

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/13

C07K 16/10 C12N 5/28

C07K 14/18 A61K 39/42

A61K 31/00 A61P 31/14

//(A61K39/42,31 : 00)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813409.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 10 日

[11] 公开号 CN 1545551A

[22] 申请日 2001.7.25 [21] 申请号 01813409.2

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 26 [33] IL [31] 137522

[86] 国际申请 PCT/IL2001/000684 2001. 7. 25

[87] 国际公布 WO2002/008292 英 2002. 1. 31

[85] 进入国家阶段日期 2003. 1. 27

[71] 申请人 DRK - 布拉特斯班德艾迪恩斯特巴登
伍尔梯姆伯格

地址 德国乌尔姆

[72] 发明人 伯恩哈德·库巴内克

马尔恰·达席瓦尔·卡尔多索

卡尔·西蒙内特 什洛莫·达冈

拉赫尔·埃伦

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

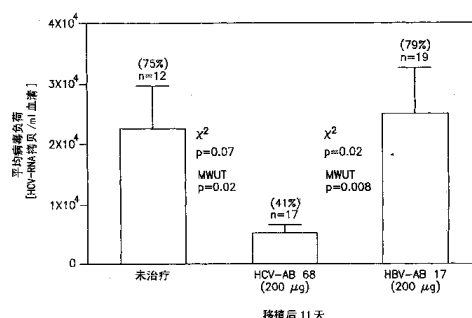
代理人 程金山

权利要求书 3 页 说明书 13 页 序列表 3 页
附图 9 页

[54] 发明名称 针对丙型肝炎病毒 E2 糖蛋白的人单
克隆抗体

[57] 摘要

本发明公开了一种产生人抗体的杂交瘤细胞系, 该抗体能够结合丙型肝炎病毒 (HCV) E2 糖蛋白并且能够在动物模型中体内中和 HCV 感染, 本发明还公开了由该细胞系产生的抗体。本发明同时公开了所述抗体在预防和治疗 HCV 感染方面的各种用途。从人供体中获得的、具有高滴度的抗 HCV E2 抗体的外周血淋巴细胞在体外被 EB 病毒转化, 随后与异骨髓瘤细胞融合以产生能够分泌对 HCV E2 糖蛋白具有高亲和力和特异性的人抗体的杂交瘤。



- 1、一种人单克隆抗体，该抗体选自：
 - 5 (a) 一种能够在体内中和 HCV 感染并且能够结合到 HCV 包膜糖蛋白上的人单克隆抗体；
 - (b) 人单克隆抗体 HCV-AB68，其由保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC)，保藏号为 00051714 的杂交瘤细胞系分泌，或者其保持有 HCV-AB68 抗原结合特性的片断；
 - 10 (c) 一种人单克隆抗体或者其片断，其包含至少一个重链可变区和一个轻链可变区，重链可变区的氨基酸序列描述于图 4 (SEQ ID NO: 4)，轻链可变区的氨基酸序列描述于图 4 (SEQ ID NO: 3)。
- 2、于 2000 年 5 月 17 日保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC)，保藏号为 00051714 的杂交瘤细胞系。
- 15 3、一种被根据权利要求 1 的抗体结合的抗原。
- 4、一种药物组合物，其包含治疗有效量的、权利要求 1 的抗体和药用载体。
- 5、权利要求 1 中的抗体在治疗和/或预防 HCV 感染的药物组合物制备方面的用途。
- 20 6、权利要求 1 中的抗体在治疗 HCV 感染的药物组合物制备方面的用途。
- 7、一种药物组合物，其包含治疗有效量的权利要求 1 的抗体，该抗体与至少一种作为附加活性组分的其它抗病毒制剂结合，该制剂优选选自干扰素，抗 HC 单克隆抗体，抗 HC 多克隆抗体，RNA 聚合酶抑制剂，蛋白酶抑制剂，IRES 抑制剂，解旋酶抑制剂，反义化合物和核酶。
- 25 8、根据权利要求 7 的药物组合物，其中的抗病毒制剂是一种小分子。
- 9、与抗病毒制剂结合的权利要求 1 的抗体在治疗 HCV 感染的药物组合物制备方面的用途，所述的制剂优选选自干扰素，抗 HC 单克隆抗体，抗 HC 多克隆抗体，RNA 聚合酶抑制剂，蛋白酶抑制剂，IRES 抑制
- 30

剂，解旋酶抑制剂，免疫调节剂，反义化合物和核酶。

- 10、一种用于治疗 HCV 感染的药物组合物，其包含一种作为活性组分的、依据权利要求 1 的抗体，和一种药用载体。
- 11、一种用于治疗 HCV 的药物组合物，其包含治疗有效量的权利要求
5 1 的抗体，该抗体与至少一种作为附加活性组分的其它抗病毒制剂结合，该制剂优选选自干扰素，抗 HC 单克隆抗体，抗 HC 多克隆抗体，RNA 聚合酶抑制剂，蛋白酶抑制剂，IRES 抑制剂，解旋酶抑制剂，免疫调节剂，反义化合物和核酶。
- 12、根据权利要求 11 的药物组合物，其中的抗病毒制剂是一种小分
10 子。
- 13、一种治疗 HCV 感染的方法，其包含将治疗有效量的根据权利要求 1 的抗体给予需要其的个体。
- 14、一种降低 HCV 感染在个体群中发生的方法，其包含将根据权利要求 1 的人单克隆抗体给予个体群以在个体群中降低 HCV 感染的发
15 生。
- 15、一种治疗 HCV 感染的方法，其包含将治疗有效量的根据权利要求 11 的药物组合物给予需要其的个体。
- 16、一种治疗 HCV 感染的方法，其包含将治疗有效量的根据权利要求 12 的药物组合物给予需要其的个体。
- 20 17、一条多肽，该多肽是具有图 4 所示氨基酸序列的单克隆抗体 HCV-AB 68 可变区的轻链，或者其保留有单克隆抗体 HCV-AB 68 对 HCV 结合特异性的一部分。
- 18、一条多肽，该多肽是具有图 4 所示氨基酸序列的单克隆抗体 HCV-AB 68 可变区的重链，或者其保留有单克隆抗体 HCV-AB 68 对
25 HCV 结合特异性的一部分。
- 19、一种多核苷酸，其编码抗体的一条链，此链具有单克隆抗体 HCV-AB 68 的结合特异性，所述的多核苷酸选自：
(a) 一种编码单克隆抗体 HCV-AB 68 一条链的多核苷酸，所述的单克隆抗体由保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC)，保藏号为
30 00051714 的杂交瘤细胞系分泌；

(b) 一种编码(a)中所定义的链的一个片段的多核苷酸, 当与所述抗体的其它链或者所述抗体的所述其它链的一个片段结合的时候, 所述片段能够基本上保持整个抗体的抗原结合特性。

针对丙型肝炎病毒 E2 糖蛋白的人单克隆抗体

5

发明领域

本发明涉及一种产生人抗体的杂交瘤细胞系，所述的人抗体能够结合丙型肝炎病毒包膜糖蛋白，本发明还涉及由该细胞系产生的抗体，以及其各种用途。

10

发明背景

丙型肝炎病毒（HCV）感染是一个主要的、世界范围的健康问题。全世界大约有 1,700,000,000 人感染丙肝病毒，而且长期感染的患者有发展为肝硬化和肝细胞癌的高危因素（Cohen 1999 Science 285:26-30）。

15

单独或与三氮唑核苷联合使用干扰素- α 来治疗 HCV，结果表明分别在 20% 和 40% 的患者间有功效。

20

HCV 是一种有包膜病毒，其遗传信息被编码在 9.5 千碱基正链的 RNA 基因组中。341 个碱基对的高度保守的非编码区位于这个病毒基因组的 5' 末端，其后跟随有一个长的可读框，该可读框编码大约有 3,010 个氨基酸的多蛋白。已经在两个推定的包膜糖蛋白 E1（gp35）和 E2（gp72）上分别鉴定出了 5 或 6 和 11 个连接到 N 端的糖基化位点。高水平的遗传变异性与包膜基因相关。这着重体现在 E2 基因的 5' 末端，其被定义为 HVR1 和 HVR2 的两个高变区已经被描述（Kato 等., 1992 Bioch. Biophys. Res. Commun. 189:119-127）。

