(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 117106070 B
(45)授权公告日 2024.06.11

(21)申请号 202311089088.4
(22)申请日 2019.11.11
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117106070 A
(43)申请公布日 2023.11.24
(62)分案原申请数据
201911095151.9 2019.11.11
(73)专利权人 珠海泰诺麦博制药股份有限公司
地址 519090 广东省珠海市金湾区珠海大道6366号6#厂房一楼110室
(72)发明人 廖化新 王月明 郑伟宏 李嘉祺
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 陈迎春 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/08(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/42(2006.01)
A61P 31/22(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)

(56)对比文件
CN 104513813 A,2015.04.15
CN 106279378 A,2017.01.04
EP 0321249 A2,1989.06.21
US 2003166168 A1,2003.09.04
WO 2015115767 A1,2015.08.06
蔡琳俐;王玮;付文锟;潘德全;叶江辉;朱桦;程通;夏宁邵.水痘-带状疱疹病毒主要衣壳蛋白ORF40单克隆抗体的制备及初步应用.中国免疫学杂志.2019,(09),全文.
王敏力;沈琦.水痘-带状疱疹免疫球蛋白研究进展.中国生物制品学杂志.2007,(09),全文.

审查员 吕健

权利要求书1页 说明书17页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

抗水痘-带状疱疹病毒的抗体

(57)摘要

本发明涉及对水痘-带状疱疹病毒具有特异性并以高亲和力结合的中和性单克隆抗体或其抗原结合片段,以及产生这种抗体的制备方法。本发明的抗体具有中和水痘-带状疱疹病毒感染的高效力,本发明还涉及所述抗体所结合的表位,以及所述抗体在感染个体中诊断、预防以及治疗的应用。

CN 117106070 B

1.一种分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗感染水痘-带状疱疹病毒的人类个体的药物中的用途,其中

所述分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区CDR和轻链可变区CDR,其中所述重链可变区CDR为:

CDR1,其序列如SEQ ID NO:7所示;

CDR2,其序列如SEQ ID NO:8所示;

CDR3,其序列如SEQ ID NO:9所示,

所述轻链可变区CDR为:

CDR1,其序列如SEQ ID NO:10所示;

CDR2,其序列如SEQ ID NO:11所示;

CDR3,其序列如SEQ ID NO:12所示,

其中,所述人类个体是新生儿,早产儿,分娩期妇女,以及因器官移植手术、恶性血液病、恶性肿瘤、肾病综合征接受免疫抑制剂、细胞毒性药物或放射性治疗导致免疫功能不全者或免疫受损的个体。

2.权利要求1所述的用途,其中所述分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示或与SEQ ID NO:21具有至少90%的同一性,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示或与SEQ ID NO:22具有至少90%的同一性。

3.一种包含分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段的组合物在制备用于治疗感染水痘-带状疱疹病毒的人类个体的药物中的用途,其中

所述分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区CDR和轻链可变区CDR,其中所述重链可变区CDR为:

CDR1,其序列如SEQ ID NO:7所示;

CDR2,其序列如SEQ ID NO:8所示;

CDR3,其序列如SEQ ID NO:9所示,

所述轻链可变区CDR为:

CDR1,其序列如SEQ ID NO:10所示;

CDR2,其序列如SEQ ID NO:11所示;

CDR3,其序列如SEQ ID NO:12所示,

其中,所述人类个体是新生儿,早产儿,分娩期妇女,以及因器官移植手术、恶性血液病、恶性肿瘤、肾病综合征接受免疫抑制剂、细胞毒性药物或放射性治疗导致免疫功能不全者或免疫受损的个体。

4.权利要求3所述的用途,其中所述分离的抗VZV单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示或与SEQ ID NO:21具有至少90%的同一性,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示或与SEQ ID NO:22具有至少90%的同一性。

5.权利要求3或4所述的用途,其中所述组合物是药物组合物,所述药物组合物还包含可药用载体。

抗水痘-带状疱疹病毒的抗体

[0001] 本申请为申请日为2019年11月11日,发明名称为“抗水痘-带状疱疹病毒的抗体”的申请201911095151.9的分案申请。

背景技术

[0002] 水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus,VZV)属于人类单纯疱疹病毒,是一种包膜病毒,VZV具有高度的种属特异性,其自然感染仅发生于人与大猩猩。VZV的包膜上含有多种糖蛋白,例如gE、gB、gH、gI、gC、gL等。VZV糖蛋白不仅涉及病毒进入细胞,还可以从感染的细胞转移到未感染的细胞,其可激起对病毒的体液及细胞免疫反应。

