



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104220090 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201280043224. X
 (22) 申请日 2012. 09. 20
 (30) 优先权数据
 201106807-9 2011. 09. 20 SG
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2014. 03. 05
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/SG2012/000344 2012. 09. 20
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02013/043125 EN 2013. 03. 28
 (83) 生物保藏信息
 CBA20110005 2011. 07. 27
 CBA20110006 2011. 07. 27
 CBA20110007 2011. 07. 27
 CBA20110004 2011. 07. 27

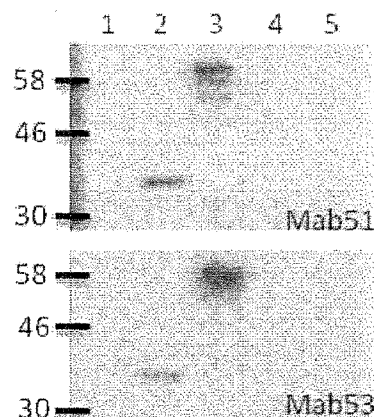
(51) Int. Cl.
A61K 39/135 (2006. 01)
A61P 25/00 (2006. 01)
A61P 1/00 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)
G01N 33/533 (2006. 01)
G01N 33/534 (2006. 01)
G01N 33/535 (2006. 01)

(71) 申请人 淡马锡生命科学实验室有限公司
 地址 新加坡新加坡市
 (72) 发明人 贾强 林晓芳 况慧星
 (74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225
 代理人 朱梅 徐琳

权利要求书2页 说明书14页
 序列表1页
 PCT/RO/134表4页 附图6页

(54) 发明名称
 肠道病毒 71 型的特异性抗体及其用途

(57) 摘要
 本申请提供至少一种分离的抗体或其片段，其中，所述抗体或其片段能够特异性地结合至少一种 EV71 衍生的肽。



1. 一种分离的中和性单克隆抗体或其片段,所述分离的中和性单克隆抗体或其片段能够特异性地结合肠道病毒 71 型 (EV71) 的至少一个表位,其中,所述抗体属于免疫球蛋白 M 亚类。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中,所述表位为 SEQ ID NO:1。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体,其中,所述抗体基本上具有单克隆抗体 Mab51 的免疫结合特性。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体选自:

(a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110005 产生的抗体;

(b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110005 产生的抗体的结合特性的抗体;和

(c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110005 产生的抗体的抗原结合的抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中,所述表位是 EV71 的至少一个构象表位。

6. 根据权利要求所述的抗体,其中,所述构象表位是完整的病毒衣壳。

7. 根据权利要求 6 所述的抗体,其中,所述衣壳蛋白是 VP1、VP2、VP3、VP4 和 / 或 VP0 前体。

8. 根据权利要求 1 和 5 至 7 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体基本上具有单克隆抗体 Mab57 的免疫结合特性。

9. 根据权利要求 1 和 5 至 8 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体选自:

(a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110007 产生的抗体;

(b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110007 产生的抗体的结合特性的抗体;和

(c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110007 产生的抗体的抗原结合的抗体。

10. 一种分离的单克隆抗体或其片段,其中,所述抗体能够特异性地结合 SEQ ID NO:1 的肠道病毒 71 型 (EV71) 的至少一个表位。

11. 根据权利要求 10 所述的抗体,其中,所述抗体基本上具有单克隆抗体 Mab53 的免疫结合特性。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的抗体,其中,所述抗体属于免疫球蛋白 G 亚类。

13. 根据权利要求 10 至 12 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体选自:

(a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110006 产生的抗体;

(b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110006 产生的抗体的结合特性的抗体;和

(c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110006 产生的抗体的抗原结合的抗体。

14. 一种分离的单克隆抗体或其片段,所述分离的单克隆抗体或其片段能够特异性地结合具有序列 IGDSVS 或 GDSVSR 的肠道病毒 71 型 (EV71) 的至少一个表位。

15. 根据权利要求 14 所述的抗体,其中,所述抗体基本上具有单克隆抗体 Mab4 的免疫结合特性。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的抗体,其中,所述抗体选自:

(a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110004 产生的抗体;

(b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110004 产生的抗体的结合特性的抗体;和

(c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110004 产生的抗体的抗原结合的抗体。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是至少一种人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,EV71 具有选自 A、B2、B4、B5、C1、C2、C4 和 C5 中的基因型。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是用至少一种放射性核素和 / 或荧光染料标记的。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体连接有至少一种药、抗病毒药和 / 或毒素。

21. 一种分离的杂交瘤细胞系,其由美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏,保藏编号为 CBA20110004、CBA20110005、CBA20110006 和 / 或 CBA20110007。

22. 一种检测和 / 或定量对象中至少一种 EV71 感染的细胞的存在和分布的方法,所述包括:

a. 使至少一种根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的抗体或其片段与从至少一个对象得到的至少一个样本接触;和

b. 检测和定量所述抗体与 EV71 感染的细胞的结合。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中,检测步骤包括使所述样本与包含或结合至可检测元素的结合蛋白接触。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法,其中,所述抗体被固定到固体表面上。

25. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中,所述结合蛋白包含放射性原子,被结合至荧光分子,或者被结合至酶。

26. 一种用于诊断 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的试剂盒,所述试剂盒包括至少一种根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的抗体或其片段。

27. 根据权利要求 26 所述的试剂盒,其中,所述 EV71 相关疾病是选自无菌性脑膜炎、脑炎、脑神经麻痹、格林 - 巴利综合征、脊髓灰质炎样综合征和手足口病中的至少一种疾病。

28. 一种治疗和 / 或预防 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的方法,所述方法包括向需要其治疗的对象施用至少一种根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的抗体或其片段。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中,所述 EV71 相关疾病是选自无菌性脑膜炎、脑炎、脑神经麻痹、格林 - 巴利综合征、脊髓灰质炎样综合征和手足口病中的至少一种疾病。

30. 根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的分离的抗体,其用于医药中。

31. 根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的分离的抗体,其用于治疗和 / 或预防 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病中。

32. 根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的分离的抗体用于制备治疗和 / 或预防 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的药物的用途。

33. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

肠道病毒 71 型的特异性抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明主要涉及肠道病毒 71 型 (EV71) 的特异性单克隆抗体。特别是,但非专有地,所述抗体可以是中和性单克隆抗体。

背景技术

[0002] 肠道病毒是造成广谱的人类和非人类疾病的异种群病原体之一。肠道病毒属于小 RNA 病毒科内的大属;该科内的其他属包括鼻病毒属、嗜肝病毒属、心病毒属和口蹄疫病毒属。肠道病毒属包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇 A 病毒 (CAV)、柯萨奇 B 病毒 (CBV)、埃可病毒和肠道病毒 68-71 以及许多的从人类和其他灵长类分离的未特征化的肠道病毒。跟其他小 RNA 病毒一样,肠道病毒的病毒体包括一个无包膜的二十面体衣壳,其包围含有感染性的单链基因组正义 RNA (ssRNA) (大小约为 7-8.5kb) 的核。肠道病毒与其他小 RNA 病毒科成员的区别在于它们在酸中的稳定性和它们粪-口的传播扩散途径。病毒进入细胞被认为涉及特定的细胞受体。病毒体蛋白包含四种衣壳蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 的多个拷贝。小蛋白 VPg (分子量 (Mr) 约 24x103) 与基因组 RNA 的 5' 末端共价连接。肠道病毒的其他蛋白包括主要非结构蛋白 P2 和 P3。

[0003] 肠道病毒 71 型 (EV71) 属于肠道病毒属的人肠道病毒 A 种。EV71 不是动物传染病的因子,而是包括无菌性脑膜炎、脑炎、脑神经麻痹、格林-巴利综合征和脊髓灰质炎样综合征的许多神经疾病的致病因子。

[0004] EV71 还与包括其他肠道病毒 (如 CA16、CA5、CA9 和 Echo7) 的人类手足口病 (HFMD) 的大爆发相关。然而,在与 HFMD 相关的全部肠道病毒中,EV71 因其在过去的十年中在亚太地区的大规模爆发以及其引起严重的神经并发症且有时引起死亡的能力而受到公众最多关注。

[0005] 在临床表现中 EV71 显示出很大的变异。由于这种在临床表现中的很大的变异以及及与 EV71 及其更大神经毒力的潜力相关的日益增加的公共卫生关注,能够在 HFMD 爆发期间快速识别 EV71 的特异性毒株以及能够快速区分 EV71 和 CA16 (另一种造成 HFMD 大爆发的主要因素) 是重要的。因为对于与 EV71 或 CA16 的不同毒株的感染相关的 HFMD 而言,早期症状相似,所以常规的 EV71 诊断的“金标准”方法是通过使用体外微量中和试验的组织培养分离和血清分型。这不仅费时,而且灵敏性和特异性较小 (J. L. 1996)。此外,中和试验涉及使用单特异抗血清,其可用性相当有限。此外,由于聚集,不可中和的病毒常常阻碍抗原分型。通常还使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。重组蛋白捕获 ELISA (Shih, Li et al. 2000) 和 IgM 捕获 ELISA (Wang, Lin et al. 2004) (两者都可以作为商业诊断试剂盒买到) 由于缺乏对于 EV71 的特异性而具有局限性 (Hovi and Roivainen 1993), 常常导致假阳性结果。

[0006] 市场上也有两种诊断检测试剂盒,一种基于实时 RT-PCR,而另一种基于病人血清中的抗 EV71 IgM 检测。这两种方法都有严重缺点。例如,实时 PCR 需要良好维护的实验室和昂贵的设备,同时血清抗体的检测仅可能发生在感染后的几周,由于 EV71 的严重疾病具有快速发病和发展的特点,这是一个缺点。

[0007] 静脉内免疫球蛋白 (IVIG) 是另一种已在病毒感染和炎性疾病的治疗中通常使用的方法, 显示出病毒的有效革除和修饰 (Dwyer1992)。因此, 在 EV71 治疗中有潜在的 IVIG 应用。然而, 在本领域中没有可用的能够中和 EV71 感染的中和性单克隆抗体。

[0008] 由于迄今为止, 对嗜神经病毒 EV71 仍然缺乏有效的抗病毒疗法或疫苗, 因此迫切需要开发 EV71 的有效疗法和早期特异性诊断方法。

发明内容

[0009] 发明概述

[0010] 本发明致力于上述问题, 特别是, 提供了至少一种新的单克隆抗体, 所述单克隆抗体对至少一种 EV71 和 / 或 EV71 相关疾病具有特异性。所述单克隆抗体可以是中和性的。