25

使用在哺乳动物细胞中表达的 HCV E1-E2 蛋白的研究说明：被感染的个体对 HCV E2 有抗体反应（Harada, 等, 1994 J. Gen. Virol. 76: 1223 - 1231）。近来的研究工作提示：在来自 HCV 感染患者的血清中存在中和抗体（Rosa et al., 1996 PNAS(美国) 93:1759-1763; Zibert 等., 1995 Virology 208:653-661; Zibert 等., 1997 J. Virol. 71:4123-4127）。

30

因为病毒不能在体外生长，因此研究者们使用替代物分析来了解病

毒中和反应 (Houghton. Hepatitis C viruses. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM(eds) Virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1035 – 1058 页)。一种替代分析——结合中和作用 (NOB) 分析评价特定抗体或血清在防止 HCV E2 蛋白与人 T 细胞系相关联的能力 (Rosa 等., 1996 PNAS(美国) 93:1759-1763)。

在 Habersetzer 等., 1998 Virology 249:32-41 中, 描述了在体外能够抑制 HCV E2 与人细胞间的相互作用的人单克隆抗体。

在 Burioni 等., 1998 Hepatology 28:810-814 中报道了对应于 HCV E2 蛋白的人重组体 Fabs, 其能够在体外类似地抑制 HCV 与人细胞间的相互作用。

在 PCT 专利申请 WO 200005266 中公开了一些抗体, 这些抗体含有至少一个人抗体可变结构域的互补决定区 (CDR), 这些抗体特异性识别 HCV E2 的构象依赖性表位, 并能沉淀 E1/E2 复合体。

在 PCT 专利申请 WO 9740176 中公开了一种重组体人抗体 Fab 部分, 该部分能够与通过使用组合抗体文库而得到的 HCV E2 结合。此抗体用于治疗 HCV 感染的相关性仍需要作进一步证实。

因此, 主要感兴趣的所在是鉴定针对 E2 糖蛋白的人单克隆抗体 (Mabs), 这些抗体能够在体内中和 HCV 感染。此抗体可以建立治疗 HCV 感染的新候选方法。

在 Cardoso 等., J. Med. Virol. 55, 28-34(1998)中描述了能够结合到丙型肝炎病毒包膜糖蛋白上的人单克隆抗体的分离。其中一种被描述的抗体 (4F7) 被进一步表征并且测序, 这种抗体就是本发明的主题。

发明概述

依照本发明, 提供了一种杂交瘤细胞系, 该细胞系分泌的人抗体能够结合丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 并且能够在动物模型体内中和 HCV 感染。依照本发明, 外周血单核细胞 (PBMC) 从具有抗 HCV E1/E2 抗体的人个体中获得。来自于人供体的 PBMC 可以从全血中获得或者通过白细胞分离置换法(leukopheresis)获得。然后用 EB 病毒(EBV) 体外转化人 PBMC (Simoneit 等. 1994 Hybridoma 13:9-13)。在转化以后, 通过本

领域熟知的技术，将所得到的抗 HCV 一产生的类淋巴母细胞在体外优选与人鼠融合体例如异骨髓瘤(Heteromyeloma)融合(例如 Kohler & Milstein, Nature, 256:495-497, 1975)。产生的杂交瘤细胞系可以在合适的培养基中体外培养，所需要的单克隆抗体从上清液中回收，或者任选地，也可以
5 将杂交瘤细胞系注射至小鼠腹腔中，并且从这些小鼠的恶性腹水(ascitis)或血清中获得抗体。通过任何本领域已知的方法例如酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定法(RIA)对杂交瘤细胞系的上清液进行筛查，通过将 HCV E1/E2 作为抗体结合底物来筛查是否存在抗 HCV E1/E2 抗体。通过此方法产生的人单克隆抗 HCV E1/E2 抗体被进一步用于 HCV
10 感染的小动物模型中来检验其中和病毒或者降低病毒负荷(viral load)的能力。病毒的中和作用或者病毒负荷的降低可以通过例如，使用对动物血清中 HCV RNA 的 RT-PCR 分析或者通过 HCV 阳性鼠的数量来进行测量。

依照本发明的优选实施方案，提供了一种杂交瘤细胞系，该细胞系
15 于 2000 年 5 月 17 日保藏在欧洲动物细胞保藏中心(European Collection of Cell Cultures)(ECACC, CAMR, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, UK)，保藏号为 00051714。该实施方案还提供了由上述杂交瘤细胞系分泌的抗 HCV E2 人单克隆抗体(在此被命名为 HCV-AB 68)及其片断，这些片断保留有该抗体的抗原结合特性。这样的片断可以是例如 Fab 或 F(ab)₂
20 片断，其通过使用各种酶来降解整个抗体而获得，这对本领域的技术人员是熟知的并且已经被广泛地描述。通过使用标准分析法如 RIA, ELISA 或 FACS(荧光激活细胞分选仪)分析来确定抗体的抗原结合特性。

通过使用 BIAcore2000 仪器(Pharmacia Biosensor)确定：本发明的
25 抗体对在 10^{-9} M 和 10^{-11} M 范围内的 HCV E2 具有相对高的亲和力。

被上述定义的抗体所结合的抗原也构成本发明的一个方面。

本发明的另一方面是 HCV-AB 68 单克隆抗体在疾病预防和治疗中的各种用途。依据本发明的这一方面，包含有 HCV-AB 68 抗体的药物组合物可以被用来治疗慢性丙型肝炎患者，所述治疗是通过给予这些患者治
30 疗有效量的能够结合 HCV E2 的抗体或者其片断。治疗学有效量指的是

能够在个体中有效减轻 HCV 感染症状的量，或者是有效降低循环中病毒粒子的量。这些药物组合物也可用于例如对 HCV 阳性母亲分娩的新生儿的被动免疫，也可用于肝移植患者的被动免疫以防止在这些患者体内可能出现的反复 HCV 感染。本发明的另一个方面是一种药物组合物，其包含治疗有效量的本发明的抗体，该抗体与至少一种作为附加活性组分的其它抗病毒制剂结合。这些制剂包括但不限于干扰素，抗 HCV 单克隆抗体，抗 HCV 多克隆抗体，RNA 聚合酶抑制剂，蛋白酶抑制剂，IRES 抑制剂，解旋酶抑制剂，免疫调节剂，反义化合物和核酶。

10 附图简述

图 1 是蛋白印迹实验的一张照片，其显示了 HCV-AB 68 与几种在电泳之前被各种条件处理的 E2 蛋白的结合。板 (a) 和板 (b) 代表了在天然条件下制备的 E2 样品。板 (c) 和板 (d) 代表了用 β -巯基乙醇 (β -ME) 处理的 E2 样品。板 (e) 和板 (f) 代表了用 DTT 处理的 E2 样品。板 (a) (c) (e) 代表了这样的 E2 样品，这些样品在上样之前，在 37°C 培育了 5 分钟，而板 (b) (d) (f) 样品于上样前在 100°C 被加热。

各个泳道含有表达自不同 E2 构建体的蛋白或者由使用不同表达系统表达的蛋白。

1、E2 BEVS。一种昆虫细胞中产生的重组体 E2 蛋白。

20 2、没有 HVR1 (高可变区 1) 的 E2 BEVS。一种在 5' 末端缺失了 33 个氨基酸的重组体 E2 蛋白。

3、E2 MCS BEVS。代表所有 6 种 HCV 基因型的最常见序列的重组体 E2 蛋白。

4、没有 HVR1 的 E2 MCS BEVS。3 中的重组体 E2 蛋白，其缺失了除 4 个氨基酸以外的大部分 HVR1。

5、E2 CHO。CHO 细胞中产生的重组体 E2 蛋白。

图 2 显示了通过 HCV-AB 68 和一种对照抗体 (HCV-AB17)，免疫磁性分离 (IMS) 来自 HCV 感染血清的 HCV 颗粒。图 2A 是一张琼脂糖凝胶的照片，其显示了代表 HCV 颗粒的 PCR 产物。图 2B 是一张图示，其代表了对结合 + 未结合部分进行 PCR，所检测到的结合病毒占

