

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2018/086599 A1

(43) 国际公布日
2018 年 5 月 17 日 (17.05.2018)

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/10 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/110506

(22) 国际申请日: 2017 年 11 月 10 日 (10.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201611038444.X 2016年11月11日 (11.11.2016) CN

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN
INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/
CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学
苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 万晓春(WAN, Xiaochun); 中国广东省深圳
市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong
518055 (CN)。 李俊鑫(LI, Junxin); 中国广东省
深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号,
Guangdong 518055 (CN)。 刘绿艳(LIU, Lvyang);
中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大
道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京三友知识产权代
理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市金
融街35号国际企业大厦A座16层,
Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: ANTI-H7N9 FULLY-HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY 5J13, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗H7N9全人源单克隆抗体5J13及其制法与应用

(57) Abstract: The present application provides an anti-H7N9 fully-human monoclonal antibody 5J13, a preparation method therefor, and an application thereof. The antibody can perform target binding with hemagglutinin HA of H7N9 virus, and has neutralization activity of anti-H7N9 virus infection and good biocompatibility.

(57) 摘要: 本申请提供了一种抗H7N9全人源单克隆抗体5J13及其制备方法与应用。所述抗体可靶向结合H7N9病毒的血凝素HA, 具有抗H7N9病毒感染的中和活性, 较好的生物相容性。



WO 2018/086599 A1

抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 及其制法与应用

技术领域

本申请属于免疫学领域，具体地涉及抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 及其制法与应用。

5

背景技术

在 2015 年全球十大畅销药中，有 6 个是全人源或人源化单克隆抗体药物。排名第一的是艾伯维公司治疗关节炎的抗 TNFa 单克隆抗体 Humira，这是一个全人源单克隆抗体，已经是连续 3 年销售额 100 亿以上的药王。从 1986 年第一个单克隆抗体药物上市开始，单抗药物经历了鼠源单抗药物（如 Orthoclone OKT3）、嵌合单抗药物（Rituximab）、人源化单抗药物（Herceptin）和全人源单抗药物（Humira）等阶段。由于人体出现抗鼠抗体反应（HAMA），鼠源单抗药物、嵌合单抗药物已经逐渐被淘汰，目前占据市场的单克隆抗体药物全都是人源化单克隆抗体药物。与国际先进的人源抗体生产技术相比，深圳乃至全中国都有很大差距，主要表现在人源抗体药物领域的创新能力薄弱，自主研发的品种少，目前还没有原创人源化单克隆抗体药物上市的消息，庞大的抗体药物市场被国外药企占领。我国要改变落后局面，争夺消费潜力巨大的国内外抗体药物市场，亟需攻克全人源单克隆抗体技术。

10

15

人源单克隆抗体在治疗炎症、癌症特别是流行性感方面具有高特异性的显著疗效。流行性感是由流感病毒引起的传染性疾病，严重威胁人类健康。全球每年约有 10 亿人受季节性流感病毒感染，其中有 25-50 万人死亡。H7N9 病毒是一种流感病毒，对传统的抗病毒药金刚烷胺(amantadine)和金刚烷乙胺（rimantadine）有耐药性，目前尚没有有效治疗手段。H7N9 病毒在入侵细胞时需要依赖病毒自身表达的特定分子与人细胞上的受体结合，才能感染细胞，并进一步扩增。中和病毒的人源抗体是人 B 淋巴细胞产生的某些特异抗体，能够与病毒表面的抗原结合，从而阻止该病毒黏附靶细胞受体，防止病毒侵入细胞，能够高效防治 H7N9 流行性感。

20

25

发明内容

一方面，本申请涉及抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够中和 H7N9 病毒的生物活性片段。

另一方面，本申请涉及编码所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的基因及含该基因的载体或细胞。

30

另一方面，本申请涉及产生所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 的方法。

另一方面，本申请涉及包含所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的药物组合物。

另一方面，本申请涉及本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段或所述药物组合物的应用。

另一方面，本申请涉及一种检测 H7N9 病毒的试剂盒。

附图说明

图 1 为实施例 1 NTH-3T3 表达 CD40L 的流式检测结果图。

图 2 为实施例 1 流式细胞仪分选记忆 B 细胞结果图。

图 3 为实施例 1 ELISA 实验结果图。

图 4 为实施例 2 琼脂糖凝胶电泳结果图。

图 5 为实施例 2 SDS-PAGE 蛋白电泳结果图。

图 6 为实施例 3 血凝抑制实验结果图。

图 7 为实施例 4 中和实验结果图。

具体实施方式

一方面，本申请提供抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 区的氨基酸序列分别如下所示：

重链 CDR1 区：GFSFSNYG；

重链 CDR2 区：ISYDGTNK；

重链 CDR3 区：AKGRGPYC SSSICYHGMDV；

轻链 CDR1 区：QSVLSGSINMNY；

轻链 CDR2 区：WAS；

轻链 CDR3 区：QQYYSTPLT。

在一些实施方式中，该抗体的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

该抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

SEQ ID NO:2:

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

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
Gly Leu Asp Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Arg Gly Pro Tyr Cys Ser Ser Ser Ile Cys Tyr
5 His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 。

SEQ ID NO:4:

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile
Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Gly Ser Ile Asn Met Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
10 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
Glu Ile Lys 。

在一些实施方式中,该抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 所示,
或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列; 和/
15 或

该抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:12 所示, 或该序列经替换、
缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

SEQ ID NO:6:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
20 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
Gly Leu Asp Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Arg Gly Pro Tyr Cys Ser Ser Ser Ile Cys Tyr
His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
25 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
30 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
5 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys.

SEQ ID NO:8:

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile
Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Gly Ser Ile Asn Met Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
10 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp
Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
15 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys.

