



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108474017 B

(45) 授权公告日 2021.08.27

(21) 申请号 201680052944.0

J·E·莫拉阿拉尔孔

(22) 申请日 2016.07.25

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108474017 A

代理人 张小勇

(43) 申请公布日 2018.08.31

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据
2152-2015 2015.07.31 CL

C07K 16/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.13

G01N 33/53 (2006.01)

G07H 21/04 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2016/054424 2016.07.25

(56) 对比文件

CN 102245767 A, 2011.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/021815 EN 2017.02.09

WO 9616974 A1, 1996.06.06

CN 1646684 A, 2005.07.27

(73) 专利权人 智利天主教教皇大学
地址 智利圣地亚哥

US 2013266600 A1, 2013.10.10

审查员 冯晓亮

(72) 发明人 S·M·布埃诺拉米雷斯
A·M·卡莱伊斯帕拉

权利要求书1页 说明书9页
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

用于检测呼吸道合胞病毒抗原P的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合呼吸道合胞病毒(RSV)的蛋白P的单克隆抗体或其片段,其包含具有与SEQ ID No:1或SEQ ID No:5具有至少90%、95%或99%的同一性的序列的重链可变区或具有与SEQ ID No:2或SEQ ID No:6具有至少90%、95%或99%的同一性的序列的轻链可变区。本发明还提供用于离体或体外检测RSV的病毒性抗原P的诊断方法,其中使用由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生和分泌的单克隆抗体。本发明能够用于检测RSV的试剂盒,其包含有所述杂交瘤产生的抗体。

1. 结合人呼吸道合胞病毒 (RSV) 的蛋白P的单克隆抗体, 其中:
该结合人RSV的蛋白P的抗体包含由SEQ ID No:1的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID No:2的氨基酸序列组成的轻链可变区, 或
该结合人RSV的蛋白P的抗体包含由SEQ ID No:5的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID No:6的氨基酸序列组成的轻链可变区。
2. 根据权利要求1所述的结合人RSV的蛋白P的单克隆抗体, 其中该抗体还结合至允许其检测的标记, 所述标记选自荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。
3. 编码根据权利要求1或2所述的结合人RSV的蛋白P的单克隆抗体的多核苷酸, 其中:
编码该抗体的重链可变区的多核苷酸由SEQ ID No:3的核苷酸序列组成, 并且编码该抗体的轻链可变区的多核苷酸由SEQ ID No:4的核苷酸序列组成, 或
编码该抗体的重链可变区的多核苷酸由SEQ ID No:7的核苷酸序列组成, 并且编码该抗体的轻链可变区的多核苷酸由SEQ ID No:8的核苷酸序列组成。
4. 根据权利要求1所述的结合人RSV的蛋白P的单克隆抗体在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于检测生物样品中RSV的体外方法, 其中该方法包括将生物样品与根据权利要求1的结合人RSV的蛋白P的单克隆抗体接触并且检测抗体-抗原结合。
5. 根据权利要求4所述的用途, 其中生物样品选自感染RSV的体外细胞、鼻分泌物、鼻洗液、咽分泌物和/或支气管洗液或分泌物。
6. 根据权利要求4或5任一项所述的用途, 其中用于检测抗体与抗原结合的测定选自ELISA、免疫荧光、免疫组化、免疫层析、流式细胞术、免疫沉淀和/或蛋白质印迹。
7. 根据权利要求6所述的用途, 其中该抗体缀合有允许其检测的标记, 并且该标记选自荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。
8. 根据权利要求6所述的用途, 其中该抗体附接至固体支持物。
9. 根据权利要求8所述的用途, 其中该固体支持物是由选自硝酸纤维素、纤维素、聚乙烯和尼龙的化合物之一形成的膜。
10. 用于检测RSV的诊断试剂盒, 其中该试剂盒包含根据权利要求1或2所述的结合人RSV的蛋白P的单克隆抗体。
11. 根据权利要求10所述的诊断试剂盒, 其中该抗体附接至固体支持物。
12. 根据权利要求11所述的诊断试剂盒, 其中该固体支持物是由选自硝酸纤维素、纤维素、聚乙烯和尼龙的化合物之一形成的膜。
13. 根据权利要求11至12任一项所述的诊断试剂盒, 其中该诊断试剂盒对应于用于检测RSV的免疫层析测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫测定、蛋白质印迹、ELISA、免疫扩散或免疫沉淀。

用于检测呼吸道合胞病毒抗原P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) 的蛋白P的单克隆抗体或其片段,其可用于开发人RSV感染的诊断方法。

现有技术

[0002] 由病毒引起的呼吸系统疾病是世界各地的公共健康问题。儿童人群中这些感染的主要原因是:人呼吸道合胞病毒 (RSV)、腺病毒 (ADV)、甲型和乙型流感病毒 (INF A和B)、副流感病毒 (PIV) 和人偏肺病毒 (MPV)。目前,没有预防这些病毒的有效机制,并且每天产生大约9400 万个新病例 (世界卫生组织)。与暴发有关的卫生系统过饱和也会造成重大的经济损失。

[0003] RSV是一种病毒,它影响呼吸系统,目前代表着巨大的经济和社会相关性,影响到儿童和老年人的高水平的发病率和死亡率。在这些人群中,尤其是在婴儿和两岁以下的儿童中,RSV引起各种各样的临床表现,从更温和的形式如鼻炎、扁桃体炎和中耳炎,以及其他更严重的形式如肺炎、支气管炎、细支气管炎和肺泡炎。血清学研究估计,70%至100%的儿童分别在1岁和2岁时已经至少暴露于该病毒一次。据已估计,每年RSV导致5岁以下的儿童感染约3400万,住院340万,死亡约20万。目前,在智利和拉丁美洲,RSV是一种流行病学相关病毒。一些研究已经表明,RSV在新生儿和婴儿中引起的呼吸系统感染病例的百分比可能高于冬季暴发期间的70%。此外,拉丁美洲的研究强化了RSV 作为2岁以下的个体中下呼吸道感染的主要感染原的作用,其报道发病率超过40%。不幸的是,现在没有批准的疫苗用于免疫新生儿,也没有有效的治疗方法来控制这一人群的感染。

[0004] RSV是一种具有单链基因物质和负编码极性的大约15.3kb的包膜 RNA病毒,其属于副粘病毒科 (Paramyxoviridae) 并属于肺病毒属 (Pneumovirus)。RSV基因组编码以下列方式分类的10个基因: 5'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-3',其由RNA依赖性RNA聚合酶 (蛋白L) 转录为10个独立的信使RNA。这些蛋白中的五种负责基因材料的包装以及定义病毒颗粒的自身结构,分别对应于核衣壳N的蛋白和基质M的蛋白,以及跨膜F、G和SH的糖蛋白。其他四种蛋白M2-1、M2-2、L和P参与病毒复制和转录。此外,蛋白NS-1和NS-2是非结构蛋白,它们减少感染细胞的I型干扰素的表达,因此它们阻止了固有免疫应答的活化。

[0005] 在公共卫生服务中,目前的诊断方法包括使用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和免疫层析测试 (快速测试) 的基于鼻咽拭子样品中直接免疫荧光检测病毒抗原的测试。从所提到的产品来看,基于免疫荧光的病毒检测盒 (viral panel) 是最引人注目的,因为它们允许检测最大数量的呼吸系统病毒,在利用Luminex xTAG进行呼吸系统病毒检测盒 (RPV) PCR的情况下有12种类型,以及在eSensor呼吸系统病毒检测盒的情况下有14种类型。尽管检测范围广泛,但重要的是要注意它们使用的成本和响应时间因素。在第一个提到的测试的情况下,成本大约70 USD,响应时间为12至18小时,而第二个测试的成本大约90USD,响应时间60分钟。