病毒总量的百分比。

图 3 代表了 HCV-AB68 可变结构域的轻链和重链的核苷酸序列。基因的 FWs（框架）和 CDRs（互补决定区）被标记。

图 4 代表了 HCV-AB68 可变结构域的轻链（V_L）和重链（V_H）的
5 氨基酸序列。基因的 FWs 和 CDRs 被标记。

图 5 是一张图示，其代表了在未治疗的组中、用 HCV-AB 68 治疗的组中、和用 HBV-AB17 治疗的对照组中（在治疗模型中），在移植后 12 天的平均病毒负荷和 HCV 感染动物的百分比（括号中的数字）。

图 6 是一张图示，其代表了在未治疗的组中和用不同剂量的 HCV-
10 AB 68 治疗的组中，在移植后 16 天和 21 天的平均病毒负荷和血清中含有阳性 HCV RT-PCR 信号的 HCV-三跗节类（Trimer）小鼠的百分比（括号中的数字）。

图 7 是一张图示，其代表了在未治疗的组中、用 HCV-AB 68 治疗的组中、和用 HBV-AB 17 治疗的对照组中（在感染抑制模型中），在
15 移植后 11 天的平均病毒负荷和血清中含有阳性 HCV RT-PCR 信号的 HCV-三跗节类 小鼠的百分比（括号中的数字）。

图 8A 是一张蛋白印迹的照片，其显示了抗 HCV 抗体 4E5 与几种表达自不同 E2 构建体的蛋白或者由使用不同表达系统表达的蛋白之间的结合。泳道的数字与那些在图 1 中描述的数字相对应。

图 8B 是一张图示，其代表了在未治疗的组中、用 HCV-AB 68 治疗的组中、和用 4E5 治疗的组中（在感染抑制模型中），在移植后 15 天的平均病毒负荷和血清中含有阳性 HCV RT-PCR 信号的 HCV 三跗节类小鼠的百分比（括号中的数字）。

图 9 是一张图示，其代表了在未治疗的组中、用 I70 治疗的组中、
25 用 HCV-AB 68 治疗的组中、和同时使用 I70 与 HCV-AB68 治疗的组中，在移植后 14 天的平均病毒负荷和血清中含有阳性 HCV RT-PCR 信号的 HCV 三跗节类小鼠的百分比（括号中的数字）。

以下参照实施例对本发明进行描述，这些实施例是通过例证的方法
30 提供的而且这些实施例并不是为了对本发明进行限制。

实施例

材料与方法

EBV 转化和细胞融合

- 5 外周血单核细胞 (PBMC) 从HCV感染的人供体血中获得。此供者在三代ELISA试验 (Ortho Diagnostic Systems, 德国) 和补充试验 (RIBA, Ortho 或者 Matrix, Abbott) 中都表现为HCV阳性。用EB病毒 (EBV) 转化此供者的PBMC (Siemonet K 等. 1994, Hybridoma 13: 9-13)。将转化产生的类淋巴母细胞的上清液用于抗HCV E1/E2抗体产物筛查。通过
- 10 使用HCV基因型1a病毒 (H株) 的包膜蛋白E1和E2的ELISA来执行这种筛查。将阳性克隆与异骨髓瘤细胞系K6H6/B5(Cardoso MS 等. 1998, J Med Virol 55: 28-34)融合。如上筛查所得到的杂交瘤克隆, 将阳性克隆通过限制稀释克隆三次并且最后被扩增以用于抗体生产。

15 IgG 亚类的确定

- 人IgG亚类的确定是通过使用平板的夹心ELISA来进行的, 该平板用纯化的羊F(ab)₂抗一人IgG (Chemicon) (0.25μg/孔) 或者E2 (通过杆状病毒表达系统内部产生) (0.1μg/孔) 包被。鼠抗人IgG亚类 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (Sigma) 被作为第二抗体, 纯化的羊抗鼠IgG过氧化物酶偶联剂 (Zymed 实验室) 被作为检测试剂。室温下培育1小时后
- 20 洗涤, 加入底物溶液3, 3', 5, 5'-四甲基-联苯胺二氢氯化物 (TMB) (Sigma)。使用ELISA读出器在450nm处读取结果。

亲和常数测定

- 25 依照生产商的使用说明书, 使用由生产商提供以确定离解率的BIA评价3.0软件, 用BIAcore 2000 仪器 (Pharmacia Biosensor) 来确定纯化的HCV-AB 68对HCV E2的亲和常数 (KD)。

- 使用两种不同的来源的HCV E2蛋白: 1) E2 CHO, 由哺乳动物CHO细胞产生的、可商购的重组HCV基因型1b E2蛋白 (Austral Biologicals, CA; 基于 Choo 等. 1991 PNAS 88: 2451)。这是一种被截短了的蛋白, 其包
- 30

含有331个氨基酸而且在蛋白印迹上的电泳结果表现为一段约60KD的带。2) E2 BEVS, 用杆状病毒作为表达载体, 在昆虫细胞中产生的重组体HCV基因型1b E2蛋白。此蛋白包含279个氨基酸, 而且在E2的 3'疏水末端有150个氨基酸缺失 (删除这些氨基酸的目的是为了使蛋白溶解并且使蛋白表达)。

蛋白印迹分析

所有的蛋白凝胶都使用预制的4-12% NuPage Bis-Tris胶(Novex, CA)来进行。根据厂商的建议, 使用Xcell II小细胞(Novex, CA)来将蛋白转移到硝酸纤维素膜。

关于天然凝胶, 将200 ng的每种抗原与缺少还原剂的天然样品缓冲液混合, 并且在加样前于37℃或100℃培育5分钟。对于还原凝胶, 将相同数量的抗原与包含有或β-巯基乙醇(360 mM)或DTT (50mM)的天然样品缓冲液混合, 并且用与天然凝胶相同的方法进行处理。

转移以后, 将印迹放在封闭缓冲液(PBS/奶/0.04% 吐温-20)中过夜培育, 然后与0.5 μg/ml HCV-AB 68一起培育3小时。印迹被封闭缓冲液清洗三次, 而后在封闭缓冲液中与被1:20,000稀释的过氧化物酶偶联的羊抗人IgG共培育60分钟。用PBS/0.04%吐温-20洗涤5分钟, 在洗涤3次后, 印迹被暴露于X光胶片并且使用增强化学发光(ECL)进行显影。

酶联免疫吸附试验 (ELISA):

将微量滴定板(F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate, Nunc, 丹麦)用2μg/ml E2-BEVS的PBS溶液包被, 50μl/孔。从1μg/ml开始被连续稀释的纯化的HCV-AB 68被加入孔内, 在4℃O.N.培育。1:20,000稀释的羊抗人IgG过氧化物酶偶联剂 (Zymed) 被用作二抗。37℃培育一个小时后洗涤, 加入底物溶液3, 3', 5, 5'-四甲基-联苯胺二氢氯化物 (TMB, Sigma, St. Louis, Mo)。在波长450 nm处, 用ELISA读出器读取结果。

来自感染者血清的HCV的免疫沉淀

为了检测HCV-AB 68与HCV颗粒的结合能力, 开发了免疫磁性分离

(IMS) 测定。在被感染患者的血清中出现的HCV病毒颗粒可以被用特定抗体包被的磁性珠捕获。在结合部分和未结合部分被磁性分离以后，用特殊的RT-PCR分析来检测这些颗粒。

依据生产商的说明书，将2 μ g的HCV-AB68包被到蛋白-A磁珠上 (Dynal A.S.)。HBV-AB 17，一种抗HBV而产生的单克隆抗体被作为一种阴性对照。所有反应均在室温下进行。在pH 8.1的0.1 M Na-P缓冲液中洗涤抗体包被的磁珠3次，在1% BSA中封闭30分钟，而且在将其再悬浮于PBS-0.1% BSA中之前，再次用PBS洗涤。平行地，用蛋白-A琼脂糖 (Pharmacia)对从感染个体中得到的测试血清进行预处理以清除血清抗体。这样的结果可以通过将10 μ l的蛋白-A琼脂糖与10 μ l的血清振荡培育30分钟，然后在5000转/分的转速下离心5分钟实现。而后将去除抗体的血清与抗体包被的磁珠振荡培养2小时。使用含有0.1% BSA的PBS将最后的体积定容至200 μ l。通过磁性分离而使其与非结合部分分离的结合部分，在被最后重新悬浮于200 μ l PBS之前，要用1毫升的PBS洗涤5次。

