



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103998465 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201280062779. 9

(22) 申请日 2012. 11. 23

(30) 优先权数据

3002-2011 2011. 11. 25 CL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/056688 2012. 11. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/076702 ES 2013. 05. 30

(71) 申请人 智利天主教教皇大学

地址 智利圣地亚哥

(72) 发明人 A·M·卡莱伊斯帕拉

S·M·布埃纳拉米耶

J·E·莫拉阿拉尔松

R·S·戈麦斯约翰逊

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 傅宇昌

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表2页 附图8页

(54) 发明名称

对于呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 M2-1 抗原而言特异的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及对于呼吸道合胞病毒 (RSV) 而言特异的单克隆抗体的用途。具体地, 本发明涉及由特异地针对病毒抗原 M2-1 的杂交瘤细胞系 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体 IgG2A, 所述病毒抗原 M2-1 与该病毒的核衣壳相联合。所述抗体可以用于 RSV 感染的检测和 / 或测定试验。本发明还提供了用于预防和治疗由 RSV 引起的感染的方法, 其包括施用包含由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体的组合物。最后, 本发明还提供了在生物学样品中 RSV 的病毒抗原的诊断和检测方法, 其中使用由杂交瘤 8A4/G9 的细胞所产生和分泌的单克隆抗体。

对于呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 M2-1 抗原而言特异的单克隆 抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及识别人呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 M2-1 蛋白的单克隆抗体,其可用于开发 RSV 感染的诊断方法和用于生产用于治疗 and / 或预防 RSV 感染的药物组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 在全世界,急性呼吸道感染是儿科住院和死亡的主要原因 (Bryce, Boschi-Pinto 等人, 2005)。在寒冷的月份期间,由病毒引起的呼吸道感染加剧并且产生病例数的增加,这是获得了流行性爆发的特征的情形。在儿科人群中引起这些流行病的病毒主要是呼吸道合胞病毒 (RSV)、腺病毒 (ADV) 和流感病毒。呼吸道感染的另一种致病因子为变性肺炎病毒 (hMPV),这是一种近期鉴定出的并且在两岁以下的幼儿中引起严重的呼吸道感染的病毒 (van den Hoogen, Herfst 等人, 2004),尽管其诊断并不大众化。然而,在全世界的乳婴中,RSV 是引起急性呼吸道感染的主要因子,其在冬季月份中引起严重的爆发。根据 WHO,该病毒每年感染 6 千 4 百万人,其中 16 万人死亡 (www.who.int)。该病毒的感染引起宽范围的临床场景,其可以是轻的,例如鼻炎,或者可以是严重得多的,例如肺炎或细支气管炎,其中在乳婴、早产儿、具有先天性心脏病的儿童和免疫抑制的儿童中观察到最严重的场景 (Cabalka, 2004)。此外,由该病毒引起的感染是极其频繁和反复出现的,因为几乎 100% 的三岁以上的儿童有过至少一次 RSV 感染发作 (Bont, Versteegh 等人, 2002)。由于这种感染没有留下足够的免疫记忆,因而再感染是时常发生的,其中随着患者年龄增加而其严重性降低。然而,被再感染的个体作为储库起作用并且对于 1 岁以下的幼儿来说是传染源,所述 1 岁以下的幼儿自己产生严重的呼吸系统场景。在智利,在寒冷的月份 (五月-八月) 期间,该病毒是 70% 的需要住院的急性下呼吸道感染的原因 (Avendano, Palomino 等人, 2003),引起他们之中的 0.1% 的死亡。尽管该百分比是低的,但是病例的巨大数量使得死亡数目非常重大。该情形造成急救护理服务机构的饱和,这经常需要在卫生服务机构中应用紧急措施,例如在医院中用于儿科患者的床位的复原,可选择的和已计划的外科手术的中止,和在其中出现爆发的月份期间辅助人员的雇佣。在医院护理服务机构中经常使用的 RSV 的诊断方法为基于通过鼻咽拭子的直接免疫荧光的病毒抗原检测的诊断测试。该测试的局限涉及需要在样品的处理和分析方面经过培训的人员,和此外涉及所述测试的结果不是立即获得,留下一个其中患者还未被诊断但是感染继续其进程的时间段。面对这样的问题,开发可以用于产生需要最少培训且快速实施的备选的 RSV 检测测试 (例如,免疫色谱法测试) 的有效的单克隆抗体看起来是对于满足所述需求来说必需的备选方案,因为它们允许在被 RSV 感染的患者的样品中病毒抗原的特异性识别,此外需要少量的样品。以这种方式,我们的发明的结果是能够非常有效地检测有效的且以少量存在的 RSV 抗原的抗体,其允许开发用于被 RSV 感染的患者的快速、有效且准确的检测和诊断的备选方法,以便可以确定影响疾病发展的早期且合适的治疗。此外,我们的抗体的功效使得能够提出其在制备用于治疗 and / 或预防 RSV 感染的药物组合物中的用途。本发明的抗体特别地相应于识别人 RSV 的 M2-1 蛋白并且由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明涉及对于呼吸道合胞病毒 (RSV) 而言特异的单克隆抗体的用途。具体地, 本发明涉及由特异地针对病毒抗原 M2-1 的杂交瘤细胞系 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体 IgG2A, 所述病毒抗原 M2-1 与该病毒的核衣壳相联合。所述抗体可以用于 RSV 感染的检测和 / 或测定试验。所述抗体处于纯的状态并且没有任何其他污染性生物材料。在本发明的抗体的描述中, 不加区别地使用术语“M2-1 蛋白”和“M2 蛋白”。

[0006] 在本发明的另一个方面, 提供了用于预防和治疗在给定的宿主中由呼吸道合胞病毒 (RSV) 引起的感染的方法, 所述方法包括以对于阻止该疾病来说足够的剂量施用包含由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体的组合物。可以对所述抗体进行人源化, 以使在使用该抗体的患者中针对其的免疫应答的可能性最小化。

[0007] 此外, 本发明使得能够提供由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体的任何药学形式的制剂, 所述单克隆抗体适合于治疗或预防由 RSV 引起的疾病。

[0008] 本发明还提供了在生物样品中 RSV 的病毒抗原的诊断和检测方法, 其中使用由杂交瘤 8A4/G9 的细胞所产生和分泌的单克隆抗体, 在诸如下列的试验中: ELISA、免疫荧光显微术、免疫组织化学、流式细胞术、细胞纯化 (细胞分选仪, 通过荧光, 经由与磁珠结合或任何使用抗体的分离方法)、免疫沉淀法、Western 印迹和色谱法。所述样品可以是经 RSV 体外感染的细胞或者从怀疑具有 RSV 感染的个体获得的样品。在个体的样品的情况下, 它们可以相应于鼻分泌物、鼻洗出物、咽分泌物、支气管洗出物或分泌物或者被认为合适的任何其他类型的样品。本发明提供了开发用于分离和检测在生物样品和细胞培养物中的呼吸道合胞病毒的方法的机会, 其中使所述生物样品和细胞培养物与偶联在任何类型的固体支持物例如硝酸纤维素、尼龙膜或其他支持物之上的由杂交瘤细胞系 8A4/G9 所产生和 / 或分泌的单克隆抗体相接触。本发明给出了开发用于呼吸道合胞病毒等的快速检测试剂盒的机会, 所述试剂盒包含由杂交瘤 8A4/G9 所产生的抗体。本发明还提供了这样的可能性, 即掺入任何类型的与由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体化学地相结合的分子或底物 (例如, 荧光团、生物素、放射性同位素、金属、酶和 / 或任何与由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的单克隆抗体相偶联的化学组成部分), 作为在生物样品中的检测、治疗、分析和 / 或诊断方法。

[0009] 附图描述

[0010] 图 1: 由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的免疫球蛋白 G 的轻链和重链的可变区的核苷酸序列和推导出的氨基酸序列。A. 编码重链 (IgG_H-8A4/G9, 上图) 和轻链 (Ig κ V_L-8A4/G9, 下图) 的信使 RNA 的核苷酸序列, 其通过对纯化自处于活跃生长的杂交瘤的总 RNA 样品开始制备出的互补 DNA 进行测序而获得。B. 关于重链 (IgG_H-8A4/G9, 上图) 和轻链 (Ig κ V_L-8A4/G9, 下图) 的可变区的推导出的氨基酸序列。

[0011] 图 2: 显示了借助于 ELISA 的对于 RSV 的 M2 抗原的检测试验的结果的图, 其中使用了克隆 8A4/G9 的抗 -M2 抗体 (第一个柱)、在兔中产生的抗 -M2 多克隆抗体 (第二个柱)、仅二抗“抗小鼠 IgG-HRP” (第三个柱)、二抗“抗兔 IgG-HRP” (第四个柱)、克隆 8A4/G9 的抗 -M2 抗体但不存在抗原 (第五个柱) 和在兔中产生的抗 -M2 多克隆抗体但不存在抗原 (第六个柱)。可以观察到, 克隆 8A4/G9 的抗 -M2 单克隆抗体比在兔中产生的多克隆抗体更有效地检测出 M2 抗原。

