



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103739707 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201310693018. X

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 17

A61P 31/16 (2006. 01)

(71) 申请人 上海市免疫学研究所

G01N 33/53 (2006. 01)

地址 200025 上海市卢湾区重庆南路 280 号

C07K 14/11 (2006. 01)

申请人 上海人类基因组研究中心

(72) 发明人 王颖 熊斐斐 夏立亮 吴标

王登宇 赵国屏

(74) 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司 31211

代理人 王函

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

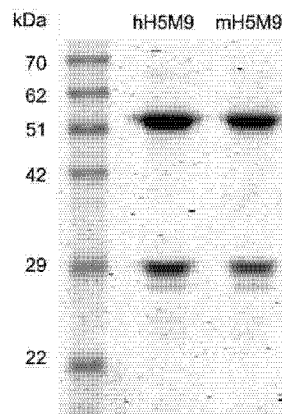
权利要求书1页 说明书10页
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种抗禽流感 H5N1 病毒血凝素 (Hemagglutinin, HA) 抗原的人源化抗体, 所述人源化抗体的重链可变区具有 SEQ ID No. 1 所示的氨基酸序列; 所述人源化抗体的轻链可变区具有 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列。此外, 本发明还公开了该人源化抗体的制备方法和用途。该人源化抗体具有广泛普遍的对禽流感 H5N1 病毒的血凝抑制活性, 且对禽流感 H5N1 的 HA 抗原多种亚型具有高亲和力和中和活性, 同时能识别一个 H5HA 独有的保守区域。该人源化抗体既具有高中和活性, 又能降低免疫源性, 识别的表位在 H5 型流感病毒中具有高度保守性, 在今后禽流感 H5N1 预防、治疗和疫苗设计中有广泛的应用前景。



1. 一种抗禽流感 H5N1 病毒血凝素抗原的人源化抗体,该抗体特异性结合禽流感 H5N1 抗原,其特征在于,所述人源化抗体的重链可变区具有 SEQ ID No. 1 所示的氨基酸序列;所述人源化抗体的轻链可变区具有 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的人源化抗体,其特征在于,所述人源化抗体的重链抗原互补决定区具有 SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6 及 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列;所述人源化抗体的轻链抗原互补决定区具有 SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9 及 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列。

3. 一种权利要求 1 所述的人源化抗体的改造方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1,基于目标抗体的可变区序列和结构信息的人源抗体模板的选择:将需人源化的鼠源目标抗体 mH5M9 轻、重链可变区的序列通过序列相似性搜索,选择与轻、重链相似性最高的人源抗体作为候选的人源化模板;

步骤 2,抗原结合区的移植:将鼠源目标抗体 mH5M9 的互补决定区 CDR 移植到人源化模板抗体相应位置上,得到最初人源抗体 A1;

步骤 3,框架区残基回复突变位点的选择:基于模拟的 mH5M9 结构,采用计算生物学方法,对一些重要的框架区残基进行突变方向的筛选,最初人源抗体 A1 的重链可变区 VH 的第 37、66、71 和 109 位残基,被选择需突变为目标抗体上的相应残基,即第 37 位残基缬氨酸被甲硫氨酸代替,第 66 位残基赖氨酸被精氨酸代替,第 71 位丝氨酸被缬氨酸代替;第 109 位残基亮氨酸被缬氨酸代替,最终得到人源化抗体 hH5M9。

4. 一种编码权利要求 1 所述人源化抗体的 DNA 分子或基因,其特征在于,其重链可变区具有 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列,轻链可变区具有 SEQ ID NO :4 的核苷酸序列。

5. 一种表达载体,其特征在于,含有权利要求 4 所述的基因序列。

6. 一种宿主细胞,其特征在于,它由权利要求 5 所述的表达载体转化而成。

7. 一种如权利要求 1 所述的人源化抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1,提供一种表达载体,该表达载体含有权利要求 4 所述的基因序列;

步骤 2,用步骤 1 所述的表达载体转化宿主细胞;

步骤 3,在适合所述抗体表达的条件下培养步骤 2 所得的宿主细胞;

步骤 4,分离纯化获得所述的抗体。

8. 如权利要求 1 所述的人源性抗体在制备血凝抑制禽流感 H5N1 病毒的药物中的应用。

9. 如权利要求 1 所述的人源性抗体在制备对禽流感 H5N1 的 HA 抗原多种亚型具有高亲和力和中和活性的试剂中的应用。

10. 如权利要求 1 所述的人源性抗体在鉴定识别 HA 抗原表位中的应用。

11. 一种在 H5 型流感病毒中具有高度保守性的 HA 抗原表位肽序列,其特征在于,该 HA 抗原表位肽序列为如下氨基酸序列:KPNDAINF,如 SEQ ID NO :11 所示。

抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种抗禽流感 H5N1 的血凝素(Hemagglutinin,HA)抗原的人源化抗体。此外,本发明还涉及该抗体的制备方法以及用途。

