细胞系，该细胞系适于获得选自gp 95和gp 130的灭活的FIV编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体。
20. 以保藏号PTA-4837保藏在美国典型培养物保藏中心的细胞系。

灭活的猫免疫缺陷病毒编码的
糖蛋白的表位的特异性单克隆抗体

5

背景技术

猫免疫缺陷病毒 (FIV)，原来称之为猫嗜 T-淋巴细胞的慢病毒，是首先由 Pederson 等 (Science, (1987) 235: 790-793) 报道的，并已经在家猫和印度豹中被鉴定。世界范围的猫都会感染。如同 HIV，FIV 也备受国际关注。根据美国猫从业者协会 (American Association of Feline Practitioners)，多达十二分之一的猫可能 FIV 检验呈阳性。感染之后，有一个短暂的发热、淋巴结病和嗜中性白血球减少症阶段。多数猫在这一阶段复原，并在免疫缺陷发生之前数月或数年内表现正常。由于这种免疫缺陷的潜伏表现，利用活病毒疫苗治疗或预防 FIV 是相当危险的。虽然 FIV-编码的抗原或抗原蛋白的表位的特异性单克隆抗体是已知的，例如 US 5,117,014 和 US 5,219,725，但是这些抗体不能识别灭活的 FIV。这意味着对于现在商品化的 FIV 疫苗 (它们均利用灭活的 FIV)，还没有已知的、可用于疫苗组合物中的病毒量或灭活的 FIV 成分的效价的测定的单克隆抗体。

因此，本发明的一个目的是提供一种对失活的 FIV 糖蛋白的表位特异的单克隆抗体。

本发明的另一个目的是提供一种用于失活的 FIV 的量的测定方法。

本发明的更进一步目的是提供一种测定失活的 FIV 疫苗效价的方法。

本发明的特征是，本发明的单克隆抗体对失活的 FIV 糖蛋白的表位是特异的，但不识别活 FIV 糖蛋白、蛋白质或抗原的表位。

根据下面的详细描述，本发明的目的和特征是显而易见的。

发明内容

本发明提供一种灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体。

本发明进一步提供一种检测样品中灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白独特表位的方法，该方法包括：使样品和灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白独

特表位的特异性单克隆抗体相互接触以形成复合物；并检测该复合物。

附图说明

图 1 是单克隆抗体 mAb 1D9 的蛋白质免疫印迹分析照片，该抗体被鉴定为对灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白独特表位是特异的。

- 5 对图 1 的进一步描述如下：FIV 被膜糖蛋白与单克隆抗体 1D9 的免疫沉淀。用硫代-NHS-LC-生物素(sulfo-NHS-LC-biotin)生物素化富含福尔马林灭活的 FIV 病毒原液，并用 Triton X-100 萃取。通过将萃取物和 Mab 1D9 或 H5332 一起温育，完成免疫沉淀。在固定化蛋白 G 上收集免疫复合物，洗涤，并进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹。使用过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白检测印迹上的蛋白
- 10 质。泳道 1 和 5，为生物素化的分子量标记物；泳道 2，20 微升用于免疫沉淀的 Mab 1D9；泳道 3，为 100 微升用于免疫沉淀的 1D9；泳道 4，为 100 微升用于免疫沉淀的不相关单克隆抗体 H5332。抗体的 H 链 (50Kd) 和 L 链 (25Kd) 以及一些 BSA(67Kd)被过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白非特异性地染色。

具体实施方式

- 15 猫免疫缺陷病毒 (FIV) 被膜糖蛋白参与受体与细胞的相互作用，而此相互作用决定细胞对该病毒的易感性。FIV 被膜糖蛋白也参与病毒渗透和合胞体形成，并且是体液和细胞免疫应答的主要靶(Bendinelli, M., *et al.*, *Clinical Microbiology Review*, (1995) 8:87-112)。该被膜糖蛋白由在病毒粒中非共价连接的两成分组成，其中两成分为表面 (SU) 蛋白，它被高度糖基化，其表观分子
- 20 量为 95,000-100,000，和跨膜 (TM) 蛋白，它糖基化较少，其表观分子量为 35,000-40,000 (Pacino, G. *et al.*, *Virology*, (1995) 206:796-806)。各种研究已经显示 FIV 被膜蛋白能够在猫中诱导保护性 FIV 免疫性。因此，测量 FIV 被膜蛋白的相对数量或纯度的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 对于测定 FIV 疫苗的效价会非常有用。然而，所有当前商品化的 FIV 疫苗都利用灭活的或被杀死的病
- 25 毒，而已知的识别或与 FIV 或 FIV 糖蛋白反应的单克隆抗体不识别或不与失活的 FIV 或 FIV 糖蛋白发生反应。估计该病毒的灭活可能改变了 FIV 被膜蛋白的构象。