[0012] 图 3: 描绘了从克隆 8A4/G9 的抗 -RSV M2 单克隆抗体的功效试验获得的结果的图,

所述试验用于在不同的抗体稀释度之下检测抗原和用于测定其特异性。所述抗-M2 单克隆抗体 (425 μ g/ml) 以 1/100 的稀释度 (终浓度为 4.25 μ g/ml) (第一个柱)、1/1000 的稀释度 (终浓度为 425ng/ml) (第二个柱)、1/2000 的稀释度 (终浓度为 212.5ng/ml) (第三个柱) 进行使用,和此外,作为阴性对照,使用 hMPV 的 M2 蛋白作为抗原 (第四个柱),仅二抗“抗小鼠 IgG-HRP” (第五个柱),和没有抗原的对照 (第六个柱)。

[0013] 图 4:描绘了当处于 1/100 的稀释度 (4.25 μ g/ml) (图 4A) 和 1/1000 的稀释度 (425ng/ml) (图 4B) 时所述抗-M2 单克隆抗体的灵敏度的结果的图。在每个图中,显示了所述抗体检测不同量的抗原的能力。所检验的抗原量为 1 μ g (第一个柱)、500ng (第二个柱)、100ng (第三个柱)、50ng (第四个柱)、25ng (第五个柱),没有抗原的对照 (第六个柱),其中使用腺病毒的 P8 蛋白作为抗原的特异性对照 (第七个柱),和仅二抗“抗小鼠 IgG-HRP” (第八个柱)。

[0014] 图 5:描绘了当处于 1/3000 的稀释度 (141.6ng/ml) (图 5A) 和 1/7500 的稀释度 (56.6ng/ml) (图 5B) 时,通过抗-M2 单克隆抗体 (425 μ g/ml) 借助于流式细胞术对经 RSV 感染的 HEp-2 细胞进行的检测的数据的图。在每个图中,显示了在经感染的细胞 (黑色柱) 和未感染的细胞 (白色柱) 中抗原的检测,其中使用抗-M2 单克隆抗体 (第一对柱)、仅具有二抗“抗小鼠 IgG-FITC”的对照 (第二对柱) 和具有抗-RSV F 抗体的阳性对照 (Bourgeois, Corvaisier 等人, 1991) (第三对柱)。该最后一种抗体在这两个试验中均以 1/1000 的稀释度进行使用。

[0015] 图 6:图 6A 显示了经感染并用本发明的抗-M2 单克隆抗体进行染色的 HEp-2 细胞的免疫荧光照片。图 6B 显示了经感染并用 Millipore 的抗-F 单克隆抗体进行染色的 HEp-2 细胞的免疫荧光照片。在这些照片中,左上部分显示了相应于关于 RSV 的 M2 的标记物的仅在绿色通道中的染色的照片,右上的照片显示了相应于核标记物的仅在蓝色通道中的染色,和下面部分的照片显示了合并的这两个通道。

[0016] 图 7:描绘了在关于商业抗-F 抗体 (图 7A) 和关于抗-M2-1 单克隆抗体 (图 7B) 的在 ELISA 试验中 RSV 的测定结果的图。在每个图中,显示了所述抗体检测抗原的能力 (第一个柱)、没有抗原的对照 (第二个柱) 和其中仅使用二抗的对照 (第三个柱)。图 7C 相应于显示了这两种抗体的结果的图。在这些图中观察到,抗-M2-1 单克隆抗体能够比商业抗-F 抗体更好地检测出病毒颗粒。

[0017] 图 8:描绘了关于稀释度为 1/100 (4.25 μ g/ml) 的抗-M2-1 单克隆抗体 (图 8A)、关于稀释度为 1/100 (10 μ g/ml) 的商业抗-F 抗体 (图 8B) 和关于稀释度为 1/10 的抗-RSV DHI 抗体 (图 8C) 的在 ELISA 试验中 RSV 的测定结果的图。在每个图中,显示了所述抗体检测抗原的能力 (第一个柱)、没有抗原的对照 (第二个柱) 和其中仅使用二抗的对照 (第三个柱)。图 8D 的图显示了这三种抗体的结果。观察到,我们的单克隆抗体是能够识别病毒颗粒的唯一的抗体。

[0018] 图 9:显示了通过“夹心”类型的 ELISA 而获得的结果的图,其中使用本发明的抗-M2 单克隆抗体,并且采用先前被诊断为有或没有 RSV 感染的患者的鼻咽拭子样品。显示了三位于 RSV 而言阳性的患者 (图 9A、9B 和 9C)、一位关于 hMPV 而言阳性的患者 (图 9D)、一位健康的患者 (图 9E) 以及没有样品和没有用于测定特定信号的捕获抗体的阴性对照 (图 9F)。在图 9A 至 9E 中,所述图的第一个柱代表通过使用稀释度为 1/1000 的检测抗体

(多克隆抗体)来进行的病毒抗原的检测;第二个柱代表通过使用稀释度为 1/2000 的检测抗体来进行的病毒抗原的检测;第三个柱相应于其中没有使用检测抗体的对照;并且,第四和第五个柱显示了在没有用单克隆抗体活化平板但分别使用稀释度为 1/1000 和 1/2000 的检测抗体的情况下进行的试验的结果。图 9F 显示了相应于对照的图,其中前两个柱显示了在两个检测抗体稀释度(1/1000 和 1/2000)下没有样品的试验的结果,并且第三和第四个柱显示了以两个检测抗体稀释度(1/1000 和 1/2000)的没有样品且没有捕获抗体的试验的结果。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明涉及单克隆抗体 IgG2A 在特异地识别源自 M2-1 蛋白的抗原方面所具有的能力,所述抗原与呼吸道合胞病毒(RSV)的核衣壳相联合。

[0021] 单克隆抗体是一类均一的抗体,其特征在于特异地识别单一抗原。它们由单种杂交细胞(杂交瘤)产生,所述杂交细胞是 B 淋巴细胞克隆与肿瘤浆细胞的融合产物。特异地和以高亲和力与抗原结合的特性推动了单克隆抗体的开发,以作为对于检测产生巨大的科学、临床和工业用途利益的分子来说具有很大用处的工具。目前,由于其特异性和可再现性(这使得能够为研究打下更好的基础),单克隆抗体在基础研究和应用研究中均被广泛使用。然而,正是在生物医学领域中,单克隆抗体具有巨大的实际应用,要么用于多种感染性疾病的诊断和治疗,要么作为对于其他病理学状态的疗法。虽然确实单克隆抗体被用于所有类型的检测和诊断技术中,但是正是在用于体外诊断的试剂盒的设计中,它获得了最好的结果。为此,目前存在有各种各样的快速检测试剂盒,例如妊娠测试,其基于使用抗-hCG 抗体来测定在尿中人绒毛膜促性腺激素(hCG)的水平。此外,用于治疗用途的单克隆抗体已变得非常重要。目前存在有通过使用诸如下列的商业单克隆抗体来进行的对于各种不同病理学状态的治疗性治疗:阿仑珠单抗、吉妥珠单抗奥佐米星、利妥昔单抗、曲妥珠单抗等(Reichert)。

[0022] RSV 是属于副粘病毒科肺病毒亚科的有包膜的 RNA 病毒。其 RNA 被转录为 10 个 mRNA,其中的每一个编码一种病毒蛋白质,除了 M2mRNA 外,所述 M2mRNA 具有两个以 22 个核苷酸重叠的开放阅读框(ORF),其编码两种不同的蛋白质:ORF-1 编码 M2-1,和 ORF-2 编码 M2-2。由其他 mRNA 所编码的蛋白质为核蛋白(N)、磷蛋白(P)、L 蛋白、基质蛋白(M)、NS1、NS2、SH、融合蛋白(F)和 G。N 蛋白与基因组 RNA 相联合从而形成核衣壳,L 为与核衣壳相联合的 RNA 聚合酶,P 与 N 和 L 相互作用,M 为位于病毒包膜内侧的非糖基化蛋白,NS1 和 NS2 为非结构蛋白,并且 SH、G 和 F 构成病毒包膜的一部分。迄今为止开发出的 RSV 诊断试剂盒使用针对 RSV 的 F、N 和 / 或 G 蛋白的抗体,并且建议用于治疗或预防 RSV 感染的抗体也针对相同的蛋白质(CL948-96, CN101130765, US6790611, W02009088159, (Erdman 和 Anderson, 1990), (Murray, Loney 等人, 2001))。目前,还不存在有使用与 RSV 的 M2-1 蛋白相结合的抗体的 RSV 诊断试剂盒或者用于治疗 and / 或预防 RSV 感染的药物组合物。

[0023] M2-1 是分子量为 22KD 的多肽,其作为转录加工因子起作用,所述转录加工因子避免在转录过程中的过早终止,并且以这种方式,有助于在基因连接处的转录阅读并允许 RSV 的聚合酶接近下游的转录单位。该过程在 RSV 的复制循环期间发生,其中刚合成的 M2-1 蛋白通过其与 P 的相互作用而与核衣壳相联合。此外,已观察到 M 蛋白仅在 M2-1 存在下与核衣壳相联合,并且已暗示所述相互作用使得能够关闭该病毒的转录酶活性,可能用于通过