背景技术

[0002] 禽流感是一种由甲型流感病毒的一种亚型引起的传染性疾病综合征。甲型流感病毒根据其表面蛋白质的不同被分为 H1 到 H16 等 16 种亚型。世界各地的禽流感主要由高致病性的 H5 和 H7 两种亚型引起,而人对其中的 H1 和 H3 亚型易感。高致病性禽流感 H5N1 病毒在亚洲造成成千上万的禽类死亡,并且疫情已经波及到中东地区、欧洲和非洲 50 多个国家。原本禽流感是只在禽类动物之间传播,但是随着进化,某些动物流感病毒株发生了变异,获得对人的致病性以及能够在人群中传播的能力,成为人类流感病毒。据世界卫生组织统计,自 2003 年起截止至 2013 年 4 月全球 15 个地区共确诊 628 名病例,374 人死亡,病死率高达 60%。

[0003] 为了防止 H5N1 的流行传播,一些防止措施被广泛使用,比如疫苗,抗病毒药物及免疫治疗。目前有 19 种 H5N1 疫苗可以使用(http://www.who.int/influenza/resources/documents/characteristics_virus_vaccines/en/index.html),但是疫苗只能在预防阶段起作用。抗病毒性药物是个有效的途径,但是可供选择的种类比较局限。而基于抗体的被动免疫疗法在预防和治疗上都取得了很大的突破,成功应用于诸如甲肝病毒、乙肝病毒、巨细胞病毒、狂犬病毒、疱疹病毒、呼吸道合胞体病毒感染等。除此之外,1918 年西班牙流感在全球爆发时,恢复病人的血清成功的降低了 50% 的治病率,而在中国用血清治疗 H5N1 感染也取得了成功。一些研究小组也成功制备了抗 H5N1HA 的单克隆抗体,并在小鼠模型中表现了预防和保护的功能(Sun, L. et al. PloS one, 2009, 4:e5476; Simmons, C. P. et al. PLoS medicine 2007, 4:e178; Prabhu, N. et al. Journal of virology, 2009, 83:2553-2562; Fleury, D. et al. Proteins, 2000, 40:572-578; Throsby, M. et al. PloS one, 2008, 3:e3942)。因此制备中和抗体是治疗和预防 H5N1 感染的重要途径。但是,由于目前杂交瘤技术制备的单克隆抗体都是鼠源抗体。随着使用单抗进行治疗病例数的增加,鼠单抗的弊端逐渐显露,主要是鼠源性抗体能引起人较为严重的免疫原性问题,产生人抗鼠抗体反应(Human anti-mouse antibody response, HAMA),HAMA 可影响单抗的治疗效果,甚至可诱发过敏反应;其次,鼠单抗通常不能有效激活人体的生物效应功能,如补体依赖的细胞毒及抗体依赖的细胞毒作用;此外,鼠单抗在人体内半衰期也很短。为解决这些问题,诞生了多种抗体人源化改造技术,使抗体的免疫原性得到不同程度的降低,包括人鼠嵌合抗体(Chimeric antibody)和人源化抗体(Humanized antibody)。但不可否认抗体人源化改造费时、费力,改造后往往存在亲和活性降低、特异性下降等情况,而且或多或少存在免疫原性问题,因此人源性抗体也逐渐快速增长起来。

[0004] 人鼠嵌合抗体即将鼠抗的可变区与人球蛋白的稳定区相连接,即抗体的 Fab 或

F(ab/2) 来源于鼠类,而 Fc 段来源于人类,既保留了抗体对抗原的特异亲和力,也可以部分降低 HAMA 反应。

[0005] 人源化抗体是通过同源模建进行表面氨基酸残基人源化而制备得到。CDR-grafting 是主要的人源化手段,将人抗体可变区中互补决定族(CDR)序列改换成鼠源单抗 CDR 序列,使抗体既具有鼠源性单抗的特异性又保持抗体亲合力。由于这种 CDR-grafted 抗体只含有很少一部分鼠源蛋白成分(只有 CDR 来自小鼠),过敏反应大大降低并且对靶抗原又有较高的特异性和亲合力,在人体内的免疫原性被极大地降低,因此这种抗体的产生和发展,具有广泛的临床应用潜能。

[0006] 综上所述,将禽流感 H5N1 单克隆鼠源抗体经过嵌合及人源化改造,使其既具有高中和活性,又能降低免疫源性,在今后禽流感 H5N1 预防和治疗中有广泛的应用前景。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题之一是提供一种抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体。

[0008] 本发明要解决的技术问题之二是提供该抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体的制备方法。

[0009] 本发明要解决的技术问题之三是提供该抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体的用途。

[0010] 本发明第一方面提供了一种抗禽流感 H5N1 病毒血凝素抗原的人源化抗体,该抗体特异性结合禽流感 H5N1 抗原。将抗禽流感 H5N1 病毒血凝素鼠源性单克隆抗体 H5M9 的重链可变区和轻链可变区基因进行人源化改造,包括框架区和抗原结合区域 / 互补决定区的氨基酸置换。

[0011] 该抗禽流感 H5N1 病毒血凝素抗原的人源化抗体包括:

[0012] 1) 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链可变区;

[0013] 2) 具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的轻链可变区;

[0014] 3) 与人抗体重链恒定区相一致的重链恒定区;

[0015] 4) 与人抗体轻链恒定区相一致的轻链恒定区。

[0016] 本发明第二方面提供了一种抗禽流感 H5N1 病毒血凝素抗原的人源化抗体的改造方法。

[0017] 步骤 1, 基于目标抗体的可变区序列和结构信息的人源抗体模板的选择。将需人源化的鼠源目标抗体 mH5M9 轻、重链可变区的序列分别通过在 BLASTP-search against the non-redundant protein database 中进行序列相似性搜索,选择与轻、重链相似性最高的人源抗体作为候选的人源化模板。