SEQ ID NO:10:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Gln Val Gln Leu Val
20 Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ala
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr Cys Ala Lys Gly Arg Gly Pro Tyr Cys Ser Ser Ser Ile Cys Tyr His Gly Met Asp Val Trp Gly
25 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
30 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 5 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 Leu Ser Pro Gly Lys。

SEQ ID NO:12:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln
 Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val
 10 Leu Ser Gly Ser Ile Asn Met Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 15 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys。

经 ELISA 实验验证, 本申请所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 可以靶向结合 H7N9
 20 病毒的血凝素 HA。血凝抑制试验证明 5J13 可以中和 H7N9 病毒, 其 IC₅₀ 值可低至
 0.2071 μ g/ml, KD 值为 3.04×10^{-10} ; 在病毒感染细胞模型模型中, 其 IC₅₀ 值仅为 0.1 μ g/ml
 左右。本申请所述抗体为全人源性单克隆抗体, 相比鼠源抗体, 全人源抗体的基因完全来
 源于人的基因, 没有其他种属的成分, 在人体内不发生抗鼠抗抗体等毒副作用, 具有更好
 的生物相容性, 更适合和更有潜力成为治疗流感病毒的大分子药物。

25 另一方面, 本申请提供编码本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 的基因。在
 一些实施方式中, 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸的核苷酸序列, 在一
 些实施方式中, 该核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示; 和/或

所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸的核苷酸序列, 在一些实施方式中,
 该核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

30 SEQ ID NO:1:

cagggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt
 cagcttcagtaactatggtttgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggactgggtggcagttatctcatatgacggaactaa

taaataattatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgcatctgcaaatgaacagcctgag
agctgaggacacggctgtgtattactgtgcgaaaggtcgggggccttattgtagtagttccatctgctatcacggtatggacgtctgggg
ccaagggaccacgggtcaccgtctctca。

SEQ ID NO:3:

5 gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagcca
gagtgtttatccggctccatcaatatgaactacttagcttggtagcagagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggc
atctacccgggaatccgggtccctgaccgattcactggcagcgggtctgggacagatttactctcaccgtcagcagcctgcaggctga
agatgtggcagtttattactgtcagcaatattacagtactccgtcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaa。

10 在一些体实施方式中, 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 的氨基
酸的核苷酸序列, 在一些实施方式中, 该核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 所示;
和/或

所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸的核苷酸序列,
在一些实施方式中, 该核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:11 所示。

SEQ ID NO:5:

15 cagggtgcagctgggtgagctctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattca
gcttcagtaactatggtttgactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggactgggtggcagttatctcatatgacggaactaata
aatattatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgcatctgcaaatgaacagcctgagag
ctgaggacacggctgtgtattactgtgcgaaaggtcgggggccttattgtagtagttccatctgctatcacggtatggacgtctggggcc
aagggaccacgggtcaccgtctcctcagctagcaccaaggggccatcggtcttccccctggcacctctcctcaagagcacctctgggg
20 gcacagcggccctgggtgcctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcg
tgcacaccttcccggcgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagctgggcac
ccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaaaact
cacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatg
atctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccacgaagacctgaggtcaagttaactggtagctggacggcg
25 tggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgca
ccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaag
ccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccgtgtggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct
30 catgtcctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga。

SEQ ID NO:7:

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagccaga
gtgtttatccggctccatcaatatgaactacttagcttggtagcagagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcat

ctaccgggaatccgggtccctgaccgattcactggcagcgggtctgggacagattcactctcaccgtcagcagcctgcaggctgaag
atgtggcagtttattactgtcagcaatattacagtactccgctcactttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaaaccgtggccgccc
cctccgtgttcattctccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgtgggtgtgctgtgaacaacttctacccccggg
aggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagtccggcaactcccaggagtccgtgaccgagcaggactccaag
5 gactccacctactccctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgagggttaccaccag
ggcctgtcct ccccgtagac caagtccttc aaccggggcg agtgctag。

SEQ ID NO:9:

atgggctggtcctgcatcatcctgttctggtggccaccgccaccggccagggtgcagctggtggagtctgggggaggcg
tggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcagcttcagtaactatggtttgactgggtccgccaggc
10 tccaggcaaggggctggactgggtggcagttatctcatatgacggaaactaataatattatgcagactccgtgaaggccgattcac
catctccagagacaattccaagaacacgctgcatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcg
aaaggtcgggggccttattgtagtagttccatctgctatcacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccg tctcctcagcta
gcaccaaggggccatcggtcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggacagcggcctgggctgctgtgtaagg
actactccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttcccgccgtcctacagtctc
15 aggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctg
aactcctggggggaccgtcagcttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccttgggtcacatgcg
tggtggtggcagctgagccacgaagaccctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag
acaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatg
20 gcaaggagtacaagtgaaggttccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctcaaagccaaagggcagcc
ccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggctt
ctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctg
gactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct catgctccgtgatgc
atgaggctctgcacaaccactacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga。

25 SEQ ID NO:11:

atgggctggtcctgcatcatcctgttctggtggccaccgccaccggcgacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctg
tgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagccagagtggtttatccggctccatcaatatgaactacttagcttggtacca
gcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcattctaccgggaatccgggtccctgaccgattcactggcagcgg
gtctgggacagatttactctcaccgtcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattacagtactccgctc
30 actttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaaaccgtggccgccccctcctgttctcttccccctccgacgagcagctgaagtc
cggcaccgctccgtgggtgtgctgtgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtgaaggtggacaacgcct
gcagtccggcaactcccaggagtccgtgaccgagcaggactccaaggactccactcctgtcctccacctgacctgtc
caaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggttaccaccaggccctgtcctccccgtgaccaagtccttc
aaccggggcg agtgctag。

另一方面，本申请提供含如上所述基因的载体。

再一方面，本申请提供含如上所述基因或如上所述载体的细胞。

再一方面，本申请提供一种产生所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的方法，该方法包括培养含编码抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 的重轻链的上述基因或上述载体的基因工程细胞或直接培养上述细胞，收集，纯化得所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13。

现有技术中存在采用噬菌体展示技术制备抗 H7N9 病毒人源单克隆抗体的方法，尽管该方法具有生产成本低、不经过免疫和细胞融合等繁琐工作的优点，但是其缺点也比较明显，从非免疫抗体库中获得的抗体往往亲和力不足、受外源基因转化率的限制、抗体库的库容量不足以涵盖动物的抗体多样性等。本申请从病人的血液中分离分泌功能抗体的 B 细胞，然后提取 RNA 和合成 cDNA，从中克隆分泌目的抗体的基因，最后重组和表达全人源单克隆抗体。该技术操作简单快捷，生产的人源抗体具有高亲和力和特异性，此外，可进一步采用改进的从记忆 B 细胞中分离具有中和病毒功能或杀伤肿瘤功能的本申请所述单克隆抗体技术，更是大大减少了繁琐操作和成本。