通过RT-PCR分析来评价结合部分和未结合部分的病毒数量。依据生产商的说明书，使用Tri-试剂BD (Sigma)来提取病毒RNA。RT反应(20 μ l 终体积)包含有4 μ l的RT缓冲液，1mM dNTP's，10mM DTT，100 U mLV-RT(Promega)，2.7 U AMV-RT (Promega)和2.5pM HCV反义引物 ATGRTGCTCGGTCTA。反应条件被设置为由37 $^{\circ}$ C升至42 $^{\circ}$ C，每20分钟增加1 $^{\circ}$ C。反应完成于94 $^{\circ}$ C培育10分钟这一步骤。5 μ l的RT反应物被作为PCR反应的模板(50 μ l 终体积)。PCR反应包括5 μ l PCR缓冲液，2.5mM MgCl₂，0.2mM dNTP's，0.25 U Taq 聚合酶(Promega)，0.25pM 有意义引物 CACTCCACCATRGATCACTCCC 和 反义引物 ACTCGCAAGCACCTATCAGG。在94 $^{\circ}$ C 1分钟；在58 $^{\circ}$ C 1分钟；在72 $^{\circ}$ C 1.5分钟进行33个扩增循环，最后在72 $^{\circ}$ C有一个5分钟的延长步骤。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶上分离，在EagleEye II装置上进行EB染色后，显影并且定量。

序列分析

使用RNAsolB(TEL-TEX, 有限公司)，从10 \times 10⁶杂交瘤细胞中分离

RNA。在50 μ l的反应体积中,依照标准程序,用反转录酶(RT)和寡脱氧胸苷(Promega)从10 μ g的总RNA来制备cDNA。用下列变性的引物,使用1 μ l的RT反应混合物进行PCR:

5'前导引物:

5 重链(V_H):

5'GGGAATTCATGGAGTTKGGGCTKAGCTGGRTTTTC 3'

轻链(V _{λ}):

5'-GGGAATTCATGRCCTGSWCYCCTCTCYTYCTSWYC-3'

或者 (V _{κ}):

10 , 5'-GGGAATTCATGGACATGRRRDYCCCHVGYKCASCTT-3'

相应于人恒定区的3'引物:

V_H 5'-GCGAAGCTTTCATTTACCCRGAGACAGGGAGAG-3'

V _{λ} 5'-GCGAAGCTTCTATGAACATTCTGTAGGGGCCAC-3'

V _{κ} 5'-GCGAAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-3'。

15 常用的单字母密码被结合到引物序列中:

R=A或者G S=C或者G W=A或者T Y=C或者T

D=A或者G或者T H=A 或者 C 或者 T V=A 或者 C 或者

G K=G 或者 T

将全长的重链和轻链的cDNA (PCR反应产物) 克隆到哺乳动物表达
20 质粒中。重链和轻链DNAs的多个独立的组合被转染到组织培养细胞中,
而且将其上清液用于抗体特异的活性分析。对轻链和重链质粒的阳性组
合,即产生抗体活性的组合进行测序。通过与基因库相比较和通过与Kabat
序列(Kabat等., 1991, Sequences of proteins of immunological interest (5th Ed.)
美国卫生保健部(U.S. Dept. of Health Services),美国国立卫生院(National
25 Institute fo Health), 贝塞斯达, 马里兰州)进行序列对比, 来对序列进行分
析。

实施例 1

用上面描述的方法来从抗 HCV 抗体阳性的人供体中获取人外周血单
30 核细胞(PBMC)并且在体外用 EBV 转染这些单核细胞。而后将其与人鼠

异骨髓瘤融合以形成杂交瘤细胞系。一种稳定的杂交瘤克隆被进一步表征，该克隆分泌特异的人抗 HCV E1/E2 抗体，其被表示为 HCV-AB 68。上述克隆所分泌的抗体被发现是 IgG1。HCV-AB 68 对 E2 CHO 的亲

常数为 $1.4 \times 10^{-11} \pm 0.3$ ，对 E2 BEVS 的亲

常数为 $1.7 \times 10^{-9} \pm 1$ 。通过蛋白印迹分析和 ELISA 来测试其特异性。在蛋白印迹中，HCV-AB 68 结

合同时

在杆状病毒表达系统（BEVS）和在哺乳动物表达系统（CHO 细胞）中表达的不同 E2 构建体。图 1 证明：HCV-AB 68 除了构建体 No.2（即：没有 HVR1 区域的 E2 蛋白）以外，结合到所有的 E2 构建体。在 β 巯基乙醇或者 DTT 存在的情况下，抗体不与 E2 结合。这些结果表明

HCV-AB 68 识别构象表位。

此外，抗体虽然不与构建体 2（其缺乏 HVR1）结合，但是却与构建体 4（除了 4 个 HVR1 3'末端的氨基酸以外缺乏 HVR1， IQLI）结合。看起来这几个氨基酸形成了 E2 上抗体结合表位的一部分。表 1 证明了在 ELISA 中，HCV-AB 68 对 E2 BEVS 的结合特性。

15

表 1: 通过 ELISA, HCV-AB 68 对 E2 的结合

	HCV-AB 68	OD _{450nm}
	μ g/ml	
	1	0.439
20	0.5	0.362
	0.25	0.305
	0.125	0.267
	0.0625	0.204
	0.03125	0.171
25	0.0156	0.12
	0.0078	0.065

实施例 2

如材料与方法中所述，通过免疫磁性分离（IMS），HCV-AB 68 抗体

被用于从 HCV 感染患者中的血液中捕获 HCV 颗粒。对两个患者进行了

单独实验，每个实验重复进行 3 次。患者 1 的 HCV 基因型是 1b 而患者 2 的基因型是 1a/1b。每个血清的 HCV 滴度为 $1-5 \times 10^6$ 。图 2 显示：HCV-AB68 结合的片段比 HBV-AB17 对照结合的片段要明显大得多。HCV-AB68 可以结合超过 50% 的病毒颗粒，而对照的 HBV-AB17 背景结合是在 1—5% 之间（图 2B）。

实施例 3

分离编码 HCV-AB 68 可变区的基因，全部测序，而且确定其亚型和互补决定区。通过与基因库序列和 Kabat 蛋白序列进行序列对比，确定了抗体含有一个全长人 Ig 基因序列。图 3 显示了编码 HCV AB 68 可变区重链和轻链的 cDNA 核酸序列（序列识别号码分别是 1 和 2）。图 4 显示了相应的氨基酸序列（序列识别号码分别是 3，4）。

序列数据显示：HCV-AB 68 可变区由亚类群 $V_{H3} J_{H4} V_{K1} J_{K1}$ 组成。

15 实施例 4

使用下面的 HCV—三跗节类 动物模型来表征 HCV-AB 68 的生物活性：对小鼠进行处理，以使得人的肝脏部分片段可以稳定的移植到其体内。该处理步骤包括在加强辐射后，进行 scid（严重联合免疫缺陷）小鼠骨髓移植。使用 HCV 阳性患者的血清，体外进行人肝脏片段的病毒感染(US 5,849,987)。

以两种不同的代表抗体的各种潜在用途的方式使用动物模型：对感染的治疗和抑制。

1、治疗——这种方式证明了使用所述抗体来治疗慢性 HCV 感染的能力。通过腹膜内二次注射，给予已经建立 HCV 病毒血症的三跗节类小鼠 HCV-AB 68 或者不相关的 HBV—AB17；每只小鼠总共给予 40μg 的 mAb，连续给予两天（20μg/小鼠/天）。在治疗完成后 1 天，在小鼠的血清样品中确定 HCV—RNA。图 5 说明：HCV—AB 68 能够同时降低阳性小鼠百分比（从 85% 到 42%）和平均病毒负荷（从 3.1×10^4 到 1.0×10^4 HCV RNA 拷贝/ml）。而非相关人单克隆抗体 HBV—AB 17 却没有显示出任何降低平均病毒负荷或者阳性小鼠百分比的能力。