[0006] 因此,用有效、快速和低成本的诊断测试来检测RSV是非常重要的,它能够与可用

的诊断方法的特征相竞争。针对这样的问题,本发明描述了单克隆抗体,它是用于提供所述需要的必要替代物,因为它们允许特异性识别来自感染RSV的患者的样品中的病毒抗原。这样,本发明包括诸如单克隆抗体的产品和一种替代方法,其使用单克隆抗体用于临床样品中RSV感染患者中具有100%特异性的检测和快速、有效且准确的诊断,并且能够通过ELISA检测浓度等于1.5ng特异性抗原。这将允许临床专业人员确定早期且合适的治疗。

[0007] 单克隆抗体是一种均质型抗体,其特征在于特异性识别单一抗原。它们由单个杂交细胞(杂交瘤)产生,它是B淋巴细胞克隆和肿瘤浆细胞(tumor plasmatic cell)融合的产物。与抗原特异性结合并且与抗原具有高亲和力的性质已经促使单克隆抗体发展成为检测分子的非常有用的工具,这产生了科学、临床和工业应用的巨大利益。目前,由于单克隆抗体的特异性和可重复性、更好地支持研究,其在基础和应用研究中得到广泛使用。然而,在生物医学领域,单克隆抗体已经具有巨大的实际应用价值,无论是用于诊断还是治疗多种传染病,以及作为用于其他病症的疗法。在单克隆抗体已经用于各种检测和诊断技术的同时,单克隆抗体已经用于已经获得最佳结果的体外诊断试剂盒设计中。对此,目前有各种(diver)快速检测试剂盒,如怀孕测试,其基于使用抗hCG抗体测定尿液中绒毛膜促性腺激素(hCG)水平。此外,用于治疗用途的单克隆抗体已获得很大的关联性(relevance)。目前,使用商业单克隆抗体如:阿仑单抗(Alemtuzumad)、吉妥珠单抗奥佐米星、利妥昔单抗、曲妥珠单抗(Trastumab)等存在针对不同病理学的治疗性处理。

[0008] 在现有技术中有国际公布W02013076702,其描述了特异性检测呼吸道合胞病毒的单克隆抗体的用途,具体描述了在我们的实验室中产生的针对M2-1抗原的抗体(Gomez et al, J Med Virol. 2014 Jul; 86 (7): 1256-66)。该抗体与本发明不同在于,本发明的用于RSV检测的单克隆抗体具有蛋白P作为抗原,而不是如所引用的文献中描述的 M2-1。产生针对蛋白P的抗体的优点是这些针对不同抗原的抗体可以与抗M2-1抗体(先前公开)一起用于免疫测定中,增加了检测少量鼻咽样品中抗原的灵敏度。

[0009] 文献US2014093501描述了由针对RSV的至少一种鼠单克隆抗体的重链和轻链可变链组成的抗体。具体而言,该抗体针对蛋白F。不同于本发明,本发明的用于RSV检测的单克隆抗体具有蛋白P作为抗原,而不是如所引用的文献中描述的针对F。值得注意的是,抗原P比抗原F 更保守,这使得能够检测呈现不同血清型的RSV株。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及针对人呼吸道合胞病毒(RSV)的两种单克隆抗体。具体而言,本发明涉及两种鼠单克隆抗体,其对应于称为2E6/D2和6H5/H1 的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体,并且其针对RSV的抗原P反应。这些抗体不会彼此竞争抗原结合位点,也不会对它同时结合发挥阻碍作用。所述单克隆抗体能够用于检测测定、诊断和/或确定RSV感染。这些抗体能够同时用于增加其中抗原的可用性低的临床样品中检测的灵敏度。具体而言,来自杂交瘤2E6/D2的抗体能够有效捕获临床样品中RSV的蛋白P。这些捕获并固定的蛋白稍后被由杂交瘤6H5/H1产生的抗体检测,所述抗体缀合至作用于显色底物的酶。该质量允许将具有不同标记的两种抗体组合用于检测样品中发现少量的相同抗原。

[0012] 本发明提供用于检测RSV的病毒性抗原P的离体或体外诊断方法,其中在如ELISA、荧光显微术、免疫印迹、免疫荧光、免疫组化、免疫层析、流式细胞术、细胞分选、免疫沉淀和/或蛋白质印迹等的测定中使用由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生和分泌的单克隆抗体。待

分析的样品选自：感染了RSV的体外细胞、鼻分泌物、鼻洗液、咽分泌物和/或支气管洗液或分泌物、脑脊液、血浆等等。本发明提供了用于检测生物样品和细胞培养物中RSV的方法，该方法使用由先前提到的杂交瘤的细胞系产生和/或分泌的单克隆抗体，该抗体偶联于任何种类的固体支持物中，如硝化纤维素、尼龙膜、磁珠、荧光珠或其他支持物；或者偶联至任何其他分子，如酶、蛋白、荧光团、放射性同位素或任何其他化合物。本发明能够用于检测RSV的试剂盒，该试剂盒包含由所提到的杂交瘤产生的抗体。而且，本发明在其范围内包含引入偶联至由杂交瘤2E6/D2和 6H5/H1分泌的单克隆抗体的任何种类的化学结合的分子或底物，如标记、荧光团、生物素、放射性同位素、金属、酶和/或任何化学元素，其中所述化学结合的分子或底物允许可视化或检测抗体。这样，本发明还提供了作为生物样品中检测、分析和/或诊断方法的一部分的特异性识别蛋白 P的抗体，其偶联至不同于抗体的分子或底物或标志物。

附图说明

[0013] 图1：使用间接ELISA测定通过由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生的单克隆抗体检测RSV的蛋白P。用50ng纯化重组RSV的蛋白P或用 1×10^6 pfu的RSV活化平板。作为阴性对照，其他孔用 1×10^6 pfu的偏肺病毒 (MPV) 或50ng的BSA蛋白活化；还有没有抗原、具有一抗、具有缀合有HRP的小鼠抗IgG的孔 (未活化) 以及没有抗原、没有一抗、只有小鼠抗IgG抗体 (HRP) 的孔。随后，将孔用每孔170ng的量的来自杂交瘤2E6/D2的抗P抗体 (A)、每孔170ng的量的杂交瘤6H5/H1 的抗P抗体 (B) 和每孔使用170ng的量的抗P RSVH102抗呼吸道合胞病毒磷蛋白抗体 (目录号#AB94965 (Abcam)) (C) 孵育。条形图中显示的数据表示由存在于小鼠二抗抗IgG中的辣根过氧化物酶 (HRP) 催化的底物转换四甲基联苯胺至有色化合物发射的450nm波长的检测吸光度，所述小鼠二抗抗IgG特异性结合由杂交瘤2E6/D2、6H5/H1分泌的抗体和Abcam的RSVH102。这些值对应于至少两次独立测定中每个样品的发射吸光度的平均 $\pm$ 标准差。*** $P < 0.0001$ ，对于经与阴性对照相比并使用Dunnett's的多重比较进行检验的ANOVA检验，ns，与阴性对照相比没有显著差异。

[0014] 图2：测定由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生的单克隆抗体在检测RSV 蛋白P中的灵敏度。用以50ng蛋白P开始并最终为0.04ng的系列稀释度1:2 (A) 和用以 1×10^5 pfu RSV接种物开始至稀释度1:5120的系列稀释度1:2 (B) 活化ELISA平板。包括作为阴性对照的未活化的孔。曲线图中显示的数据表示由来自杂交瘤2E6/D2和6H5/H1的抗P抗体 (以 170ng/孔的量使用) 中存在的辣根过氧化物酶 (HRP) 酶发射的450nm 的吸光度 (A和B)。Abcam的RSV的抗P RSVH102 (目录号#AB94965) 也以170ng/孔的浓度使用 (A和B)。这些值对应于在至少两次独立的测定中每个样品的发射吸光度的平均值。

[0015] 图3：对于纯化的RSV抗原检测，由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生的RSV的抗P单克隆抗体的系列稀释测定。用50ng RSV重组蛋白P活化ELISA平板，并且从浓度为 $3.4 \mu\text{g/ml}$ (170ng/孔) 开始用系列稀释度 1:2的抗P抗体2E6/D1或6H5/H1检测抗原。数据表示为在至少两次独立测定中每个一式两份样品的450nm发射吸光度值的平均值。