[0011] 根据第一个方面, 本发明提供了至少一种免疫球蛋白 M 亚类的分离的中和性单克隆抗体或其片段, 所述分离的中和性单克隆抗体或其片段能够特异性地结合 EV71 的至少一个表位。特别是, 所述抗体可以选自:

[0012] (a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110005 或 CBA20110007 产生的抗体;

[0013] (b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110005 或 CBA20110007 产生的抗体的结合特性的抗体; 和

[0014] (c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110005 或 CBA20110007 产生的抗体的抗原结合的抗体。

[0015] 根据本发明的任一方面的表位可以包含氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1), 由氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1) 组成, 或者主要由氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1) 组成, 和 / 或可以是构象表位。

[0016] 根据另一个方面, 本发明提供了至少一种分离的单克隆抗体或其片段, 所述分离的单克隆抗体或其片段能够特异性地结合 EV71 的至少一个表位。特别是, 所述抗体可以选自:

[0017] (a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110004 或 CBA20110006 产生的抗体;

[0018] (b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110004 或 CBA20110006 产生的抗体的结合特性的抗体; 和

[0019] (c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110004 或 CBA20110006 产生的抗体的抗原结合的抗体。

[0020] 根据本发明的任一方面的表位可以包含氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1) 或 Mab4 特异性结合的表位, 由氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1) 或 Mab4 特异性结合的表位组成, 或者主要由氨基酸序列 KQEKD (SEQ ID NO:1) 或 Mab4 特异性结合的表位组成。

[0021] 根据另一个方面, 本发明提供了至少一种分离的杂交瘤细胞系, 其于 2011 年 7 月 27 日由澳大利亚细胞库 (214Hawkesbury Road, Westmead NSW2145) 保藏, 保藏编号为 CBA20110004、CBA20110005、CBA20110006 或 CBA20110007。

[0022] 根据另一个方面, 本发明提供了检测和 / 或定量 EV71 的存在的方法、治疗和 / 或预防 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的方法、用作医药的本发明的抗体或其片段、本发明的抗体或其片段用于制备药物的用途、试剂盒、核酸及其应用。

[0023] 由下列描述显而易见的是, 本发明的优选实施方式允许最佳使用所述分离的抗体

来利用其对 EV71 的至少一个表位的准确性和特异性。从以下描述可以看出,这种优点和其他相关优点对本领域技术人员来说将是明显的。

附图说明

[0024] 图 1 是在表征过程中由 Mab51 和 Mab53 的蛋白质印迹杂交得到的结果的照片。泳道 1:横纹肌肉瘤 RD 细胞全细胞溶胞产物。泳道 2:浓缩的 C4(Yamagata) 病毒。泳道 3:GST- 标记的 VP1 重组蛋白 (~ 61kDa)。泳道 4:GST- 标记的 VP2 重组蛋白 (~ 56kDa)。泳道 5:GST- 标记的 VP3 重组蛋白 (~ 50kDa)。

[0025] 图 2 是在表位作图过程中由 Mab51 和 Mab53 的蛋白质印迹杂交得到的结果的照片。泳道 1:GST-KQEK 融合蛋白 (~ 25kDa),泳道 2:GST-HKQEKD 融合蛋白,泳道 3:GST-HKQEK 融合蛋白,泳道 4:GST-KQEKD 融合蛋白,泳道 5:GST 融合蛋白。

[0026] 图 3A、3B 和 3C 是由 Mab4 表位作图的蛋白质印迹杂交得到的结果的照片。图 3A:泳道 1:VP1(1-66)GST 重组蛋白蛋白质,泳道 2:VP1(1-132),泳道 3:VP1(1-163),泳道 4:VP1(1-177),泳道 5:VP1(1-208),泳道 6:(1-222),泳道 7:VP1(1-240),泳道 8:VP1(1-260);图 3B:泳道 1:GST 蛋白(阴性对照),泳道 2:A48(48-297),泳道 3:A32(32-297),泳道 4:A24(24-297),泳道 5:A10(10-297)。图 3C:泳道 1:GST 蛋白(阴性对照),泳道 2:A12(12-297),泳道 3:A14(14-297),泳道 4:A16(16-297),泳道 5:A18(18-297),泳道 6:A18(20-297),泳道 7:A22(22-297)和泳道 8:A10(10-297,阳性对照)。

[0027] 图 4 是由蛋白质印迹杂交得到的结果的照片,显示 Mab51 和 Mab53 与 EV71 亚基因型的交叉反应性。泳道 1:A(BrCr),泳道 2:B2(7423/MS/87),泳道 3:B4(HFM41),泳道 4:B5(NUH0083),泳道 5:C1(Y90-3761),泳道 6:C4(75-Yamagata),泳道 7:C5(3437/SIN/06),泳道 8:RG-C2(AF286504)。

[0028] 图 5 是由 CA16(在芬兰分离的,1994, U05876) 感染的 Vero 细胞与 Mab 抗 3D、Mab51、Mab53、Mab57 和 Mab4 的免疫荧光测定 (IFA) 得到的结果的照片。A-E:明视野和荧光显微术的合并图像。F-J:荧光显微术。

[0029] 图 6 是由 Mab51 的 IFA 得到的结果的照片,显示与 EV71 亚基因型的交叉反应性。如在每个图像的左上角所描绘的,Vero 细胞被 EV71 病毒毒株感染。

[0030] 图 7 是由 Mab53 的 IFA 得到的结果的照片,显示与 EV71 亚基因型的交叉反应性。如在每个图像的左上角所描绘的,Vero 细胞被 EV71 病毒毒株感染。

[0031] 图 8 是 Mab4 的 IFA 得到的结果的照片,显示与 EV71 亚基因型的交叉反应性。如在每个图像的左上角所描绘的,Vero 细胞被 EV71 病毒毒株感染 Vero 细胞。

[0032] 图 9 是 Mab57 的 IFA 得到的结果的照片,显示与 EV71 亚基因型的交叉反应性。如在每个图像的左上角所描绘的,Vero 细胞被 EV71 病毒毒株感染。

[0033] 图 10A 是对照小鼠 (AG129 ;用 EV71 感染激发) 脊髓的剖视图,箭头指示神经纤维网空泡形成和神经元损伤 (neuronal loss),前角中没有炎症 (原始放大倍率 100x)。

[0034] 图 10B 是图 10A 的高倍视图,显示神经纤维网空泡形成和神经元损伤,没有炎症 (原始放大倍率 400x)。

[0035] 图 11A 是受保护小鼠 (AG129 ;用 EV71 感染激发和用 Mab51 预防性保护) 脊髓的

剖视图,显示无显著病状(原始放大倍率 40x)。

[0036] 图 11B 是脊髓的剖视图,显示无显著病状(原始放大倍率 100x)。

[0037] 图 11C 是图 11A 的高倍视图,显示无显著病状(原始放大倍率 400x)。

具体实施方式

[0038] 为了方便,在本说明书中提到的参考文献以文献列表的形式列出并加在实施例的结尾。这些参考文献的全部内容在此通过引用的方式并入。

[0039] 定义

[0040] 为了方便,在本说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语集中于此。

[0041] 在此使用的术语“抗体”指的是与特异性表位结合的任何免疫球蛋白或完整分子以及其片段。这些抗体包括,但不限于,多克隆抗体,单克隆抗体,嵌合抗体,人源化抗体,单链抗体,整个抗体的 Fab、Fab'、F(ab)' 片段和 / 或 F(v) 部分。术语“单克隆抗体”可被称为“Mab”。例如,抗体“单克隆抗体 51”可以与“Mab51”可互换使用,并且其能够特异性地结合包括但不限于 SEQ ID NO:1 的表位的 EV71。所述抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体及其保持母源抗体的抗原结合功能的片段。同样地,抗体“Mab57”能够特异性地结合包括但不限于含有 EV71 的至少一种衣壳蛋白的构象表位的 EV71,并且所述抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体及其保持母源抗体的抗原结合功能的片段。同样,抗体“Mab53”能够特异性地结合包括但不限于 SEQ ID NO:1 的至少一个表位的 EV71,并且所述抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体及其保持母源抗体的抗原结合功能的片段。抗体“Mab4”能够特异性地结合包括但不限于至少一个表位的 EV71,并且包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体及其保持母源抗体的抗原结合功能的片段。

[0042] 在此所用的术语“抗体片段”指的是抗体全序列的保持母源抗体的抗原结合功能的不完全的或分离的部分。抗体片段的实例包括:Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双特异性抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。本发明包括 Mab51、Mab57、Mab53 和 Mab4 的片段,只要它们保持全长抗体的所需亲和力即可。特别是,其可以短至少一个氨基酸。例如,Mab51 的片段包含使其能够结合 EV71 的衣壳蛋白的 SEQ ID NO:1 的表位的抗原结合功能,Mab57 的片段包含使其能够结合 EV71 的衣壳蛋白的构象表位的抗原结合功能,Mab53 的片段包含使其能够结合 EV71 的衣壳蛋白的 SEQ ID NO:1 的表位的抗原结合功能,以及 Mab4 的片段包含使其能够结合 EV71 中的特异性表位的抗原结合功能。

[0043] 在此所用的术语“抗原”指的是促使抗体产生并能引起免疫反应的物质。其在本发明中可以与术语“免疫原”可互换使用。在严格意义上,免疫原是从免疫系统中诱出应答的那些物质,而抗原被定义为与特异性抗体结合的物质。抗原或其片段可以是和特定抗体接触的分子(即,表位)。当使用蛋白质或蛋白质的片段来使宿主动物免疫时,蛋白质的许多区域可以诱发抗体的生成(即,诱出免疫应答),所述抗体特异性地结合抗原(该蛋白质上的特定区域或三维结构)。抗原可以包括,但不限于,EV71 的衣壳蛋白和 / 或非结构蛋白。特别是,术语“表位”指的是形成抗体结合位点的约 5 个至约 13 个氨基酸的连续序列。以与 Mab 或结合蛋白结合的形式表位可为基本上缺乏三级结构的变性蛋白质。所述表位可以是构象表位。“构象表位”在此被定义为组成与免疫系统的受体直接接触的抗原的亚单位(通常,氨基酸)的序列。每当受体与未经消化的抗原相互作用的时候,如果蛋白质是未

卷绕的,则接触的表面氨基酸会是彼此不连续的。这些在三维构象中集合在一起并与受体的互补位相互作用的不连续的氨基酸被称为构象表位。相反,如果抗原被消化,则形成称作肽的小段,其与主要组织相容性复合物分子结合而后随后通过连成线的氨基酸与 T 细胞受体结合。这些被认为是线性表位。线性表位的非限定性实例是 SEQ ID NO:1 和 / 或 Mab4 结合的表位。