- 现在令人惊讶地发现，命名为 mAb 1D9 的单克隆抗体，只特异性地识别失活的 FIV，不识别活 FIV。而且，ELISA 和免疫沉淀实验表明，本发明的单
- 30 克隆抗体与 FIV 被膜糖蛋白的表面蛋白成分特异性地发生反应。

术语单克隆抗体，如在说明书和权利要求中所使用的，是指从已经被克隆而产生抗体产生细胞系的单个抗体产生细胞获得的抗体。表位表示被抗体识别的一个特定氨基酸序列、被修饰的氨基酸序列或蛋白质二级或三级结构。术语灭活的病毒表示“不存活的”或“被杀死的”病毒。

- 5 可以使用本领域已知的传统技术制备本发明的单克隆抗体。例如，可以用部分纯化的灭活病毒如 FIV-Shiz、FIV-Petaluma 或其他类似的病毒，优选 FIV-Shiz，免疫接种小鼠；然后筛选小鼠尾血的抗体应答和选定用于融合；挑选克隆的杂交瘤细胞并筛选其与失活的 FIV 的特异反应性。可以在生物反应器中使这样所获得的单一稳定克隆的杂交瘤生长，并合并多次收获的抗体，以生产所
- 10 要的单克隆抗体 mAb 1D9。

可以通过保藏在美国典型培养物保藏中心的、给予的保藏号为 ATCC 号 PTA-4837 的细胞系生产该抗体。

- 可以通过传统的灭活方法实现病毒灭活，例如，使用化学灭活剂如二元吡丙啉、苯酚、 α -丙内酯 (α -lactopropionate)、 β -丙内酯、福尔马林、硫柳汞、
- 15 戊二醛、十二烷基硫酸钠等，或其混合物，优选福尔马林的化学灭活法。也可以通过加热或在紫外线存在情况下的补骨脂素灭活该病毒。

- 本发明的单克隆抗体对于灭活的 FIV 是特异的，并且与失活的 FIV 被膜糖蛋白（例如 gp 95 或 gp 130）的独特表位形成足够强烈的相互作用，在用于灭活的病毒数量或失活的 FIV 疫苗效价测定的分析中是有用的。因此，本发明提
- 20 供一种用于检测样品中灭活的 FIV 编码的糖蛋白独特表位的方法，此方法包括：将该样品与灭活的 FIV 编码的糖蛋白独特表位的特异性单克隆抗体相接触，以形成复合物；并检测该复合物。

在本发明的方法中适用的样品包括那些在培养基中或在疫苗组合物中含有灭活病毒或灭活病毒感染细胞的样品。

- 25 在本发明的方法中适用的检测复合物的方法包括任何普遍用于检测单克隆抗体蛋白质复合物的手段，例如通过酶标记、荧光标记、或生物素标记的抗-小鼠抗体的检测，通过蛋白 A 的检测，等等。在实际操作中，可以具有单克隆抗体 mAb 1D9 作为检测抗体的 ELISA 或免疫沉淀分析的形式实施本发明的方法。

- 30 为了更清楚的理解本发明，列举下列实施例。这些实施例仅仅用于举例，

不能被理解为是对本发明范围或潜在原理的限制。的确，除了在此显示和描述的以外，通过下文列出的实施例和前面的描述，本发明的各种修改对于本领域的技术人员来说将变得显而易见。这样的修改也在本发明权利要求的范围之内。