[0016] 图4：使用点印迹确认由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1分泌的单克隆抗体的特异性。将由杂交瘤2E6/D2或6H5/H1产生的RSV抗P抗体与含有以下固定化样品的硝酸纤维素膜孵育1小时 (呈染色形式或“点”的形式)：MPV (1×10^6 PFU)、RSV (1×10^6 PFU)、BSA ($1 \mu\text{g}$)、RSV的蛋白 P

(1 μ g、500ng和50ng)和20 μ g未感染或感染RSV的HEp-2细胞提取物。孵育后,洗涤膜并与缀合有HRP蛋白的小鼠抗IgG二抗孵育1小时。孵育后,使用捕获商业底物“增强化学发光蛋白质印迹检测系统”(ECL,Amersham,Uppsala,Sweden)的催化产生的化学发光而进行单克隆抗体与抗原结合的可视化。观察到由杂交瘤2E6/D2或6H5/H1产生的抗体只与存在RSV的蛋白P、RSV病毒和感染RSV的细胞的点结合,证实了这些抗体的特异性。

[0017] 图5:通过在感染了RSV的HEp-2细胞中的免疫荧光检测蛋白 P-RSV。HEp-2细胞在体外生长直至接近汇合(70-90%),待用RSV 感染48小时。然后,用多聚甲醛将它们固定,并准备用于间接免疫荧光。为此,将来源于杂交瘤6H5/H1、杂交瘤2E6/D2和Abcam的RSVH102抗P抗体(目录号#AB94965)的单克隆抗体用作一抗。将缀合至发射519 nm荧光(强烈标志(intense sign))的荧光团Alexa Fluor 488的小鼠抗IgG商业抗体用作二抗。将细胞核用发射661nm荧光的荧光团 TOPRO-3碘化物染色(在未感染细胞和感染细胞中观察到浅灰色圆圈)。当使用三种一抗中的任何一种时,仅在受感染的细胞中细胞质中观察到强烈反应性(强白色标志,用白色箭头表示)。

[0018] 图6:使用由杂交瘤2E6/D、6H5/H1分泌的单克隆抗体和Abcam的抗体RSVH102(目录号#AB94965)的组合使用夹心法ELISA进行临床样品中的RSV检测。使用170ng用作捕获抗体的由杂交瘤2E6/D2分泌的抗体(A)或Abcam的抗体抗P RSVH102(目录号#AB94965)(B)活化ELISA平板。用50 μ l的呈现病毒性呼吸系统症状患者的鼻咽拭子(HNF) 样品孵育用捕获抗体活化的孔。分析了作为阴性对照的健康患者10(A) 和3(B) 份样品。使用RSV阳性患者的20(A) 和5(B) 份样品和作为特异性对照的偏肺病毒阳性患者的20(A) 和5(B) 份样品。包括加入纯化RSV蛋白P的孔作为阳性对照。以稀释度1:2000使用缀合至辣根过氧化物酶的由杂交瘤6H5/H1(A和B) 和2E6/D2(B) 产生的抗体(每孔75ng) 检测由2E6/D2抗体或抗P RSVH102商业抗体捕获的抗体。显示的数据是每个样品发射的450nm的吸光度值的平均值 $\pm$ 标准差(*P<0.05;**P<0.001;***P<0.0001并且ns不存在显著差异;使用经与 MPV阳性患者或健康患者比较的ANOVA检验)。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明涉及两种单克隆抗体或其片段: IgG1同种型的2E6/D2和 IgG2A同种型的6H5/H1,它们特异性识别RSV的蛋白P(本文也称为抗P抗体)。

[0021] 本发明描述了特异性识别RSV蛋白P的两种单克隆抗体。如所指出的,这些抗体由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生。由杂交瘤2E6/D2产生的两条抗体链的可变区的氨基酸序列描述于重链SEQ ID No:1和轻链 SEQ ID No:2中。编码它们的核苷酸序列分别描述于SEQ ID No:3和 SEQ ID No:4中。以相同的方式,由杂交瘤6H5/H1产生的两条抗体链的可变区的氨基酸序列描述于重链SEQ ID No:5和轻链SEQ ID No:6 中。编码它们的核苷酸序列分别描述于SEQ ID No:7和SEQ ID No:8 中。

[0022] 从这些可变序列构建包含它们的抗体,包括仅可变区之一或者以任何可能的组合混合它们。所有这些实施方案在本发明的方法范围内。即,本发明包括序列SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:5和SEQ ID No:6以及与所述氨基酸序列具有至多90%、95%或99%的同源性或同一性的相似序列中的至少一个的抗体。以及,包含序列SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:7和SEQ ID No:8以及它们的互补反向序列和与所述核苷酸序列具有至多80%、85%、90%、95%或99%的同源性或同一性的相似序列中的至少一个的核苷

酸序列。核苷酸序列中考虑的更高的同源性程度基于遗传密码的简并性。这样,本发明还包括一组核苷酸序列,其编码特异性识别RSV蛋白P的单克隆抗体或其片段。

[0023] 在本发明的具体实施方案中,所述抗体或其片段缀合有允许其检测的标记,如生物素、金属、酶、蛋白、荧光团、放射性同位素或其他任何化合物。

[0024] 在本发明的另一具体实施方案中,所述抗体或其片段是鼠抗体或人源化抗体。

[0025] 如图所示,这些抗体不与存在于具有呼吸系统感染相关的其他病毒的患者相关病毒或样品中的其他蛋白或分子发生反应。这大大降低了用于诊断方法时假阴性的可能性。

[0026] 本发明还提供生物样品中RSV的病毒性抗原P的离体或体外诊断方法和检测,其中在检测抗体与抗原结合的测定中使用由杂交瘤2E6/D2 和6H5/H1产生和分泌的单克隆抗体。

[0027] 该方法包括将生物样品与针对RSV的单克隆抗体或其片段接触,所述生物样品选自体外感染RSV的细胞、流鼻涕、鼻洗液、咽分泌物和/或支气管洗液或分泌物等,所述单克隆抗体由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1 分泌,并且然后使用选定的测定检测抗体与抗原的结合,所述测定为 ELISA、荧光显微术、免疫印迹、免疫荧光、免疫组化、免疫层析、流式细胞术、细胞分选、免疫沉淀和/或蛋白质印迹。

[0028] 而且,本发明的方法包括由上文提到的杂交瘤的细胞系产生和/或分泌的抗体或其片段,其偶联有任意其它类型的固体支持物,如硝酸纤维素、尼龙膜、磁珠、荧光珠或其它支持物。在本发明的另一具体实施方案中,用于该方法的抗体或其片段缀合有允许其检测的标记,如生物素、金属、酶、蛋白、荧光团、放射性同位素或其他任何化合物。

[0029] 本发明还描述了用于检测RSV的试剂盒,其包含由所提到的杂交瘤产生的至少一种抗体。在本发明的具体实施方案中,由用于所述试剂盒的先前提到的杂交瘤的细胞系产生和/或分泌的抗体或其片段偶联有任意其它类型的固体支持物,如硝酸纤维素、尼龙膜、磁珠、荧光珠或另一支持物。此外,在本发明的具体实施方案中,用于该试剂盒的抗体或片段缀合有允许其检测的标记,如生物素、金属、酶、蛋白、荧光团、放射性同位素或其他任何化合物。

[0030] 在本发明的另一具体实施方案中,诊断试剂盒对应于免疫层析测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫测定、蛋白质印迹、点印迹(Dot plot)、ELISA、免疫扩散或免疫沉淀。这样,本发明还提供了作为生物样品中检测、分析和/或诊断方法的一部分的特异性识别蛋白P 的抗体,其偶联至不同于抗体的分子或底物或标记。

[0031] 以下描述了允许证明本发明的单克隆抗体的不同应用的实施例。

[0032] 应用实施例

[0033] 实施例1:获得纯化的RSV蛋白P。

[0034] 为了获得纯化的RSV蛋白P,进行了在细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21中异源形式(重组)表达策略。为此,提取感染了RSV的 HEp-2细胞培养物的RNA,通过PCR扩增编码蛋白P的基因并克隆于细菌表达载体(pET15b)中,该细菌表达载体允许使用诱导剂分子异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)控制克隆基因表达。作为重组蛋白的纯化策略,所使用的表达载体具有编码六个连续组氨酸的插入物,使得当该蛋白诱导过表达时,这些蛋白在其C末端表达6个连续His。使用该策略的优点是蛋白获得特征电荷,其允许通过在合