[0044] 术语“包含”在此被定义为当在实践本发明中可以结合地利用各种组分、成分或步骤时的情况。因此,术语“包含”涵盖更加限制性的术语“主要由...组成”和“由...组成”。

[0045] 如在此使用的,术语“衍生”指的是至少一种 EV71 表位的化学修饰。多核苷酸序列的化学修饰可以包括,例如,用烷基、酰基或氨基取代氢。衍生多核苷酸编码保持天然分子的至少一种生物学功能或免疫功能的多肽。衍生多肽是通过糖基化、聚乙二醇化或任何类似方法修饰的多肽,所述修饰的多肽保持衍生该修饰的多肽的多肽的至少一种生物学功能或免疫功能。

[0046] 在此使用的术语“人源化抗体”指的是至少一种抗体分子,在该抗体分子中,在非抗原结合区中的氨基酸序列被改变成使得所述抗体更加类似于人类抗体,并且仍然保持其原有的结合能力。

[0047] 在此使用的术语“杂交瘤”指的是已被工程化来大量产生所需抗体的细胞。例如,为了产生至少一种杂交瘤,从已用有关抗原激发的动物的脾中取出 B 细胞并使其与至少一种无限增殖化细胞融合。通过使细胞膜更容易透过进行这种融合。融合的杂交细胞(称作杂交瘤)将快速地且无限地繁殖,并且将产生至少一种抗体。杂交瘤的实例是保藏编号为 CBA20110004、CBA20110005、CBA20110006 或 CBA20110007 的细胞系。

[0048] 在此所用的“无限增殖化细胞”也被称为转化细胞 - 即,生长性质已被改变的细胞。这并不必然意味着这些细胞是“癌”细胞或“肿瘤”细胞(即,如果被引入到实验动物中则能够形成肿瘤),尽管在一些情况下它们可以做到。无限增殖化细胞系包括,但不限于,NS1, Jurkat, HeLa, HepG2, SP2/0, Hep-3b 等。

[0049] 术语 Mab 或相关结合蛋白的“免疫结合特性”,在全部其语法形式中,指的是 Mab 或结合蛋白对其抗原的特异性、亲和力和交叉反应性。

[0050] 术语“分离的”在此被定义为这样的生物组分(如核酸、肽或蛋白质),该生物组分已基本上与在天然产生该组分的生物体的细胞中的其他生物组分(即,其他的染色体的和染色体外的 DNA 和 RNA 以及蛋白质)分离生产出来或纯化出来。已由此分离的核酸、肽或蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包含通过在宿主细胞中的重组体表达制备的核酸、肽和蛋白质以及以化学方法合成的核酸。

[0051] 术语“中和性抗体”在此被定义为能够中和病原体在宿主中发起感染和 / 或使感染永久延续的能力的抗体。本发明提供了一种中和性的人单克隆抗体,其中,所述抗体识别来自 EV71 的抗原。

[0052] 在此所用的术语“样本”以其最广泛的意义被使用。被怀疑含有编码至少一种 EV71 衍生的肽或其片段的核酸或者 EV71 自身的生物样本可以包括体液、细胞提取物、染色体、细胞器或从细胞分离的膜、细胞;基因组 DNA、RNA 或 cDNA(在溶液中被结合到固体载体)、组织、组织印迹(tissue print)等。

[0053] 在此使用的术语“特异性结合(specific binding)”或“特异性地结合(specifically binding)”指的是在蛋白质或肽与激动剂、抗体或拮抗剂之间的相互作用。特别是,所述的结合在抗原与抗体之间。所述的相互作用取决于是否存在通过结合分子(即,抗原或表位)识别的蛋白质的特定结构。例如,如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含有游离的标记的A和抗体的反应中,含有表位A的多肽的存在或者游离的未标记的A的存在将减少与抗体结合的标记的A的数量。例如,Mab51和Mab53可以特异性地结合SEQ ID NO:1的线性表位,Mab57可以特异性地结合衣壳上的构象表位,以及Mab4可以特异性地结合线性表位。

[0054] 术语“对象”在此被定义为脊椎动物,特别是哺乳动物,更特别是人。出于研究目的,所述对象可以特别是至少一种动物模型,例如,小鼠、大鼠等。

[0055] 本领域技术人员将理解,可以根据本发明中给出的方法在没有付出过多实验的情况下实现本发明。方法、技术和化学试剂与在给出的参考文献中或者来自标准生物技术和分子生物学教科书中的描述相同。

[0056] 根据第一个方面,本发明提供了分离的单克隆抗体和特异性地结合EV71的相关结合蛋白,其。单克隆抗体还被称为“Mabs”,可以是可由单一抗体产生细胞诱导出来的基本上同种的抗体种群。因此,在该种群中的全部抗体可以是相同的并且可以具有针对特定表位的相同特异性。Mab应答的特异性为有效的诊断剂提供了基础。单克隆抗体和由其衍生的结合蛋白还具有作为治疗剂的效用。

[0057] 根据本申请的任一方面的抗体提供了至少一种抗EV71抗体,所述抗体能够中和EV71感染和抑制细胞间播散。这些根据本申请的任一方面的抗体可被用于治疗EV71和EV71相关疾病的预防剂和/或治疗剂。

[0058] 特别是,免疫球蛋白M亚类的分离的单克隆抗体或其片段可以是能够特异性地结合EV71的至少一个表位的中和性单克隆抗体或其片段。所述表位可以是SEQ ID NO:1的线性表位,或者可以是构象表位。所述构象表位可以是完整病毒衣壳。更特别地,所述衣壳蛋白可以是VP1、VP2VP3、VP4和/或VP0前体。

[0059] 根据一个实施方式,所述抗体可以基本上具有单克隆抗体Mab51的免疫结合特性。特别是,所述抗体可以选自:

[0060] (a) 由杂交瘤细胞系CBA20110005产生的抗体;

[0061] (b) 具有由杂交瘤细胞系CBA20110005产生的抗体的结合特性的抗体;和

[0062] (c) 与能够结合由杂交瘤细胞系CBA20110005产生的抗体的抗原结合的抗体。

[0063] 根据另一个实施方式,所述抗体可以基本上具有单克隆抗体Mab57的免疫结合特性。特别是,所述抗体可以选自:

[0064] (a) 由杂交瘤细胞系CBA20110007产生的抗体;

[0065] (b) 具有由杂交瘤细胞系CBA20110007产生的抗体的结合特性的抗体;和

[0066] (c) 与能够结合由杂交瘤细胞系CBA20110007产生的抗体的抗原结合的抗体。

[0067] 这些抗体可以能够阻断病毒在宿主体内传播的机理。它们有效地中和无细胞的病毒颗粒并抑制病毒的直接的细胞间播散。因为抗体特异性地结合对病毒存活是必要的EV71的高度保守的表位(例如VP1的SEQ ID NO:1和完整病毒衣壳的构象表位),所以耐药性的发展是最不太可能的。本发明的这些抗体提供了多种优点,包括能够用作HFMD的药物或疫

苗。

[0068] 特别是,根据本发明的任一方面的抗体可以在杂交瘤上清液或腹水流体中大量得到、制备。使用根据本发明的任一方面的任一种杂交瘤细胞系,还可以得到单克隆抗体的恒定且可再生的来源。所定义的根据本发明的任一方面的抗体的表位还使得其病毒中和能力的机理研究容易进行。使用本领域中已知的任何方法,还可以容易地通过亲和色谱法纯化这些抗体,例如,但不限于,可以使用在Li,Mao et al.,2009中公开的方案纯化根据本发明任一方面的抗体。

[0069] 在一个实施方式中,根据本发明的任一方面的中和性抗体可以导致完全防止遭受EV71的细胞病变效应(CPE)。这些抗体可以能够有效地在体内保护免受EV71感染。这些抗体的效能和特异性示于实施例中。

[0070] 在一个实施方式中,根据本发明的中和性抗体结合SEQ ID NO:1的EV71的VP1的表位。所述表位的该区可以是高度保守的而因此很少出现突变。

[0071] 在另一个实施方式中,根据本发明的中和性抗体结合EV71的至少一个构象表位。这是有利的,原因在于表位通常天然以三维构象形式存在,并且所述抗体可以因此更高效和有效地检测EV71的存在和/或随后中和EV71的作用。这些抗体可以因此能够结合和识别病毒抗原,而无需进行在前的组织切片处理。所述构象表位可以包含至少一种衣壳蛋白和/或至少一种非结构蛋白。所述衣壳蛋白可以是完整病毒衣壳蛋白。所述衣壳蛋白可以包括选自VP1、VP2VP3、VP4和VP0前体中的一种或多种蛋白质。

[0072] 特别是,根据本发明的任一方面的抗体可以包含单克隆抗体Mab51或Mab57的免疫结合特性。Mab51的这些免疫结合特性是由杂交瘤Mab51产生的,杂交瘤Mab51根据布达佩斯条约的规定于2011年7月27日由澳大利亚细胞库(214Hawkesbury Road,Westmead NSW2145,澳大利亚)保藏,分配的保藏编号为CBA20110005。Mab57的这些免疫结合特性是由杂交瘤Mab57产生的,杂交瘤Mab57根据布达佩斯条约的规定于2011年7月27日由澳大利亚细胞库(214Hawkesbury Road,Westmead NSW2145,澳大利亚)保藏,分配的保藏编号为CBA20110007。所述杂交瘤提供了本发明的mAbs和结合蛋白的连续来源。

[0073] 根据另一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体或其片段,所述分离的单克隆抗体或其片段可以能够特异性地结合至少一个线性表位。特别是,所述表位可以为SEQ ID NO:1或Mab4特异性地结合的表位或其片段。根据本发明的任一方面的抗体可以能够识别整个EV71病毒谱并且同时和/或可以能够区分EV71感染和CA16感染。这些抗体可以是高特异性和灵敏性的。

[0074] 特别是,根据本发明的一个方面的抗体可以包含单克隆抗体Mab53或Mab4的免疫结合特性。Mab53的这些免疫结合特性是由杂交瘤Mab53产生的,杂交瘤Mab53根据布达佩斯条约的规定于2011年7月27日由澳大利亚细胞库(214Hawkesbury Road,Westmead NSW2145,澳大利亚)保藏,分配的保藏编号为CBA20110006。所述杂交瘤提供了本发明的Mab53和结合蛋白的连续来源。Mab4的这些免疫结合特性是由杂交瘤Mab4产生的,杂交瘤Mab4根据布达佩斯条约的规定于2011年7月27日由澳大利亚细胞库(214Hawkesbury Road,Westmead NSW2145,澳大利亚)保藏,分配的保藏编号为CBA20110004。所述杂交瘤提供了本发明的Mab4和结合蛋白的连续来源。