另一方面，本申请提供一种药物组合物，其包含本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段。

另一方面，本申请提供所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段或所述的药物组合物在制备用于治疗由 H7N9 病毒引起的疾病的药物中的应用。

另一方面，本申请提供一种检测 H7N9 病毒水平的试剂盒，其含有本申请所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段；在一些实施方式中，所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物，以及缓冲液；所述第二抗体例如为抗本申请所述单克隆抗体 5J13 的抗抗体。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

(1) 本申请所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA，具有显著抗 H7N9 病毒感染的中和活性。

(2) 相比鼠源抗体，本申请全人源抗体的基因完全来源于人的基因，没有其他种属的成分，在人体内不发生抗鼠抗抗体等毒副作用，具有更好的生物相容性，更适合和更有潜力成为治疗流感病毒的大分子药物。

(3) 相较于现有技术提供的噬菌体展示技术制备抗 H7N9 病毒人源单克隆抗体的方

法，本申请采用的单个 B 细胞开发抗 H7N9 病毒的抗体具有操作简单快捷，生产的人源抗体具有高亲和力和特异性等优点。

为了对本申请的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实施例对本申请的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本申请而不适用于限制本申请的范围。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

实施例 1

(1) 构建稳定表达 CD40L 的 NTH-3T3 细胞系 (3T3-CD40L)

利用慢病毒建立 3T3-CD40L 饲养细胞。构建慢病毒表达载体 pLVX-CD40L，转染 293T 细胞，转染第四天收集病毒上清液。活化 NIH-3T3 细胞，培养 3 代后用慢病毒感染，继续培养并传代 3 次。利用流式细胞仪进行分选 FITC 荧光强度在 MFI 附近的细胞，重新加入至培养瓶中，37℃，5%CO₂ 培养箱中培养和检测，检测结果如图 1 所示，其是将表达 CD40L 的 3T3 细胞和空载体 pLVX(带有 ZsGreen)转染的 3T3 细胞分别用带有 APC 的抗 CD40L 染色，然后上流式细胞仪分析。结果发现，所有 3T3-CD40L 饲养细胞都表达 CD40L。当细胞长到 80%~90%时，消化收集细胞，浓度为每毫升 1×10^7 细胞。置于辐射仪中进行 5000 rads 辐射，冻存液重悬细胞，浓度为每毫升 3.5×10^7 细胞，分装 1ml 在冷冻小管，液氮冻存（可以保存 2 年）。

(2) 记忆 B 细胞的分选和活化

用淋巴分离液分离和冻存曾经感染 H7N9 病毒的康复病人的 PBMC，每管 $10 \sim 50 \times 10^6$ 细胞，冻存在液氮罐中。配制 PBMC 流式染色液，其成分如下表 1 所示

表 1 PBMC 流式染色液

抗体	体积 (μL)
CD19-PE-Cy7	0.5
IgM-PE	1.0
IgA-APC	2.5
IgD-FITC	2.5
PBS-1% (wt/vol) BSA	43.5

解冻 PBMC，加入上述 PBMC 流式染色液并在流式细胞仪上分选，结果如图 2 所示，分选出 CD19⁺IgM⁻IgA⁻IgD⁻ 的记忆 B 细胞，细胞纯度需在 90%以上，若低于 90%，重复分选过程。配制激活 B 细胞的混合培养基，如下表 2 所示：

表 2

组分	体积
完全 IMDM 培养基	336 mL
IL-2 ($10,000 \text{ U mL}^{-1}$)	3.5 mL
IL-21 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)	175 μL
步骤 (1) 中得到的 3T3-CD40L	10 mL

将记忆 B 细胞加入到混合培养基中，混匀后有限稀释在 384 孔板，每孔 1 个细胞，体积为 50 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中静置培养。13 天后，取上清液进行 ELISA，获得人源单克隆抗体 5J13。

5 (3) 人源单克隆抗体 5J13 结合 H7N9 病毒的血凝素 HA 实验

流感病毒血凝素 HA 是病毒包膜表面柱状抗原，能与人、鸡、豚鼠等多种红细胞受体结合引起红细胞凝集，具有免疫原性，抗血凝素抗体可以中和流感病毒。对上述获得的人源单克隆抗体 5J13 进行 ELISA 实验，具体地：

10 (1) 将 100ng/100 μL 的 H7N9 病毒的 HA 蛋白（购自 ACROBiosystems）包被在 96 孔酶标板中，每孔 100 μL ；

(2) 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜；

(3) 用 PBST 溶液洗涤三遍，每孔加 5% 的脱脂奶粉溶液 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时；

(4) 用 PBST 溶液洗涤三遍，加 100 μL 没有感染病毒的正常人血清（阴性对照）或加感染病毒的病人血清或抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13，各三个重复；

15 (5) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时后用 PBST 溶液洗涤三遍；

(6) 以 1:5000 稀释带 HRP 的抗人 IgG 抗体（abcam），加入酶标版中，每孔 100 μL ；

(7) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时后用 PBST 溶液洗涤三遍；

(8) 每孔加 100 μL TMB 底物溶液（Thermo Scientific），37 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟；

20 (9) 每孔加终止溶液 2M 硫酸 100 μL ，立刻在酶标仪中 450nm 波长检测吸光值。其结果如图 3 所示，ELISA 实验表明本申请获得的人源单克隆抗体 5J13 可以靶向结合 H7N9 病毒的血凝素 HA。

实施例 2 人源化单克隆抗体 5J13 基因的克隆、重组、表达和纯化

25 将实施例 1 获得的能够分泌结合 H7N9 病毒的 5J13 抗体的 B 细胞进行裂解，取裂解液进行 RNA 的反转录，获得人源抗体基因的 PCR 模板 cDNA。设计和合成克隆抗体基因的引物，以 cDNA 为模板克隆抗体的重链和轻链的基因，并且重组在真核细胞 293F 或

HEK293 中进行表达和纯化。具体地：

(1) 将裂解后的 B 细胞液转移至 96 孔板 (Eppendorf, 030133366)。

(2) 反转录体系：150 ng 随机引物 (Invitrogen, 48190-011), 0.5 μl 10mM dNTP (Invitrogen, 18427-088), 1 μl 0.1 M DTT (Invitrogen, 18080-044), 0.5% v/v Igepal CA-630 (Sigma, I3021-50ML), 4 U RNAsin (Promega), 6 U Prime RNase Inhibitor (Eppendorf) and 50 U Superscript® III reverse transcriptase (Invitrogen, 18080-044), 补 DEPC 水至 14 μl/well。