适pH下亲和层析进行纯化。具有组氨酸尾的重组蛋白的纯化是用棉塞(tampon)溶液的洗脱实现的,所述溶液含有组氨酸的类似物咪唑,其与蛋白竞争带有Ni²⁺的树脂柱中的结合位点。

[0035] 最后,使用SDS-PAGE胶分析纯化的样品。

[0036] 实施例2:杂交瘤(B淋巴细胞克隆和肿瘤浆细胞的融合产物)的产生。

[0037] 使用免疫有1mg的纯度大于50%的抗原(乳化于弗氏佐剂的纯化的 RSV重组蛋白P)的BALB/c小鼠产生杂交瘤。免疫后,选择在其血清中呈现更高抗体滴度的小鼠,并且给予其另一加强注射。三天后,分离其脾淋巴细胞以与非分泌的骨髓细胞系NS0/2的细胞进行体细胞融合。将产生的杂交瘤接种于96孔板中的含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT)的选择性培养基中。10天后,通过ELISA评价活杂交瘤的上清,以检测针对用于免疫的抗原的抗体。将阳性杂交瘤扩增至24孔板用于产生更大量的上清,其后来用于进行表征分析(特异性、灵敏度、效率)。最后,具有更高特异性的杂交瘤通过有限稀释法进行克隆,即进行细胞悬液的连续稀释,直至获得含有单个细胞的小份。然后,在小鼠中制备腹水并确定每种单克隆抗体的亚类。孵育不同浓度的抗体并使用小鼠单克隆抗体抗Melan A(Santa Cruz Biotechnology,Dallas,TX)制备标准曲线,通过ELISA确定产生的单克隆抗体的浓度。

[0038] 实施例3:测定编码由杂交瘤2E6/D2分泌的RSV的抗P抗体和由杂交瘤6H5/H1分泌的RSV的抗P抗体的可变区的轻链(VL)和重链(VH)的核苷酸序列。

[0039] 以下操作方案分别用于杂交瘤2E6/D2和6H5/H1。将杂交瘤培养于补充有3.7g/L碳酸氢钠和10%胎牛血清的DMEM-高葡萄糖培养物的中间在含有10%CO₂、37℃下生长直至细胞密度为70万个细胞/ml。用 Trizol(Invitrogen)混合物处理获得 3.5×10^6 个细胞的总RNA。0.5μg 的RNA用于使用Impron II(Promega)试剂盒进行逆转录反应生成cDNA。使用PCR扩增编码免疫球蛋白的κ和λ链的基因的可变区。为此,使用 Novagen(目录号69831-3)试剂盒的Ig引物组的通用引物并遵循制造商说明。

[0040] 用引物MuIgκVL5'-B: 5' ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT3' (SEQ ID NO:10) 扩增轻链可变区并且用引物MuIgVH5'-A: 5' GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKG RTTT3' (SEQ ID NO: 11) 和MuIgVH5'-F: 5' ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT3' (SEQ ID NO:12) 扩增重链可变区。根据制造商说明将PCR产物克隆于克隆载体 pTOP0-TA(Invitrogen)中并通过Pontificia Universidad Católica de Chile的测序服务在测序仪ABI prism 3130xI(Applied Biosystem)中进行测序。使用生物信息学程序Vector NTI(Invitrogen)获得推断的杂交瘤 2E6/D2的氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2和杂交瘤6H5/H1 的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0041] 实施例4:使用间接ELISA测定进行RSV抗原检测测定,测定RSV 抗P单克隆抗体对纯化的RSV抗原的特异性。

[0042] 该测定的目的是证明由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1产生的抗体针对 RSV蛋白P的特异性。使用间接ELISA技术进行抗原的检测,其中用 50ng纯化的抗原37℃活化ELISA平板1小时。以相同的方式,用 1×10^6 板形成单位(pfu)的RSV活化平板。在与孵育RSV相同的条件下,将偏肺病毒(MPV)包括为阴性对照,并还在独立的孔中包括50ng的BSA 蛋白。然后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)/0.05%吐温洗涤平板两次。然后,用PBS/10%FBS在37℃封闭平板2小时。然后,重复洗涤并且然后用稀释于PBS/10%FBS的终浓度3.4μg/ml的抗体(2E6/D2和6H5/

H1) 中的每一种在环境温度下孵育1小时(每种抗体在独立的平板中)。在相同的条件下,在不同的平板中,使用识别RSV蛋白P的单克隆抗体(抗呼吸道合胞病毒磷蛋白抗体RSVH102,目录号#AB94965,Abcam)至3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度进行对照测定。孵育时间后,重复洗涤并向每一个孔加入以稀释度1:2000稀释于PBS/10%FBS的标记有辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)的小鼠抗IgG二抗,环境温度下1小时。最后,进行洗涤,并用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,Becton Dickinson)显色。为了终止反应,加入50 μl 2N H_2SO_4 ,并在ELISA酶标仪中在450nm读取结果。为了确定二抗的反应是特异性识别一抗的和所获得的信号不是由二抗与病毒抗原的非特异性结合引起的,完成了其中仅使用了二抗,没有一抗,也没有样品(未活化的孔)的对照。用于确定一抗的反应是特异性针对抗原的另一对照,它包括对没有被抗原活化(没有抗原)的ELISA平板使用抗体,或者对具有50ng BSA蛋白或不同病毒(MPV)的ELISA平板使用抗体。结果显示,本发明的单克隆抗体能够特异性识别50ng的纯化抗原,因为它们不识别BSA蛋白,也不识别另一相关病毒的蛋白(图1A 和1B)。另一方面,观察到在测定中用作对照的商业抗体RSVH102(图 1C)特异性用于检测重组RSV的病毒和蛋白P二者。

[0043] 实施例5:测定单克隆抗体检测病毒抗原灵敏度的测定。

[0044] 进行该测定用于确定来自杂交瘤2E6/D2和6H5/H1的RSV抗P单克隆抗体能够使用间接ELISA检测的蛋白和病毒的最大稀释度。为此,使用了在实施例4中所述的相同的技术。用从50ng纯化抗原开始的11 个连续稀释度1:2的RSV蛋白P活化平板。对于病毒,用从 1×10^5 pfu 开始的连续稀释度1:2的病毒活化平板。以稀释于PBS/10%FBS的3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (170ng/孔)的浓度使用抗P 2E6/D2或6H5/H1抗体。然后,小鼠抗 IgG检测抗体的稀释度为1:2000 (25ng/孔)。结果显示,抗体抗P 2E6/D2 能够识别直到40皮克(pg)的RSV蛋白P。来自杂交瘤6H5/H1的抗P 抗体更灵敏并且直到RSV蛋白P的最后稀释度还能检测到更强的捕获信号(图2A)。Abcam的抗P RSVH102抗体、#AB94965也能够识别所有稀释度的RSV蛋白P,但是效率低于来自杂交瘤6H5/H1的抗P抗体。

[0045] 对于以它们检测高稀释度的RSV的能力呈现的抗体的灵敏度,能够观察到来自杂交瘤2E6/D2的抗P抗体能够检测所有稀释度的病毒,相同方式的是来自杂交瘤6H5/H1的抗体,其等价于大约390个病毒颗粒。两种单克隆抗体比能够检测稀释度1:40的商业RSV抗P抗体更有效(图 2B)。