[0075] 根据本发明的一个方面的抗体可以选自:

[0076] (a) 由杂交瘤细胞系 CBA20110006 或 CBA20110004 产生的抗体；

[0077] (b) 具有由杂交瘤细胞系 CBA20110006 或 CBA20110004 产生的抗体的结合特性的抗体；和

[0078] (c) 与能够结合由杂交瘤细胞系 CBA20110006 或 CBA20110004 产生的抗体的抗原结合的抗体。

[0079] 根据本发明的任一方面的抗体可以能够识别任何基因型的 EV71。特别是，所述抗体可以能够识别选自 A、B1、B2、B3、B4、B5、C1、C2、C3、C4 和 C5 中的基因型的 EV71。

[0080] 本发明的 Mabs 可以由任何通过培养连续细胞系生产抗体分子的技术生产。这些方法包括，但不限于，Kohler 和 Milstein 在 1975 年最初开发的杂交瘤技术，以及三源杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和用于生产人单克隆抗体的 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等人, 1985)。可以使用人抗体并且可以通过人杂交瘤得到人抗体 (Cote 等人, 1983)。

[0081] 可以使用为通过将适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与适当生物学活性的人抗体分子的基因剪接在一起生产“嵌合抗体”而开发的技术 (Morrison, et al., 1984 在此通过引用的方式全部并入本文中)。例如，可以将小鼠抗体分子 (如 Mab51、Mab57、Mab53 或 Mab4) 的基因与适当生物学活性的人抗体分子的基因剪接在一起。嵌合抗体是一种分子，其中，不同的部分是由不同的动物种类得到的，例如，具有从鼠科 Mab 得到的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些嵌合抗体。嵌合抗体还是含有人 Fc 部分和鼠科 (或其他非人) Fv 部分的那些嵌合抗体。

[0082] 为了生产人源化抗体，已经开发了一些技术 (例如，US5, 585, 089 和 / 或 US5, 225, 539, 在此将其通过引用的方式全部并入本文中)。免疫球蛋白轻或重链可变区由三个高变区 (称为互补性决定区 (CDR)) 中断的“框架”区组成。简言之，人源化抗体是来自非人动物物种的抗体分子，其具有来自非人动物物种的一个或多个 CDR 和来自人免疫球蛋白分子的框架区。嵌合抗体和人源化抗体两者都可以是单克隆的。对于在人类疾病或病症的体内诊断和治疗中的用途，这些人或人源化嵌合抗体是优选地。

[0083] 包含抗体分子的个体基因型的抗体片段可以通过已知技术产生。例如，该抗体片段可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化而产生；Fab 片段可以通过还原 F(ab)2 片段的二硫键而产生，以及可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而产生的 Fab 片段。该抗体片段可以由任一本发明的多克隆或单克隆抗体中的任一种产生。

[0084] 在抗体生产过程中，可以通过本领域中已知的技术实现对所需的抗体的筛选。例如，这些技术可以包括，但不限于，放射免疫测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀素反应，免疫扩散测定、原位免疫测定 (使用胶态金、酶、放射性同位素标记等)、蛋白质印迹、沉淀反应、凝集测定 (凝胶凝集测定、血细胞凝集测定等)、免疫荧光测定、免疫电泳测定等。例如，可以通过检测第一抗体上的标记来检测抗体结合。在另一个实施例中，可以通过检测第二抗体或其他试剂与第一抗体的结合来检测第一抗体。第二抗体可以被标记。

[0085] 在至少一种诊断和 / 或治疗能力中，为了提高体内 EV71 的靶向，可以用至少一种放射性核素和 / 或荧光染料标记所述抗体。例如，可以使用通过正电子发射断层摄影 (PET) 检测 EV71。用放射性核素标记的抗体可以确保更好地靶向 EV71 以进行检测和 / 或治疗。所述抗体可以进一步用至少一种用于治疗 EV71 的药、抗病毒药和 / 或毒素标记。特别是，

所述抗体可以以高度特异性被用于将药递送到受感染细胞以抑制病毒感染。所述的药可以包括,但不限于,利巴韦林和其他有效的EV71感染抑制剂(如牛或人乳铁蛋白等)。连接有至少一种抗病毒的发明的抗体可以增加所述药对EV71感染的细胞的可用性,其可以提高所述药的功效并且还可以减少通常由抗病毒药引起的副作用。这样可以导致可能减少与EV71感染相关的其他并发症的用于EV71的新疗法。

[0086] Mab51、Mab57、Mab53 或 Mab4 可以连接有至少一种可追踪剂并且可以潜在地用于在体外或在体内定量EV71感染的细胞。所述的可追踪剂可以是任何可追踪的生物或化学组分。所述的可追踪剂可以包括,但不限于,环境因子,血液标记,抗原,杀虫剂,药,化学品,毒素,PCBS,PBBS,铅,神经毒素,血液电解液,代谢物,分析物,NA⁺,K⁺,CA⁺,尿素氮,肌酸酐,生化血液标记和组分,ChE,AChE,BuChe,肿瘤标记,PSA,PAP,CA125,CEA,AFP,HCG,CA19-9,CA15-3,CA27-29,NSE,羟基丁酸盐,乙酰乙酸盐,抗疟药(如阿莫地喹、蒿甲醚、青蒿素、蒿琥酯、阿托伐醌、辛可宁、辛可尼定、氯喹、多西环素、卤泛群、甲氟喹、伯氨喹、乙胺嘧啶、奎宁、奎尼丁和磺胺多辛);抗生素(如氨苄西林、阿奇霉素、多西环素、红霉素、青霉素和四环素);抗逆转录病毒药(如阿巴卡韦、阿德福韦、去羟肌苷、恩替卡韦、茚地那韦、拉米夫定、奈韦拉平、瑞莫夫韦(remofovir)、利托那韦、沙奎那韦、替比夫定(telbivudine)、替诺福韦、扎西他滨和齐多夫定)。

[0087] 根据本发明的任一方面的抗体可被用在本领域中已知的与检测和定位EV71相关的方法中。例如,这些方法可以包括,但不限于,蛋白质印迹、ELISA、放射免疫测定、免疫荧光测定、免疫组织化学测定等。根据本发明的任一方面的检测和/或定量的方法可以是非侵入的方法并且还可以用于研究EV71的几个免疫方面。

[0088] 特别是,本发明提供了一种检测和/或定量对象中至少一种EV71感染的细胞的存在和分布的方法,所述方法包括:

[0089] a. 使至少一种根据本发明的任一方面的抗体或其片段与从至少一个对象得到的至少一个样本接触;和

[0090] b. 检测和定量所述抗体与EV71感染的细胞的结合。

[0091] 检测步骤可以包括使所述样本与包含或结合可检测元素的结合蛋白接触。特别是,根据本发明的任一方面的抗体可被固定到固体表面上。更特别地,所述结合蛋白可以包含放射性原子,可以结合荧光分子,或者可以结合酶。

[0092] 本发明还包括用于定性和定量测定EV71的测定和测试试剂盒。根据所选方法,例如,"竞争"、"夹心"、"DASP"等,该试剂盒可以至少包含根据本发明的任一方面的Mab或相关结合蛋白、用于检测生物样本中Mab或相关结合蛋白与EV71的免疫特异性结合的工具以及使用说明书。所述试剂盒还可以包含阳性和阴性对照。它们可被配置用于与自动分析器或自动免疫组织化学玻片染色仪器一起使用。

[0093] 特别是,本发明的测定试剂盒可以进一步包含可被标记或可被设置用于附着在固体载体上(或者被附着到固体载体上)的第二抗体或结合蛋白。该抗体或结合蛋白可为,例如,与EV71结合的抗体或结合蛋白。该第二抗体或结合蛋白可为多克隆或单克隆抗体。

[0094] 在检测和/或中和EV71的作用中,Mab51、Mab57、Mab53 或 Mab4 是高度有效的。可以将它们单独和/或一起用于EV71的高效和有效的早期检测。根据本发明的任一方面的抗体为检测EV71提供了方便、高特异性和灵敏性的工具。一种这样的工具是ELISA形式。

Mab51、Mab57、Mab53 或 Mab4 中的每一个都可被单独或组合用作捕获抗体。如果单独使用，则所选的抗体可被用作捕获抗体，而结合有辣根过氧化物酶 (HRP) 的相同抗体可被用作检测抗体。

[0095] 其他的检测 EV71 病毒的免疫方法包括，例如，斑点印迹和原位杂交。

[0096] 根据另一个方面，本发明提供了至少一种治疗和 / 或预防 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的方法，所述方法包括向需要该治疗和 / 或预防的对象施用至少一种根据本发明的任一方面的抗体或其片段。本发明的抗体可以与靶向不同 EV71 表位的其他相似抗体联合施用。因此所述病毒会没有机会适应该治疗形式。

[0097] 根据另一个方面，本发明提供了用于医药中的至少一种根据本发明的任一方面的抗体或其片段。

[0098] 根据再一个方面，本发明提供了根据本发明的任一方面的抗体或其片段用于制备治疗 EV71 和 / 或至少一种 EV71 相关疾病的药物的至少一种用途。述 EV71 相关疾病包括，但不限于，无菌性脑膜炎、脑炎、脑神经麻痹、格林 - 巴利综合征、脊髓灰质炎样综合征和手足口病等。

[0099] 根据又一个方面，本发明提供了至少一种药物组合物，所述药物组合物包含根据本发明的任一方面的抗体和药学上可接受的载体。

[0100] 根据本发明的任一方面的 EV71mAbs 作为诊断工具优于其他当前方法。例如，所述 mAbs 对 EV71 具有高度特异性，这在病毒学领域中仍然是没有充分理解的。这种高度特异性 mAbs 表现了在 EV71 诊断领域中的突破。根据本发明的任一方面的 mAbs 可以识别全部或者基本上全部的 EV71 基因型。这些 mAbs 还提供了一种安全和方便地检测 EV71 的诊断方法。所述抗体可用于诊断以及用于制备用于治疗的重组抗体，并且同样地在抑制潜在的 EV71 爆发中将是非常有用的工具。

[0101] 此外，虽然存在分型方法，但是仍然需要能够用在诊断测定法中来快速和准确区分 EV71 和 CA16 并且能够用于特异性地识别 EV71 的毒株的试剂。根据本发明的任一方面的 mAbs 可以快速和准确地识别 EV71 的毒株和 / 或区分 EV71 和 CA16。这些试剂和方法将允许临床医师提高处理大量临床样本的速度和精确度。这些试剂和方法还将帮助临床医师进行病人管理，排除不必要的测试，提高诊断和预后的速度和精确度，帮助控制 EV71 感染，以及减少不必要的抗生素的使用。根据本发明的任一方面的 Mabs 可以用于直接检测水疱或口腔拭子中的病毒颗粒。