[0003] VZV初次感染时通过结膜和呼吸道粘膜进入体内引起水痘,即原发感染水痘(varicella),是具有高度传染性的儿童常见疾病。对于健康儿童,水痘是一种病程大约4~5天的自限性疾病;对于有免疫缺陷的儿童和无免疫力的新生儿而言,感染水痘则可能引起严重的并发症,例如病毒性肺炎,脑炎等,甚至会导致致命性后果。少数成人会感染水痘,症状严重,常并发肺炎(20%-30%),病死率亦高;而孕妇患水痘除病情严重外,并可引起胎儿畸形、流产或死产。有研究表明妊娠期水痘发生率为0.1‰~0.7‰,若妊娠前6个月发生初次感染,宫内感染率约为25%;先天性水痘综合征的发生率约为感染胎儿的12%。

[0004] VZV也可以潜伏在神经节,年老、免疫力衰退或因疾病、药物导致免疫抑制等因素会导致潜伏的病毒将被重新激活,引起沿神经分布的带状疱疹,即复发感染带状疱疹(zoster)。复发感染VZV会引起皮损异常的播散性感染及肺、脑、肝、肾、心、眼等脏器损伤并常伴随疱疹后神经痛,严重者甚至死亡。疱疹后神经痛疼痛剧烈,可持续数年之久,极大影响患者生活质量。带状疱疹及疱疹后神经痛的发生概率随年龄增大而增大,这给老龄化社会造成了较大的社会负担。

[0005] 当前对于VZV病毒感染最主要的预防措施为注射疫苗。针对VZV病毒原发感染和复发感染引起的两种临床症状,目前市面上分别采用水痘疫苗和带状疱疹疫苗来进行预防。另外的治疗方法则以抗病毒药物为主,包括采用阿昔洛韦、泛昔洛韦、伐昔洛韦和无环鸟苷、阿糖腺苷等。因此,目前还没有有效的、特异的治疗手段。

[0006] 当前以病毒中和性抗体为基础的抗体治疗已经应用在许多疾病的治疗上。对于VZV病毒感染而言,美国FDA批准了一款水痘-带状疱疹免疫球蛋白(Varicella-Zoster Immunoglobulin,VZIG),由加拿大Cangene公司生产,用于主要是孕妇和新生儿的VZV感染的高危人群。然而该VZV免疫球蛋白是血液制品,本身存在资源稀缺性和批间差异性,并且存在窗口期,有传播病原的风险。此外,这类产品存在传播血源性病原体如艾滋病病毒、乙肝病毒、丙肝病毒等安全性的问题,因此在应用上存在缺陷。中国及大部分国家目前没有VZV免疫球蛋白相关药品上市。

[0007] 尽管现有的疫苗和系统性抗病毒药物能够预防和控制VZV感染,但并无法消除众多的VZV感染并发症。因此,仍然需要发现有效的针对VZV的中和抗体,可以有效地检测VZV并阻断VZV感染宿主和在宿主间传播。此外针对VZV感染,仍然需要能够改善的治疗方法,特别是适于针对VZV感染进行紧急干预的方法。本申请提供的抗VZV抗体及其组合物满足了上

述需求。

发明内容

[0008] 本发明提供一种新的能够以高亲和力结合VZV的中和性抗VZV抗体、包含所述抗体的组合物、试剂盒、所述抗VZV抗体的用途及其使用和制备方法。

[0009] 一方面,本发明提供了分离的抗VZV抗体及其抗原片段。在一个具体的实施方案中,所述抗VZV抗体及其抗原片段包含选自表I所示任一抗体的VH区序列的一个、两个或三个CDR(优选三个CDR)。在另一些实施方案中,本发明抗体包含选自表I所示任一抗体的VL区序列的一个、两个或三个CDR(优选三个CDR)。在一些实施方案中,本发明抗体包含表I所示任一抗体的6个CDR区序列。在一个优选实施方案中,抗体的CDR序列是表II所示的CDR序列。