图 6 显示：HCV-AB 68 在降低 HCV 阳性小鼠百分比和病毒负荷方面是剂量依赖的。如治疗 1 天后的测量结果所示，5 μ g/小鼠的总剂量将病毒负荷从 4.2×10^4 降低到 1.6×10^4 HCV RNA 拷贝/ml，并且将 HCV-RNA 阳性小鼠的百分比从 71%降低到 43%。最高剂量（60 μ g/小鼠）显示出最强的作用：病毒负荷降低了超过 1-log 系数（从 4.2×10^4 到 3.1×10^3 拷贝/ml）而且 HCV-阳性小鼠的百分比从 71%降低到 14%。在治疗停止 6 天后，对于所有 3 种剂量，病毒负荷和 HCV-阳性小鼠的百分比稍微反弹至明显低于在未治疗组中看到的水平。在该时间点，对于不同组的平均病毒负荷，仍然观察到了用药反应行为。

2、感染抑制——这种方式证明了使用抗体来预防肝脏感染的能力。将含有 10^6 HCV-RNA 拷贝/ml 的 0.5ml 人血清样品与 200 μ g 的 HCV-AB 68 或者与不相关的人抗-HBsAg 单克隆抗体 HBV-AB17 预先培育（室温 3 小时），随后将其用于体外感染正常人肝脏碎片。感染发生以后，将该肝脏碎片移植到小鼠体内，并且在 11 或者 15 天以后在血清中确定 HCV-RNA。图 7 显示：通过测定平均病毒负荷和 HCV-RNA 阳性小鼠的百分比表明 HCV-AB 68 在抑制 HCV 感染肝脏方面的作用。HCV-AB 68 将这些 HCV 阳性小鼠的百分比从 75%降低到 41%。其同时将病毒负荷从 2.2×10^4 降低到 5.0×10^3 HCV RNA 拷贝/ml 小鼠血清。而相等量（200 μ g）的不相关人单克隆抗体 HBV-AB17，却既不能降低阳性小鼠的百分比，也不能降低病毒负荷，这些结果与未治疗的对照组中所得到的结果类似（图 7）。在一个不同的实验中，在移植后 15 天取样进行测量，结果表明：HCV-AB 68 能够将 HCV 阳性小鼠的百分比从 76%降低到 41%（ $p=0.05$, $n=17$ ）并且将平均病毒负荷从 6.0×10^4 降低到 1.1×10^4 HCV RNA 拷贝/ml（ $p=0.003$ ）。

相反，蛋白印迹分析的结果证明另一种抗 HCV 人单克隆抗体 4E5 能够在体外结合到 E2（图 8A），但是在 HCV-三跗节类动物模型中，该抗体不能降低 HCV 感染小鼠的百分比并且不能降低平均病毒负荷（图 8B）。

30 实施例 5

在 HCV—三跗节类 模型中，测试了两种不同的潜在的抗病毒制剂的组合在治疗上的作用。该实验使用了 4 组小鼠。一组小鼠用抗病毒药物 I70（来自 Biochem Therapeutics，这是一种抑制 HCV 翻译的小分子）治疗。第二组用 HCV—AB68 治疗。第三组用两者的组合治疗。第四组作为对照，仅仅使用 Dulbecco's 氏磷酸盐缓冲盐水。在 I70 治疗组中，每只小鼠在肝脏移植后 10—13 天接受 1mg 的药物（0.25 mg/小鼠/天，腹膜内给予(i. p)）。在 HCV-AB 68 治疗组中，每只小鼠在肝脏移植后 12—13 天接受 40μg 的抗体（20μg/小鼠/天 i.p.）。在组合组中，每只小鼠接受上述治疗的组合。在第 14 天（治疗后一天），测定小鼠血清中的病毒负荷和 HCV 阳性小鼠的百分比。图 9 说明了使用药物组合在治疗上的优势。在治疗后 1 天进行的测量结果表明：使用 I70 进行治疗，将 HCV 平均病毒负荷从 4.72×10^4 降低到 1.42×10^4 并且将 HCV 阳性小鼠的百分比从 93 %降低到 50%，而使用 HCV—AB68 进行治疗，将 HCV 平均病毒负荷降低到 1.74×10^4 并且将 HCV 阳性小鼠的百分比降低到 50%。组合治疗将病毒负荷降低到 5.83×10^3 并且将 HCV 感染动物的百分比降低到 28%。

<110> DRK-布拉特斯班德艾迪恩斯特 巴登伍尔梯姆伯格 Ulm研究所

<120> 针对丙型肝炎病毒E2糖蛋白的人单克隆抗体

<130> AB-68 PCT

<150> IL 137522

<151> 2000-07-26

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactg 60

tcctgtgcaa cctctggatt ccccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcagtt atttcctatg atggaagtaa tgaacactct 180

atagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa caggttgtat 240

ctgcaaataga agagtctgag agctgaggac atggctgtgt atttctgtgt cagagggggcg 300

cataggagca gttggtcagg aaagcgcttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 2

<211> 321

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtct gaatatctt acctggttgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct catctatgag gcatctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggactcaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tctaatactc cctggacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg a 321

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

.

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Asn Ile Leu Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu His Ser Ile Asp Ser Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Arg Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Lys Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys	85	90	95
Val Arg Gly Ala His Arg Ser Ser Trp Ser Gly Lys Arg Phe Asp Tyr	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	