与包膜糖蛋白的相互作用来起始装配和出芽 (Li, Jans 等人, 2008)。在本说明书中, 术语“M2-1 蛋白”和“M2 蛋白”作为同义词进行使用。

[0024] 从我们的关于源自呼吸道合胞病毒 (RSV) 的病毒抗原所具有的对于免疫系统的效应的研究出发, 我们已产生了对于检测 RSV 的抗原来说特异的鼠类单克隆抗体, 其具有相对于商购可得的那些而言的优点。特别地, 由杂交瘤 8A4/G9 所产生的单克隆抗体经证明对于在使用各种各样检测技术的体外和体内免疫试验中测定 RSV 感染来说是非常有用的。因此, 所述抗体使得能够拥有这样的工具, 所述工具对于在其中具有低的病毒载量的任何类型的生物样品中由呼吸道合胞病毒引起的感染的检测、诊断和 / 或疗法来说是有价值的。该单克隆抗体可以具有多种诊断和治疗用途的应用, 例如其在免疫印迹技术、免疫荧光技术、免疫色谱法技术、流式细胞术、包含其的药物形式的生产或者涉及其利用的任何其他中的使用。可以将所述抗体与允许其检测的标记物相结合。可能的标记物的例子相应于荧光团、生物素、放射性同位素、金属、酶和适合于抗体的任何其他类型的标记物。

[0025] 本发明的单克隆抗体可以处于其天然形式, 例如由杂交瘤所分泌的那样, 或者也可以作为抗原结合片段而存在。抗原结合片段是能够与抗原相结合的抗体片段, 例如 Fab 或 Fab' 片段。在本申请中, 虽然提及的是抗体的使用, 但本发明的抗体的应用也包括抗 M2 单克隆抗体的结合片段的使用。此外, 在产生包含本发明的抗体的组合物的情况下, 所述组合物可以包含该鼠类抗体或者人源化的或嵌合的本发明的抗体。这在用于在人中施用的组合物中是特别有用的, 作为用于使得用该组合物进行治疗的个体的免疫系统产生针对本发明的抗体的应答的可能性最小化的一种方式。

[0026] 接下来描述使得能够证明本发明的单克隆抗体的各种不同应用的实施例。

[0027] 实施例 1: 编码由杂交瘤 8A4/G9 所分泌的抗 M2-1 免疫球蛋白的轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 的核苷酸序列的测定

[0028] 在 37°C 和 10% CO₂ 下, 使杂交瘤 8A4/G9 在补充有 3.7g/L 碳酸氢钠和 10% 胎牛血清 (HyClone) 的 GIBCO-BRL 的 DMEM- 高葡萄糖培养基 (Invitrogen, 目录号 SH30243.01) 中生长。当细胞密度达到 700,000 个细胞 /ml 时, 回收 3.5 × 10⁶ 个细胞, 并且从它们中进行总 RNA 的纯化, 其中使用 Trizol (Invitrogen, 目录号: 15596-018), 如先前已描述的那样 (Chomczynski, 1993)。使用 Promega 的 Impron II 试剂盒来将 0.5 μg RNA 反转录为互补 DNA, 并且将 2 μl 反应混合物用于进行聚合酶链式反应 (PCR), 其中使用在 Novagen 的 Ig-Primer set 试剂盒 (目录号 69831-3) 中所提供的引物, 按照供应商的说明书, 在 Axygen MaxyGene 热循环仪中。用其序列如下的引物获得了 PCR 产物: 对于重链, MuIgVH5' -A: 5' GGGAAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT3' 和 MuIgVH5' -F: 5' ACTAGTCGACATGAACTTYG GGYTSAGMTTGRITTT3'; 对于轻链, MuIgκ VL5' -B: 5' GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTA T3' 和 MuIgκ VL5' -C: 5' ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT3'。按照供应商的说明书将 PCR 产物克隆到克隆载体 pTOPO-TA (Invitrogen, 目录号 K450001SC) 中, 并且由智利天主教教皇大学 (Pontificia Universidad Católica de Chile) 的测序服务机构在 AbIprism3130x1 测序仪 (Applied Biosystem) 上进行测序。所获得的 DNA 序列显示在图 1A 中, 并且推导出的氨基酸序列显示在图 1B 中。通过使用生物信息学程序 Vector NTI (Invitrogen) 来获得氨基酸序列。

[0029] 实施例 2: RSV 抗原的检测试验, 抗 M2-1 单克隆抗体对于经纯化的 RSV 抗原的特异

性

[0030] 该试验的目标是证明我们的抗体对于 RSV 的病毒抗原的特异性。进行通过直接 ELISA 技术的抗原的检测,其中在 4℃ 下用 200ng 经纯化的抗原将 ELISA 平板活化 10 小时。然后,将平板用 1×PBS/0.02% Tween 洗涤一次,和用 1×PBS 洗涤两次,随后在环境温度下用 1×PBS/3% BSA 将平板封闭 2 小时。然后,重复进行洗涤,接着在环境温度下在 1×PBS/1% BSA 中与稀释度为 1/100 的克隆 8A4/G9 的抗-RSV M2 抗体 (425 μg/ml) 一起温育 2 小时。在温育时间度过后,重复进行洗涤,并且在环境温度下在 1×PBS/1% BSA 中与稀释度为 1/2000 的用辣根过氧化物酶 (HRP) 进行标记的抗小鼠 IgG 抗体一起温育 1 小时。最后,进行洗涤,并且用 50 μl 的柠檬酸盐缓冲液 / 四甲基联苯胺 (TMB) (3-3'-5-5'-四甲基联苯胺, 1mg/ml) (稀释度为 9:1) 和 1ul/5ml 的 H₂O₂ 进行揭示。添加 2M H₂SO₄ 以终止反应,并且在 450nm 下读取结果。为了检测抗原,使用克隆 8A4/G9 的抗-RSV M2 抗体作为一抗,并且随后使用标记有 HRP 的抗小鼠 IgG 作为检测抗体 (二抗)。作为阳性对照,使用在我们实验室中在兔中产生的抗-RSV M2 多克隆抗体;在该情况下,二抗相应于标记有 HRP 的抗兔 IgG 抗体。为了确定在识别一抗中二抗的反应是特异的,和此外所获得的信号不是由于二抗与病毒抗原的非特异性结合而引起的,实施了其中仅使用二抗且没有一抗的对照。为了确定一抗的反应是特异于该抗原的另一个对照在于在未用该抗原进行活化的 ELISA 平板上使用所述抗体。结果 (图 2) 显示,本发明的单克隆抗体能够识别 200ng 的经纯化的抗原,其中信号甚至比用多克隆抗原的阳性对照更强。

[0031] 实施例 3:用于测定所述单克隆抗体用于检测病毒抗原的功效率的试验

[0032] 进行试验以确定允许检测病毒抗原的克隆 8A4/G9 的抗-RSV M2 单克隆抗体的最大稀释度。为此,采用相同的实施例 2 的直接 ELISA 技术,但在该情况下用 100ng 经纯化的抗原活化平板并且所使用的抗-M2 抗体 (425 μg/ml) 稀释度为 1/100、1/1000 和 1/2000。阴性对照相应于作为抗原的 hMPV 的 M2 蛋白,以便确定抗体反应是对于 RSV 的抗原而不是其他病毒的抗原而言特异的。为了确定在识别一抗中二抗的反应是特异的,和此外所获得的信号不是由于二抗与病毒抗原的非特异性结合而引起的,实施了其中仅使用二抗且没有一抗的对照。此外,为了确定所产生的信号相应于抗体与抗原的特异性结合,实施了其中 ELISA 平板在与抗体一起温育之前不用抗原进行活化的对照。结果 (图 3) 显示,尽管显著地增加了抗体稀释度,但是所获得的信号仍保持是高的;并且本发明的抗体不与 hMPV 的 M2 蛋白非特异地反应。这表明,低浓度的我们的抗-M2 单克隆抗体能够特异地检测 RSV 的抗原。

[0033] 实施例 4:所述抗-M2 单克隆抗体对于 RSV 的抗原的灵敏度

[0034] 该实施例相应于为了测定我们的单克隆抗体可以检测出的最小的抗原量而进行的试验。进行直接 ELISA 试验,与在前面的实施例中所提及的一样。在该情况下,用经纯化的抗原来活化平板,其中使用不同的抗原量:1μg、500ng、100ng、50ng 和 25ng。在两个组中进行相同的试验,在所述两个组中评价两个抗-M2 抗体 (425 μg/ml) 稀释度:1/100 (图 4A) 和 1/1000 (图 4B)。由于它们先前已经在经纯化的抗原的识别中显示出强的信号,因而选择了这两个稀释度。这两组试验包括:其中 ELISA 平板未用抗原进行活化的对照 (没有抗原的对照)、用于测定所述抗体对于 RSV 的抗原的特异性的具有腺病毒的 P8 蛋白的阴性对照和其中仅使用二抗的对照。结果显示,这两个抗体稀释度产生了相似的信号,和此外,所述抗体能够检测甚至 25ng 的纯抗原,其中具有足够宽的信号。