[0010] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含A)重链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其包含选自SEQ ID NO:1、7和13的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的序列,(ii)CDR2,其包含选自SEQ ID NO:2、8和14的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的序列,(iii)CDR3,其包含选自SEQ ID NO:3、9和15的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的所述序列,和B)轻链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其包含选自SEQ ID NO:4、10和16的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的序列,(ii)CDR2,其包含选自SEQ ID NO:5、11和17的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的序列,(iii)CDR3,其包含选自SEQ ID NO:6、12和18所示的氨基酸序列,或相对于所述序列含有一个或多个且不超过5个氨基酸的氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入的序列,其中包含修饰CDR的抗VZV抗体仍然具有结合VZV的能力。

[0011] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含A)重链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成,和B)轻链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成。

[0012] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含A)重链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成,和B)轻链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

[0013] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含A)重链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成,和B)轻链的互补决定区(CDR):(i)CDR1,其由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成,(ii)CDR2,其由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,(iii)CDR3,其由SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列组成。

[0014] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含重链可变区VH,其包含与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者更高同一性的氨基酸序列或由所述序列组成,包含所述VH的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含重链可变区VH,其包含表II所示任一抗体的6个CDR,且与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,包含所述VH的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。在一些实施方案中,抗VZV抗体的重链可变区VH包含与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列相比具有一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列,包含所述VH的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。

[0015] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区VL,其包含与选自SEQ ID NO:20、22、24或26的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者更高同一性的氨基酸序列或由所述序列组成,包含所述VL的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区VL,其包含表II所示任一抗体的6个CDR,且与选自SEQ ID NO:20、22、24或26的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,包含所述VL的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。在一些实施方案中,抗VZV抗体的轻链可变区VL包含与选自SEQ ID NO:20、22、24或26的氨基酸序列相比具有一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列,包含所述VH的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。

[0016] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0017] 1)重链可变区VH包含与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者更高同一性的氨基酸序列或由所述序列组成;轻链可变区VL包含与选自SEQ ID NO:20、22、24或26所示的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或者更高同一性的氨基酸序列或由所述序列组成,或者

[0018] 2)重链可变区VH包含表II所示任一抗体的6个CDR,且与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性;轻链可变区VL包含表II所示任一抗体的6个CDR,且与选自SEQ ID NO:20、22、24或26的氨基酸序列具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,

包含所述VH和VL的抗VZV抗体具有结合VZV的能力,或

[0019] 3)重链可变区VH包含与选自SEQ ID NO:19、21、23或25的氨基酸序列相比具有一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列;轻链可变区VL包含与选自SEQ ID NO:20、22、24或26的氨基酸序列相比具有一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列,包含所述VH和VL的抗VZV抗体具有结合VZV的能力。

[0020] 在优选的实施方案中,本发明提供抗VZV抗体或其抗原结合片段,其中重链可变区VH包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或由其组成;轻链可变区VL包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或由其组成。

[0021] 在优选的实施方案中,本发明提供抗VZV抗体或其抗原结合片段,其中重链可变区VH包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或由其组成;轻链可变区VL包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或由其组成。

[0022] 在优选的实施方案中,本发明提供抗VZV抗体或其抗原结合片段,其中重链可变区VH包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列或由其组成;轻链可变区VL包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列或由其组成。

[0023] 在优选的实施方案中,本发明提供抗VZV抗体或其抗原结合片段,其中重链可变区VH包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或由其组成;轻链可变区VL包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列或由其组成。

[0024] 在一些实施方案中,上述抗VZV抗体或其抗原结合片段还包含来自人抗体胚系共有序列的重链和/或轻链恒定区序列。

[0025] 在一些实施方案中,本发明的抗体还涵盖与上文所述的任何抗体竞争结合VZV的抗体、以及与上文所述的任何抗体结合VZV相同表位的抗体。

[0026] 在一些实施方案中,至少部分的抗VZV抗体的框架序列是人共有框架序列。在一个实施方案中,本发明的抗VZV抗体还涵盖其抗体片段,优选地选自以下的抗体片段:Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。

[0027] 在一些实施方案中,本发明的抗VZV抗体是中和性抗体,用于中和VZV。

[0028] 在一方面,本发明提供了编码以上任何抗VZV抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中,提供了包含所述核酸的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。在一个实施方案中,提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞是原核的。