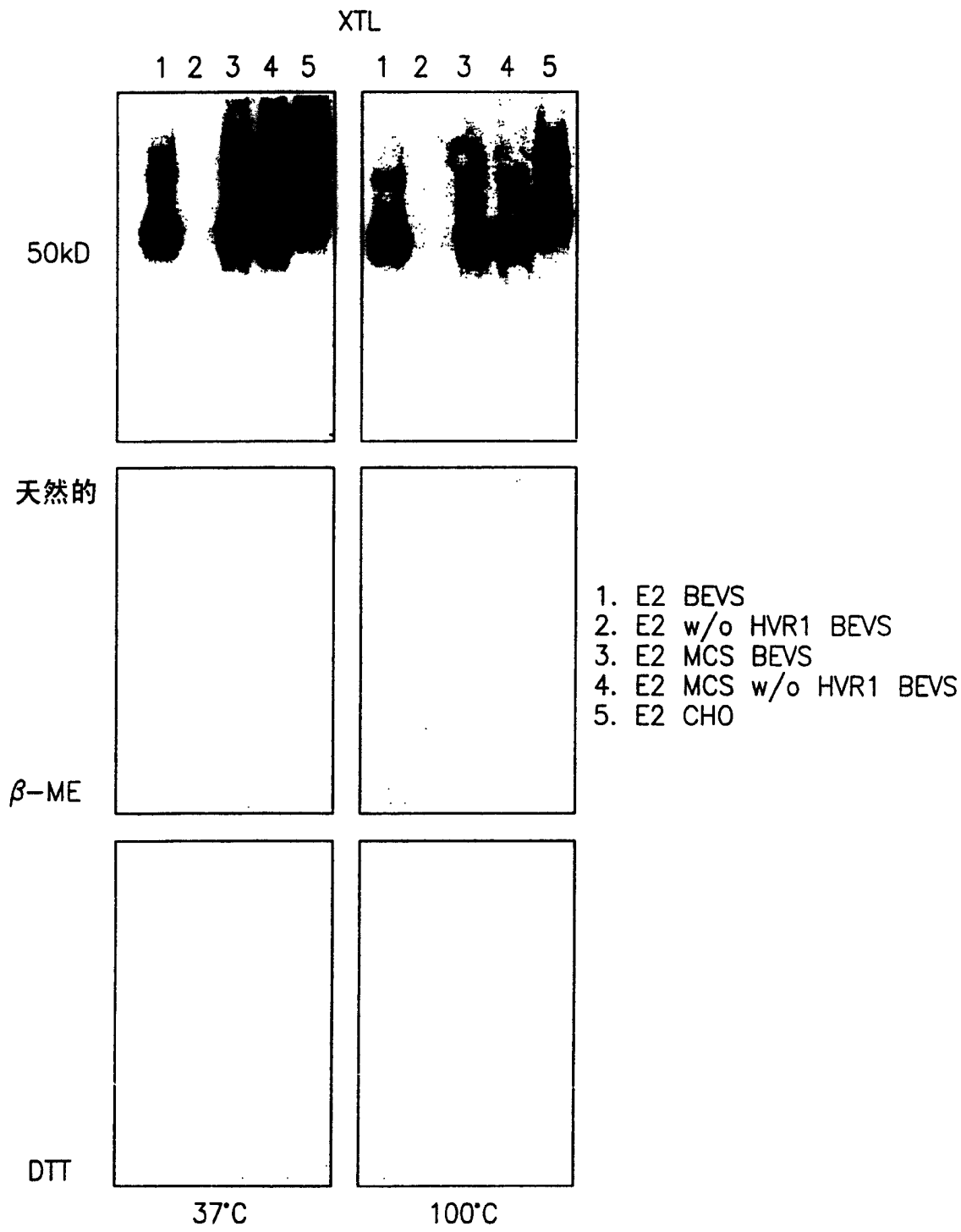


图 1

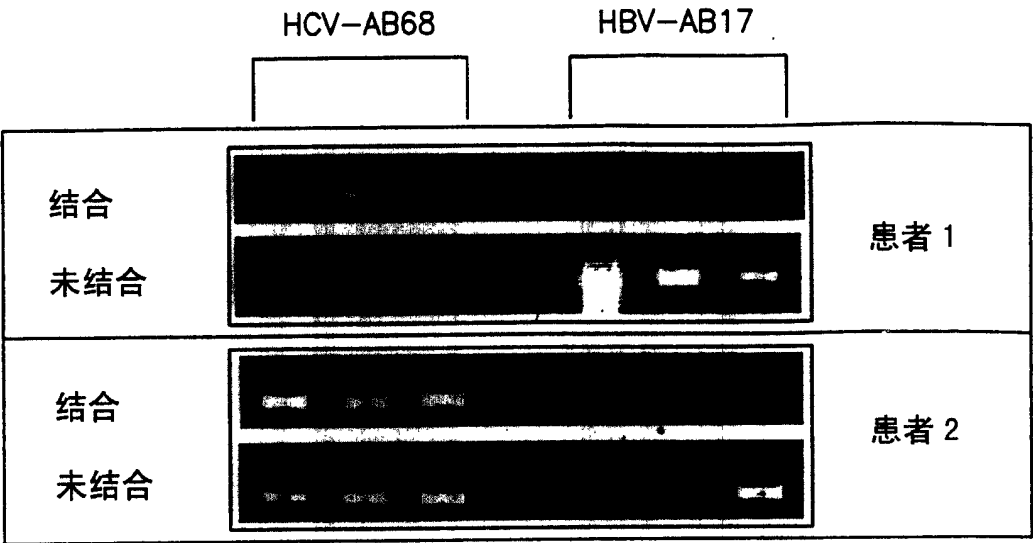


图 2A

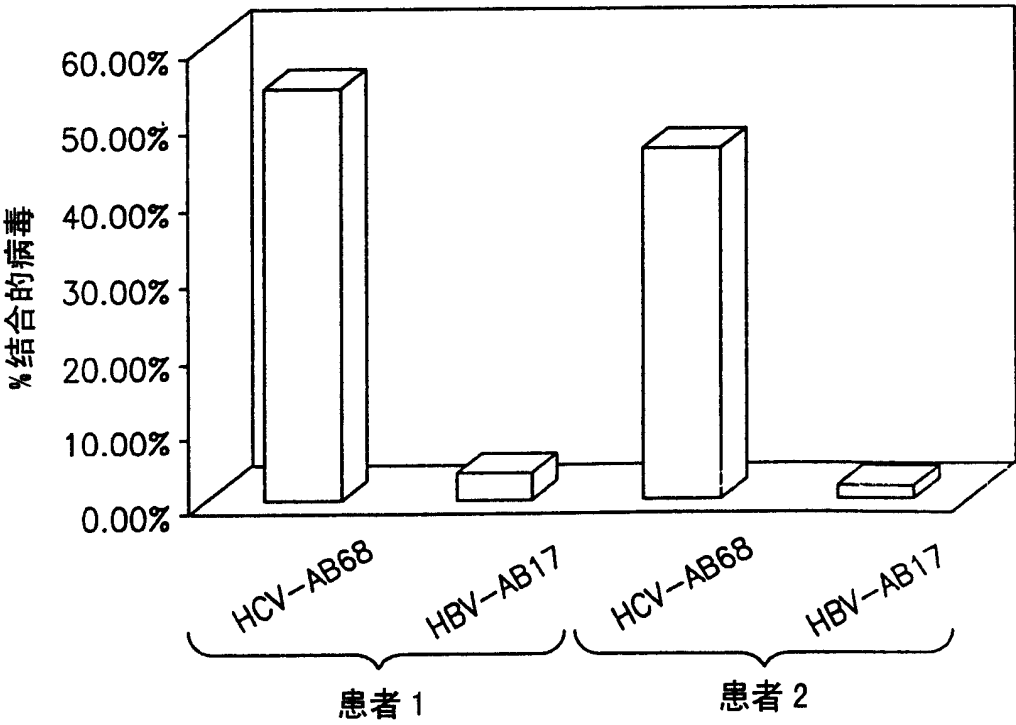


图 2B

<u>轻链</u>	
<u>FW1</u>	<u>CDR1</u>
GACATCCAGATGACCCAGTCTCTCCACCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC	CGGGCCAGTCTGAATATTCTTACCTGGTTGGCC
<u>FW2</u>	<u>CDR2</u>
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAACTCCTCATCTAT	GAGGCATCTAGTTTAGAAAGT
<u>FW3</u>	
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGGGCAGTGGATCTGGGACTCAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGC	
<u>CDR3</u>	<u>FW4</u>
CAACAGTCTAATACTCCCTGGACG	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA
<u>重链</u>	
<u>FW1</u>	<u>CDR1</u>
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGGTGTCACCCCTGGGAGGTCCTTGAGACTGTCTCTGCAACCTCTGGATTCCCCTTCAGT	AGCTATGGCATGCAC
<u>FW2</u>	<u>CDR2</u>
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCCTGGAGTGGGTGGCA	GTTATTTCTATGATGGAAGTAATGAACACTCTATAGACTCTGTGAAGGGC
<u>FW3</u>	
CGATTACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACAGGTTGTATCTGCAAAATGAAGAGTCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTTCTGTGTCA	
<u>CDR3</u>	<u>FW4</u>
GGGGCGCATAGGAGCAGTTGGTCAGGAAAGCGCTTGACTAC	TGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

图 3

V_L 氨基酸序列

	<u>FW1</u>	<u>CDR1</u>	<u>FW2</u>	<u>CDR2</u>	<u>FW3</u>
CDR1	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTTC	RASLNILTWLA	WYQQKPKĠAKPLLNY	EASSLES	GVPSTRFSGSGGTQFTLTISSLQPDDFATYYC

RASLNILTWLA WYQQKPGKAPKLLIY EASSLES GVPSRFGSGSGTQFTLTISSLQPDFFATYYC

CDR3
QQSNTPTWT

FW4
FGQGTKVEIKR

QQSNTPWTFGQGTKVEIKR

V_H 氨基酸序列

	<u>FW1</u>	<u>CDR1</u>	<u>FW2</u>	<u>CDR2</u>	<u>FW3</u>
QVQLVESGGGWQPG	QGRSLRL	SCATSGFPFS	SYGMH	VISYDGSNEHSDSVKG	RFTISRDNSKNRLYLQMKSLRAEDMAVYFCVR