[0035] 实施例 5 :使用抗 -M2 抗体,借助于流式细胞术来检测经 RSV 感染的细胞

[0036] 该试验的目标是证明其中可以使用我们的单克隆抗体的技术的宽范围。在前面的实施例中,在 ELISA 技术中使用所述抗 -M2 单克隆抗体,而在该实施例中,借助于流式细胞术来评价本发明的抗体用于检测细胞的 RSV 感染的功能性。为此,使用经 RSV 感染的 HEp-2 细胞和未感染的细胞。染色实验方案如下:用 1×PBS/0.2% 皂苷对细胞进行渗透化处理,随后在 4℃ 下以两个稀释度 (1/3000 (图 5A) 和 1/7500 (图 5B),在 1×PBS/1% BSA 中) 用克隆 8A4/G9 的抗 -RSV M2 单克隆抗体 (425 μg/ml) 染色 1 小时,随后将细胞用 1×PBS 进行洗涤并在 2000 转 / 分钟 (rpm) 下离心 6 分钟,随后重悬浮在相同的渗透化缓冲液中,并且在 1×PBS/1% BSA 中以 1/1000 进行稀释的抗小鼠 IgG 抗体 -FITC 进行染色。然后,将细胞用 1×PBS 进行洗涤,并且借助于流式细胞术进行分析。包括了其中仅使用二抗的对照,以证明在流式细胞仪中所获得的信号是由于抗小鼠 IgG 抗体 -FITC (二抗) 与本发明的抗体结合而引起的。此外,还包括了使用抗 -RSV 的 F 蛋白的抗体的阳性对照。对于所述两个抗体稀释度所获得的数据都是阳性的,如在图 5 中可以观察的,其中可以观察到经感染的细胞和未感染的细胞之间的明显差异,从而得出结论,通过流式细胞术,我们的抗体能够识别经感染的细胞。请注意,在阳性对照中,抗体以 1/1000 的稀释度进行使用,这比用本发明的抗体时所使用的稀释度大得多。这解释了用阳性对照时所获得的比用抗 -M2 单克隆抗体时更强的信号。

[0037] 实施例 6 :使用抗 -M2 单克隆抗体,借助于免疫荧光来检测 RSV 感染

[0038] 进行该试验以扩大使得能够通过使用所描述的发明来检测 RSV 感染的技术的范围。进行采用荧光显微术的试验,其中将经 RSV 感染的和未感染的 HEp-2 细胞用抗 -M2 单克隆抗体进行染色。所采用的实验方案如下:将细胞在 4℃ 下用 1×PBS/4% 甲醛 /0.03M 蔗糖固定 10 分钟,随后用 1×PBS 进行洗涤,在环境温度下用 1×PBS/0.2% 皂苷进行渗透化处理 5 分钟,在 4℃ 下添加在 1×PBS/1% BSA/0.2% 皂苷 /0.03M 蔗糖中的稀释度为 1/200 (2.125 μg/ml) 的本发明的抗 -M2 单克隆抗体 (425 μg/ml) 10 小时。然后,将样品用 1×PBS/0.02% Tween 洗涤五分钟,然后施行两次用 1×PBS 进行的洗涤。在环境温度下添加在 1×PBS/1% BSA 中的稀释度为 1/500 的二抗“抗小鼠 IgG-FITC”1 小时。重复进行洗涤,并且在环境温度下用浓度为 5ug/ml 的 Hoescht33258 将细胞核染色 5 分钟,最后用 1×PBS 进行洗涤并进行处理以在荧光显微镜下进行观察。所获得的结果 (图 6A) 显示,构成本发明的抗体对于能够借助于免疫荧光来识别经感染的细胞来说也是有用的。

[0039] 为了比较,进行刚刚所描述的相同的试验,但采用目前广泛使用的对于 RSV 的表面抗原 F 而言特异的商业单克隆抗体 (图 6B)。所使用的商业抗体相应于检测 RSV 的 F 蛋白的鼠类抗体 (抗 -F 抗体,Millipore MAB8599Clon131-2A)。概括而言,将经 RSV 感染的 HEp-2 细胞用稀释度为 1:200 的商业抗体和随后用稀释度为 1/500 的二抗“抗小鼠 IgG-FITC”进行染色。观察到,该商业抗体能够检测经 RSV 感染的细胞。

[0040] 实施例 7 :Millipore 的商业抗 -F 抗体与克隆 8A4/G9 的抗 -RSV M2 单克隆抗体之间的比较试验

[0041] 该试验相应于在 ELISA 技术中,我们的抗 -M2-1 单克隆抗体与对于 RSV 的表面抗原 F 而言特异的商业单克隆抗体 (Millipore 的抗 -F) 之间的比较分析。所述抗 -F 抗体与在实施例 6 中所使用的是相同的,在实施例 6 中进行了免疫荧光试验以检测经 RSV 感染

的细胞。作为用于测定我们的抗体的通用性的方式,在该试验中,将我们的抗-M2-1 抗体与 Millipore 的抗-F 抗体在与免疫荧光不同的技术中进行比较。为了进行该试验,将 ELISA 平板在 4°C 下用病毒颗粒 (RSV) 活化 10 小时。然后,着手在环境温度下用 1% 的鱼明胶将平板封闭 2 小时,以随后用 1×PBS/0.02% Tween 进行一次洗涤和用 1×PBS 进行两次洗涤。接着,在环境温度下将平板与稀释度为 1/1000 的希望进行比较的两种抗体一起温育 2 小时。在温育时间度过后,再次进行洗涤,然后将平板与稀释度为 1/1500 的标记有 HRP 的抗小鼠 IgG 抗体一起进行温育。最后,重复进行洗涤,并且用柠檬酸盐缓冲液/TMB(9:1) 和 H₂O₂(1 μl/5ml 溶液) 来揭示所述 ELISA。用 50 μl 的 2M H₂SO₄ 来终止反应。在该试验中所实施的对照相应于:其中不使用样品的阴性对照(平板先前未用病毒颗粒进行活化),以确保信号是由 RSV 的抗原的识别所决定的;和其中仅使用二抗的另一个对照,以确定二抗单独地不识别病毒抗原。该试验的结果概括在图 7 的图中。在这些图中观察到,在 1/1000 的稀释度下,商业抗体不能够检测出 RSV 的病毒颗粒。然而,抗-M2-1 单克隆抗体则能够在所述稀释度下识别病毒颗粒。这就是说,本发明的抗体是有效的,甚至在其他商业抗体不能检测抗原的稀释度下。此外,该试验证明,我们的抗体在各种各样的抗原检测技术中是有效的。

[0042] 实施例 8: Millipore 的商业抗-F 抗体、抗-RSV DHI 和克隆 8A4/G9 的抗-RSV M2 单克隆抗体之间的比较试验

[0043] 在该 ELISA 试验中所比较的抗体是:本发明的抗-M2-1 单克隆抗体、Millipore 的抗-F 单克隆抗体 (Mab8599) 和 Diagnostic Hybrids 的抗-RSV 单克隆抗体 (DHI, RSV MAbs01-013302)。选择最后一种抗体用于比较是由于它在临床中被广泛用于诊断关于 RSV 感染而言阳性的患者,并且由智利天主教大学临床医院的医学研究中心提供。

[0044] 按照与在实施例 7 中所指明的那种相同的程序进行该比较试验,除了被更改的抗体稀释度外。在该情况下,对于抗-F 单克隆抗体和对于抗-M2-1 单克隆抗体两者都使用 1/100 的稀释度,和对于 RSV DHI 抗体,按照诊断实验室的建议,使用 1/10 的稀释度,因为在该稀释度下对于 RSV 患者获得阳性信号。与在前面实施例中的一样,包括了:没有样品的对照,以看信号是由 RSV 的抗原的识别所决定的;和仅具有二抗的对照,以确定我们的二抗单独地不识别病毒抗原。所获得的结果显示在图 8 中,并且可以观察到,在这些稀释度下,商业抗体不显示关于病毒颗粒的阳性信号(图 8B 和 8C),然而抗-M2-1 单克隆抗体能够检测病毒颗粒(图 8A)。重要的是提及,用于诊断被 RSV 感染的患者的商业抗体 RSV DHI 的使用是专门为荧光显微术试验而进行标准化的,这是由此可以解释在 ELISA 试验中没有检测出 RSV 的原因。就其而言,抗-M2-1 单克隆抗体的阳性信号的获得表明,这可以是目前未考虑的用于通过 ELISA 技术来临床诊断经 RSV 感染的患者的有价值的工具。此外,还打开了使用该单克隆抗体用于开发免疫诊断试剂盒的可能性。