[0029] 在一个实施方案中,本发明提供制备抗VZV抗体或其抗原结合片段的方法,其中所述方法包含在适于表达编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养所述宿主细胞,以及任选地分离所述抗体或其抗原结合片段。在某个实施方案中,所述方法还包括从宿主细胞回收抗VZV抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在一个实施方案中,本发明提供由本发明的方法制备的抗VZV抗体或其抗原结合片段。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供包含本文所述的任何抗VZV抗体或其抗原结合片段的组合物,优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物还包含药用载体。在一个实施方案中,组合物中包含的抗VZV抗体及其抗原结合片段偶联至偶联部分。在

一些实施方案中,本发明提供能够延长所述抗体或其抗原结合片段的半衰期的组合物中包含的抗VZV抗体及其抗原结合片段偶联至偶联部分。

[0032] 在另一个方面,本文中提供的是组合物,其包含任何抗VZV抗体或其片段。在一些实施方案中,该组合物进一步包含药学可接受载剂,赋形剂,或稀释剂。在一些实施方案中,该组合物是药学组合物。

[0033] 一方面,本发明涉及中和对象或样品中VZV的方法,所述方法包括:(a)将对象或样品与本文所述的任何抗VZV抗体或其片段接触;和(b)检测抗VZV抗体或其片段和VZV间的复合物的形成。在一个优选实施方案中,本发明的抗VZV抗体及其抗原结合片段还包括可检测的标记。本发明还涉及本文任何抗VZV抗体或其片段在制备用于中和受试者VZV的组合物或药物或试剂盒中的用途。

[0034] 在另一方面,本发明涉及预防、治疗受试者VZV感染或与VZV感染相关的一种或多种疾病或症状(例如水痘、带状疱疹)的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文的任何抗VZV抗体或其片段,或施用本发明的药物组合物。在一个实施方案中,所述受试者是新生儿,早产儿,分娩期妇女,以及器官移植手术、恶性血液病、恶性肿瘤、肾病综合征等接受免疫抑制剂、细胞毒性药物或放射性治疗等导致免疫功能不全者。

[0035] 本发明还涉及本文的任何抗VZV抗体或其片段在制备用于治疗或预防与VZV感染或与VZV感染相关的一种或多种疾病或症状的药物中的用途。在一些实施方案中,与VZV相关的病症是水痘或者带状疱疹。

[0036] 另一个方面,本发明涉及在受试者中提高,增强,或刺激免疫应答或功能的方法,该方法包含对该受试者施用有效量的本文的任何抗VZV抗体或其片段,由此在该受试者中提高,增强,或刺激免疫应答或功能。

[0037] 在另一个方面,本文的任何抗VZV抗体或其片段,供作为药物使用。

[0038] 再一方面,本发明提供了诊断受试者是否感染VZV的方法,包括使用本发明的抗VZV抗体及其抗原结合片段检测来自受试者的样品中VZV的存在和/或水平。在一个优选实施方案中,本发明的抗VZV抗体及其抗原结合片段还包括可检测的标记。

[0039] 另一方面,本发明提供了一种包含本发明的抗体或者组合物的试剂盒,例如诊断试剂盒,检测试剂盒,治疗试剂盒等。

[0040] 本发明还涵盖本文所述的任何实施方案的任意组合。本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有抗VZV抗体或其片段、方法和用途。

[0041] 发明的有益效果

[0042] 本发明提供了能够特异性识别/结合VZV的全人源抗体及其抗原结合片段,所述全人源抗体及其抗原结合片段是具有中和作用的、能够抑制VZV感染的中和抗体,且该抗体及其抗原结合片段亲和力好、特异性强、无异种血清反应、没有传播其他传染性疾病的危险,能够用于预防、治疗受试者的VZV感染或与所述感染相关的一种或多种疾病或症状,例如水痘、带状疱疹。

附图说明

[0043] 图1:纯化的抗体的SDS-PAGE检验结果,泳道1、4、7分别是非还原的全人源VZV单克隆抗体TRN1024、TRN1025和TRN1026,泳道3、6、9分别是非还原的全人源VZV单克隆抗体

TRN1024、TRN1025和TRN1026,泳道2、5、8是Mark蛋白。

[0044] 图2:三株全人源VZV单克隆抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026的ELISA检测结果。

[0045] 图3:三株全人源VZV单克隆抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026的拟合的缔合和解离传感图。

[0046] 图4:三株全人源VZV单克隆抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026的抗核抗性检测结果。

发明详述

[0047] 1.1定义

[0048] 在下文详细描述本发明前,应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂,因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案,而并不意图限制本发明的范围,其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