[0046] 包括了所有的对照测定,其允许排除含有除样品(RSV蛋白P或病毒)之外的所有测定组分的抗体的非特异性反应。

[0047] 实施例6:检测单克隆抗体检测病毒抗原效率的测定。

[0048] 进行该测定用于确定允许使用ELISA检测病毒抗原的来自杂交瘤 2E6/D2和6H5/H1的RSV抗P单克隆抗体的最大稀释度。为此,使用了在实施例6中所述的相同的间接ELISA技术。用50ng的纯化抗原活化孔,并以从工作浓度(3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)开始以稀释度1:2稀释于PBS/10% FBS的11个稀释度使用抗P抗体2E6/D2或6H5/H1。在图3中观察到对于在测定中使用的所有稀释度,抗P 2E6/D2和6H5/H1抗体能够检测 RSV蛋白P。Abcam的抗P RSVH102抗体(目录号#AB94965)也能够检测所有稀释度的RSV蛋白P,但是它比抗P 6H5/H1抗体的效率略低。

[0049] 在该测定中包括阴性对照,对应于不含有样品(蛋白P)的孔,它用PBS/10%FBS封闭,没有加入一抗(抗P 2E6/D2或抗P 6H5/H1)并且它仅含有缀合有HRP的小鼠抗IgG抗体。

[0050] 实施例7:使用RSV抗P单克隆抗体、使用夹心法ELISA技术临床诊断感染了RSV的患者样品。

[0051] 由于获得自鼻咽拭子的临床样品至病毒蛋白的可获得性和浓度低,需要改良检测方法并使用夹心法ELISA方法,使用来自杂交瘤2E6/D2 的抗P抗体或Abcam的RSV抗P抗体 RSVH102(目录号#AB94965) 作为捕获抗体。缀合有HRP的克隆抗P 6H5/H1或克隆抗P 2E6/D2分泌的抗体用作检测抗体。对于该测定,用稀释于PBS的 $3.4\mu\text{g/ml}$ (170ng/孔)的来自杂交瘤2E6/D2的抗P抗体或Abcam的RSV抗P抗体 RSVH102(目录号#AB94965)在 37°C 活化ELISA平板的孔1小时。用 PBS-0.05%吐温20洗涤两次,然后平板用 $200\mu\text{L}$ 的PBS/10%FBS在 37°C 封闭2小时。再次洗涤,根据诊断方法“D3Ultra DFA呼吸系统病毒筛选和ID试剂盒 de DHI (Diagnostics Hibryds) USA”(按照常规方式命名为“病毒检测盒”),每孔用 $50\mu\text{L}$ 的RSV阳性患者的鼻咽抽吸物在 4°C 过夜孵育,并且按照如下所述进行处理*。包括以下作为对照:1) 特异性对照 ($50\mu\text{L}$ 的诊断患有MPV的患者样品,使用病毒检测盒),2) 阳性对照 (50ng 的重组RSV蛋白P) 以及3) 对应于健康患者样品的阴性对照(病毒阴性,使用病毒检测盒)。到下一天,洗涤,每孔用 $50\mu\text{L}$ 的缀合有HRP的来自6H5/H1或2E6/D2的抗P抗体在 25°C 孵育1小时。将平板洗涤两次,用 $50\mu\text{L}$ 的TMB溶液显色,在暗处孵育10至15分钟。用 $50\mu\text{L}$ 的 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应。在通过临床诊断认证的ELISA酶标仪 Epoch中读取平板。该测定所获得的结果示于图6中,其中能够观察到使用来自杂交瘤2E6/D2的抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤6H5/H1的抗体-HRP作为检测抗体的夹心法ELISA技术允许检测感染了RSV的患者样品中的抗原(图6A),其先前由认证的临床实验室使用病毒检测盒通过直接免疫荧光确认过。包括在该测定中的患者数量是20,其中17位 ELISA检测为阳性,具有0.1以上的光密度(OD)。该测定还证明了呈现来自杂交瘤2E6/D2和6H5/H1的抗体的多功能性,因为它们能够同时结合抗原而彼此不竞争或不干扰,允许捕获和随后检测患者样品中的蛋白P。在图6B中显示了使用商业捕获抗体和两种检测抗体的抗P克隆 6H5/H1和2E6/D2获得的结果。结果显示,总共5位RSV阳性患者,对于Abcam的RSV抗P抗体RSVH102(目录号#AB94965) 与抗P 6H5/H1 克隆和与克隆2E6/D2的捕获组合,只有1位在夹心法ELISA中检测出。这些结果显示,本发明的单克隆抗体在检测临床样品中与Abcam的RSV 抗P抗体RSVH102(目录号#AB94965) 相比的高效率。

[0052] *:临床样品处理。用于测定的样品是从包含在通用运输介质中的鼻咽拭子获得的。样品在 4°C 下2000rpm旋转干燥10分钟。然后,将上清(SN1)与沉淀分离;后者用 $100\mu\text{L}$ 的RIPA缓冲液($50\text{mM Tris-HCl pH } 8.0$, 150mM NaCl , $1\%\text{NP-40}$, $0.5\%\text{脱氧胆酸钠}$, $0.1\%\text{SDS}$ 于蛋白酶抑制剂混合物中) 4°C 孵育15分钟,每隔5分钟涡旋振荡一次。然后,在 4°C 下2000rpm旋转干燥10分钟。最后,取所获得的上清液(SN2) 并与SN1混合。

[0053] 实施例8:使用点印迹(Dot-Blot)测定对RSV的抗P单克隆抗体对纯化RSV抗原的特异性进行测定。

[0054] 该测定的目的是使用免疫印迹方法确认由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1 产生的抗体针对RSV蛋白P的特异性。使用点印迹技术进行抗原检测,其中使用硝酸纤维素膜作为用于固定存在于悬滴中的抗原的固体支持物。为此,在每张硝酸纤维素膜上沉积 $20\mu\text{l}$ 含有: $1\times 10^6\text{pfu}$ 的MPV、 $1\times 10^6\text{pfu}$ 的RSV、纯化的RSV蛋白P($1\mu\text{g}$ 、 500ng 和 50ng)、 $20\mu\text{g}$ 的感染了RSV的HEp-2细胞提取物和 $20\mu\text{g}$ 的未感染的HEp-2细胞提取物。 $20\mu\text{l}$ 含有 500ng 的BSA用作阴性对照。允许膜上施加的溶液空气干燥 15分钟。然后,用含有0.05%吐温20的PBS中5%的BSA在

25℃封闭膜1h。用封闭溶液中3.4μg/ml的来自杂交瘤2E6/D2或杂交瘤6H5/H1 的抗P单克隆抗体在25℃孵育膜1h。然后,在25℃使用PBS-0.05%吐温20进行三次洗涤去除过量未结合至抗原的抗体。使用缀合有HRP的小鼠抗IgG抗体 (Invitrogen,Life Technologies#62-6520) 检测与抗原结合的抗体。这是在25℃在封闭溶液中孵育1h,然后在25℃使用PBS-0.05%吐温20进行三次洗涤去除过量未结合的抗体。使用商业底物“增强化学发光蛋白质印迹检测系统”(ECL,Amersham,Uppsala,Sweden) 的催化(由结合至小鼠抗IgG抗体的酶HRP介导)产生的化学发光进行单克隆抗体与抗原结合的可视化。在photodocumentation MyECL (Thermo Fisher) 中捕获化学发光。在图4中观察到,来自杂交瘤2E6/D2和6H5/H1 的抗体仅结合含有RSV或蛋白P的“点”,它们不非特异性结合含有不相关蛋白、其它病毒或未感染细胞的“点”。

[0055] 实施例9:使用RSV抗P单克隆抗体通过免疫荧光检测HEp-2细胞中RSV感染。

[0056] 进行该测定用于扩增技术谱,其允许使用本发明检测RSV的感染。进行荧光显微术测定,其中用衍生自杂交瘤2E6/D2或6H5/H1的RSV 抗P单克隆抗体孵育感染或未感染RSV的HEp-2细胞。所使用的操作步骤如下:用稀释于PBS的4%多聚甲醛在25℃固定细胞10分钟。然后,用PBS洗涤细胞,并用稀释于PBS/10%FBS中的0.2%皂苷25℃透化30分钟。加入稀释于PBS/10%FBS中的浓度3.4μg/ml的衍生自杂交瘤2E6/D2或6H5/H1的单克隆抗体,25℃1小时。然后,用PBS洗涤两次,加入以稀释度1:200稀释于PBS/10%FBS中的缀合有荧光团Alexa fluor 488 (Life Technologies) 的小鼠抗IgG二抗,25℃暗处1小时。重复洗涤,用稀释度1:5000的TOPRO-3碘化物642/661 (Invitrogen, #T3605) 染核,25℃暗处15分钟。最后,用PBS洗涤,安装盖片用于在落射荧光显微镜中观察。获得的结果显示,本发明的组成抗体还可用于使用免疫荧光特异性识别感染的细胞,而不以非特异性方式与未感染的细胞结合(图5)。