(3) 反转录反应程序：42℃, 10min; 25℃, 10min; 50℃, 60min; 94℃, 5min。

(4) cDNA 保存在-20℃。

(5) 引物的设计和合成：

正向引物 5' - 3' 序列 (Forward Primer 5' - 3' sequence)

重链可变区 PCR 引物：

5' VH1 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:13)

5' VH1/5 CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:14)

5' VH3 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO:15)

5' VH3-23 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG (SEQ ID NO:16)

5' VH4 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO:17)

5' VH 4-34 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO:18)

5' VH 1-18 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO:19)

5' VH 1-24 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG (SEQ ID NO:20)

5' VH3-33 CTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO:21)

5' VH 3-9 CTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID

NO:22)

5' VH4-39 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID

NO:23)

5' VH 6-1 CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG (SEQ ID

5 NO:24)

3' JH 1/2/4/5 TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG (SEQ ID NO:25)

3' JH 3 TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG (SEQ ID NO:26)

3' JH 6 TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG (SEQ ID NO:27)

κ 轻链可变区 PCR 产物

10 5' V_κ 1-5 CTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC (SEQ ID
NO:28)

5' V_κ 1-9 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGACATCCAGTTGACCC AGTCT
(SEQ ID NO:29)

15 5' V_κ 1D-43 CTGCAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC (SEQ
ID NO:30)

5' V_κ 2-24 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC (SEQ ID
NO:31)

5' V_κ 2-28 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC (SEQ ID
NO:32)

20 5' V_κ 2-30 CTGCAACCGGTGTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC (SEQ ID
NO:33)

5' V_κ 3-11 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACAC AGTC
(SEQ ID NO:34)

25 5' V_κ 3-15 CTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC (SEQ ID
NO:35)

5' V_κ 3-20 TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCT (SEQ ID NO:36)

5' V_κ 4-1 CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC (SEQ ID
NO:37)

30 3' J_κ 1/4 GCCACCGTACGTTTGATYTCACCTTGGTC (SEQ ID NO:38)

3' J_κ 2 GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC (SEQ ID NO:39)

3' J_κ 3 GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTC (SEQ ID NO:40)

3' J_κ 5 GCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC (SEQ ID NO:41)

(6) 用 KOD-Plus-Neo (TOYOBO, KOD401) 试剂盒 PCR 分别扩增抗体基因的重链和轻链, 40μL 体系: 3.5μL cDNA, 20 nM 混合引物, 4μL 缓冲液(buffer), 4μL 2mM dNTPs, 2.4μL MgSO₄, 1μL KOD。

(7) 反应程序: 94℃, 2min; 45 个循环: [98℃, 10s; 58℃, 30s; 68℃, 28s。

(8) 对扩增产物进行琼脂糖凝胶, 其结果如图 4 所示, 结果显示, 抗体轻链为 κ, 其可变区大小为 339bp, 重链可变区大小是 378bp。

(9) 抗体基因重链可变区 PCR 产物测序结果如 SEQ ID NO:1 所示序列, 其相应的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示序列。抗体基因轻链可变区 PCR 产物测序结果如 SEQ ID NO:3 所示序列, 其相应的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示序列。

依据所得重轻链可变区序列, 设计并委托 Invitrogen 公司合成抗体基因重链全长 H 基因, 其带有 BamH1/EcoR1 双酶切位点; 及抗体基因轻链全长 L 基因, 其带有 Not1/Xho1 双酶切位点。

(10) 将 H 基因和 pcDNA3.1 分别进行 BamH1/EcoR1 双酶切后相连, 形成 pcDNA3.1-H 载体。

(11) 将 L 基因和 pcDNA3.1 分别进行 Not1/Xho1 双酶切后相连, 形成 pcDNA3.1-L 载体。

(12) 培养 293F 细胞。

(13) 20μg pcDNA3.1-H(该 H 基因的不带编码信号肽的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示, SEQ ID NO:5 可带有编码信号肽的序列, 如 atgggctggt cctgcatcat cctgttcctg gtggccaccg ccaccggc) 载体和 10μg pcDNA3.1-L (该 L 基因的不带编码信号肽的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 所示, SEQ ID NO:7 可带有编码信号肽的序列, 如 atgggctggt cctgcatcat cctgttcctg gtggccaccg ccaccggc) 载体共转染 293F 细胞, 培养 96 小时。

(14) 取上清液进行 ELISA (ABC 是上清液, DEF 是阳性对照, GH 是阴性对照); ELISA 具体的实验步骤如前所述, ELISA 实验结果如下表 3 所示:

表 3

数据	450nm	数据	450nm
A	3.103	E	1.885

B	3.321	F	1.201
C	3.001	G	0.0675
D	1.914	H	0.0554

上述结果显示上清液中含有能够结合 H7N9 病毒的抗体。

(15) 纯化过程，具体地，全人源单克隆抗体 5J13 的纯化过程为：

(a) 200 μ g pcDNA3.1-L 载体和 100 μ g pcDNA3.1-H 载体共转染 300ml 293F 细胞，培养 96 小时。

5 (b) 收集上清液，加入 proteinA 亲和层析柱，用 10 倍 PBS 清洗，加入 2ml pH3.0, 0.1M 甘氨酸收集抗体。收集管中加入 100 μ l 中和缓冲液 (1M Tri-HCL)，以便及时中和洗脱所得抗体液的 pH 值。

(c) 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中透析，透析完后，近期用的存放在 4 $^{\circ}$ C，长期储存在 -20 $^{\circ}$ C。共获得 300 μ g 5J13 抗体，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，跑 SDS-PAGE 蛋白电泳结果如图 5 所示，从图 5 中可以看出获得了高纯度的抗体。

实施例 3 纯化后的全人源单克隆抗体 5J13 的中和实验及抗体亲和力实验

全人源单克隆抗体 5J13 的中和实验

(1) 血凝实验

15 (a) 取 96 孔 V 形微量反应板，用微量移液器在 1~12 孔每孔加 25 μ L PBS，共滴 8 排，后 4 排的第 1 列孔再补加 25 μ L PBS。