[0049] 为了解释本说明书,将使用以下定义,并且只要适当,以单数形式使用的术语也可以包括复数,并且反之亦然。应当理解,本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案,并且不意欲是限制性的。

[0050] 术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

[0051] 术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

[0052] 如本文中所用,术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中,当使用术语“包含”或“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如,当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时,也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

[0053] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链,但在某些情况下可包括较少的链,例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

[0054] 如本文所用,“单克隆抗体”或“mAb”指来源于例如真核生物的、原核生物的或噬菌体克隆的单一拷贝或克隆的抗体,即,除了通常以很少量存在的可能变体抗体(例如,含有天然突变或在单克隆抗体制品的生产过程中产生的变体抗体)以外,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位。修饰语“单克隆”表示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。单克隆抗体可以例如通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术例如CDR嫁接、或此类或其它本领域已知的技术的组合来产生。

[0055] 本领域技术人员明了,“全抗体”(在本文中可与“完整抗体”互换使用)包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)。每条重链从N至C端由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH区和VL区可以进一步再划分为互补决定区(CDR)和间插其间的构架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和4个FR组成,从氨基端到羧基端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0056] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。“天然序列Fc结构域”包含与在自然界中找到的Fc结构域的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc结构域包括例如天然序列人IgG1 Fc结构域(非A和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc结构域;天然序列人IgG3 Fc结构域;和天然序列人IgG4 Fc结构域;及其天然存在变体。

[0057] “人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于这样抗体的氨基酸序列,所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源,其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0058] 术语“中和抗体”是指能够与病原体结合并清除或者显著降低病原体的毒力(例如,感染细胞的能力)的抗体或抗体片段。此类中和抗体通常在杀灭细胞外起作用,防止病原体侵入细胞。

[0059] 在一些实施方案中,本发明涵盖抗VZV抗体的片段。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab′、Fab'-SH,$F(ab')_2$、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有单一抗原结合位点,和残留的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生$F(ab')_2$片段,其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

[0060] “互补决定区”或“CDR区”或“CDR”或“高变区”,是抗体可变区中主要负责与抗原表位结合的氨基酸区域。重链和轻链的CDR通常被称作CDR1、CDR2和CDR3,从N-端开始顺序编号。

[0061] 本领域公知多种用于在一个给定的VH或VL氨基酸序列中确定其CDR序列的方案:Kabat互补决定区(CDR)是基于序列变异性确定的并且是最常用的(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)),而Chothia指的是结构环的位置(Chothia等人,(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人(1989)Nature 342:877-883),AbM HVR是Kabat HVR和Chothia结构环之间的折中,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用,“接触性”(Contact)HVR基于对可获得的复杂晶体结构的分析。根据不同的CDR确定方案,这些HVR中的每一个HVR/CDR的残基如下所述。

[0062]

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
CDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
CDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
CDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
CDR1 (Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
CDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
CDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
CDR3 (Kabat 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0063] 在一个实施方案中,本发明抗体的CDR是根据Kabat编号系统位于如下Kabat残基位置的CDR序列:

[0064] VL中的位置24-34(CDR1)、位置50-56(CDR2)、和位置89-97(CDR3),以及VH中的位置27-35(CDR1)、位置50-65(CDR2)、和位置93-102(CDR3)。

[0065] CDR也可以基于与参考CDR序列(例如本发明示例性CDR之任一)具有相同的Kabat编号位置而确定。

[0066] 与抗体相关的术语“变体”在本文中指,包含已经通过至少1个,例如1-30,或1-20或1-10个,例如1或2或3或4或5个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的目标抗体区域(例如重链可变区或轻链可变区或重链CDR区或轻链CDR区)的抗体,其中变体基本上保持改变之前的抗体分子的生物学特性。在一方面,本发明涵盖在本文中所述及的任何抗体的变体。在一个实施方案中,抗体变体保持改变前抗体的至少60%,70%,80%,90%,或100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。可以理解的,抗体的重链可变区或轻链可变区、或各CDR区可以单独改变或组合改变。在一些实施方案中,在一个或多个或全部三个重链CDR中的氨基酸改变不超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个。优选地,所述氨基酸改变为氨基酸取代,优选保守取代。

[0067] 术语“保守取代”是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸取代,例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸取代,一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸取代,或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸取代。示例性的取代如下表所示:

[0068]