[0102] 现已主要描述了本发明，通过参照下列实施例将更加容易理解本发明，下列实施例以举例说明的方式被提供，并不意欲限制本发明。

[0103] 本领域技术人员将理解，可以根据本发明中给出的方法在没有付出过多实验的情况下实现本发明。方法、技术和化学试剂的描述在给出的参考文件中或者来自标准生物技术和分子生物学教科书中。

[0104] 实施例

[0105] 在 Sambrook 和 Russel 的分子克隆：实验指南（冷泉港实验室，纽约（2001））中主要描述了本领域中已知的标准生物学技术，在下文中不再具体描述。

[0106] 实施例 1

[0107] 由完整 EV71 病毒制备和纯化 Mab51、Mab57、Mab53 或 Mab4。

[0108] 分泌特异性 Mabs 的杂交瘤由已用在 0.1ml PBS 中的纯化 EV71-B5 毒株（经等体积的佐剂 (SEPPIC, France) 乳化）肌内免疫两次的 BALB/c 小鼠得到。在将脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞（购自 ATCC）融合前三天给予相同剂量病毒的腹膜内辅助注射。通过有限稀释克隆经鉴定产生特异性抗体的杂交瘤，并在 75cm² 烧瓶中扩充。一周后，收获杂交瘤悬浮液并通过以 400g 离心 10 分钟而使细胞碎片沉淀，接着收集上清液并在 -20℃ 贮藏。用分光光度测量测定 Mab 浓度 (Nanodrop, DE, USA)。

[0109] 抗原捕获 ELISA

[0110] 用在 100 μl 的碳酸盐缓冲液 (73mM 碳酸氢钠和 30mM 碳酸钠, pH9.7) 中的 500ng⁻¹ μg/孔的捕获抗体涂布 96 孔圆底微量滴定板 (Nunc, Roskilde, Demark) 在 4℃ 过夜或者在 37℃ 2 小时。将该板用 PBST 冲洗两次，接着在用抗体或抗原各自孵育之后用 PBS 冲洗两次。在室温下用 100 μl 封闭缓冲液（含有 5% 奶的 PBS）封闭涂有抗体的板 1 小时，而后在 37℃ 用在 PBST 中稀释的 100 μl 的含病毒样本孵育 1 小时。通过在 37℃ 用 100 μl 的结合有辣根过氧化物酶的检测 MAb（内部 (in-house) 标记; Pierce）孵育 1 小时来检测病毒结合。通过加入 100 μl 的新鲜制备的底物溶液（邻苯二胺二氢氯化物; Sigma）介导色原体显影。通过加入 0.1N 硫酸终止反应，并在 490nm 记录光密度。检出限被确定为给出 3 的信噪比的光密度值。

[0111] 实施例 2

[0112] Mab51 和 Mab53 的特征描述

[0113] 如使用同种型分型试剂盒 (GE) 所鉴定的, Mab51 和 Mab53 分别属于 IgM 和 IgG 亚类。如图 1 所示, Mab51 和 Mab53 能够检测如蛋白质印迹所示的被感染的 Vero 细胞中的 EV71 病毒蛋白质表达。如图 1 所示, C4 毒株的蔗糖梯度纯化的 EV71 病毒颗粒的蛋白质印迹显示 Mab51 和 Mab53 对 VP1 具有特异性。

[0114] Mab51 和 Mab53 的表位作图

[0115] 为了描述 Mab51 和 Mab53 表位的特征, 将 VP1 蛋白分段成 GST- 标记的连续重叠的肽段并且克隆到 pGex-4T-1 载体中并在大肠杆菌 (E. coli) BL21 细胞中表达并分别使用 Mab51 和 Mab53 在蛋白质印迹中进行测试。片段长度的逐渐减小导致识别出 Mab51 和 Mab53 的线性表位, 其被绘制到 VP1 蛋白的第 215-219 位氨基酸。如图 2 所示, 最小表位由五个氨基酸 KQEKD (SEQ ID NO:1) 组成。

[0116] Mab4 的表位作图

[0117] 为了描述 Mab4 表位的特征, 将 VP1 蛋白分段成 GST- 标记的连续重叠的肽段并且克隆到 pGex-4T-1 载体并在大肠杆菌 (E. coli) BL21 细胞中表达并使用 Mab4 在蛋白质印迹中进行测试。结果示于图 3 中。VP1 衣壳蛋白被表达为八个 C- 末端截短的蛋白质。全部八个携带完整 N- 末端序列的片段被 Mab4 识别。因此, Mab4 的表位被定位在 VP1 蛋白的 N- 末端区域。特别是, 如图 3 所示, Mab4 的表位被发现在第 1-66 位氨基酸内。接着, 如在图 3A 中所示的片段 A 蛋白质被表达为用 A10、A24、A32 和 A48 表示的四个 N- 末端截短的蛋白质。从图 3B 中显示的蛋白质印迹结果可以看出, Mab4 仅能够识别包含第 10-297 位氨基酸残基的 A10 片段。这说明 Mab4 的表位在第 10-24 位氨基酸内。

[0118] 表达另一组 N- 末端截短的蛋白质, 同时对于每个连续的蛋白质缺失 2 个氨基酸。如在图 3C 中所示, 从印迹中可以看出, 只有 A12 能够被识别。这说明所述表位应当开始于

第 12 或 13 位氨基酸,这是因为 A14 不能被 Mab4 识别。因此, Mab4 的推定表位应当为第 12-17 位氨基酸 (IGDSVS) 或第 13-18 位氨基酸 (GDSVSR)。然而,为了确认 Mab4 的表位,这些推定表位必须表达为带有 GST 标签以用 Mab4 测试其免疫反应性。

[0119] 实施例 3

[0120] 通过蛋白质印迹检测 Mab51 和 Mab53 对 EV71 亚基因组 (subgenogroup) 的特异性

[0121] 为了证实病毒颗粒中 SEQ ID NO:1 表位蛋白质的存在,来自不同的 EV71 亚基因组的病毒颗粒进行蔗糖纯化。ECL 试剂用于显影。用病毒感染 RD 细胞,并且在 48 小时之后当超过 90% 的细胞显示细胞病变效应时,收集上清液。通过澄清旋转和经由 0.2 μ m 截止过滤器的微孔过滤移除细胞碎片,接着通过在 100'000g 下超旋转 3 小时进行浓缩。在 27'000g 下于 20% 至 60% 蔗糖梯度中离心 3 小时来纯化病毒颗粒。检测几个带并且收集在 40 至 60% 蔗糖弯月面 (sucrose meniscus) 中的病毒带。如图 4 所示,进行分别使用 Mab51 和 Mab53 作为第一抗体的蛋白质印迹并且在病毒部分中检测 SEQ ID NO:1 蛋白质带。

[0122] 实施例 4

[0123] 进行使用 Mab 抗 3D、Mab51、Mab53、Mab57 和 Mab4 免疫荧光测定 (IFA) CA16 (在芬兰分离的,1994, U05876) 受感染的非洲绿猴肾细胞 (vero) 细胞。结果示于图 5 中。可以看出,所述抗体 (Mab51、Mab53、Mab57 和 Mab4) 都没有识别 CA16 的存在。

[0124] 为了确证表位的突变分析中的发现,用来自不同的亚基因组的野生型 EV71 感染 (vero) 并进行 IFA。在表 1 中提供所选的毒株。

[0125]

名称	亚基因型	NCBI (保藏编号)
BrCr	A	U22521
RG EV71-VP1 (B1)	B1	AF135901
7423/MS/87	B2	ETU22522
RG EV71-VP1 (83)	B3	AF376093
HFM41	B4	
NUH0083	B5	FJ461781
Y90-3761	C1	AB433864
NUH0075	C2	FJ172159
RG EV71-VP1 (C3)	C3	AY125973
75-Yamagata	C4	AB177813
RG EV71Fuyang/02/2008	C4	EU703813
3437/SIN/06	C5	GU222654

[0126] 表 1. 在 IFA 中用于感染 Vero 细胞的 EV71 的亚基因型

[0127] 全部测试毒株均被 Mab51 (如图 6 所示)、Mab53 (如图 7 所示) 和 Mab4 (如图 8 所示) 肯定地识别。在测定中使用 FITC 标记的第二抗体。Mab51、Mab53 和 Mab4 可以因此被用作作用于 EV71 的通用检测抗体。

[0128] 使用本领域中已知的体外微量中和法证实 Mab57 和 Mab53 抗 EV71 亚基因型的中和结果。结果示于下表 2 中。Mab51 在 EV71 的全部亚基因型的体外微量中和中呈阳性。并且稀释滴定度最高至 1:1024。Mab57 在 EV71 的一些不同的亚基因型 (B4、B5、C1、C2、C3 和 C5) 的体外微量中和中呈阳性。并且稀释滴定度最高至 1:4096。

[0129]

腹水	A	RGB1	B2	RGB3	B4	B5	C1	C2	RGC3	C4	C5
#51	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ¹⁰
#57	-	-	-	-	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹¹	-	2 ¹²

[0130] 表 2. 用 mAb 对 EV71 的不同的亚基因型进行体外微量中和

[0131] - :无活性

[0132] 实施例 5

[0133] 通过使用 AG129 小鼠 (B&K Universal Ltd, HILL, UK) 进行本实验。

[0134] 在用 107 空斑形成单位 (PFU) 的 EV71 毒株 HFM41 致死激发前一天用 Mab51 以 10 μg/g 体重注射 2 周龄 AG129 小鼠。

[0135] 在致死激发前用不相关的小鼠 IgM 抗体 (同种型对照) 注射对照组。当接受同种型抗体的对照动物早在感染后第 6 天发展成严重的肢体麻痹时,用 Mab51 预处理 (预防性研究) 的小鼠在整个实验过程中没有显示出任何疾病表现并保持健康。2 周龄免疫缺陷 AG129 小鼠可被非小鼠适应的 EV71 毒株 HFM41 经由腹膜内途径接种而感染,而抗 EV71 抗体 Mab51 以 10 μg/g 体重的剂量能够赋予 100% 的免受致死 EV71 激发的保护。

[0136] 结果示于下表 3 以及图 10 和 11 中。图 10 显示了脊髓的截面,箭头指示在用 EV71 感染激发的 AG129 小鼠中的前角中神经纤维网空泡形成和神经元损伤,同时没有炎症。图 11 显示了当对用 EV71 感染激发的 AG129 小鼠给予使用 Mab51 的预防性保护时显示无显著病状的脊髓的截面。

[0137] Mab51 因此能够赋予免受 EV71 感染的保护并且使其免于受感染小鼠的全部病例变化。

[0138]

	同种型对照	预防性研究
抗体处理	激发前 24 小时同种型 IgM (100 μ g)	激发前 24 小时抗体(100 μ g)
动物数量	10	10
随着天数的存活 (感染后 9 天)	第 7 天: 2 只死亡 第 8 天: 4 只死亡	无死亡

[0139] 表 3. 与同种型对照组的预防性研究的总结

[0140] 参考文献

[0141] 1. Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy Alan R. Liss, Inc., pp77-96(1985)

[0142] 2. Cote et al., (1983)Proc. Nat=l. Acad. Sci. U. S. A., 80:2026-2030.