(b) 吸取 25 μ L 标准禽流感抗原 (H7N9 病毒株 A/Shanghai/2/2013，取自深圳罗湖医院) 加入到第 1 列孔中，吹打 3~5 次充分混匀。

20 (c) 从第 1 列孔吸取 25 μ L 混匀后的抗原液加到第 2 列孔中，混匀后吸取 25 μ L 加入到第 3 列孔中，依次进行系列倍比稀释至第 11 列孔，最后从第 11 列孔各吸取 25 μ L 弃之，设第 12 列孔为红细胞对照。

(1) 自右向左依次向各孔加入 25 μ L 1%的鸡红细胞悬液。

25 (2) 将反应板置于微量振荡器上振荡 1 min，室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 静置 45 min 后观察结果，若环境温度过高，可于 4 $^{\circ}$ C 静置 60 min，红细胞对照孔成明显的纽扣状沉到孔底时即可判定结果。

(3) 结果判定：在红细胞对照孔出现正确结果的情况下，将反应板作 45 $^{\circ}$ 倾斜，观察红细胞是否完全凝集。以完全凝集的病毒最大稀释度为该抗原的血凝滴度。完全凝集的病

毒的最高稀释倍数为 1 个血凝单位 (HAU)。

(2) 血凝抑制实验

(a) 根据血凝试验结果配制 4 单位抗原 (H7N9 病毒株 A/Shanghai/2/2013, 取自深圳罗湖医院)。

5 (b) 取 96 孔 V 形微量反应板, 用移液器在第 1~12 孔各加入 25 μ L PBS。

(c) 在第一排中加入被测纯化后的全人源单克隆抗体 5J13 (50 μ g/ml), 充分混匀后移出 25 μ L 加至第二排, 依次类推, 倍比稀释至第 8 排, 第 8 排弃去 25 μ L。

(d) 各孔加入 25 μ L 4 单位抗原, 轻叩反应板, 使反应物混合均匀, 室温 20-25 $^{\circ}$ C 下静置 30 min。

10 (e) 自右向左依次向各孔加入 25 μ L 1%的鸡红细胞悬液。

(f) 将反应板置于微量振荡器上振荡 1 min, 室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 静置 40 min 后观察结果, 若环境温度过高, 可于 4 $^{\circ}$ C 静置 60 min, 红细胞对照孔成明显的纽扣状沉到孔底时即可判定结果。

本申请对比了 2016 年 05 年 10 日向中国国家知识产权局递交的, 申请号为
15 “201610303416.X”, 发明名称为“抗 H7N9 全人源单克隆抗体 2L11 及其制法与应用”中的单克隆抗体 2L11, 及 2016 年 05 月 03 日向中国国家知识产权局递交的, 申请号为
“201610288358.8”, 发明名称为“抗 H7N9 全人源单克隆抗体 2J17 及其制法与应用”中的单克隆抗体 2J17, 与本案 5J13 的血凝抑制活性, 实验结果如图 6 所示, 从图 6 中可以看出本申请 5J13 血凝抑制活性的 IC_{50} 为 0.2071 μ g/ml, 而 2L11 及 2J17 (图中均示为同型
20 对照) 抗体没有血凝抑制活性。

抗体亲和力检测:

亲和力检测的仪器为 PALL 的 Fortebio。配制 200 μ L 50 μ g/ml 5J13 抗体, 结合 proteinA 传感器 300 秒, HA 抗原配制 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM 和 3.125nM 浓度溶液, 结合抗体 240 秒, 解离时间为 30 分钟, 显示 5J13 对 H7N9 病毒有高亲和力, $KD=3.04\times 10^{-10}$ 。

25 实施例 4 抗 H7N9 的 5J13 抗体体外中和实验

(1) 实验目的

使用病毒感染细胞模型 (犬肾细胞 MDCK), 通过微量中和-ELISA 实验评价 5J13 抗体对 H7N9 流感病毒的抑制作用和效果, 检测抗体抗流感病毒活性。

(2) 实验步骤

30 (2.1) 细胞铺板

胰酶消化对数生长期MDCK犬肾细胞，终止后离心收集，吹散均匀，制备单细胞悬液；用细胞培养液将细胞浓度调整至 5×10^4 个/ml，接种于96孔细胞培养板，细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜。

(2.2) 5J13抗体与H7N9病毒（该病毒A/Anhui/1/2013取自于中国科学院微生物研究所）

5 预处理

5J13抗体设立10个浓度梯度，依次为 10^{-10} 倍稀释，各组各浓度均设3个平行孔。

(2.3) 病毒感染

弃步骤(2.1)培养的细胞培养上清，PBS洗3遍。将预混的抗体-病毒混合液（以 10^2 μg/ml的5J13单克隆抗体依次以 10^{-10} 倍稀释，将每个浓度的5J13抗体分别与等体积的100 TCID₅₀病毒混合得该混合液）。加入96孔细胞培养板，37℃孵育1 h，吸弃混合液，PBS洗2遍。

(2.4) 配置维持液

用无血清DMEM中加入终浓度为2 μg/ml的TPCK-胰蛋白酶（TPCK-Trypsin）（维持液）。弃去96孔板中的PBS，每孔加入100 μl维持液，置于37℃，5% CO₂培养箱培养20 h。