原始残基	示例性取代	优选保守取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

[0069]

原始残基	示例性取代	优选保守取代
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0070] 在一些实施方案中,抗体变体与亲本抗体在目的抗体序列区域上具有至少80%、90%或95%或99%或更高的氨基酸同一性。

[0071] 术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表

达载体”。

[0072] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括初级转化的细胞和来源于其的子代,而不考虑传代的数目。子代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体子代。

[0073] 用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如,抗体可在细菌中产生,特别当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,见,例如,美国专利号5,648,237,5,789,199和5,840,523,还见Charlton,Methods in Molecular Biology,卷248(B.K.C.Lo,编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后,抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离,并且可以进一步纯化。

[0074] 在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括真菌和酵母菌株,其糖基化途径已经进行“人源化”,导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如,可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977)中所描述的)等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:216(1980));以及骨髓瘤细胞系如YO,NSO和Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,卷248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0075] “分离的”抗体是这样的抗体,其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中,将抗体纯化至超过95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B848:79-87(2007)。

[0076] “分离的”核酸是指这样的核酸分子,其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0077] 相对于参比多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守取代视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

[0078] 当在本申请中提到序列同一性的百分比时,若未另外特别指出,这些百分比相对于较长序列的全长计算。相对于较长序列的全长计算适用于核酸序列和多肽序列两者。

[0079] “亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用平衡解离常数(K_D)来表述。平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是k_{dis}和k_{on})的比值。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括现有技术已知以及本文中所描述的那些。

[0080] “免疫缀合物”指与一种或多种异源分子,包括但不限于载体缀合的抗体。

[0081] 术语“药物组合物”指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0082] 本发明在另一方面提供了包括一种或多种结合VZV或其免疫活性片段的单克隆抗体的药物组合物。应理解,本发明提供的抗VZV抗体或药物组合物可以整合至制剂中合适的运载体、赋形剂和其他试剂以联合给药,从而提供改善的转移、递送、耐受等。

[0083] 术语“药用载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂或媒介物。

[0084] 适用于本发明的药用载体可以是常规的,参见“Handbook of PharmaceuticalExcipients”,第七版,R.C.Rowe,P.J.Seskey和S.C.Owen,PharmaceuticalPress,London,Chicago描述的药物制剂辅料;以及“Remington'SpharmaceuticalSciences”,E.W.Martin,Mack Publishing Co,Easton,PA 出版,第21版,2012,描述的适用于药物递送所公开抗体的组合物和制剂。

[0085] 在一些实施例中,载体的性质依赖于使用的具体给药方式。例如,肠胃外制剂通常包括可注射流体作为载体,所述可注射流体包括可药用和生理上可接受的液体,例如水、生理盐水、油性或水性介质中的乳液等,并可以含有配制,例如悬浮剂、防腐剂、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、螯合剂和/或粘合剂等。在一些实施例中,药学上可接受的载体还包括低分子量的多肽、蛋白质(例如,血清白蛋白和明胶)、氨基酸(例如,甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、和赖氨酸)、糖和碳水化合物(例如,多糖和单糖)、以及糖醇(例如,甘露醇和山梨醇)。当制备注射用水溶液时,可以使用生理盐水以及包括葡萄糖和其他佐剂如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、和氯化钠的等渗溶液,并且如果必要的话,与适当的增溶剂如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇和PEG)、和非离子表面活性剂(例如,聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆188、和HCO-50)组合使用。对于固体组合物(例如,粉剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可以包括,例如药品级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。固体组合物还可在施前在液体介质中配制成可注射流体(例如,冻干组合物Herceptin™)。

[0086] 本发明的药物组合可通过多种途径施用,包括但不限于口服、静脉、肌肉、气管内、经皮、局部、鼻内、等给药方式。

[0087] 术语“有效量”指以单一或多次剂量施用后,足以获得或者至少部分获得期望的效果的量或剂量,“治疗有效量”指在治疗的受试者中产生预期效果的量,包括受试者病症的改善(例如,一个或多个症状的改善)和/或症状进展的延迟等。预防疾病的有效量指足以预防、阻止或延迟疾病的发生的量。确定有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内,例如