- 5 除另有注明外，所有份均为重量份。

实施例 1

灭活的 FIV 编码的糖蛋白的表位的特异性单克隆抗体的制备
细胞和病毒

- FIV-Shizuoka(FIV-Shiz, D FIV 亚型)是在持续感染的淋巴细胞系中繁殖的，
10 该细胞系得自 FIV-Shizuoka 和 Fet-J(ATCC 保藏号 CRL 11967)，是一种不依赖 IL-2 的细胞系，被称为 Shiz。FIV-Shizuoka 持续感染的细胞系也被保藏在 ATCC，保藏号为 CRL 11976。为了产生抗原原液，使用福尔马林灭活该病毒液并用超滤法浓缩。

- 也可以类似的方法从各种其他 FIV 株和亚型制备抗原原液，例如野生分
15 离株、FIV 株 NCSU 1 (ATCC 保藏号 VR-2333)、FIV 株 UC24818 (ATCC 保藏号 VR-2619)、FIV-Petaluma (亚型 A, TCC 保藏号 VR-2 186)、FIV-Dixon (亚型 A)、 FIV-UK8 (亚型 A)、FIV-Bangston (亚型 B)、FIV-Amori-1 (亚型 B)、 FIV-Amori-2 (亚型 B)，它们在适当的易感细胞系和依赖或不依赖 IL-2 的猫 T 细胞系上繁殖，例如，PMBCs、CRFK、NYA-1 (ATCC 保藏号 CRL-2417)、FeT-1M
20 (ATCC 保藏号 CRL-10775)、FeT-2D (ATCC 保藏号 10774)、Fet-1C (ATCC 保藏号 CRL-11968)、FL-4 (ATCC 保藏号 10772)、FL-6 (ATCC 保藏号 10773)，或在其衍生的 FIV 持续感染的细胞系上繁殖，例如具有 ATCC 保藏号 VR-1 312 的 FIV-CRFK 细胞系、具有 ATCC 保藏号 11975 的 FIV-Bangston 感染细胞系，和其他类似的细胞系，例如在美国专利 6,254,872 公开的细胞系。

- 25 单克隆抗体的产生

- 用使用甘油梯度技术纯化的经福尔马林处理的FIV-Shiz病毒免疫接种Balb/c 小鼠两次。两次注射的注射部位均为皮下。筛选小鼠尾血的抗体应答。选择一个显示高FIV特异抗体滴度的小鼠用于融合。从这只小鼠收集的脾细胞与SP2/0 骨髓瘤细胞融合。如在“抗体：实验室手册” (Ed Harlow 和 David Lane著，
30 冷泉港出版社) (“Antibodies: A Laboratory Manual” by Ed Harlow and David Lane

for Cold Spring Harbor Press) 中描述的那样挑选杂交瘤细胞。筛选原代杂交瘤克隆与经福尔马林处理的FIV-Shiz 的特异反应性。获得一个稳定克隆mAb 1D9。将mAb 1D9的杂交瘤生长在Heraeus miniPERM生物反应器中。获得并合并多次收获的抗体以产生大量mAb 1D9。

5 实施例2

单克隆抗体mAb 1D9在酶联免疫吸附测定中作为检测抗体的应用

在此评价中, 使用Galanthus Nivalis 凝集素 (GNA) 捕获糖蛋白。此GNA ELISA将GNA结合的高选择性和其与HIV-1、HIV-2、SIV和FIV糖蛋白的广谱反应性结合起来。首先, 用pH9.6 10 pg/mL GNA (溶于50 mM碳酸盐中) 包被96
10 微孔板, 温度37°C, 时间1小时。用PBS-10%FBS, 在37°C, 2小时, 封闭孔之后, 加入经过1%Empigen BB (Calbiochem)在37°C1小时处理的样品, 并在37°C温育2小时。通过含0.1%吐温20的PBS洗涤3次, 除去未结合抗原。将按1: 8000
15 稀释后的实施例1的单克隆抗体mAb 1D9添加到每一个孔中, 并将该板在37°C温育1小时。洗涤之后, 添加按1:1000稀释的过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG
Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL), 并将该板在37°C温育1小时, 然后洗涤并用TMB过氧化物酶底物 (KPL) 显色。5分钟反应阶段之后, 在650 nm - 490 nm
读对板读数。