[0057] 本说明书中描述的实施例证明具有由杂交瘤2E6/D2和6H5/H1的细胞系分泌的这些RSV抗P单克隆抗体的特异性、效率、灵敏度和多功能性。本文提供的实施例构成RSV抗P单克隆抗体的一些用途的证明,但绝不限制本发明的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 智利天主教教皇大学
- [0003] <120> 可用于检测和诊断由呼吸道合胞病毒引起的感染的由杂交瘤细胞产生和分泌的特异性针对人RSV的抗原P的单克隆抗体
- [0004] <130> W 2016/7469
- [0005] <150> CL 201502152
- [0006] <151> 2015-07-31
- [0007] <160> 12
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 153
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 合成 - 杂交瘤 2E6/D2 - 抗P VH
- [0015] <400> 1
- [0016] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Met Ala Gln Ser Gly Pro
- [0017] 1 5 10 15
- [0018] Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
- [0019] 20 25 30
- [0020] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
- [0021] 35 40 45
- [0022] Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
- [0023] 50 55 60
- [0024] Trp Leu Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro
- [0025] 65 70 75 80
- [0026] Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
- [0027] 85 90 95
- [0028] Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp
- [0029] 100 105 110
- [0030] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
- [0031] 115 120 125
- [0032] Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Pro Ser Val Tyr Pro Leu
- [0033] 130 135 140
- [0034] Ala Pro Gly Ser Leu Gly Ile Thr Ser
- [0035] 145 150
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 152

[0038]	<212> PRT
[0039]	<213> 人工序列
[0040]	<220>
[0041]	<223> 合成 - 杂交瘤 2E6/D2 - 抗P VL
[0042]	<400> 2
[0043]	Met Glu Ser Asp Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
[0044]	1 5 10 15
[0045]	Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
[0046]	20 25 30
[0047]	Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser
[0048]	35 40 45
[0049]	Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro
[0050]	50 55 60
[0051]	Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
[0052]	65 70 75 80
[0053]	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[0054]	85 90 95
[0055]	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Tyr
[0056]	100 105 110
[0057]	Gln Gln Thr His Pro Pro Thr Gln Pro Thr Cys Asn Ser Ala Ala Trp
[0058]	115 120 125
[0059]	His Leu Arg Thr Leu Pro Ser Ile Thr Val Arg Ala Ala Ser Thr Cys
[0060]	130 135 140
[0061]	Gly His Pro Val Ser Leu Gly Ile
[0062]	145 150
[0063]	<210> 3
[0064]	<211> 459
[0065]	<212> DNA
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<220>
[0068]	<223> 合成 - 杂交瘤 2E6/D2 - 抗P VH
[0069]	<400> 3
[0070]	atggaatgga gctgggtctt cctcttcctg atggcacagt ctgggcctga gctggtgagg 60
[0071]	cctggggcctt cagtgaagat gtcttgcaag gcttcaggct ataccttcac cagctcctgg 120
[0072]	atgcactggg tgaacagag gcctggacaa ggccttgagt ggatgaggca gaggcctgaa 180
[0073]	cagggcctgg agtggcttgg gaggattgat cctgcgaatg gtaattctaa atatgacctg 240
[0074]	aagttccagg gcaaggccac tataacagca gacacatcct ccaacacagc ctacctgcaa 300
[0075]	ctcagcagcc tgggtagtta tacctactat ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc 360
[0076]	tccagagaca atgccaagaa ttccctatac ctgcaaatga gcagtctgag gtctccatcc 420

[0077]	gtctatcccc tggcccctgg aagcttggga atcactagt 459
[0078]	<210> 4
[0079]	<211> 456
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> 人工序列
[0082]	<220>
[0083]	<223> 合成 - 杂交瘤 2E6/D2 - 抗P VL
[0084]	<400> 4
[0085]	atggagtcag acacagacac actcctgcta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
[0086]	actggtgaca ttgtgctgac acagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg 120
[0087]	gccaccatct catacagggc cagtgtcagt acatctggct atagttatat gcaactggaac 180
[0088]	caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 240
[0089]	ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300
[0090]	cctgtggagg agcaactcag cagcctgaca tcttaccage agacacatcc tccaacacag 360
[0091]	cctacctgca actcagcagc ctggcatctg aggacactgc cgtctattac tgtgcgagcg 420
[0092]	gcttctactt gcggacatcc agtaagcttg ggaatc 456
[0093]	<210> 5
[0094]	<211> 154
[0095]	<212> PRT
[0096]	<213> 人工序列
[0097]	<220>
[0098]	<223> 合成 - 杂交瘤 6H5/H1 - 抗P VH
[0099]	<400> 5
[0100]	Met Glu Trp Ser Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly
[0101]	1 5 10 15
[0102]	Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
[0103]	20 25 30
[0104]	Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ser
[0105]	35 40 45
[0106]	Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
[0107]	50 55 60
[0108]	Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser
[0109]	65 70 75 80
[0110]	Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro
[0111]	85 90 95
[0112]	Gly Met Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Ala
[0113]	100 105 110
[0114]	Arg Gln Thr Pro Glu Lys Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro
[0115]	115 120 125

[0116]	Gly Ala Ser Val Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Pro
[0117]	130 135 140
[0118]	Val Tyr Ala Leu Gly Pro Trp Lys Leu Gly
[0119]	145 150
[0120]	<210> 6
[0121]	<211> 121
[0122]	<212> PRT
[0123]	<213> 人工序列
[0124]	<220>
[0125]	<223> 合成 - 杂交瘤 6H5/H1 - 抗P VL
[0126]	<400> 6
[0127]	Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
[0128]	1 5 10 15
[0129]	Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Gly Asp Ile
[0130]	20 25 30
[0131]	Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
[0132]	35 40 45
[0133]	Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr
[0134]	50 55 60
[0135]	Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu
[0136]	65 70 75 80
[0137]	Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ile Arg Glu
[0138]	85 90 95
[0139]	Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys Tyr Ser Ser Ser Ile
[0140]	100 105 110
[0141]	Phe Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly Asn
[0142]	115 120
[0143]	<210> 7
[0144]	<211> 462
[0145]	<212> DNA
[0146]	<213> 人工序列
[0147]	<220>
[0148]	<223> 合成 - 杂交瘤 6H5/H1 - 抗P VH
[0149]	<400> 7
[0150]	atggaatgga gcaggcagag gcctgaacag ggcttgaggat ggcttgggag gattgatacct 60
[0151]	gcgaatggta attctaaata tgaccggaag ttccagggca aggcactat aacagcagac 120
[0152]	acatcctcca acacagccta ctctgcaca gcttctggct tcaacattac acagtctcct 180
[0153]	gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg gccaccatct catacagggc cagcaaaagt 240
[0154]	gtcagtacat ctggctatag ttatatgcac tggaaccaac agaaaccagg aatggcctct 300