15 (2.5) 中和实验-ELISA法

(2.5.1) 弃去微量培养板中的维持液；

(2.5.2) 100 μl PBS 洗细胞一次；

(2.5.3) 弃去PBS（不要让细胞干燥），加入50 μl/孔固定液（体积比为丙酮：无水乙醇=2：3）；

20 (2.5.4) 覆盖微量培养板，于室温固定细胞10 min；

(2.5.5) 弃去固定液，用100 μl PBS 液洗涤细胞，重复洗涤3次（轻轻晃动，避免强烈清洗），以去除残余的丙酮。

(2.5.6) 用5%脱脂奶粉于室温封闭细胞1 h，用100 μl PBS 液洗涤细胞1次；

25 (2.5.7) 用PBS 1：2000 稀释1抗（商购抗H7N9的NP单克隆抗体）每孔加入稀释后的50 μl，室温作用1小时。

(2.5.8) 用100 μl PBST 洗板5次以除去1抗；

(2.5.9) 用PBS 1:2000 稀释2抗（带HRP的抗鼠IgG抗体），每孔加入50 μl，室温作用1小时。

(2.5.10) 用100 μl PBST洗涤板6次以除去2抗。

30 (2.5.11) 每孔加TMB显色液50 μl。

(2.5.12) 室温避光放10分钟左右显色后，每孔加2M盐酸50 μ l终止反应。

(2.5.13) 在ELISA 测定仪上（450 纳米）读出每孔OD 值。

(3) 统计分析

使用GraphPad Prism 6.0.1 对数据进行分析并绘制剂量-效应曲线，并计算IC₅₀。抑制率

5 计算公式：

抑制率= [(OD病毒孔-OD阴性细胞对照孔)-(OD药物孔-OD阴性细胞对照孔)]/(OD病毒孔-OD阴性细胞对照孔)×100%。

所得结构如图7所示，从图7中可以看出5J13的IC₅₀=0.1024 μ g/ml。

从实施例3及实施例4可以看出，本申请5J13对两地的H7N9都有低的IC₅₀值，证明5J13
10 的广谱中和性好。

最后说明的是：以上实施例仅用于说明本申请的实施过程和特点，而非限制本申请的技术方案，尽管参照上述实施例对本申请进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解：依然可以对本申请进行修改或者等同替换，而不脱离本申请的精神和范围的任何修改或局部替换，均应涵盖在本申请的保护范围当中。

15

权利要求书

1. 抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 区的氨基酸序列分别如下所示：

重链 CDR1 区：GFSFSNYG；

重链 CDR2 区：ISYDGTNK；

重链 CDR3 区：AKGRGPYC SSSICYHGMDV；

轻链 CDR1 区：QSVLSGSINMNY；

轻链 CDR2 区：WAS；

轻链 CDR3 区：QQYYSTPLT。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

该抗体的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段，其中，该抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列；和/或

该抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:12 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

4. 编码权利要求 1~3 中任一项所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的基因。

5. 根据权利要求 4 所述的基因，其中，所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸的核苷酸序列；和/或

所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸的核苷酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的基因，其中，编码具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；和/或

编码具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

7. 根据权利要求 4 所述的基因, 其中, 所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸的核苷酸序列; 和/或

所述基因包含编码具有 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸的核苷酸序列。

8. 根据权利要求 7 所述的基因, 其中, 编码具有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:9 所示, 和/或

编码具有 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:11 所示。

9. 含权利要求 4~8 中任一项所述基因的载体。

10. 含有权利要求 4~8 中任一项所述基因或含有权利要求 9 所述载体的细胞。

11. 一种产生权利要求 1~3 中任一项所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段的方法, 该方法包括培养含编码抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 的重轻链的权利要求 4~8 所述的基因或权利要求 9 所述的载体的基因工程细胞或直接培养权利要求 10 所述的细胞, 收集, 纯化得所述抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13。

12. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1 或 2 所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段。

13. 权利要求 1~3 中任一项所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段, 或权利要求 8 所述的药物组合物在制备用于治疗由 H7N9 病毒引起的疾病的药物中的应用。

14. 一种检测 H7N9 病毒水平的试剂盒, 其含有权利要求 1~3 中任一项所述的抗 H7N9 全人源单克隆抗体 5J13 或来源于该单克隆抗体的能够特异性结合 H7N9 的生物活性片段。

15. 根据权利要求 14 所述的试剂盒, 其中, 所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物, 以及缓冲液。