[0018] 步骤 2, 抗原结合区的移植。将鼠源目标抗体 mH5M9 的互补决定区(CDR) (抗体的 CDR 序列可以通过综合 Kabat 等人 and Chothia 等人的序列定义加以鉴定) 移植到人源化模板抗体相应位置上,得到最初人源抗体 A1。

[0019] 步骤 3, 框架区残基回复突变位点的选择。基于模拟的 mH5M9 结构,采用计算生物学方法,对一些重要的框架区残基进行突变方向的筛选。具体到本例中,最初人源抗体 A1 的重链可变区 VH 的第 37、66、71 和 109 位残基,被选择需突变为目标抗体上的相应残基,即

第 37 位残基缬氨酸被甲硫氨酸代替,第 66 位残基赖氨酸被精氨酸代替,第 71 位丝氨酸被缬氨酸代替;第 109 位残基亮氨酸被缬氨酸代替,最终得到人源化抗体 hH5M9。

[0020] 本发明第三个方面提供了一种编码上述人源化抗体的 DNA 分子或基因,其重链可变区具有 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列,轻链可变区具有 SEQ ID NO :4 的核苷酸序列。

[0021] 本发明第四个方面提供了一种表达载体,含有上述抗体或抗体片段的编码基因,将上述抗体或抗体片段的编码基因在哺乳动物细胞内翻译表达为蛋白质或多肽。

[0022] 本发明第五个方面提供了一种宿主细胞,由上述表达载体转化而成,能够表达上述抗体或抗体片段。

[0023] 本发明第六个方面提供了一种上述抗体的制备方法,包括:

[0024] 步骤 1,提供一种表达载体,该表达载体含有上述抗体的基因序列;

[0025] 步骤 2,用步骤 1 所述的表达载体转化宿主细胞;

[0026] 步骤 3,在适合所述抗体表达的条件下培养步骤 2 所得的宿主细胞;

[0027] 步骤 4,分离纯化获得所述的抗体。

[0028] 本发明第七方面提供该人源性抗体的用途,即在制备血凝抑制禽流感 H5N1 病毒的疫苗中的应用,以及在制备对禽流感 H5N1 的 HA 抗原多种亚型具有高亲和力和中和活性的试剂中的应用,以及在鉴定识别 HA 抗原表位中的应用。

[0029] 本发明第八方面提供一种在 H5 型流感病毒中具有高度保守性的 HA 抗原表位肽序列,该 HA 抗原表位肽序列为如下氨基酸序列:KPNDAINF,如 SEQ ID NO :11 所示。

[0030] 本文所采用的术语“人源化抗体”系将鼠源性单克隆抗体的氨基酸序列除保留互补决定区(CDR)外,其它所有序列(包括可变区中的框架区序列)全部替换成人免疫球蛋白的氨基酸序列,以达到通过基因工程手段最大限度地降低鼠源性单克隆抗体的免疫原性。

[0031] 本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)。其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0032] 本文所用的术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中成为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个 CDR 相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位(参见 Kabat 等,NIH Publ. No. 91-3242,卷 1,647-669 页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0033] 本文所用的术语“血凝素”表示禽流感病毒的包膜糖蛋白。血凝素蛋白介导流感病毒针对宿主细胞的吸附和进入。禽流感病毒的血凝素蛋白有 16 个血清学亚型,HA1-HA16,

分别对应于 16 个病毒亚型,即 H1-H16。

[0034] 本文所用的术语“载体”表示可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。

[0035] 本文所用的术语“宿主细胞”表示导入载体的细胞,包括如下许多细胞类型,如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞,如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO 细胞,COS 细胞,NSO 细胞,HeLa 细胞,BHK 细胞,HEK293 细胞或人细胞的动物细胞。宿主细胞可以是离体的或者在体的,可以是培养的细胞或者细胞系。

[0036] 本文所用的术语“特异性结合”表示两分子间的非随机结合反应,如抗体和产生该抗体的抗原间的反应。此处,结合第一种抗原的抗体对第二种抗原的结合亲和力是检测不到或很弱。在某些实施方式中,一个某抗原特异性抗体是指以亲和力(KD) $\leq 10^{-5}$ M(如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M等)结合该抗原,其中 KD 指解离率与结合率的比值(Kd/Ka),其可以采用本领域技术人员熟悉的方法进行测定。

[0037] 经实验验证,本发明抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体具有广泛普遍的对禽流感 H5N1 病毒的血凝抑制活性,且对禽流感 H5N1 的 HA 抗原多种亚型具有高亲和力和中和活性,同时能够识别一个 H5HA 独有的保守区域。该人源化抗体既具有高中和活性,又能降低免疫源性,在今后禽流感 H5N1 预防、治疗和疫苗设计中有广泛的应用前景。

附图说明

[0038] 图 1 为本发明实施例 1 中鼠源抗体 mH5M9 轻链和重链的可变区氨基酸序列示意图,序列编号依照 Kabat 规则排序。图 1 中,下划线部分为根据 Kabat 的序列定义划分出的互补决定区(CDR)。

[0039] 图 2 是本发明实施例 1 中鼠源抗体 mH5M9、人源化抗体模板 Fab0X108 及人源化抗体最初版本 A1 和最终版本 hH5M9 氨基酸序列的比较示意图。