- [0155] ggattcactt tcagtcacta tgccatgtct tgggctcgcc agactccgga gaagcagcag 360
[0156] tctgggcctg agctggtgag gcctggggct tcagtgggtca ctgtctctgc agccaaaaca 420
[0157] acacccccac ccgtctatgc ccttggeccc tggaagcttg gg 462
[0158] <210> 8
[0159] <211> 363
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列
[0162] <220>
[0163] <223> 合成 - 杂交瘤 6H5/H1 - 抗P VL
[0164] <400> 8
[0165] atggagtcag acacactgct gactggtgac attgtgctga cacagtctcc tgcttcctta 60
[0166] gctgtatctc tggggcagag ggccactggt gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc 120
[0167] ttagctgtat ctctggggca gagggccacc atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt 180
[0168] acatctggct atagttatat gcactggaac caacagaaac caggacagcc acccagactc 240
[0169] ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct ggggtcccta ttagggagct tacacgttcg 300
[0170] gaggggggac caagctggaa atattcatct tccatcttcc caccatccag taagcttggg 360
[0171] aat 363
[0172] <210> 9
[0173] <211> 33
[0174] <212> DNA
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> 合成 - 引物的核苷酸 MuIgkVL5'-B
[0178] <400> 9
[0179] gggaattcat ggagacagac acactcctgc tat 33
[0180] <210> 10
[0181] <211> 39
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 人工序列
[0184] <220>
[0185] <223> 合成 - 引物的核苷酸 MuIgkVL5'-C
[0186] <400> 10
[0187] actagtcgac atggagwcag acacactsct gytatgggt 39
[0188] <210> 11
[0189] <211> 33
[0190] <212> DNA
[0191] <213> 人工序列
[0192] <220>
[0193] <223> 合成 - 引物的核苷酸 MuIgVH5'-A

-
- [0194] <400> 11
[0195] gggaattcat grasttskkg ytmrctkgr ttt 33
[0196] <210> 12
[0197] <211> 35
[0198] <212> DNA
[0199] <213> 人工序列
[0200] <220>
[0201] <223> 合成 - 引物的核苷酸 MuIgVH5'-F
[0202] <400> 12
[0203] actagtcgac atgaacttyg ggytsagmtt grttt 35

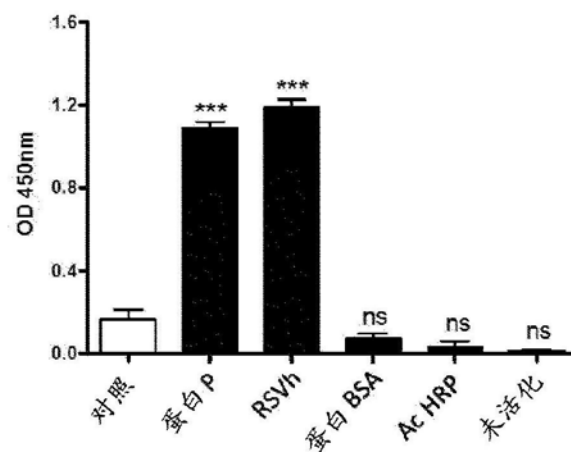
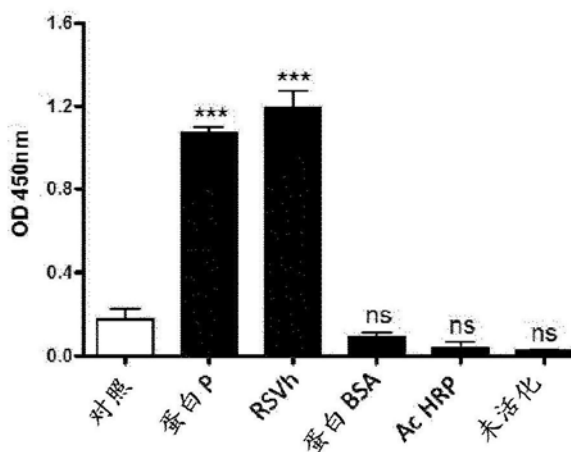
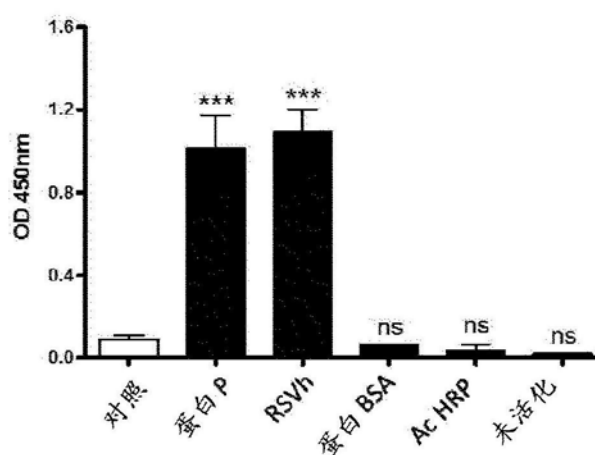
A**B****C**

图1

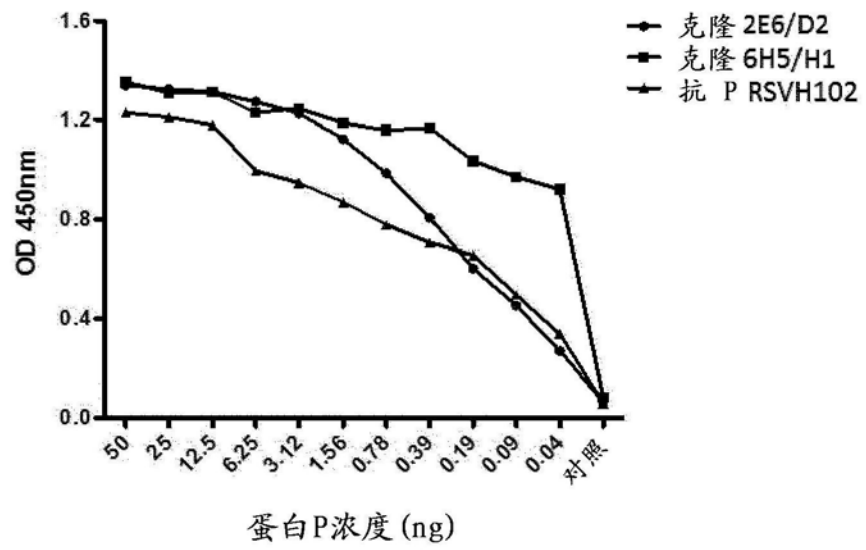
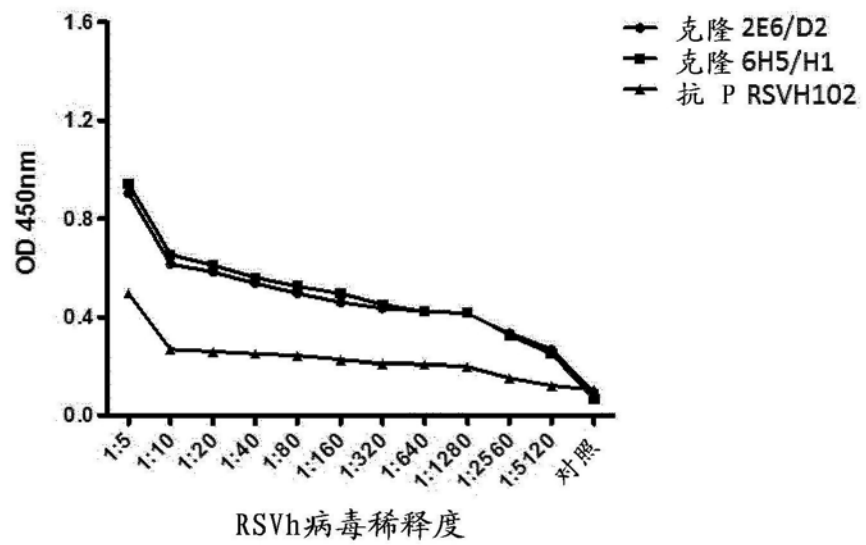
A**B**