WWRQAPGKLEWA VISYDGSNEHSIDSVKG RFTISRDN SKNRLYLQMKSLRAEDMAVYFCVR

<u>CDR3</u>	<u>FW4</u>
GAHRSSWSGKRFDY	WGQGTLVTSS

GAHRSSWSGKRFDY WGQGLTVTVSS

4
圖

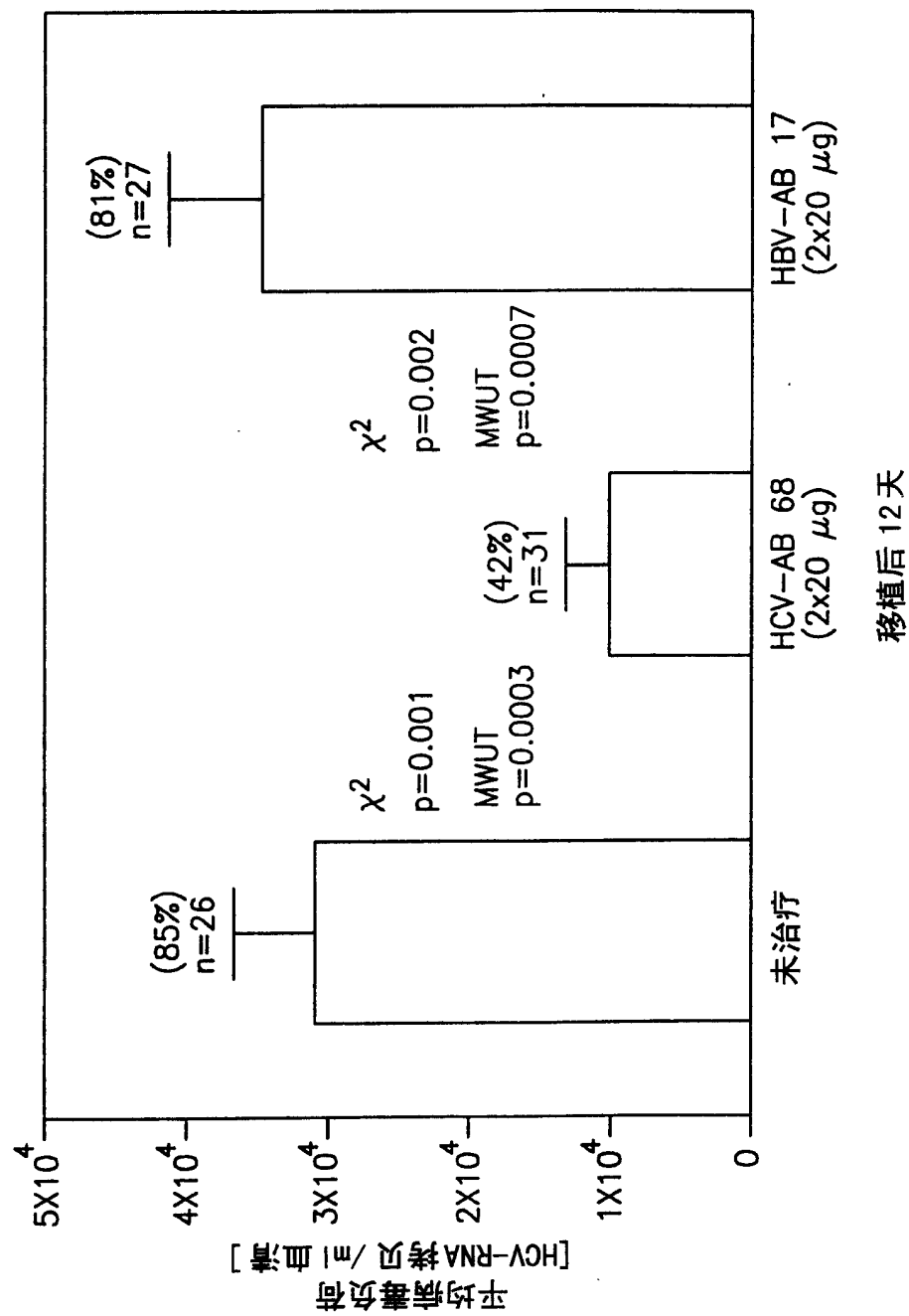


图 5

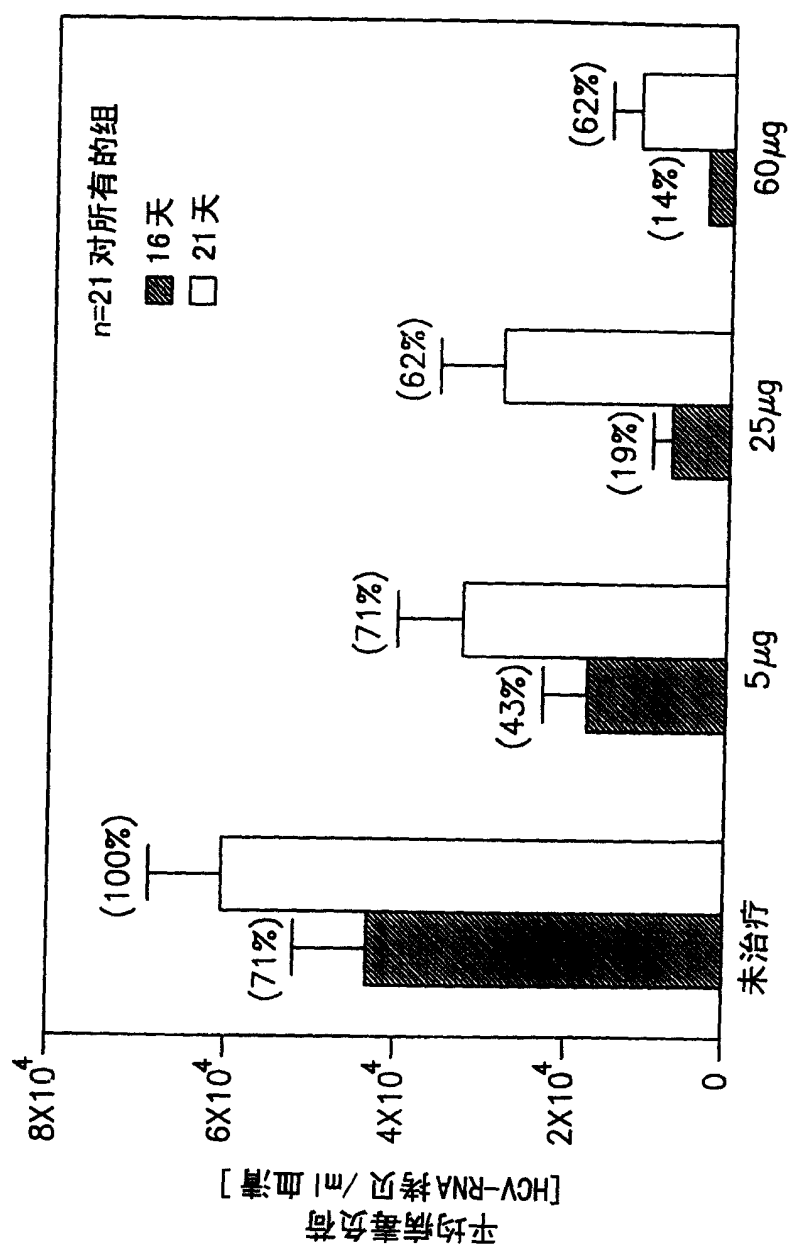