[0040] 图 3 是本发明实施例 2 中人源化抗体表达载体的质粒图谱。其中,A 为重链真核表达载体 IFH ;B 为轻链真核表达载体 IFL。

[0041] 图 4 是本发明实施例 4 中人源化 hH5M9 抗体纯化后经 SDS-PAGE 鉴定结果示意图。以鼠源抗体 mH5M9 为阳性参照。

[0042] 图 5 是本发明实施例 7 中 SPR 方法测定 hH5M9 和 mH5M9 在不同浓度下的结合与解离曲线示意图。

[0043] 图 6 是本发明实施例 8 中 Western Blotting 方法鉴定 hH5M9 识别 HA1 的示意图。以兔多抗抗 A/Anhui/1/05 为阳性参照。

[0044] 图 7 是本发明实施例 8 中人源化 hH5M9 抗体识别 H5HA 表位的示意图。

具体实施方式

[0045] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0046] 实施例 1. 鼠源抗体 mH5M9 的人源化改造

[0047] 鼠源抗体 mH5M9 的可变区序列发布在 NCBI 数据库中(重链 GenBank No. AGX28126.1, 轻链 GenBank No. AGX28125.1), 见图 1。采用 Kabat 方法, 找出其中的 CDR 序列, 见图 1 下划线部分。通过 CDR 移植的方法对鼠源抗体 mH5M9 进行人源化。通过 BLASTP-search against the non-redundant protein database 中搜索最适合的模板, 结果显示人抗 Fab0X108 的重轻链(PDB No. 3DGG_B 和 No. 3DGG_A) 同源性最高, 达到 73% 和 75%。再将鼠源抗体 mH5M9 的重链和轻链 CDR 区分别移植到人源模板 VH 和 VL 的 FR 框架上, 得到最初人源化抗体 A1, 序列比较结果见图 2。

[0048] 基于最初版本人源化抗体 mH5M9 的模拟的空间结构, 对一些重要的 FR 区残基进行突变方向的筛选。首先考虑的一类残基是可能影响互补决定区构象或结构的残基, 或是可能直接影响抗原结合的残基, 同时人模板的 FR 区与鼠抗体的 FR 区中的不同氨基酸, 列出此类残基的清单(见表 1)。通常需要将这此残基全部突变为原始抗体 mH5M9 的相应位点的残基, 通过筛选, 保留不影响抗体亲和力的残基, 最终得到人源化抗体 hH5M9, 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示和轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

[0049] 表 1 氨基酸残基突变选择

[0050]

氨基酸	人源模板 Fab0X108	鼠源 mH5M9	人源化抗体 hH5M9
H24	Ala	Thr	Ala
H37	Val	Met	Met
H66	Lys	Arg	Arg
H71	Ser	Val	Val
H93	Ala	Val	Ala
H109	Leu	Val	Val
L58	Val	Ile	Val
L87	Trp	Phe	Trp

[0051] 实施例 2. 人源化抗体表达载体的构建

[0052] 将人源化抗体 hH5M9 重、轻链可变区基因(SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4), 分别插入真核表达载体的相应位点中, 得到的阳性重组质粒 IFH-VH 和 IFL-VL, 表达载体由本实验室保存。表达载体质粒图谱如图 3 所示, 其中, A 为重链真核表达载体 IFH ;B 为轻链真核表达载体 IFL。

[0053] 实施例 3. 人源化抗体的表达

[0054] 将上述实施例 2 构建好的人源化抗体表达载体 IFH-VH 和 IFL-VL 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆接种于 500ml LB 培养基中扩增。利用 MACHEREY-NAGEL 公司的质粒抽提试剂盒(NucleoBond[®] Xtra Mid), 按照生产商说明书抽提纯化 DNA。采用 Invitrogen 公

司的 FreeStyle™MAX Reagent 转染将上述质粒 DNA 共同转染入 293F 细胞(宿主细胞 293F 细胞,购自 Invitrogen 公司),操作方法按照生产商说明书进行。转染后 6-7 天收集培养上清。

[0055] 实施例 4. 人源化抗体的纯化和鉴定

[0056] 将实施例 3 获得的细胞培养上清,上样到 GE healthcare 公司的 HiTrap MabSelect SuRe 柱,操作方法按照生产商说明书进行,得到人源化抗体 hH5M9。用 SDS-PAGE 分析纯化的人源化抗体,观察到大小约 50kDa 和约 29kDa 的带,分别被鉴定为人源化抗体重链和轻链(见图 4)。

[0057] 实施例 5. 人源化抗体的血凝抑制活性测定

[0058] 检测血凝抗原滴度:25 μ l 抗原于孔 1 中,添加 75 μ l 的 PBS 混匀得 1/4 稀释度,取 50 μ l 添加到含有 50 μ l PBS 的孔 2 中混匀得 1/8;取 50 μ l 添加到含有 50 μ l PBS 的孔 3 中混匀得 1/16,依次类推,直至孔 12 的 1/8192;50 μ l 10.75-1% 红细胞于 12 个孔中,轻轻抖混匀,1h 左右,约在 1/512 处得到 ++++ (完全血凝)或 ++ (部分血凝)结果,该处定为 1 个血凝单位;阴性对照为未添加抗原的 50 μ l PBS。