[0143] 3. Dwyer, J. M. (1992). N Engl J Med326(2):107-16.

[0144] 4. Hovi, T. and M. Roivainen(1993). J Clin Microbiol31(5):1083-7.

[0145] 5. J. L., M. (1996). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echovirus es and new enteroviruses. USA, Lippincott-Raven publishers.

[0146] 6. Kohler and Milstein(1975)Nature256:495-497.

[0147] 7. Li, X., C. Mao, et al. (2009). Biochem Biophys Res Commun390(4):1126-8.

[0148] 8. Morrison, et al., (1984)Proc Natl Acad Sci U S A. 81(21):6851-5.

[0149] 9. Sambrook and Russel, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York(2001).

[0150] 10. Shih, S. R., Y. S. Li, et al. (2000). J Med Virol61(2):228-34.

[0151] 11. US5, 585, 089

[0152] 12. US5, 225, 539

[0153] 13. Wang, S. Y., T. L. Lin, et al. (2004). J Virol Methods119(1):37-43.

[0001]

序列表

<110> 淡马锡生命科学实验室有限公司

<120> 肠道病毒 71 型的特异性抗体及其用途

<130> IP14-0166-XC12

<150> SG201106807-9

<151> 2011-09-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 肠道病毒 71 型

<400> 1

Lys Gln Glu Lys Asp

1 5

[0001]

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 FP6123	国际申请号 PCT/SG2012/000344
-------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明
(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A.对说明书第 3 页, 第 25 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>
保藏单位名称澳大利亚细胞库	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145 澳大利亚	
保藏日期 2011-07-27	保藏号 CBA20110006
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
无	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
无	

由受理局填写
<input checked="" type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员 授权官员签名

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 3 页, 第 11 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>	
保藏单位名称澳大利亚细胞库	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145 澳大利亚	
保藏日期 2011-07-27	保藏号 CBA20110005
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
无	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
无	
微生物保藏(3)	
A.对说明书第 3 页, 第 25 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>	
保藏单位名称澳大利亚细胞库	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145 澳大利亚	
保藏日期 2011-07-27	保藏号 CBA20110004
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	

无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
无	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）	
无	
微生物保藏(4)	
A.对说明书第 <u>3</u> 页，第 <u>11</u> 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/>
保藏单位名称澳大利亚细胞库	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145 澳大利亚	
保藏日期 2011-07-27	保藏号 CBA20110007
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
无	
E.补充说明（必要时）	

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）
无

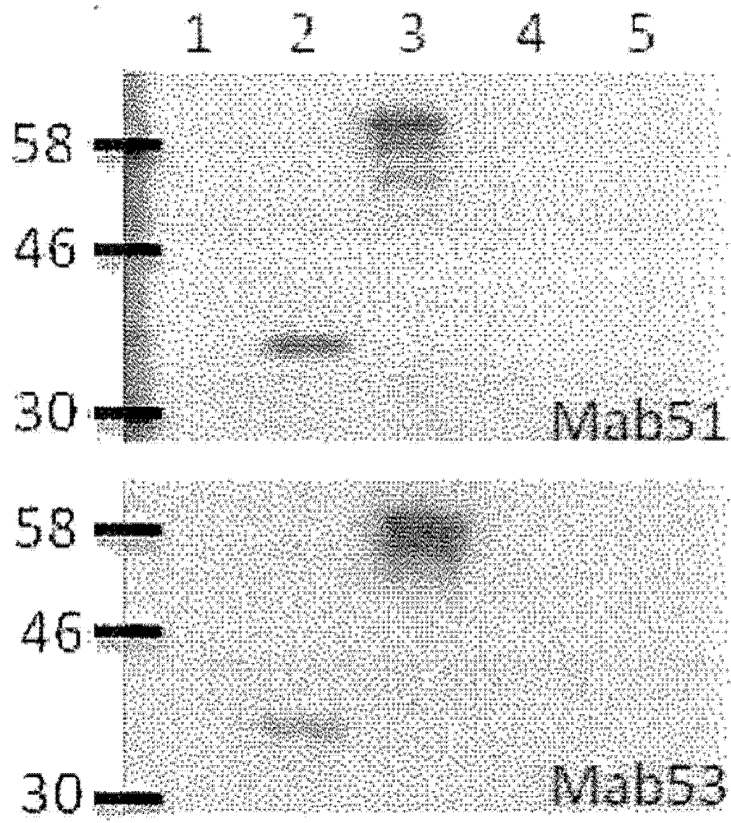


图 1

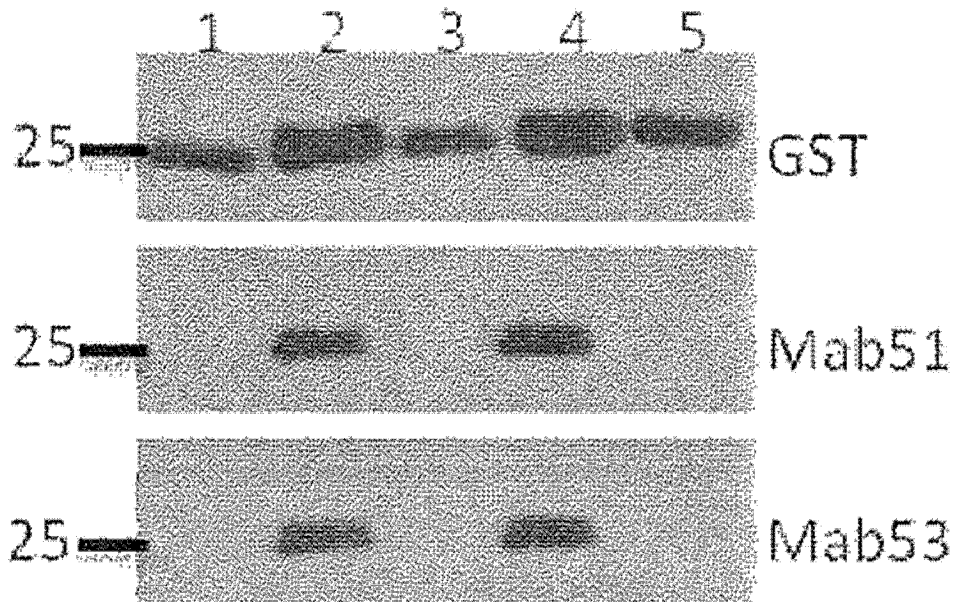
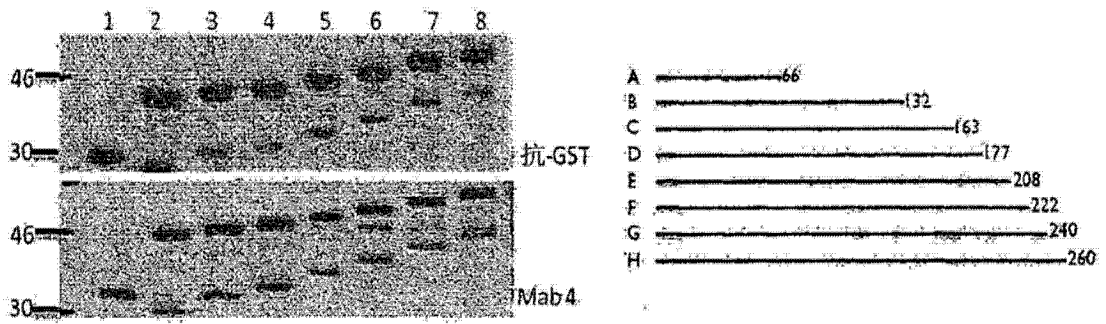
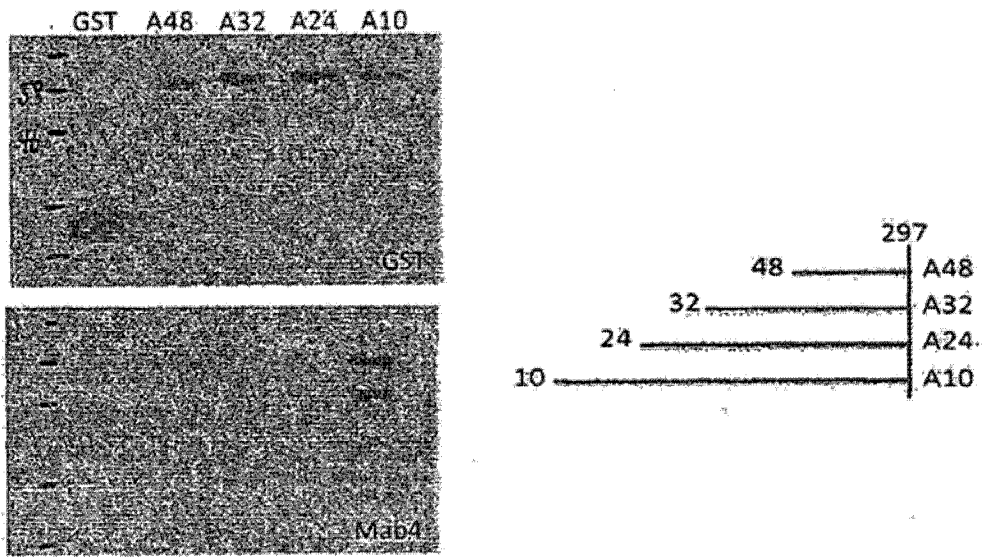