[0045] 实施例 9: 使用抗-RSV M2-1 单克隆抗体,通过 ELISA 来临床诊断经 RSV 感染的患者的样品

[0046] 进行 ELISA 试验以检验构成本专利的单克隆抗体从临床鼻咽拭子样品开始诊断或查找关于 RSV 而言阳性的患者的能力。从智利天主教大学医学院的医学研究中心获得临床样品,其先前通过免疫荧光(目前用于诊断所述疾病的方法)进行了诊断。用患者的样品进行“夹心”类型的 ELISA 试验,其中以 1/350 的稀释度采用抗-RSV M2 单克隆抗体来

活化平板,然后在环境温度下用 1% 的鱼明胶将平板封闭 2 小时。随后,用 1×PBS/0.02% Tween 进行一次洗涤和用 1×PBS 进行两次洗涤,接着将鼻咽拭子样品在 4℃ 下温育 10 小时。重新进行洗涤,并且在环境温度下与兔的抗 -RSV M2 多克隆抗体一起温育 2 小时,以两个稀释度:1/1000 和 1/2000。接着,如前面所描述的那样进行洗涤,并且与抗兔 IgG 抗体 -HRP(1/2000 的稀释度)一起进行温育并用柠檬酸盐缓冲液/TMB(9:1)和 1ul/5ml H₂O₂ 进行揭示。添加 2M H₂SO₄ 以终止反应。该试验在三位关于 RSV 而言阳性的患者(图 9A 至 9C)、一位关于 hMPV 而言阳性的患者(图 9D)和一位健康的患者(图 9E)的样品上进行,以及在没有任何样品和没有捕获抗体的阴性对照上进行,以确定所获得的信号是特异的(图 9F)。所获得的结果显示,所述抗 -M2 抗体能够从鼻咽拭子开始来识别特异于 RSV 的病毒抗原。因此,依照本发明的单克隆抗体可以成功地用于在患者的样品中检测 RSV 的病毒抗原。

[0047] 在本说明书中所描述的实施例证明了我们的由杂交瘤细胞系 8A4/G9 所分泌的抗 -RSV M2-1 单克隆抗体所具有的特异性、功效、灵敏度和通用性。其相对于商购可得的其他与 RSV 相结合的抗体而言有利的特征使得我们的抗体成为用于多种用途的有效的备选方案,在 RSV 的检测和 / 或鉴定中以及用于产生使得能够治疗和 / 或预防 RSV 感染的药物组合物。在本文中给出的实施例是所述抗 -RSV M2-1 单克隆抗体的一些用途的证明,但决不限制我们的发明的范围。

[0048] 参考文献

[0049] www.who.int. Initiative for Vaccine Research (IVR), Acute Respiratory Infections (Update September 2009).

[0050] CL948-96, Anticuerpos monoclonales humanos contra la proteína F del virus sincitial respiratorio (RSV), células que los producen; secuencias de ADN que los codifican; métodos para producirlos; uso de dichos anticuerpos; composición farmacéutica; método y equipo de prueba de diagnóstico. BIOGEN IDEC INC., CAMBRIDGE CENTER (US).

[0051] CN101130765, Hybridomas cell strain with preserving number at CGMCC1546, anti - respiratory syncytial virus N protein monoclonal antibody and respiratory syncytial virus detecting agent box (colloidal gold method), which can detect the respiratory syncytial virus. (BEIJING ASCLE BIOENGINEERING CO., LTD). 2008 - 02 - 27

[0052] US6790611, Assay for directly detecting RS virus related biological cell in a body fluid sample. BESST TEST APS. 2004 - 09 - 14.

[0053] W02009088159, Antibodies to respiratory syncytial virus. APROGEN INC. (KR). 2009 - 07 - 16 Erdman D. D. & Larry J. Anderson. Monoclonal Antibody - Based Capture Enzyme Immunoassays for Specific Serum Immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM Antibodies to Respiratory Syncytial Virus. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 1990, p. 2744 - 2749 Vol. 28, No. 12.

[0054] Murray, Jillian; Colin Loney, Lindsay B. Murphy, Susan Graham & Robert P. Yeo. Characterization of Monoclonal Antibodies Raised against Recombinant Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid (N) Protein: Identification of a

Region in the Carboxy Terminus of N Involved in the Interaction with P Protein. *Virology*2001(289), 252±261.

[0055] Avendano, L. F., M. A. Palomino 等人, (2003). "Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile(1989to2000). "*J Clin Microbiol*141(10):4879-4882.

[0056] Bont, L., J. Versteegh 等人, (2002). "Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity. "*Pediatr Res*52(3):363-367.

[0057] Bourgeois, C., C. Corvaisier 等人, (1991). "Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. "*J Gen Virol*72(Pt5):1051-1058.

[0058] Bryce, J., C. Boschi-Pinto 等人, (2005). "WHO estimates of the causes of death in children. "*Lancet*365(9465):1147-1152.

[0059] Cabalka, A. K. (2004). "Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease. "*Pediatr Infect Dis J*23(1Suppl):S41-45.

[0060] Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. "*BioTechniques*15(3):532-534, 536-537.

[0061] Erdman, D. D. 和 L. J. Anderson(1990). "Monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for specific serum immunoglobulin G(IgG), IgA, and IgM antibodies to respiratory syncytial virus. "*J Clin Microbiol*28(12):2744-2749.

[0062] Li, D., D. A. Jans 等人, (2008). "Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1protein. "*J Virol*82(17):8863-8870.

[0063] Murray, J., C. Loney 等人, (2001). "Characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant respiratory syncytial virus nucleocapsid(N) protein:identification of a region in the carboxy terminus of N involved in the interaction with P protein. "*Virology*289(2):252-261.

[0064] Reichert, J. M. "Antibody-based therapeutics to watch in2011. "*MAbs*3(1).

[0065] van den Hoogen, B. G., S. Herfst 等人, (2004). "Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. "*Emerg Infect Dis*10(4):658-666.

[0001]

序列表

<110> PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

<120> 对于呼吸道合胞病毒 (RSV) 的M2-1抗原而言特异的单克隆抗体

<130> PXW0-148/2012

<150> CL 3002-2011

<151> 2011-11-25

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> 杂交瘤8A4/G9 - IgG VH

<400> 1

```

atgaagttgg ggttcagctg gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa      60
ataattcttgg tggagtctgg gggaggctta gtgaggcctg gagggtcctt gaaactctcc      120
tgtgcagect ctggattcac ttctagtcac tatgccatgt cttgggctcg ccagactcgg      180
gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt aatagtgggt gtagttatac ctactatcca      240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaatc cctatacctg      300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag aaagggggct      360
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctctt cagccaaaae aacagcctca      420

```

<210> 2

<211> 384

<212> DNA

<213> 杂交瘤8A4/G9 - IgGk VL

<400> 2

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacattgtgc tgacacagtc tectgettcc ttagtgtat ctctggggca gagggccacc      120
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctgget atagttatat gcactggaac      180
caacagaaac caggacagcc acccagacte ctcatetate ttgtatecaa cctagaatct      240
ggggtcccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaacct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattagga gcttacagct      360
tcggaggggg gaccaagctg gaaa                                           384

```

<210> 3

<211> 140

<212> PRT

<213> 杂交瘤8A4/G9 - IgG VH

<400> 3

```

Met Lys Leu Gly Phe Ser Trp Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1           5           10           15