实施例3

单克隆抗体mAb 1D9在免疫沉淀测定中作为检测抗体的应用

20 在此评价中, 富含福尔马林灭活的FIV-Petaluma病毒的病毒原液 (0.38 mg总蛋白中FIV蛋白少于5%) 和溶于2 mL PBS中的5 mg 硫代- NHS-LC-生物素 (Pierce) 在冰上温育1小时。通过透析除去未掺入的生物素试剂之后, 用溶于12 mL PBS中的1% Triton X-100 萃取含病毒样品1小时, 并以100,000 g 离心2小时。回收上清液并用于免疫沉淀。通过在4°C将600微升萃取物和80微升mAb1D9
25 或mAb H5332一起温育1小时实现免疫沉淀。用mAb H5332 (对于Borrelia OspA蛋白具有特异性) 作为不相关抗体对照。免疫复合物被收集于固定化蛋白G (Pierce), 用冷PBS-1% NP-40洗涤4次, 再悬浮在Laemmli 缓冲液中, 并进行SDS-PAGE和蛋白质印迹。用SuperBlock (Pierce)封闭印迹60分钟, 然后和按1: 400,000稀释的过氧化物酶标记的链霉抗物生素蛋白(KPL)一起温育45分钟。用
30 PBS-0.05%吐温-20将膜洗涤4次, 并用SuperSignal 化学发光检测试剂盒(Pierce)

随后通过曝光于X-光胶片检测生物素-链霉抗物生素蛋白复合物。

实施例4

单克隆抗体mAb 1D9特异性的评价

细胞和病毒

- 5 FIV-Shizuoka (FIV-Shiz)和FIV-Petaluma是在持续感染的被分别称为Shiz和FL-6的淋巴细胞系中繁殖的。猫白血病病毒(FeLV)是在慢性感染的细胞系中繁殖的。猫杯状病毒(FCV)、猫病毒性鼻气管炎病毒(FVR) 和猫粒细胞缺乏症病毒(FPV)是在Crandell猫肾细胞上生长的。为产生抗原原液，用福尔马林灭活病毒液，并用超滤法浓缩。

10 评价

在此评价中， mAb 1D9的特异性是用在上述实施例2和3中所描述的ELISA和免疫沉淀技术测定的。

A - GNA ELISA

- 15 使用在实施例2中描述的测定法对各种抗原样品进行检验。结果显示在下面的表1中。

表1

抗原样品	抗原样品浓度	光密度 $A_{650}-A_{492}$ 值
FIV-Shiz病毒, 灭活的	1 x	0.572
FIV-Petaluma病毒, 灭活的	1 x	0.385
FIV-Shiz病毒, 活的	1 x	<u>0.006</u>
FIV-Petaluma病毒, 活的	1 x	<u>0.006</u>
FetJ TCS, 灭活的	1x	0.027
FeLV, 灭活的	1 x	0.020
FCV, 灭活的	1 x	0.027
FVR, 灭活的	1 x	0.027
FPV, 灭活的	1 x	0.026
FeLV, 活的	$10^{6.63}$ TCID ₅₀ /mL	0.039
FCV, 活的	$10^{7.67}$ TCID ₅₀ /mL	0.035
FVR, 活的	$10^{7.46}$ TCID ₅₀ /mL	0.039
FPV, 活的	$10^{6.75}$ TCID ₅₀ /mL	0.051
无抗原对照	0	0.033

观察

当使用1:8000稀释度时, mAb 1D9与灭活的FIV-Shiz和灭活的FIV-Petaluma样品发生良好反应。相反, 当用活FeLV、FCV、FVR 和FPV样品, 或用各种病毒的灭活抗原原液样品进行测定时, mAb 1D9 不显示反应性。有益地, mAb 1D9 不与活FIV-Petaluma或活FIV-Shizuoka样品发生反应, 即使它与灭活的FIV-Shiz 和灭活的FIV-Shiz的样品都反应良好。表1中的ELISA数据显示, 基于单克隆抗体mAb 1 D9的GNA ELISA 可以用于特异性地检测FIV糖蛋白。mAb 1D9与福尔马林灭活的FIV反应, 而不与活FIV反应的观察表明, mAb 1D9识别的表位是由福尔马林对FIV处理产生的独特表位。