图 2

A



B



C

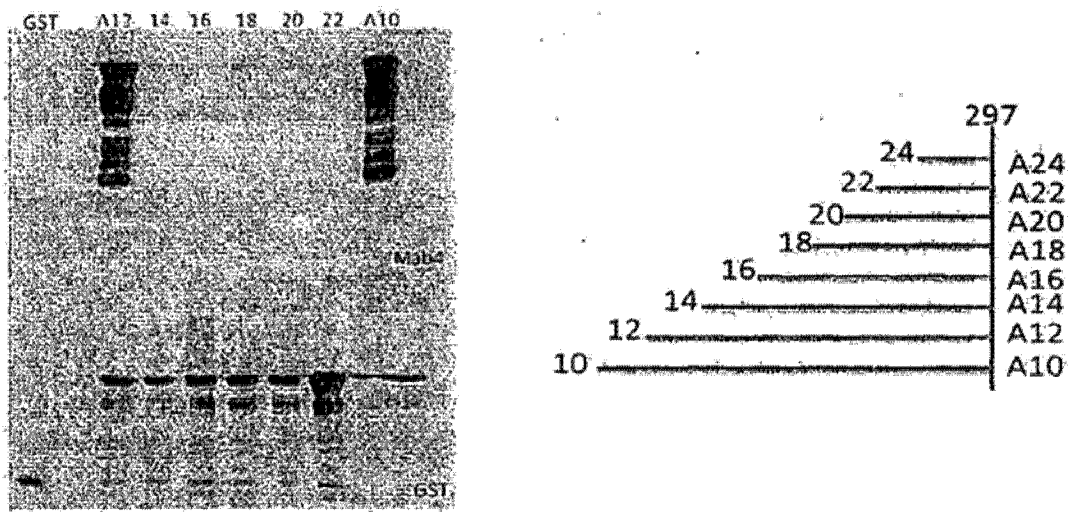


图 3

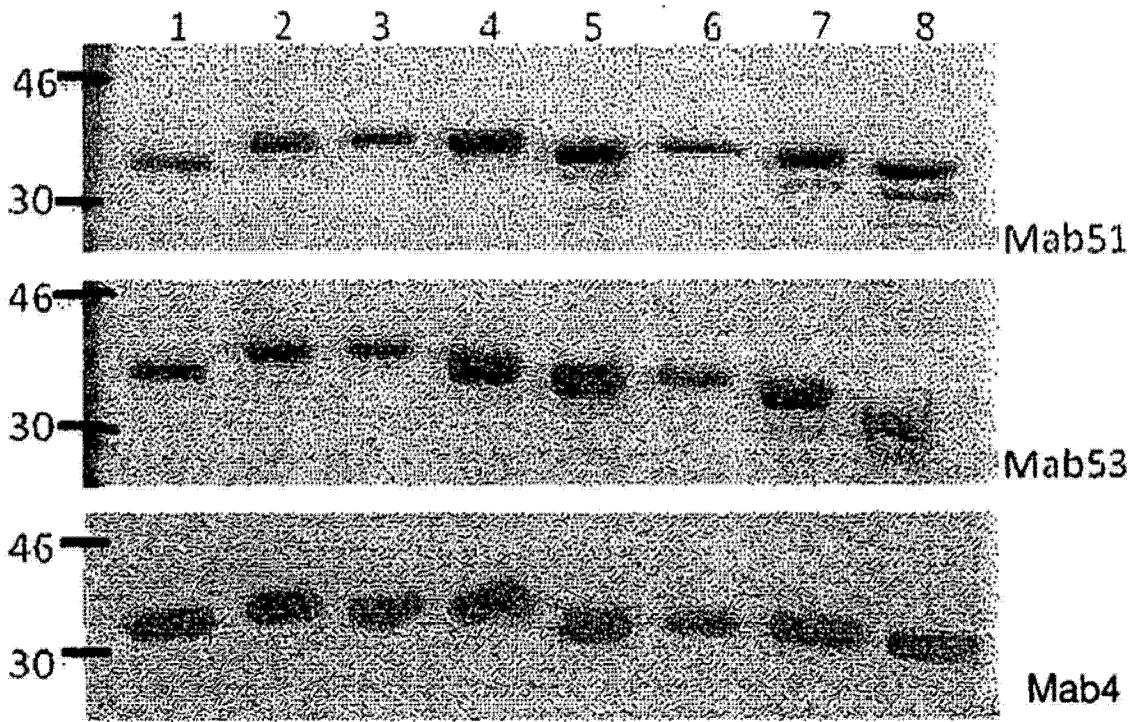


图 4

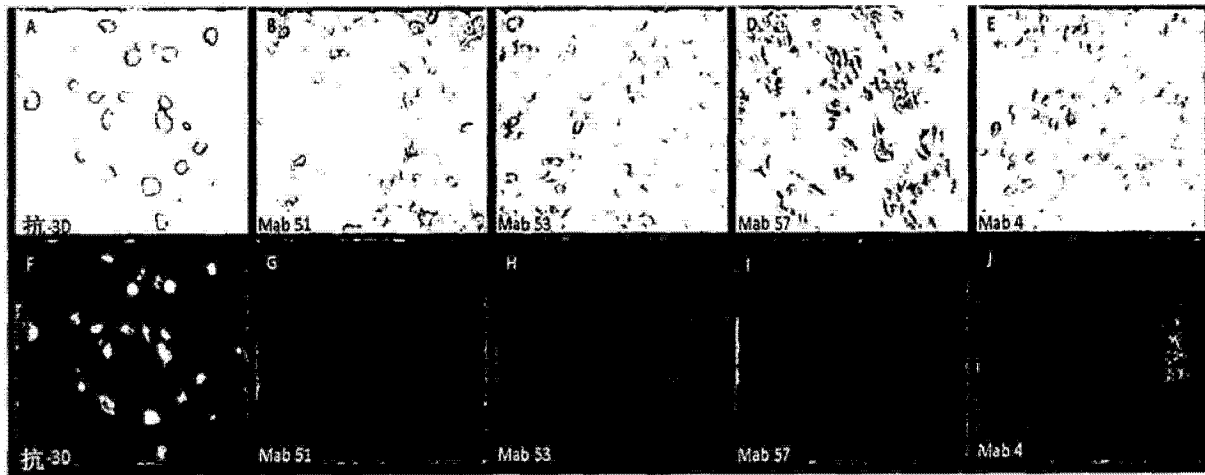


图 5

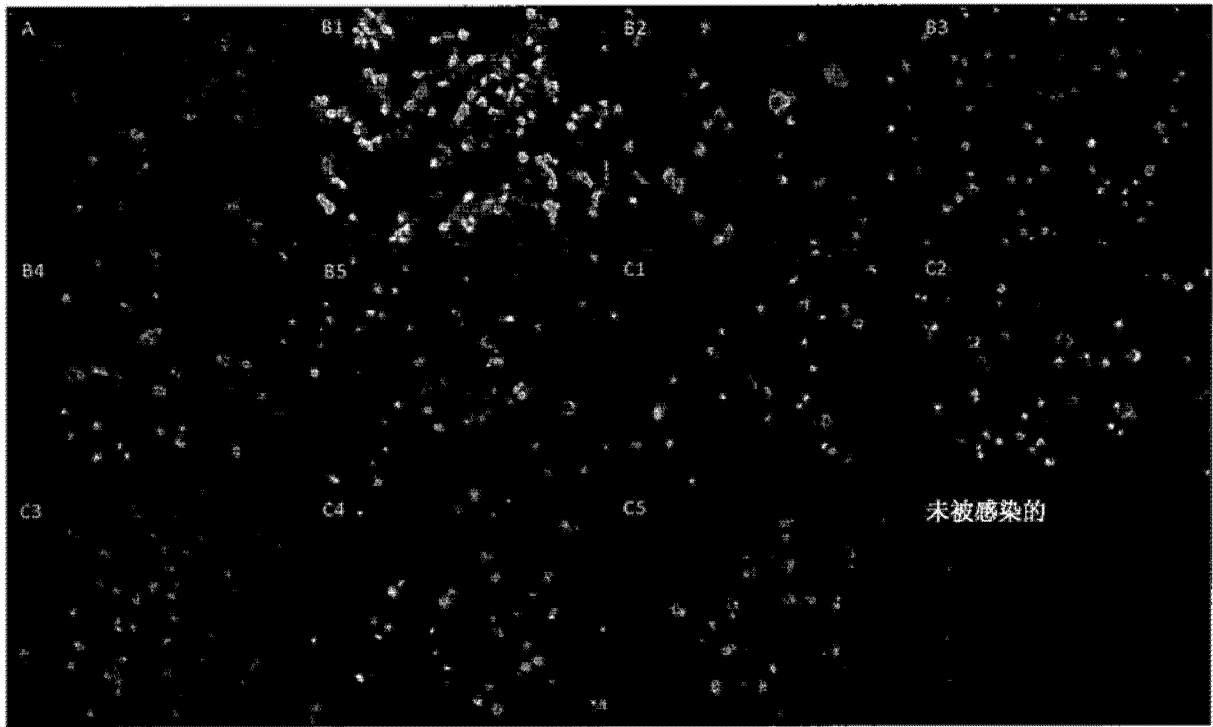


图 6

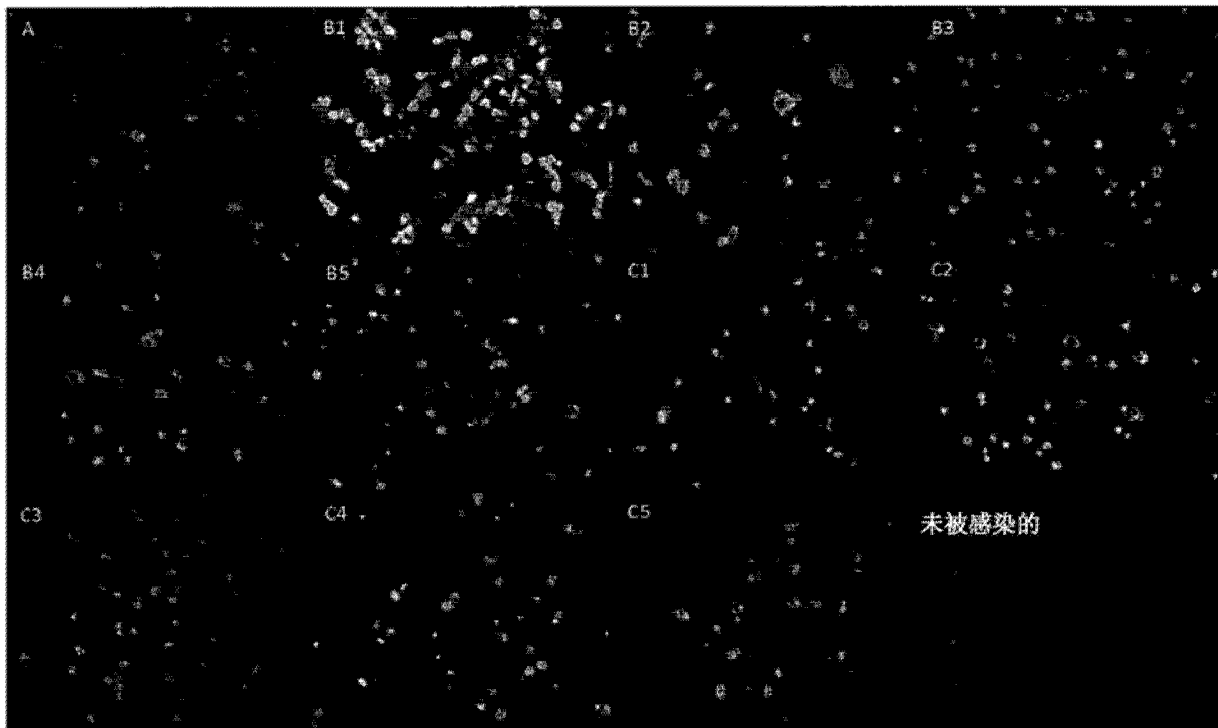


图 7

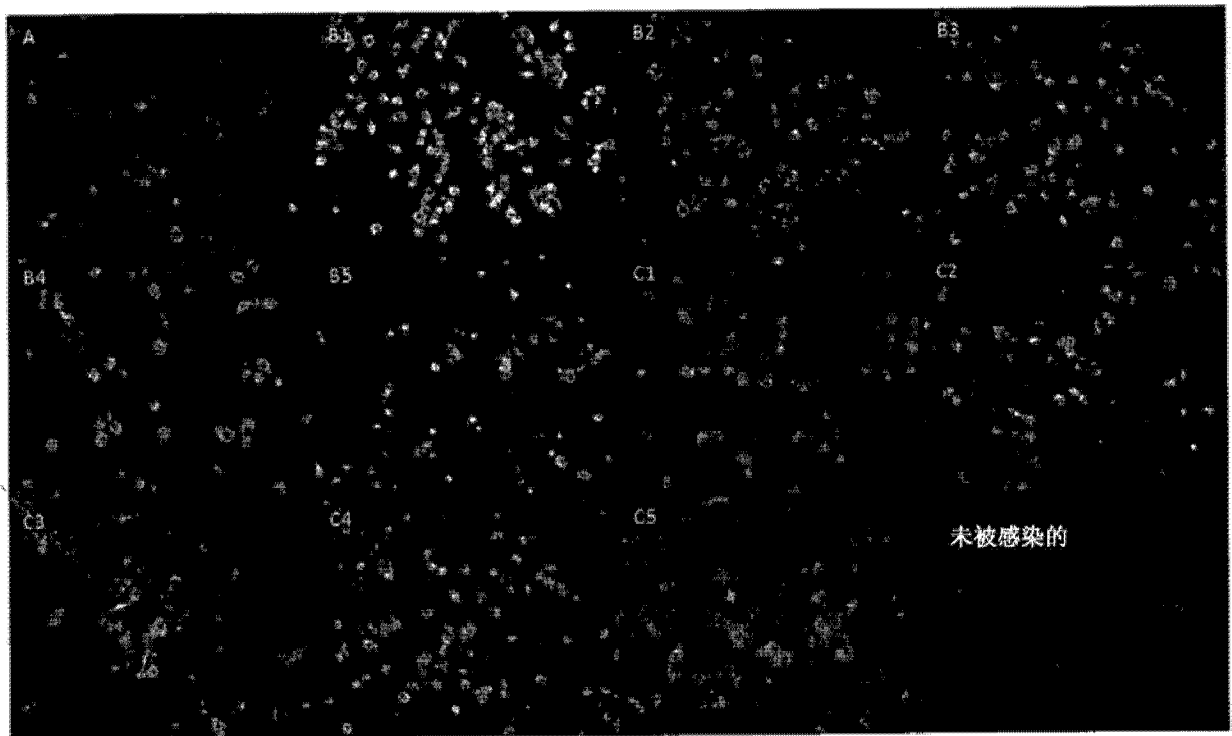


图 8

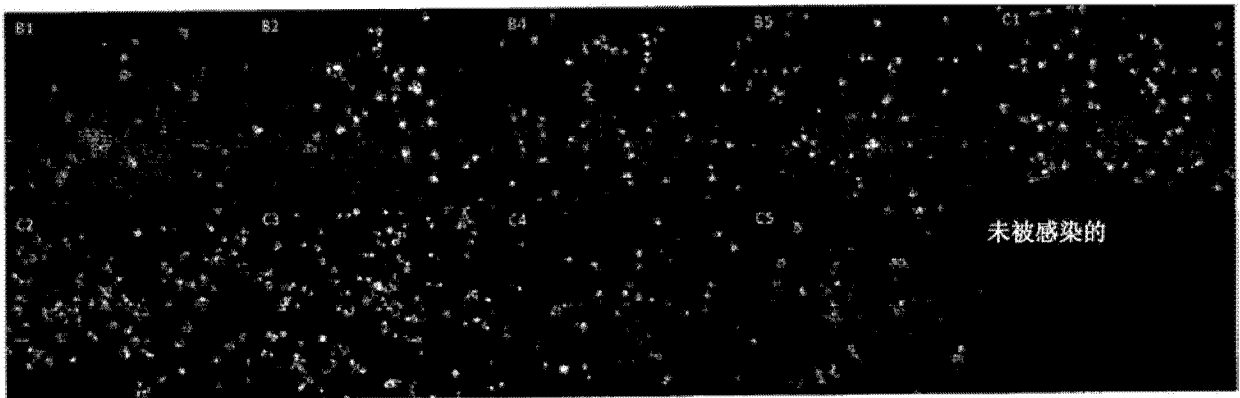


图 9

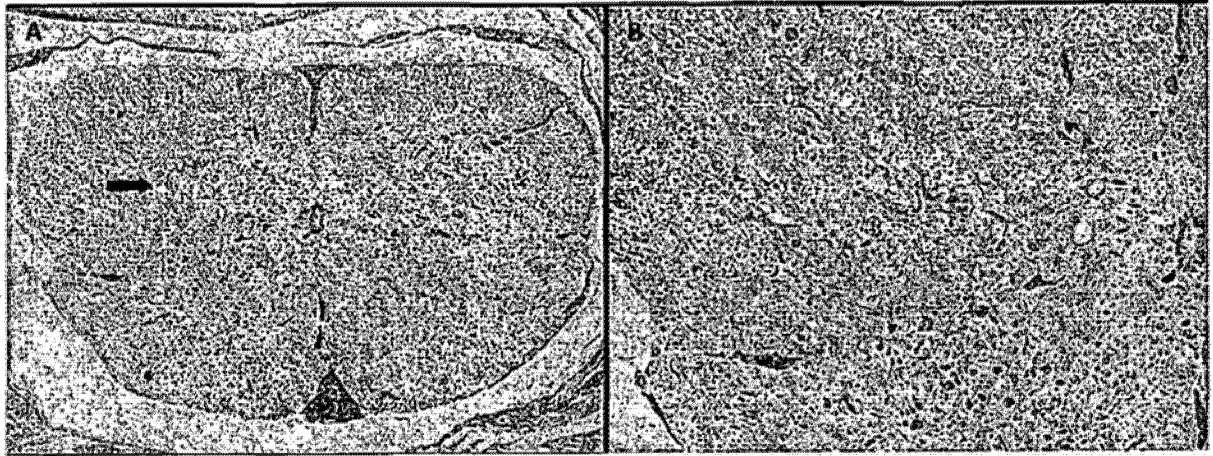


图 10

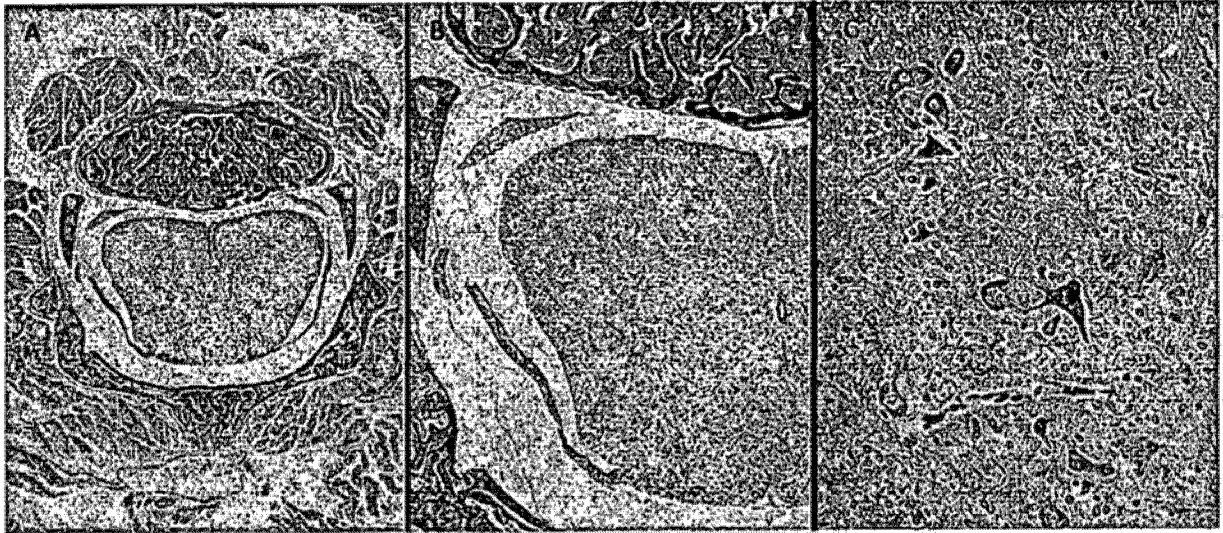


图 11

专利名称(译)	肠道病毒71型的特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	CN104220090A	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201280043224.X	申请日	2012-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学实验室有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	淡马锡生命科学实验室有限公司		
[标]发明人	贾强 林晓芳 况慧星		
发明人	贾强 林晓芳 况慧星		
IPC分类号	A61K39/135 A61P25/00 A61P1/00 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535		
CPC分类号	A61P1/00 A61P25/00 C07K16/1009 C07K2317/76 G01N33/56983 G01N2333/085 G01N2469/10		
代理人(译)	朱梅 徐琳		
优先权	201106807 2011-09-20 SG		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
本申请提供至少一种分离的抗体或其片段，其中，所述抗体或其片段能够特异地结合至少一种EV71衍生的肽。