[0059] 血凝抑制试验操作:1-12 孔,孔 1 空置,其余添加 25 μ l PBS;50 μ l 纯化的人源化抗体 hH5M9 (1mg/ml) 于孔 1,取 25 μ l 于孔 2 混匀,依次倍比稀释至孔 12;加入 25 μ l 4 个血凝单位抗原,轻轻抖混匀室温或者 37°C 放置 15min;加入 0.75-1% 红细胞 50 μ l,轻轻抖混匀,静置 1h 左右。以鼠源抗体 mH5M9 (1mg/ml) 为阳性对照。人源化抗体 hH5M9 与 8 株 H5、H1、H7 和 H9 病毒的代表株的血凝抑制活性结果如表 2 所示(数字表示稀释倍数),hH5M9 和 mH5M9 能够结合所有的 5 株 H5N1HA,但不能与 H1、H7 和 H9 反应,说明 hH5M9 保留了 mH5M9 的广谱 HI 活性,但他们对其中的一些代表株病毒的血凝活性比 mH5M9 低,说明人源化的改造对抗体的活性会有一定影响。

[0060] 表 2 人源化抗体的广谱血凝抑制活性测定

[0061]

病毒株	亚型	hH5M9	mH5M9
A/goose/Guangdong/1/96	H5N1	64	128
A/Vietnam/1194/04	H5N1	64	128
A/duck/Anhui/1/06	H5N1	64	128
A/Anhui/1/05	H5N1	64	128
A/chicken/Shanxi/2/06	H5N1	64	128
A/New Caledonia/20/1999	H1N1	<4	<4
A/duck/Guangdong/1/1996	H7N3	<4	<4
A/chicken/Shandong/6/96	H9N2	<4	<4

[0062] 实施例 6. 人源化抗体的中和能力测定

[0063] 将 H5N1HA 抗原用包被液 (pH9.6CBS) 稀释到一定浓度 (10 μ g/ml) 后包被于 96 孔板上, 100 μ l/孔, 于 2~8 $^{\circ}$ C 放置过夜。弃去孔中液体, 用 PBST 洗 3 次, 甩干后加入 200 μ l/孔的封闭液 (2%BSA PBST), 室温 1hr, 再用 PBST 洗 3 次, 甩干。用封闭液从 1 μ g/ml 开始稀释人源化抗体 hH5M9, 以 100 μ l/孔复孔加样至 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1hr, 弃液, 洗板 3 次, 甩干。用封闭液稀释酶联抗体 (HRP- 抗人 IgG κ 链特异性抗体) 至一定浓度 (1:5000), 以 100 μ l/孔加至 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 下反应 1hr, 弃液, 洗板 3-6 次, 甩干。配制底物混合液, 以 100 μ l/孔加入到 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。加入终止液 50 μ l/孔, 终止反应。在 490nm 处读取吸收值 OD, 计算人源化抗体 hH5M9 的中和能力, 结果见表 3。结果显示 hH5M9 能够广谱高效中和不同亚型 H5N1 病毒株的能力。

[0064] 表 3 人源化抗体的中和活性鉴定

[0065]

H5N1 病毒株	hH5M9 (ng/ml)	mH5M9 (ng/ml)
A/duck/Hong Kong/p46/97	0.39	0.2
A/Vietnam/1194/04	0.39	0.2
A/Indonesia/5/05	0.39	0.049
A/Xinjiang/1/06	0.78	0.2
A/Egypt/N05056/09	> 2000	> 2000
A/Anhui/1/05	0.2	0.049
A/common magpie/Hong Kong/2256/06	0.2	0.1
A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/06	0.2	0.1
A/goose/Guiyang/337/06	12.5	3.12

[0066] 实施例 7. 人源化抗体的亲和力参数测定

[0067] 采用表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 对抗原-抗体的相互作用作分析。仪器采用 ProteOn XPR36 蛋白相互作用阵列系统。GLC 传感器活化后, 通过 10mM 冰醋酸 pH6.0 稀释 H5N1HA (A/Vietnam/1194/04), 30 μ l/min60s, 使抗原达到 946 感应单位 (RU); 将抗体稀释若干梯度, 同时通过 GLC, 25 $^{\circ}$ C 100 μ l/min120s, PBS 做空白对照, C225 (EGFR 抗体) 做阴性对照; PBS 清洗后, 用解离溶液作用, 25 $^{\circ}$ C 100 μ l/min15min。ProteOn ManagerTM software 分析数据, 抗体在不同浓度下的结合与解离曲线见图 5, 通过计算得到 hH5M9 和 mH5M9 的平衡解离常数 KD, 分别是 3.84×10^{-10} M 和 3.05×10^{-11} M。hH5M9 的稍小于 mH5M9, 说明改变可变区的氨基酸会影响抗体的亲和力, 可能是由于氨基酸残基的改变使抗体的结构发生变化, 进而影响抗原抗体之间的识别。