16. 根据权利要求 15 所述的试剂盒, 其中, 所述第二抗体为抗权利要求 1~3 中任一项所述单克隆抗体 5J13 的抗抗体。

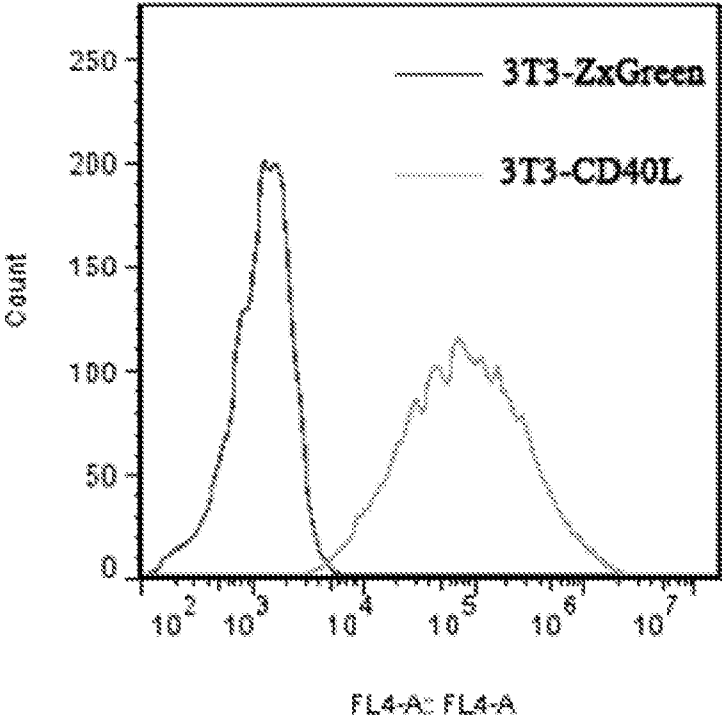


图 1

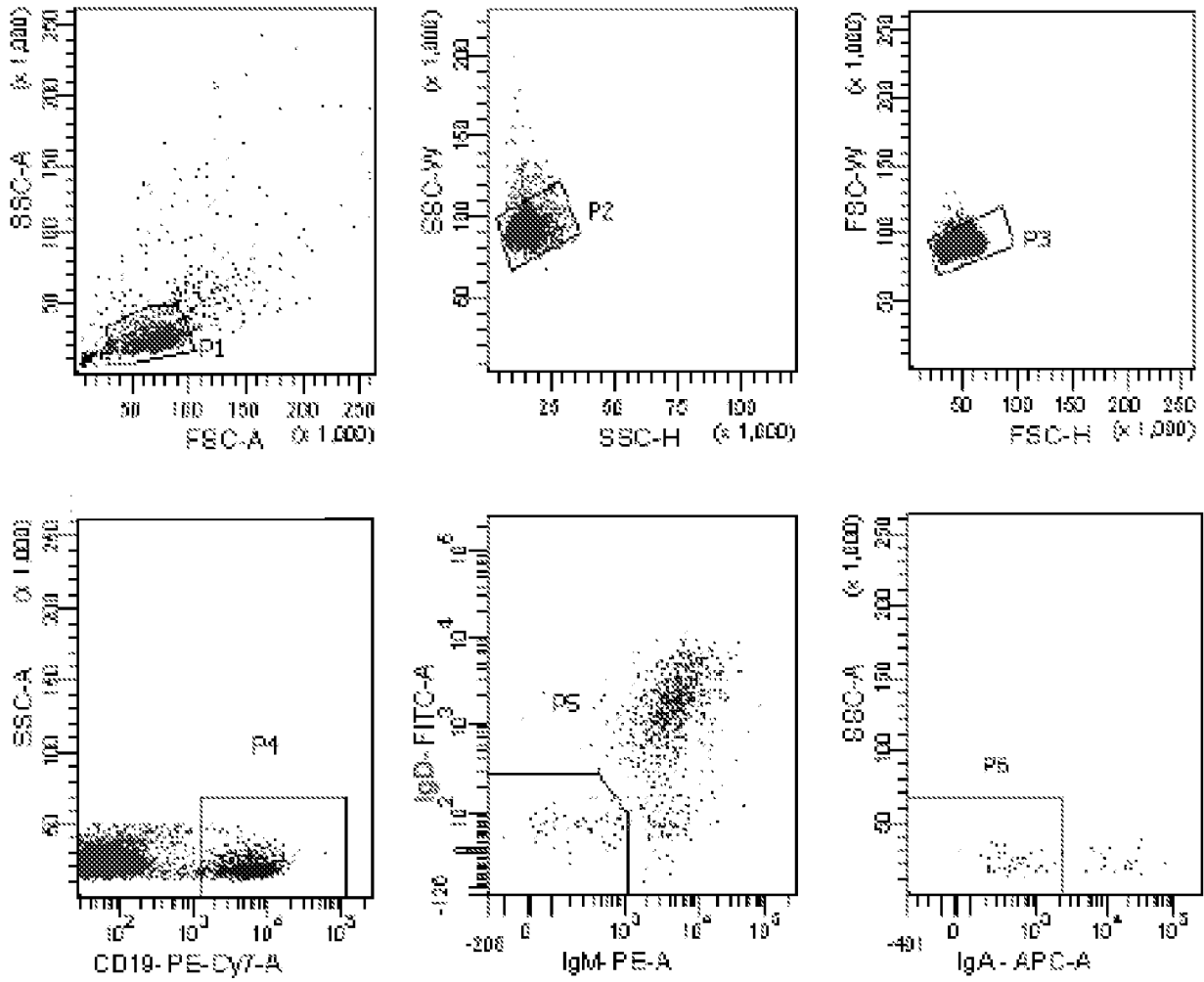


图 2

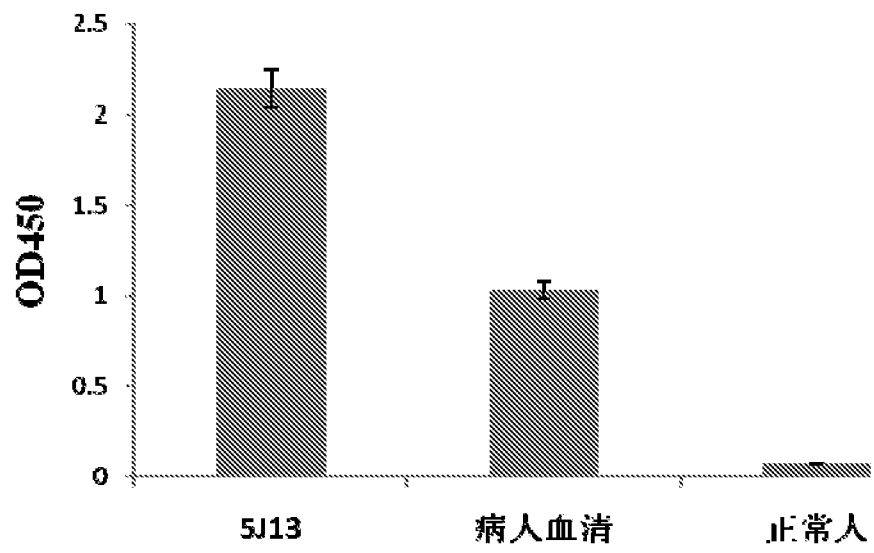


图 3

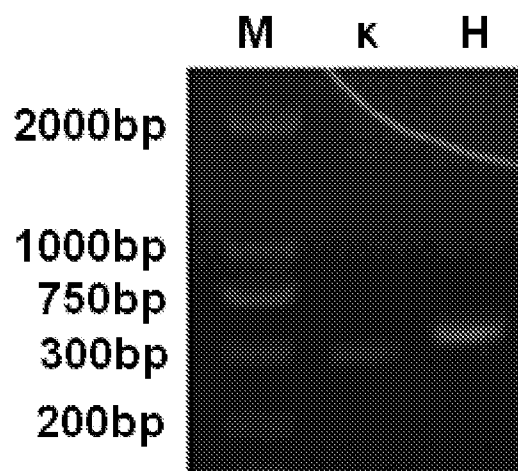


图 4

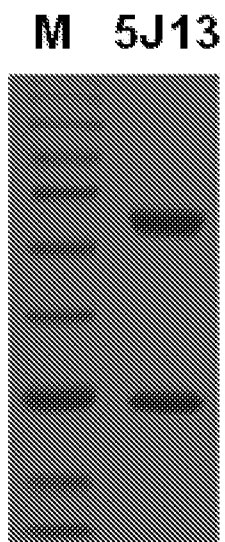


图 5

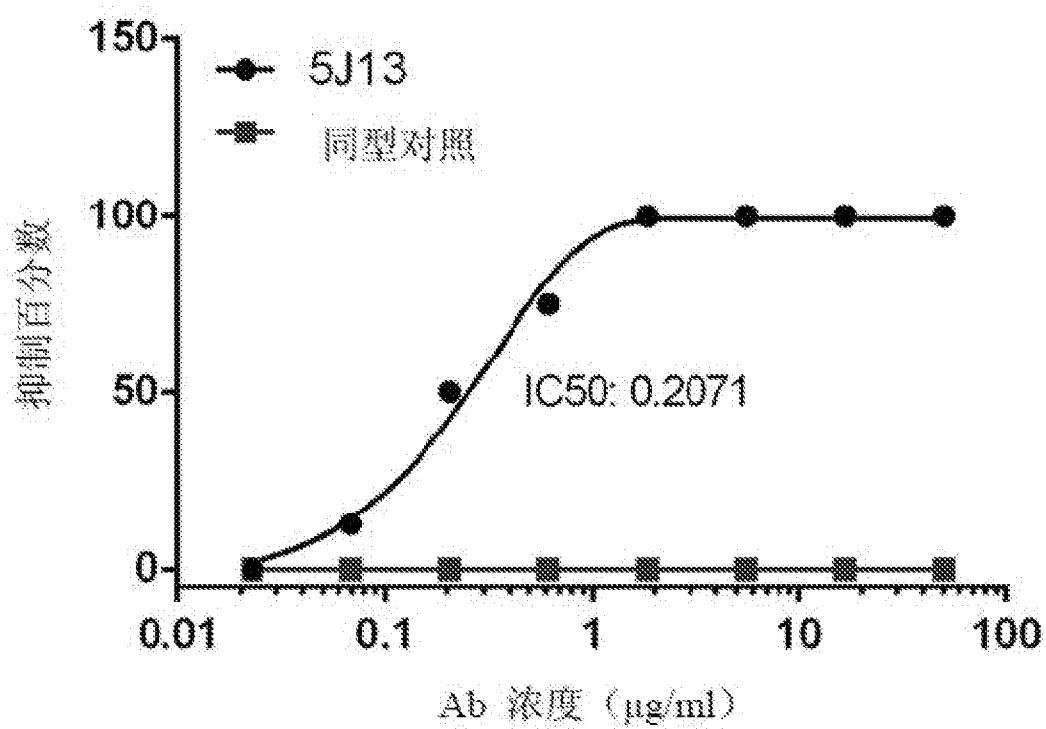


图 6

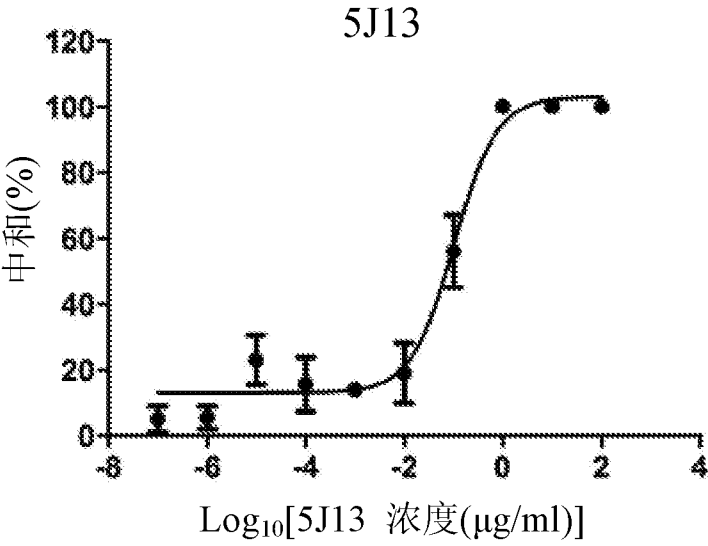


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/110506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and Key Words: 抗体, 单克隆, H7N9, A(H7N9), 甲型流感病毒, 血凝素, HA, 抗原, 5J13, B细胞, antibody, monoclonal, hemagglutinin type 7 and neuraminidase type 9, influenza A virus, hemagglutinin, antigen, B cell等.; NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-41

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106519027 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 22 March 2017 (2017-03-22) see entire document	1-16
A	CN 105985433 A (FUDAN UNIVERSITY) 05 October 2016 (2016-10-05) see entire document	1-16
A	CN 104892753 A (SINOCELLTECH LTD.) 09 September 2015 (2015-09-09) see entire document	1-16
A	CN 104045709 A (INSTITUTE OF PATHOGEN BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 17 September 2014 (2014-09-17) see entire document	1-16
A	WO 2015112994 A1 (GENENTECH INC. ET AL.) 30 July 2015 (2015-07-30) see entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2018

Date of mailing of the international search report

09 February 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/110506

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106519027	A	22 March 2017	None			
CN	105985433	A	05 October 2016	None			
CN	104892753	A	09 September 2015	WO	2015131836	A1	11 September 2015
CN	104045709	A	17 September 2014	CN	104045709	B	24 May 2017
WO	2015112994	A1	30 July 2015	MX	2016009597	A	13 October 2016