图2

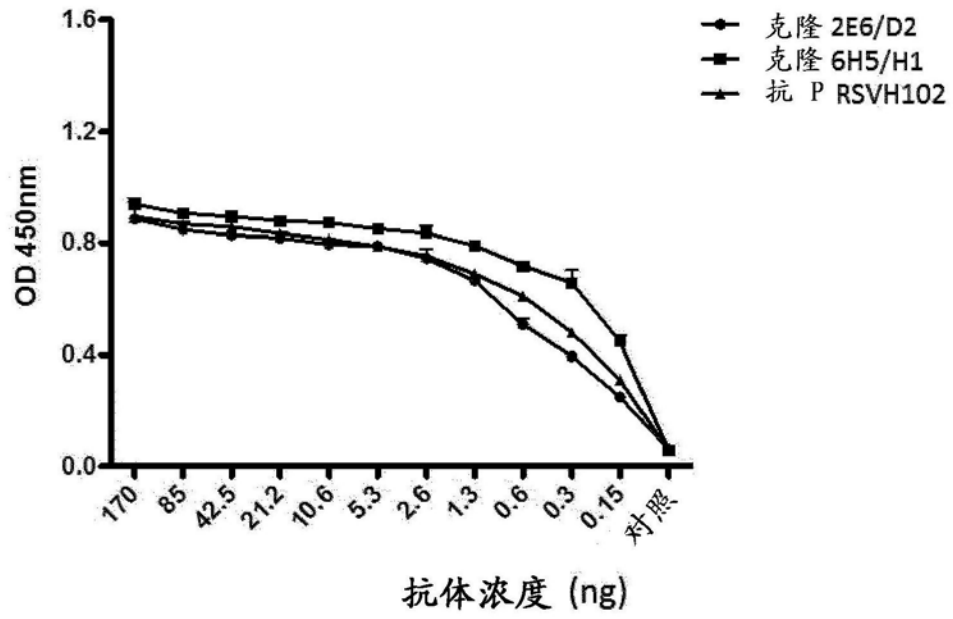


图3

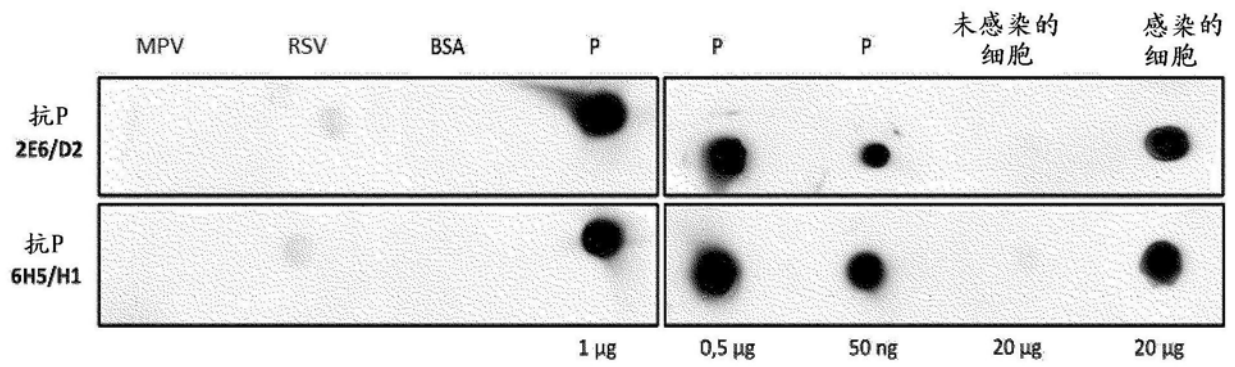


图4

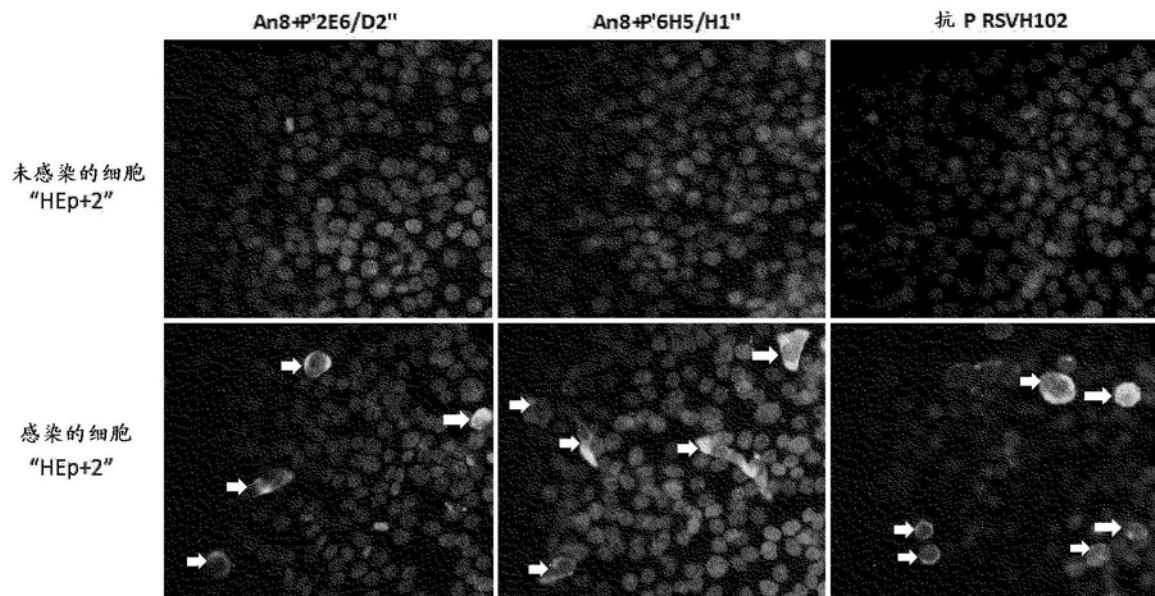
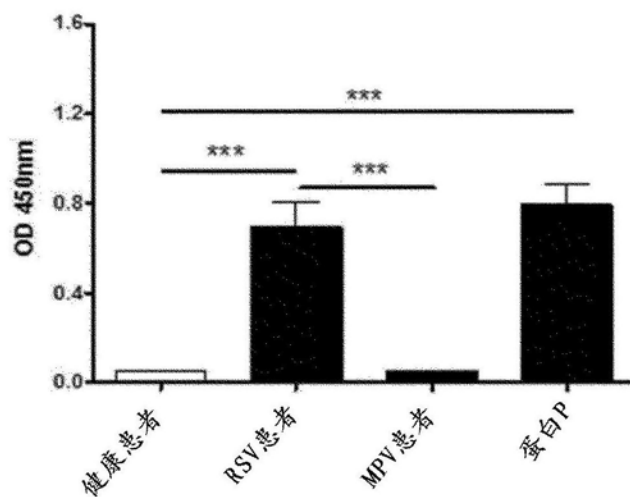
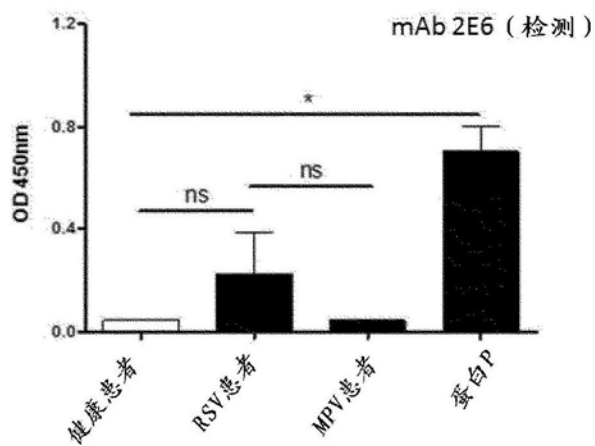
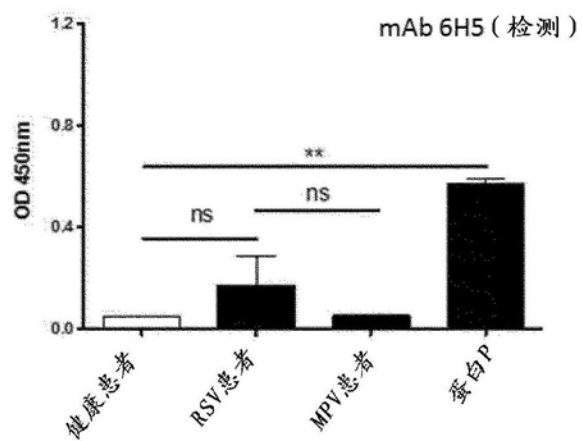


图5

A**B**

抗 P RSVH102 (捕获)



抗 P RSVH102 (捕获)

图6