[0068] 实施例 8. 人源化抗体的表位识别测定

[0069] 通过 Western Blotting 大致确定表位在 HA 的 HA1 片段上还是 HA2 片段上, 结果

见图 6。H5HA (A/Anhui/1/05) 可以分成 HA1 和 HA2 两部分。hH5M9 和阳性对照 mH5M9 均识别 HA1 片段而非 HA2, 并且是一个线性而非构象的表位。实施例 6 的中和结果显示 hH5M9 和 mH5M9 能广泛结合 H5N1 病毒株, 但是不能与 A/Egypt/N05056/09 结合, 因此比较该病毒株与其余病毒株的氨基酸差异, 见表 4。通过氨基酸序列比对, A/Egypt/N05056/09 的 HA1 有 7 个位点不同于其他 8 株 HA1, 分别是第 22、120、151、152、154、210 和 235 位的氨基酸, 这几个位置的氨基酸可能是抗体识别 HA 的候选氨基酸残基。

[0070] 表 4 不同 H5N1 病毒 HA1 氨基酸比较

[0071]

H5N1 病毒株	氨基酸位置 (根据 H5 HA 蛋白顺序标记)						
	22	120	151	152	154	210	235
A/goose/Guangdong/1/96	K	S	I	K	N	V	P
A/duck/Hong Kong/p46/97	K	S	I	K	N	V	P
A/Vietnam/1194/04	K	S	I	K	N	V	P
A/Indonesia/5/05	K	S	I	K	N	V	P
A/Xinjiang/1/06	K	S	I	K	N	V	P
A/Egypt/N05056/09	R	N	T	Q	D	I	S
A/Anhui/1/05	K	S	I	K	N	V	P
A/common magpie/Hong Kong/2256/06	K	S	I	K	N	V	P
A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/06	K	S	I	K	N	V	P
A/goose/Guiyang/337/06	K	S	I	K	N	V	P

[0072] 为了进一步确定哪个氨基酸是表位所在, 构建了 7 个突变 HA1 表达质粒, 分别是 HA^{K22G}、HA^{S120G}、HA^{I151G}、HA^{K152G}、HA^{N154G}、HA^{V210G} 和 HA^{P235G}, 转染入 293T 细胞, 用免疫荧光 (IFA) 检测抗原-抗体之间反应, 结果见表 5。仅 HA^{P235G} 失去了与 hH5M9 抗体的结合能力, 而与阳性对照依旧能结合, 因此 Pro²³⁵ 是表位所在。因此在 Pro235 附近选取 12 个氨基酸, 分别是 231 到 243 (除去 235) 位置, 构建突变 HA1 表达质粒, 转染入 293T 细胞, 用 IFA 检测抗原-抗体之间反应, 结果见表 5。HA^{N236G}、HA^{D237G}、HA^{I239G} 和 HA^{N240G} 几乎失去了与 hH5M9 的全部结合能力, HA^{K234G} 和 HA^{A238G} 则失去部分结合能力。由此, 可以得到 hH5M9 识别 HA 的表位在第 234 到 241 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:11 所示。同时合成表位肽段, 以此为抗原做 ELISA, 结果显示该肽段能够与抗体 hH5M9 结合, 因此“KPNDAINF”确实为抗体识别表位, 在 HA 上的位置如图 7 所示。

[0073] 表 5 IFA 鉴定 hH5M9 识别 A/Anhui/1/05HA 表位

[0074]

突变氨基酸位置	hH5M9	阳性对照 ^a
原始 HA	+++ ^b	+++
K22G	+++	+++
S120G	+++	+++
I151G	+++	+++
K152G	+++	+++
N154G	+++	+++
V210G	+++	+++
P235G	-	+++
T231G	+++	+++
I232G	+++	+++
L233G	+++	+++
K234G	+	+++
N236G	-	+++
D237G	-	+++
A238G	+	+++
I239G	-	+++
N240G	-	+++
F241G	-	+++
E242G	+++	+++
S243G	+++	+++

[0075] ^a 兔多抗抗 A/Anhui/1/05 作为阳性对照

[0076] ^b 突变 HA 质粒转染 293T 细胞后通过免疫荧光实验鉴定荧光强度,用 (+)——(+++) 表示。

[0077] 将该表位在禽流感数据库 (Influenza Research Database, <http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>) 中进行比对,截止 2012 年 9 月,包括 2376 条 H5N1 病毒株,其中含有 243 条人源病毒株,基本上包含了 H5N1 主要流行株。发现 2376 条中 1593 条病毒株含有该表位,覆盖率达 67.0%,而 243 条人源中 179 条病毒株含有该表位,覆盖率达 73.7%。该表位在 clades1-9 是一个高度保守的区域,这与实施例 8 的中和实验的结论一致。对表位的每一个氨基酸残基也进行比对,发现所有 8 个氨基酸残基也都比较保守, Lys²³⁴、Pro²³⁵、Asn²³⁶、Asp²³⁷、Ala²³⁸、Ile²³⁹、Asn²⁴⁰ 和 Phe²⁴¹ 的保守率分别为 98.2%、80.1%、98.6%、99.7%、94.7%、99.6%、90.7% 和 100.0%。而在其他 HA 类型,如 H1, H3, H7 和 H9 中都未发现该表位,因此表位“KPNDAINF”是 H5 所独有的。综上,人源化改造抗体 hH5M9 能够识别一个高度保守的 H5N1 病毒所独有的一个区域,这也使 H5M9 抗体有更广泛的应用价值,而

KPNDAINF 多肽有望成为产生有效抗 H5 型流感病毒的疫苗候选表位肽。

[0001]

序列表

<110> 上海市免疫学研究所、上海人类基因组研究中心

<120> 抗禽流感 H5N1 血凝素抗原的人源化抗体及其制备方法和用途

<130> CPC-NP-13-18523

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Phe Pro Asn Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ile Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln

[0002]

	100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	2		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	2		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe			
	20	25	30
Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35	40	45	
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Glu Phe Gly Val Pro Ala			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His			
65	70	75	80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn			
	85	90	95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<400> 3

gagggtcaaac	tgcaacagtc	tggacctgag	ctgggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacattcaet	gaatacacga	tacactggat	gaagcagaaa	120
cctggacagg	gccttgagtg	gattggaggt	atctttceta	acaatggaga	tactacetac	180
aaccagaaat	tcaagatcag	ggccacattg	actgtagaca	agtcctccag	cacagcctac	240
atggaactca	gcagcctgac	atctgaggat	tctgcagtct	attaactgtg	aaggaaactac	300
ggtagtagtt	acgggtactt	cgatgtctgg	ggccaaggga	ccaacggcac	egtctcttca	360

<210> 4

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gacattgtgc	tgacceaatc	tccagettct	ttggetgtgt	ctctagggca	gagggccacc	60
atatcctgca	gagccagtga	aagtgttgac	aattttggca	aaagttttat	gcactgggat	120
caacagaaac	caggacagcc	acceaaaact	ctcatctatc	gtgcatccaa	ccgagaattt	180
ggggtccttg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatteat	240
cctgtggagg	aagaagatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatcctegg	300
acgttcggtg	gaggcaccaa	gctggaaatc	aaa			333

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Glu Tyr Thr Ile His

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

[0004]

<213> 人工序列

<400> 6

Gly Ile Phe Pro Asn Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ile

1 5 10 15

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Asn Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Lys Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

[0005]

Arg Ala Ser Asn Arg Glu Phe

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe

1 5

重链可变区 VH

EVHLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTEYTIHWMKQSHGKS
LEWIGGIFPNNGDITYNQFKIRATLTVGKSSSTAYMDLRSLTSE
DSAVYYCVRNYGSSYGYFDVWGAGTTVTVSS

轻链可变区 VL

DIVLTQSPGSLTVSLGQRATISCRASESVDNFGKSFMHWYQQKPG
QSPKLLIYRASNREFGIPARFNGSGSGTDFALTINPVEADDVATYFC
QOSNEDPRIFGGGKLEIK

图 1

重链可变区	FR-1	CDR-1	FR-2	CDR-2
mH5M9	1 EVHLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTF 30	EYTIH	40 WMKQSHGKSLEWIG	50 a GIFPNNGDITYNQFKI 60
FabOX108	--K-----A-----	S-VM-	-V--KP-QG-----	Y-N-Y-D--N--E---G
A1	--K-----A-----	E-TI-	-V--KP-QG-----	G-F-N-G--T--Q---I
hH5M9	--K-----A-----	E-TI-	-M--KP-QG-----	G-F-N-G--T--Q---I
	FR-3	CDR-3	FR-4	
mH5M9	70 RATLTVGKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCVR 90	100 a b c NYGSSYGYFDV	110 WGAGTTVTVSS	
FabOX108	K----SD-----E-S-----A-	EDYYGSRWGY	--Q--L----	
A1	K----SD-----E-S-----A-	NYGSSYGYFDV	--Q--L----	
hH5M9	R----VD-----E-S-----A-	NYGSSYGYFDV	--Q--V----	
轻链可变区	FR-1	CDR-1	FR-2	CDR-2
mH5M9	1 DIVLTQSPGSLTVSLGQRATISCRASESVDNFGKSFMH 30	a b c d WYQQKPGQSPKLLIY 40	50 RASNREF	
FabOX108	-----A--A-----	---K--STS-Y-Y--	-----P-----	L---L-S
A1	-----A--A-----	---E--DNF-K-F--	-----P-----	R---R-F
hH5M9	-----A--A-----	---E--DNF-K-F--	-----P-----	R---R-F
	FR-3	CDR-3	FR-4	
mH5M9	60 GIPARFNGSGSGTDFALTINPVEADDVATYFC 80	90 QOSNEDPRIFGGGKLEIK 100		
FabOX108	-V-----S-----T-N-H---EE-A--Y-	-H-R ELL-	-----	
A1	-V-----S-----T-N-H---EE-A--Y-	-Q-NEDPR-	-----	
hH5M9	-V-----S-----T-N-H---EE-A--Y-	-Q-NEDPR-	-----	