Val Gln Cys Glu Ile Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg
                20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
                35           40           45

```

[0002]

Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
 130 135 140

<210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 杂交瘤8A4/G9 - IgGk VL

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys
 115 120 125

A**IgG VH-8A4/G9:**

ATGAAGTTGGGGTTCAGCTGGATTTTCCTTGTCCCTTGTTTTAAAAGGT
GTCCAGTGTGAAATAATTCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAG
GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT
TCAGTCACTATGCCATGTCTTGGGCTCGCCAGACTCCGGAGAAGAG
GCTGGAGTGGGTGCAACCATTAATAGTGGTGGTAGTTATACCTACTA
TCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGCC
AAGAATTCCCTATACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACAC
GGCCATGTATTACTGTGCAAGAAAGGGGGCTATGGACTACTGGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTTCAGCCAAAACAACAGCCCCA

IgGκ VL-8A4/G9:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCC
AGGTTCCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAG
CTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATAAGGGCCAGCAA
AAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAA
ACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAG
AATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTCCGAGGGGGGACC
AAGCTGGAAA

B**IgG VH-8A4/G9:**

MKLGFSWIFLVLVKGVQCEIILVESGGGLVLRPGGSLKLSCAASGFTFSH
YAMSWARQTPEKRLEWVATINSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSL
YLQMSSLRSEDAMYYCARKGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP

IgGκ VL-8A4/G9:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVS
TSGYSYMHWNQQKPGQPPELLIYLVSNLESGVPARFSGSGSDFTLN
IHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK*NGLMLHQLY

图 1

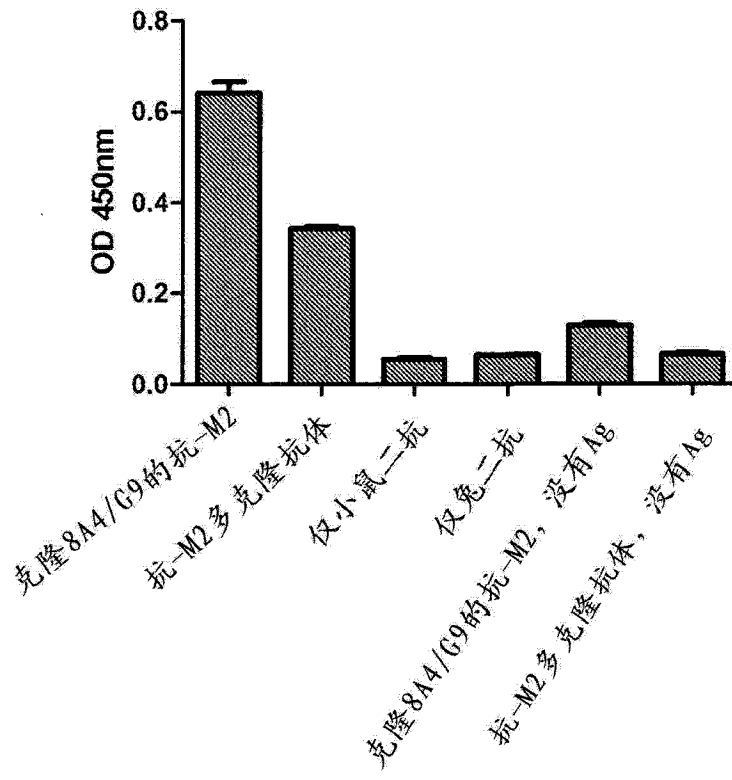


图 2

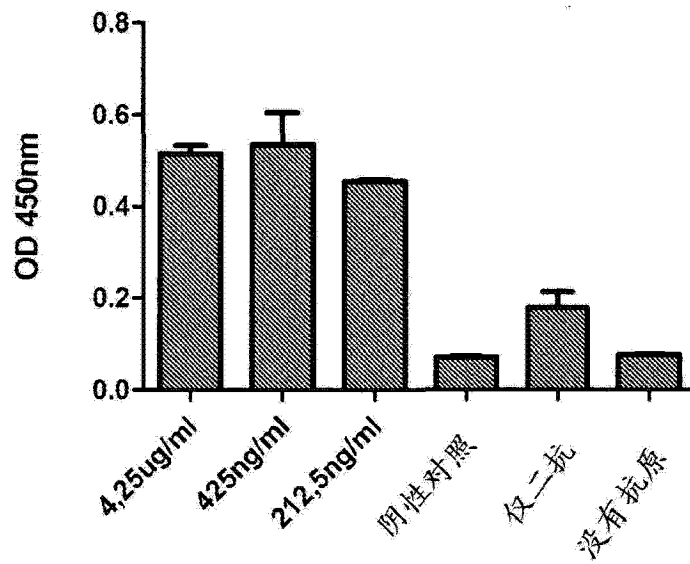


图 3

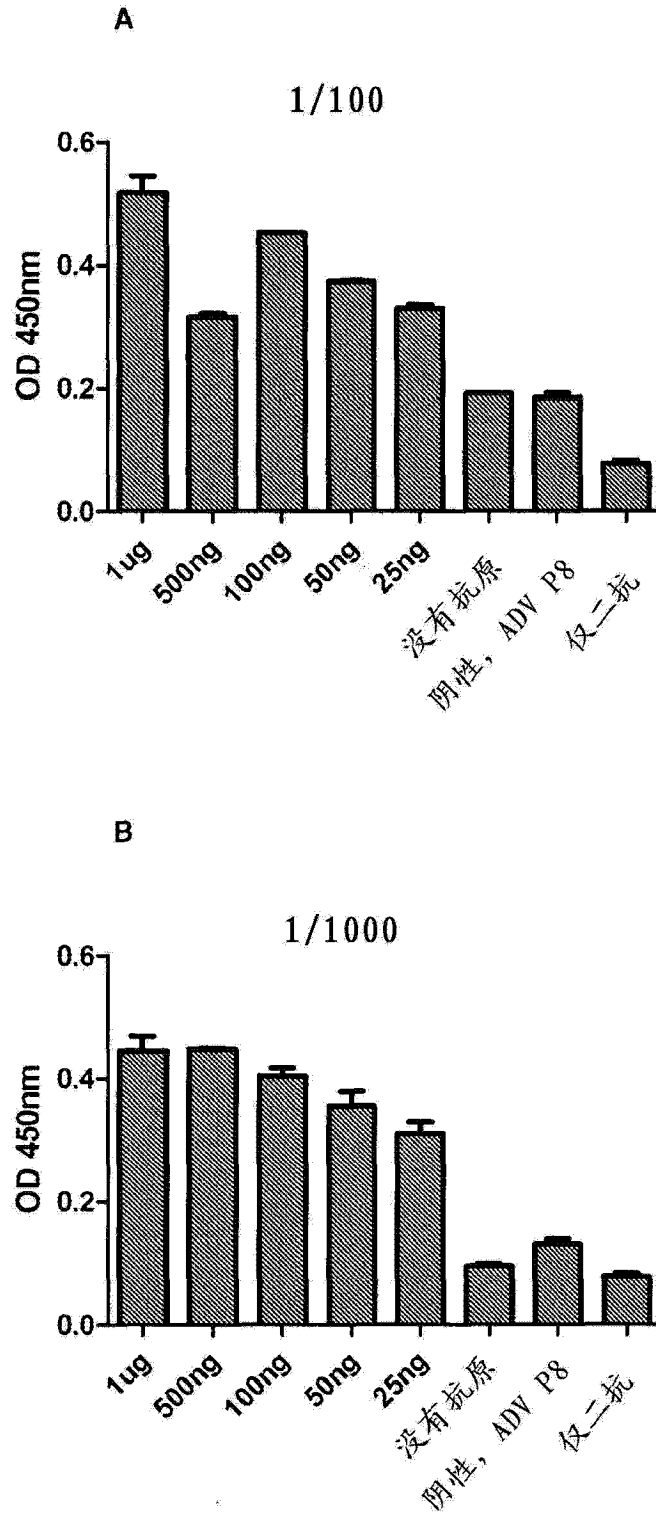


图 4

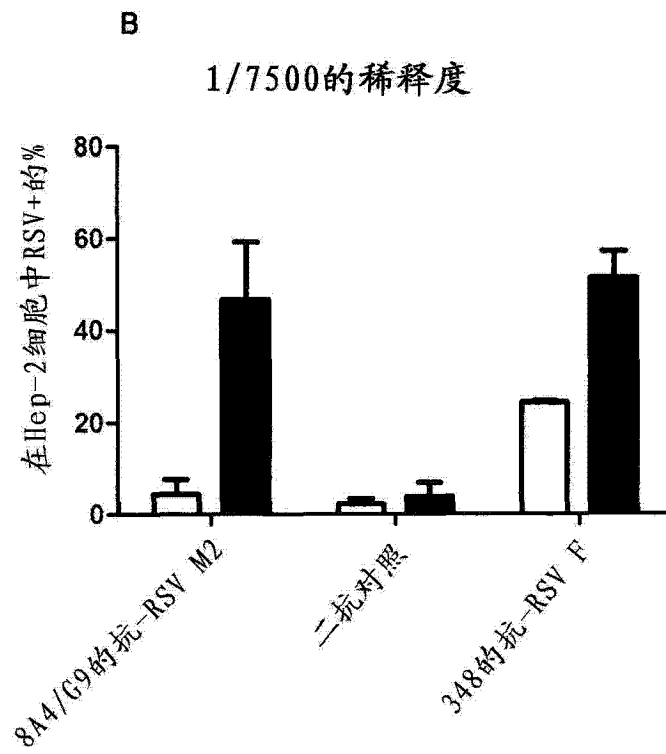
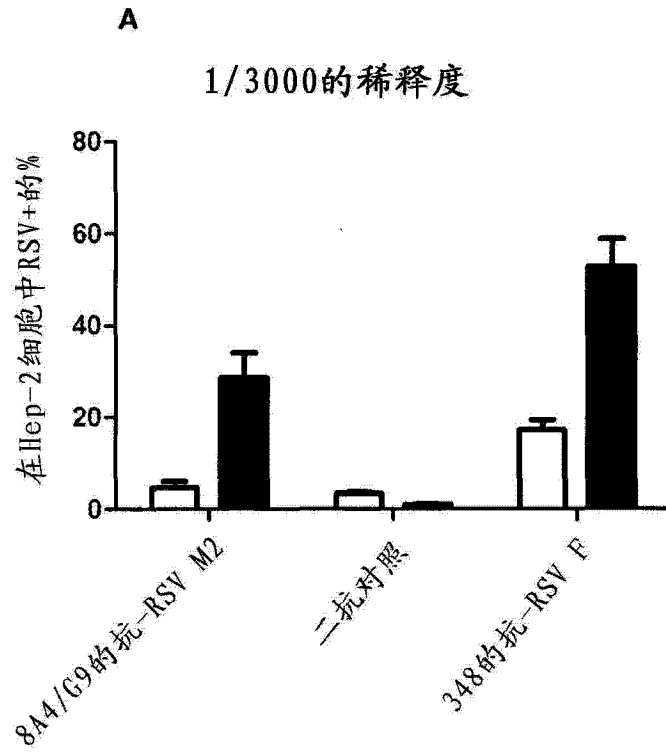
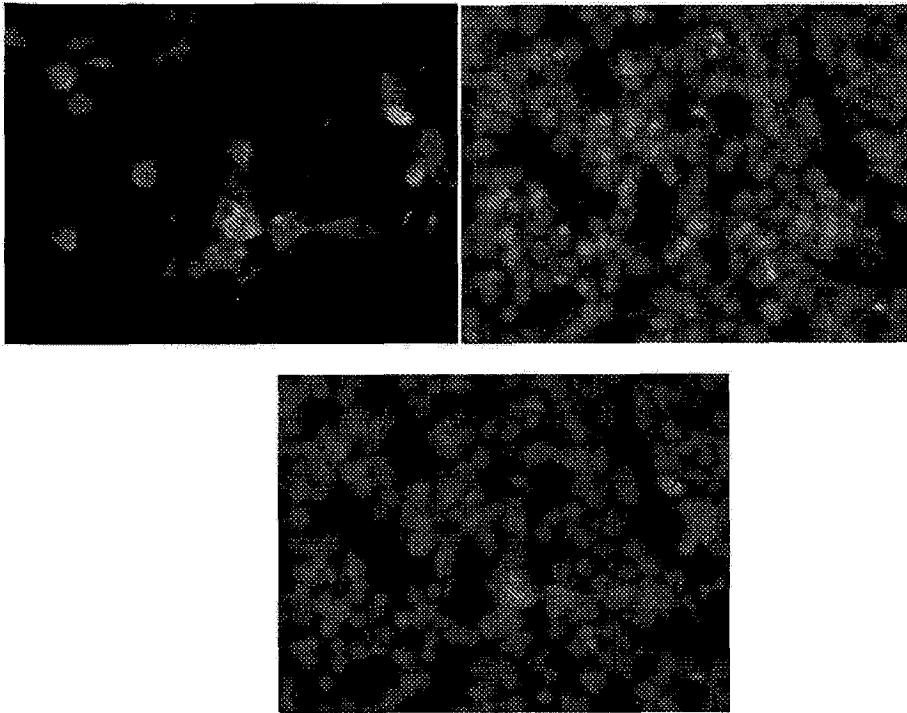


图 5

A



B

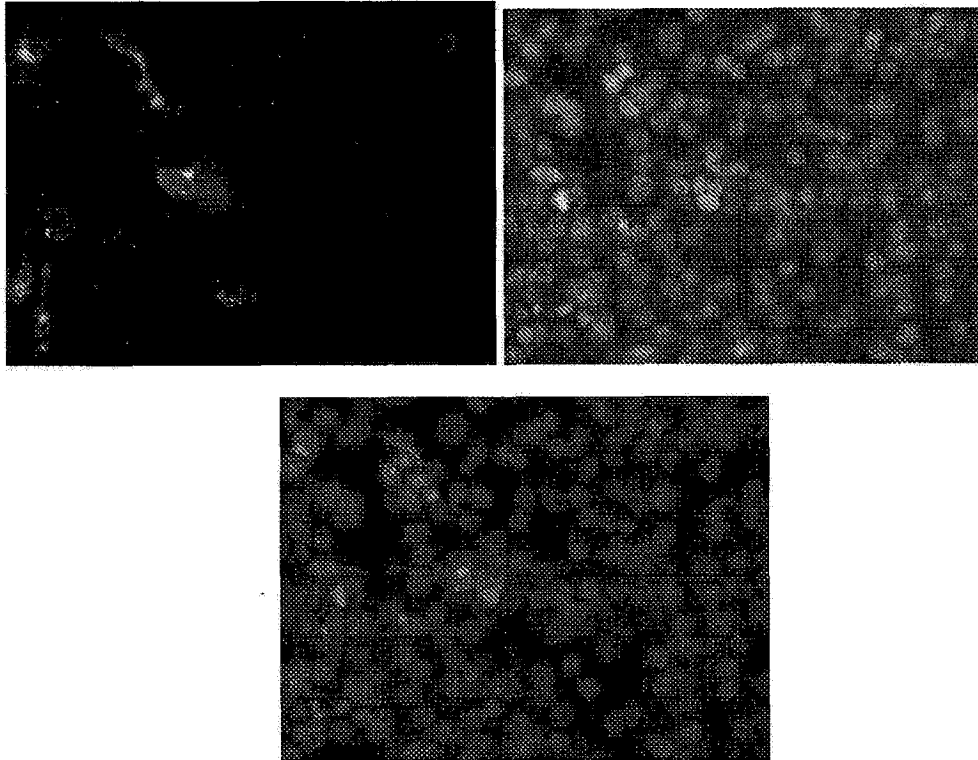


图 6

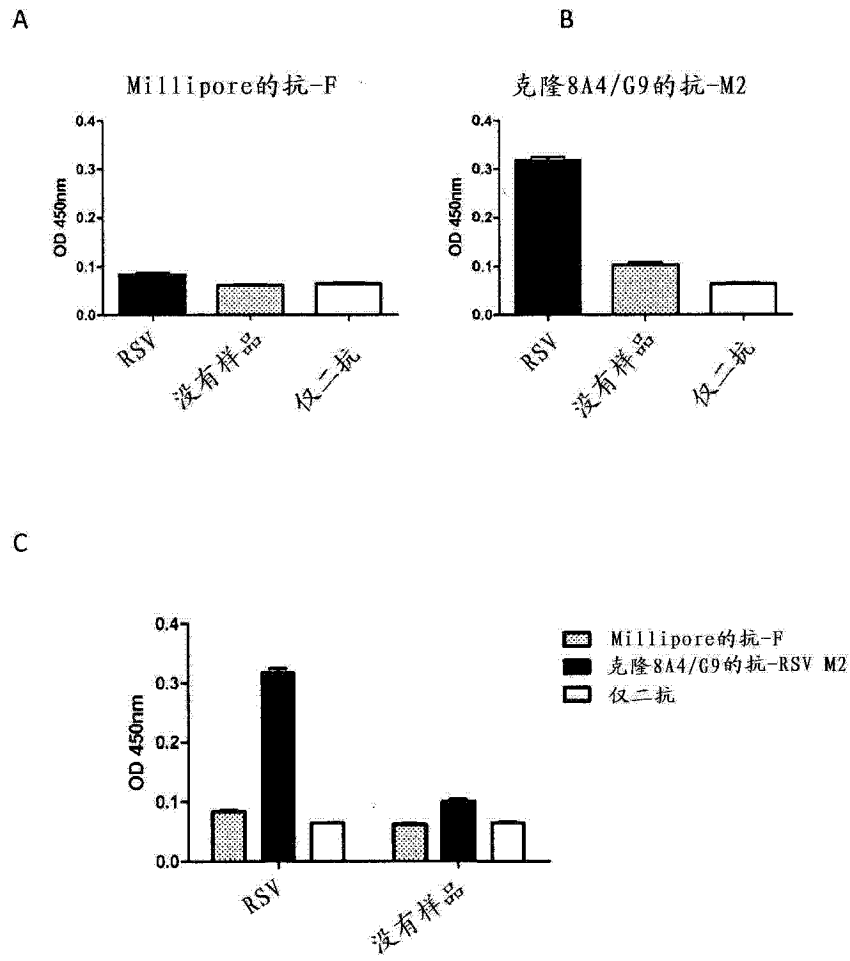


图 7

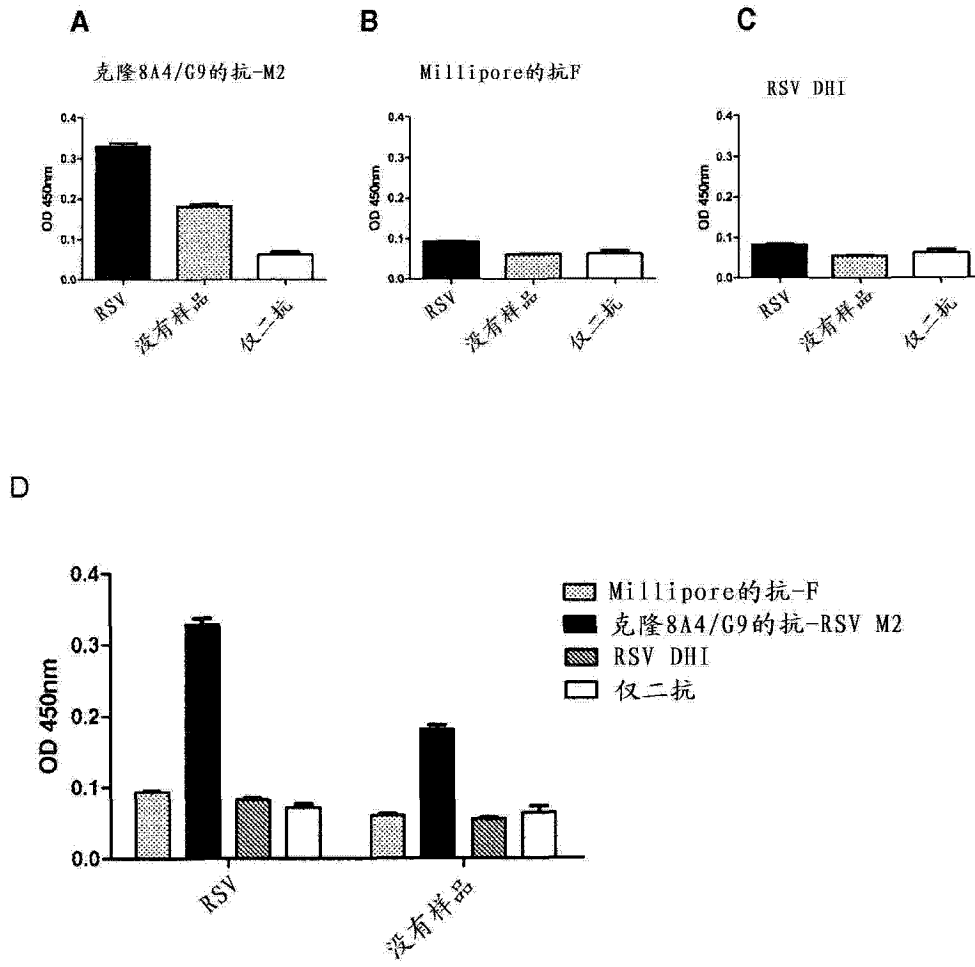


图 8

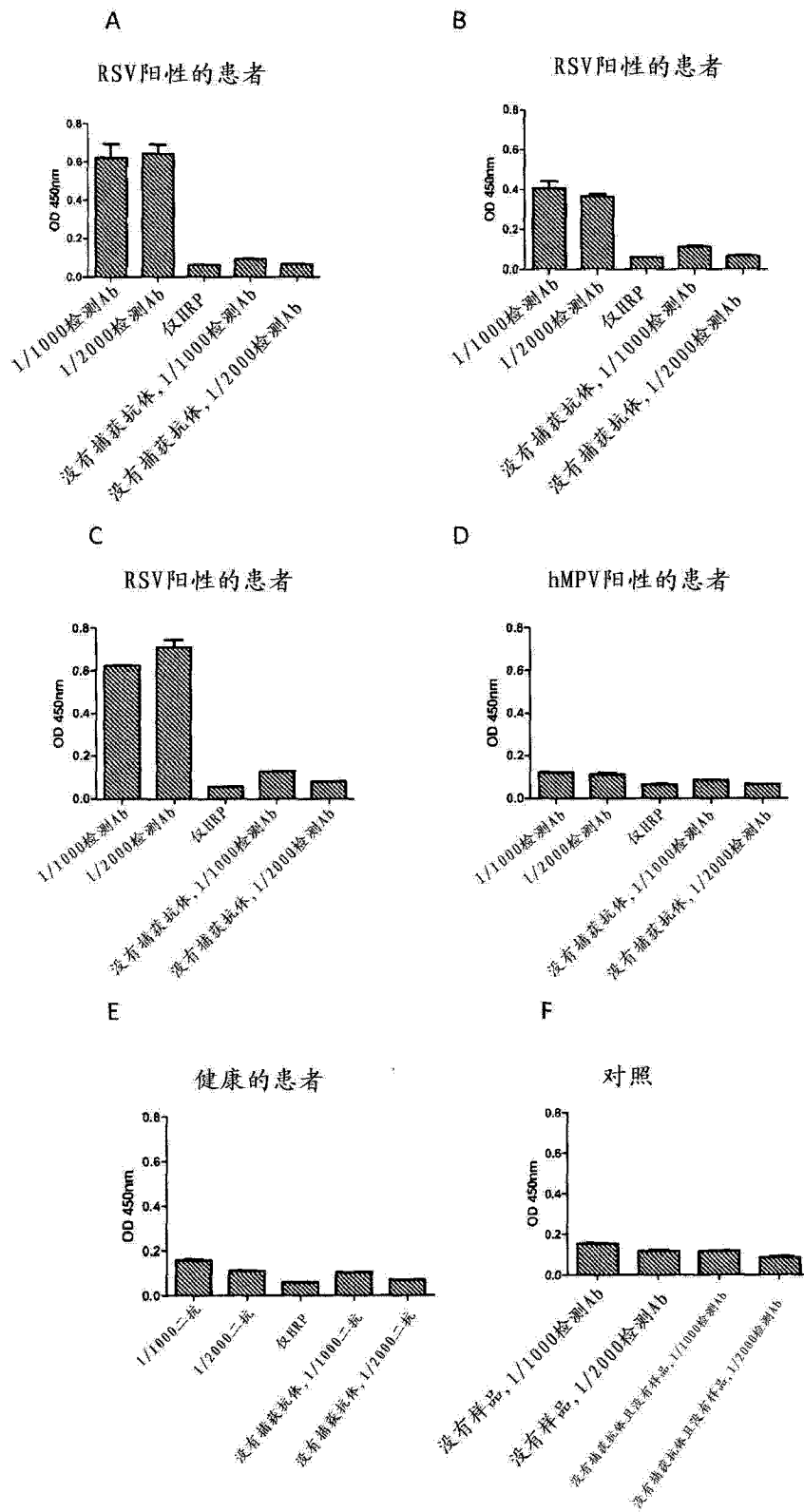


图 9

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 对于呼吸道合胞病毒(RSV)的M2-1抗原而言特异的单克隆抗体 | | |
| 公开(公告)号 | CN103998465A | 公开(公告)日 | 2014-08-20 |
| 申请号 | CN201280062779.9 | 申请日 | 2012-11-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 智利天主教教皇大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 智利天主教教皇大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 智利天主教教皇大学 | | |
| [标]发明人 | AM卡莱伊斯帕拉 SM布埃纳拉米耶 JE莫拉阿拉尔松 RS戈麦斯约翰逊 | | |
| 发明人 | A·M·卡莱伊斯帕拉 S·M·布埃纳拉米耶 J·E·莫拉阿拉尔松 R·S·戈麦斯约翰逊 | | |
| IPC分类号 | C07K16/08 A61K39/395 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | C07K16/1027 G01N33/56983 C07K2317/20 G01N2333/135 C07K2317/56 | | |
| 优先权 | 201103002 2011-11-25 CL | | |
| 其他公开文献 | CN103998465B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及对于呼吸道合胞病毒(RSV)而言特异的单克隆抗体的用途。具体地,本发明涉及由特异地针对病毒抗原M2-1的杂交瘤细胞系8A4/G9所分泌的单克隆抗体IgG2A,所述病毒抗原M2-1与该病毒的核衣壳相联合。所述抗体可以用于RSV感染的检测和/或测定试验。本发明还提供了用于预防和治疗由RSV引起的感染的方法,其包括施用包含由杂交瘤8A4/G9所分泌的单克隆抗体的组合物。最后,本发明还提供了在生物学样品中RSV的病毒抗原的诊断和检测方法,其中使用由杂交瘤8A4/G9的细胞所产生和分泌的单克隆抗体。