				CN	105934443	A	07 September 2016
				JP	2017508002	A	23 March 2017
				US	2017114121	A1	27 April 2017
				KR	20160111948	A	27 September 2016
				EP	3099710	A1	07 December 2016
				CA	2931012	A1	30 July 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/110506

A. 主题的分类

C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/42(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 抗体, 单克隆, H7N9, A(H7N9), 甲型流感病毒, 血凝素, HA, 抗原, 5J13, B细胞, antibody, monoclonal, hemagglutinin type 7 and neuraminidase type 9, influenza A virus, hemagglutinin, antigen, B cell等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-41。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106519027 A (深圳先进技术研究院) 2017年 3月 22日 (2017 - 03 - 22) 见全文	1-16
A	CN 105985433 A (复旦大学) 2016年 10月 5日 (2016 - 10 - 05) 见全文	1-16
A	CN 104892753 A (神州细胞工程有限公司) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 见全文	1-16
A	CN 104045709 A (中国医学科学院病原生物学研究所) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 见全文	1-16
A	WO 2015112994 A1 (GENENTECH INC等) 2015年 7月 30日 (2015 - 07 - 30) 见全文	1-16

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 1月 30日

国际检索报告邮寄日期

2018年 2月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

王颖

电话号码 (86-10) 62412197

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/110506

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106519027	A	2017年 3月 22日	无			
CN	105985433	A	2016年 10月 5日	无			
CN	104892753	A	2015年 9月 9日	WO	2015131836	A1	2015年 9月 11日
CN	104045709	A	2014年 9月 17日	CN	104045709	B	2017年 5月 24日
WO	2015112994	A1	2015年 7月 30日	MX	2016009597	A	2016年 10月 13日
				CN	105934443	A	2016年 9月 7日
				JP	2017508002	A	2017年 3月 23日
				US	2017114121	A1	2017年 4月 27日
				KR	20160111948	A	2016年 9月 27日
				EP	3099710	A1	2016年 12月 7日
				CA	2931012	A1	2015年 7月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)