图 2

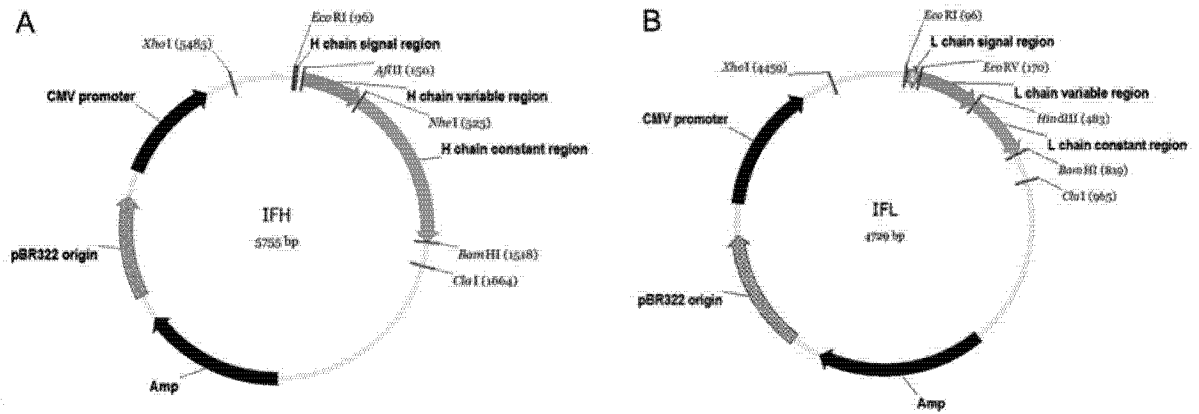


图 3

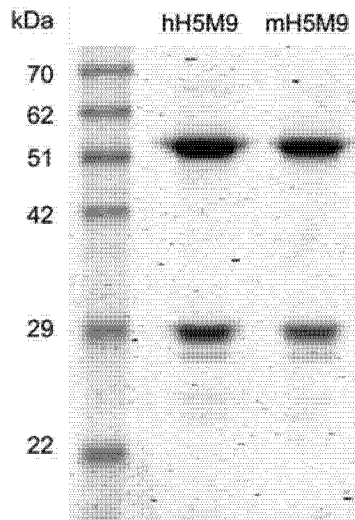


图 4

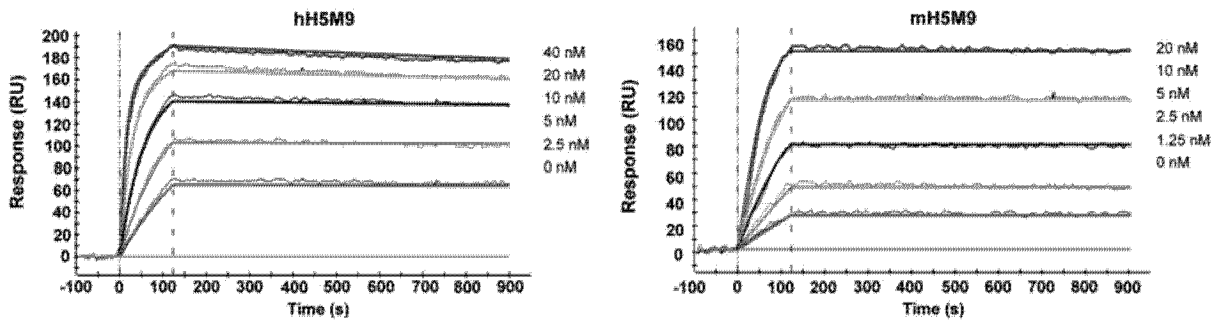


图 5

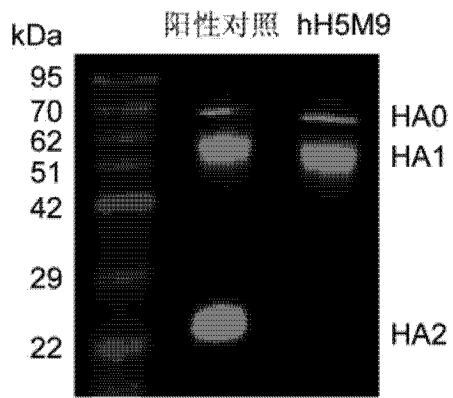


图 6

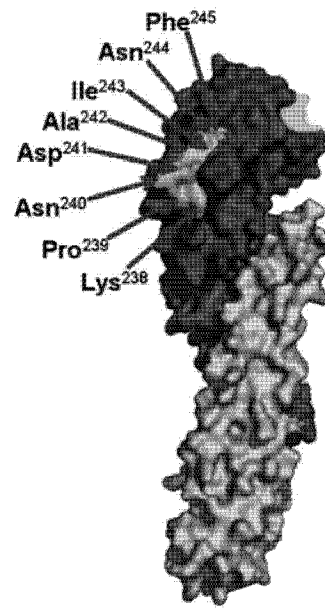


图 7

专利名称(译)	抗禽流感H5N1血凝素抗原的人源化抗体及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN103739707A	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN201310693018.X	申请日	2013-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
[标]发明人	王颖 熊斐斐 夏立亮 吴标 王登宇 赵国屏		
发明人	王颖 熊斐斐 夏立亮 吴标 王登宇 赵国屏		
IPC分类号	C07K16/10 C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 A61K39/395 A61P31/16 G01N33/53 C07K14/11		
代理人(译)	王函		
其他公开文献	CN103739707B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明公开了一种抗禽流感H5N1病毒血凝素 (Hemagglutinin , HA) 抗原的人源化抗体, 所述人源化抗体的重链可变区具有SEQ ID No.1所示的氨基酸序列; 所述人源化抗体的轻链可变区具有SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。此外, 本发明还公开了该人源化抗体的制备方法和用途。该人源化抗体具有广泛普遍的对禽流感H5N1病毒的血凝抑制活性, 且对禽流感H5N1的HA抗原多种亚型具有高亲和力中和活性, 同时能识别一个H5HA独有的保守区域。该人源化抗体既具有高中和活性, 又能降低免疫源性, 识别的表位在H5型流感病毒中具有高度保守性, 在今后禽流感H5N1预防、治疗和疫苗设计中有广泛的应用前景。