图 6

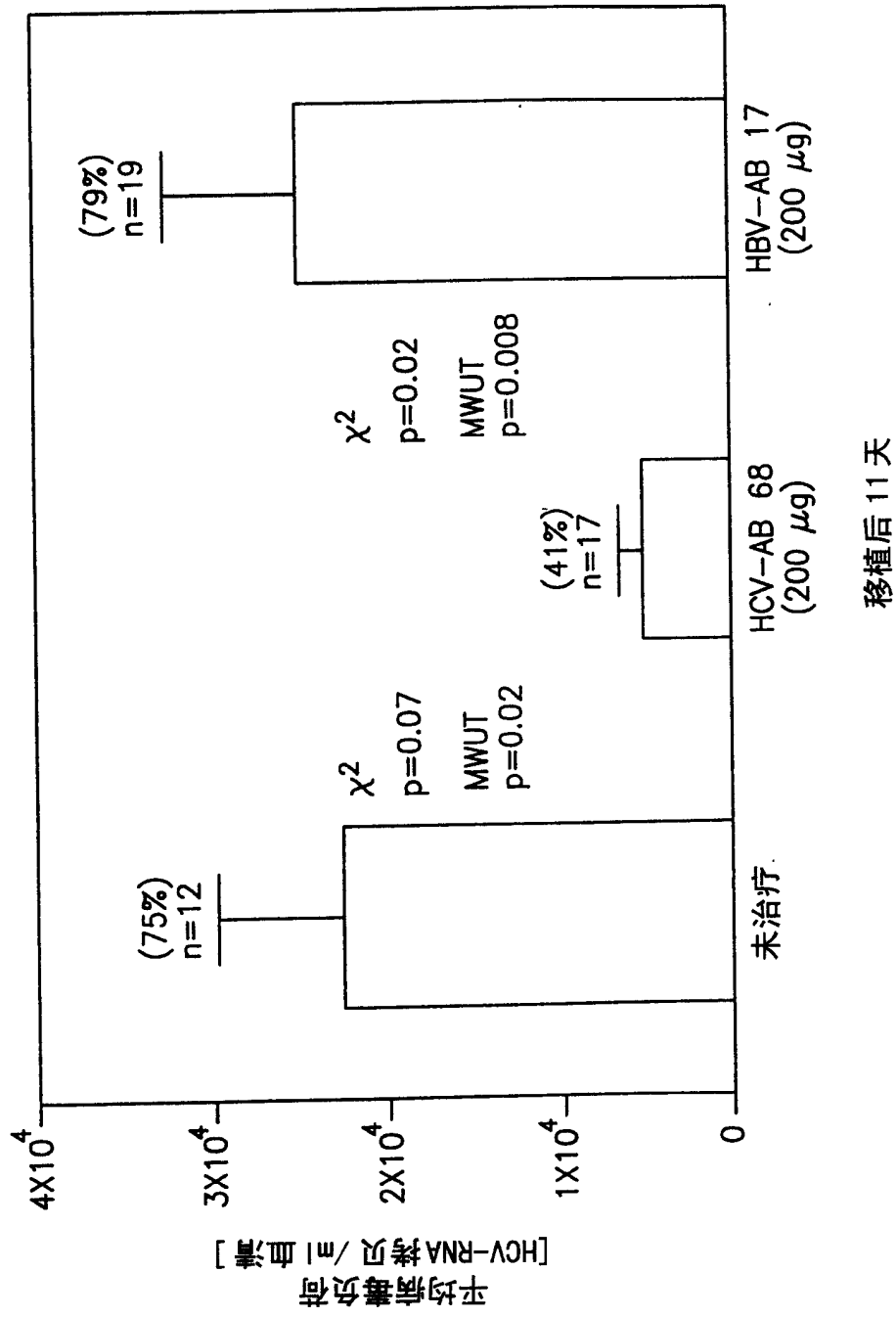


图 7

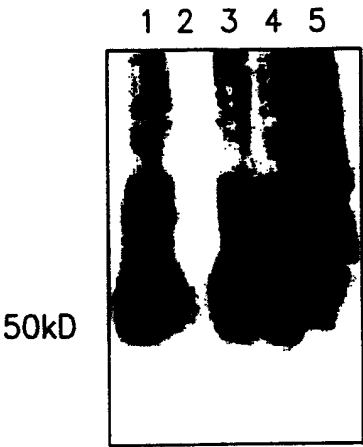


图 8A

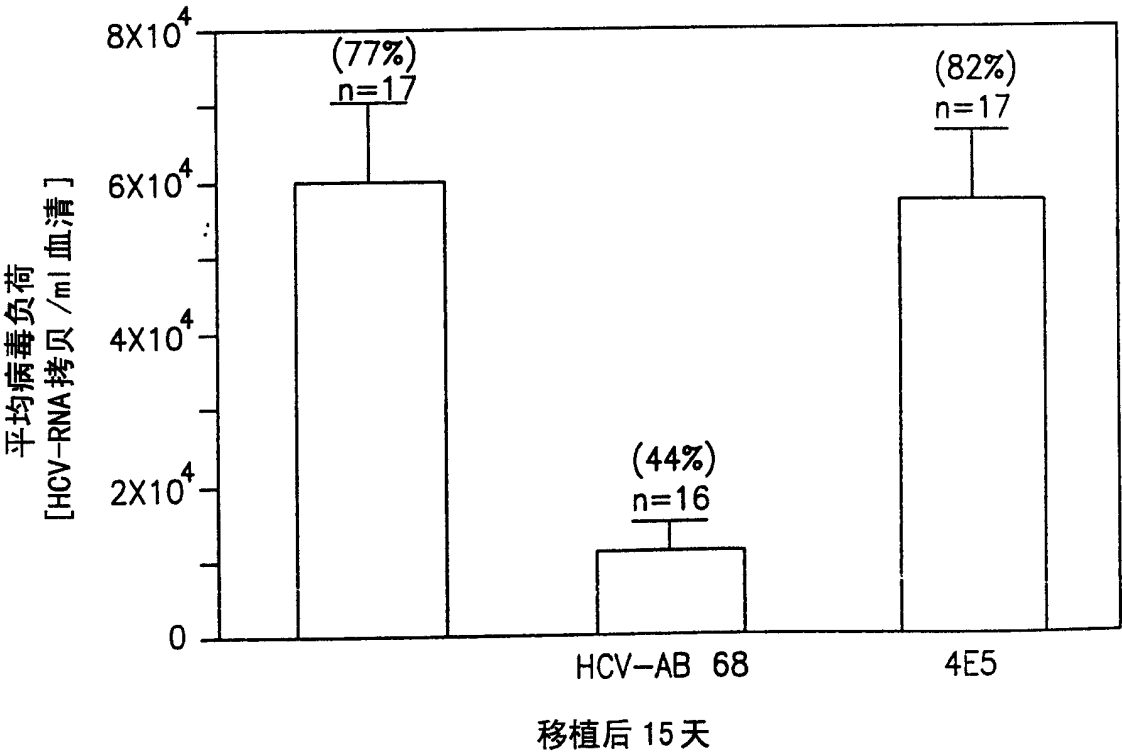
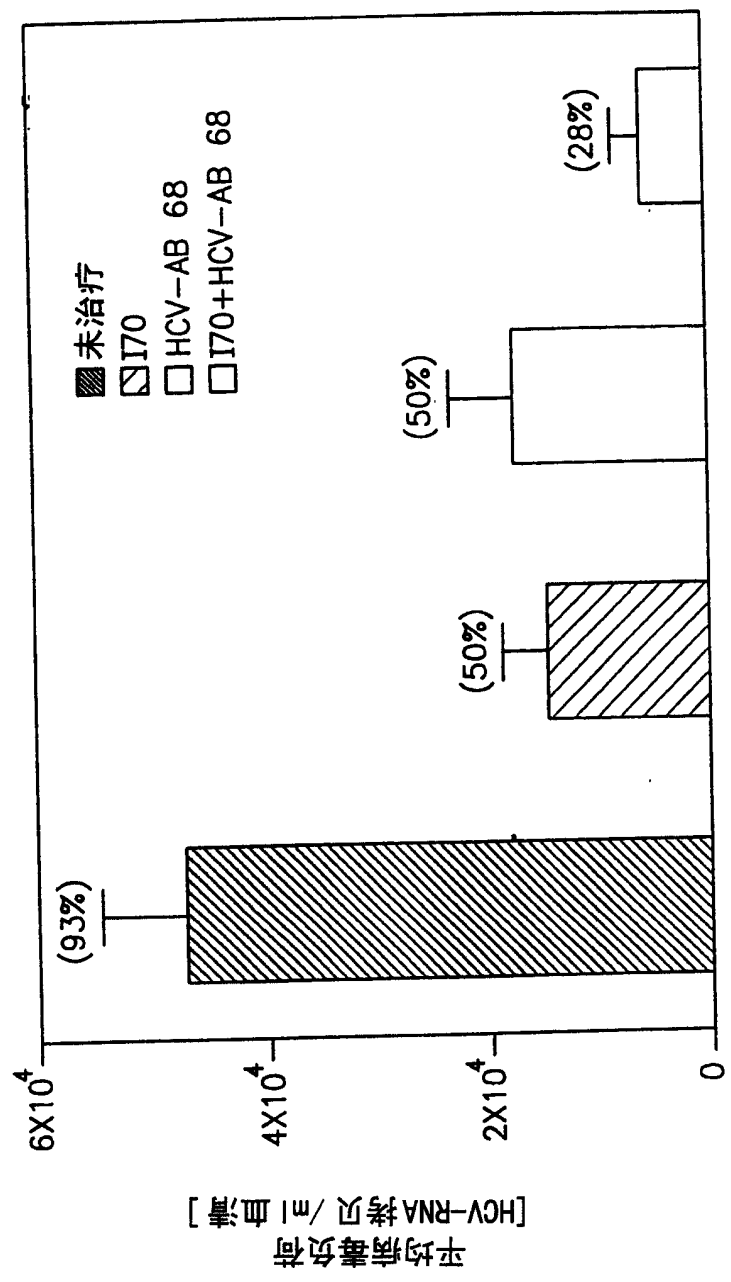


图 8B



移植后 14 天

图 9