A

IgG VH-8A4/G9:
 ATGAAGTTGGGGTTCAGCTGGATTTTCCTTGTCTTTTAAAGGT
 GTCCAGTGTGAAATAATTCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAG
 GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCATT
 TCAGTCACTATGCCATGTCTTGGGCTCGCCAGACTCCGGAGAAGAG
 GCTGGAGTGGGTCGCAACCAATTAATAGTGGTGGTAGTTATACCTACTA
 TCCAGACAGTGTGAAGGGCGGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCC
 AAGAATTCCTATACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGCTGAGGACAC
 GGCCATGTATTACTGTGCAAGAAAGGGGCTATGGACTACTGGGGTC
 AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTTCAGCCAAAACAACAGCCCCA

IgGκ VL-8A4/G9:
 ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCC
 AGGTTCCACTGGTACATTGTCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAG
 CTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAA
 AAGTGTCACTATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAA
 ACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAG
 AATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
 CTTACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
 ATTAAGTGTCAACATAGGGAGCTTACACGTTCCGGAGGGGGGACCC
 AAGCTGGAAA

B

IgG VH-8A4/G9:
 MKLGFSWIFLVLKGVQCEILVESGGGLVVRPGGSLKLSAASGFTFSH
 YAMSWARQTPEKRLEWVATINSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSL
 YLQMSLLRSEDTAMYYCARKGAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTP

IgGκ VL-8A4/G9:
 METDTLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVS
 TSGYSYMHWNQKPGQPRLLIYLVSNLESGVPAARFSGSGSDFTFLN
 IHPVEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK*NLMLHLQLY