B -免疫沉淀

为了进一步证实mAb 1D9对灭活的FIV被膜糖蛋白的特异性, 将灭活的FIV富集的原液生物素化并按实施例3所述用mAb 1D9或mAb H5332 (一种不相

关单克隆抗体) 进行免疫沉淀。如图1所示, mAb 1D9特异性地与SU蛋白反应, 由宽的95—100 Kd带所显示。具有较高分子量(约160 Kd)的带可能是SU与另一通过福尔马林处理而交联的蛋白形成的复合物。

结论

- 5 ELISA和免疫沉淀实验结果表明, 单克隆抗体mAb 1 D9特异性地与FIV 被膜糖蛋白的表面蛋白成分发生反应, 并且适用于灭活的FIV疫苗的效价测定, 或适用于灭活的病毒样品或灭活的病毒感染细胞样品的定量测定。

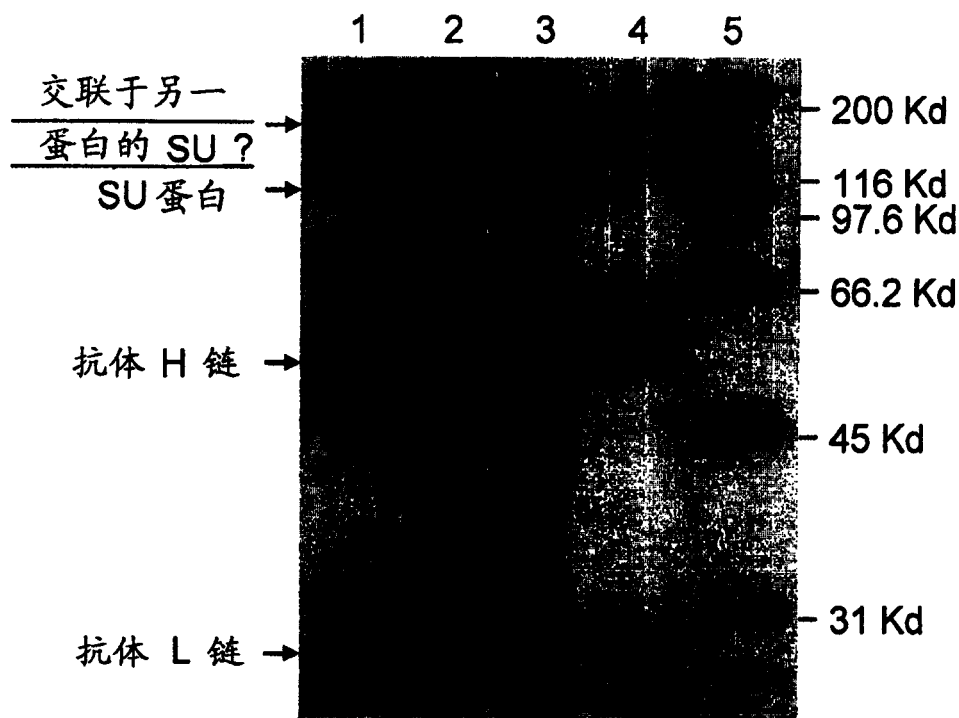


图 1

专利名称(译)	灭活的猫免疫缺陷病毒编码的糖蛋白的表位的特异性单克隆抗体		
公开(公告)号	CN1528791A	公开(公告)日	2004-09-15
申请号	CN03164909.2	申请日	2003-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
[标]发明人	CM黄		
发明人	C·M·黄		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00 C07K16/10 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/569 G01N33/577 C07K16/08 C12N15/33 C12N5/00 A61K39/12 A61P31/12		
CPC分类号	C07K16/1063 A61P31/12		
优先权	60/410246 2002-09-12 US		
其他公开文献	CN1528791B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种对于灭活猫免疫缺陷病毒(FIV)被膜糖蛋白的表面蛋白成分独特表位有特异性的单克隆抗体。该抗体可用于灭活的FIV的定量或灭活的FIV疫苗的效价的测定。