治疗有效量取决于涉及的具体疾病;疾病的程度或严重性;个体患者的应答;施用的具体抗体;施用模式;施用制剂的生物利用率特征;选择的给药方案;和任何伴随疗法的使用等。

[0088] 用于本文时,“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

[0089] 术语“水痘”指水痘带状疱疹病毒(VZV)初次感染而引发的急性传染病,其以发热及成批出现周身性红色斑丘疹、疱疹、痂疹为主要特征。

[0090] 术语“带状疱疹”指潜伏在神经节的VZV病毒重新激活并延神经轴顺行至神经支配的皮肤上增殖而产生的病症。

[0091] 术语“受试者”或“个体”是灵长类(例如,人和非人灵长类诸如猴)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0092] 1.2本发明示例性抗VZV抗体的序列

[0093] 表I:各个抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列:

[0094]

TRN1024	VH	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFSISRDNAKNSLYLQMNSLR VEDTAVYYCAREGGGQGKWRLEYGMDVWGQGTTVIVSS （SEQ ID NO:19）
	VL	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLISGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAIYYCQQYNN WPPYTFGQGTKLEIR（SEQ ID NO:20）
TRN1025	VH	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYAMTWVRQAPGKG LEWVSTISGSGGSTFYADSVRGRFTISRDNSKNALYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRSYGGNQPFDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO:21）
	VL	EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAV YYCQQYYSTPFTFGGGTKVEIK（SEQ ID NO:22）
TRN1026	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGRTFSSYAYSWVR QAPGQGLEWMGRVIPVLGITNYAPKFQGKVTITVDKVT STAFLELTGLKSDDTAVYYCARVSDDVLTGALDYWGQ GTLVTVSS（SEQ ID NO:23）
	VL	QSVLTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTRSDVGSHNRVAWFQ QSPGTAPKLMIYEVTNRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTSTSTWVFGGGTKLTVL（SEQ ID NO:24）
TRN1026衍生抗体	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGRTFSSYAYSWVR QAPGQGLEWMGRVIPVLGITNYAPKFQDKVTITADKVT STAFLELTGLKSDDTAVYYCARVSDDVLTGALDYWGQ GTLVTVSS SEQ ID NO:25）
	VL	QSVLTQPPSVSGSPGQSVTISFTGTRSDVGSHNRVAWFQ QSPGTAPKLMIYEVTNRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTSTSTWVFGGGTKLTVL（SEQ ID NO:26）

[0095] 表II:各个抗体的CDR序列：

[0096]

抗体		CDR	SEQ ID NO	序列
TRN1024	VH	CDR1	SEQ ID NO:1	GFTFSSYW
		CDR2	SEQ ID NO:2	IKQDGSEK
		CDR3	SEQ ID NO:3	AREGGGQGKWRLEYGMDV
	VL	CDR1	SEQ ID NO:4	QSVSSN
		CDR2	SEQ ID NO:5	GAS

[0097]

		CDR3	SEQ ID NO:6	QQYNNWPPYT
TRN1025	VH	CDR1	SEQ ID NO:7	GFTFSSYA
		CDR2	SEQ ID NO:8	ISGSGGST
		CDR3	SEQ ID NO:9	AKDRSYGGNQPFDY
	VL	CDR1	SEQ ID NO:10	QSVLYSSNNKNY
		CDR2	SEQ ID NO:11	WAS
		CDR3	SEQ ID NO:12	QQYYSTPFT
TRN1026	VH	CDR1	SEQ ID NO:13	GRTFSSYA
		CDR2	SEQ ID NO:14	VIPVLGIT
		CDR3	SEQ ID NO:15	ARVSDDVLTGALDY
	VL	CDR1	SEQ ID NO:16	RSDVGSHNR
		CDR2	SEQ ID NO:17	EVT
		CDR3	SEQ ID NO:18	SSYTSTSTWV

实施例

[0098] 以下实施例进一步说明本发明,然而,应理解实施例以说明而非限定的方式来描述,并且本领域技术人员可以进行多种修改。

[0099] 除非明确指明相反,否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。这些方法的描述可以参见,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley和Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates和Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(IRL Press,Oxford,1985);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,Eds.,1984);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan,A.M.Kruisbeek,D.H.Margulies,E.M.Shevach和W.Strober,eds.,1991);Annual Review of Immunology;以及期刊专著如Advances in Immunology。

[0100] 实施例1浆细胞分选

[0101] 采用水痘疫苗(默克,Zostavax)根据制造商的方法接种志愿者,并在接种后第7天采集血样,利用密度离心法分离血浆与PBMC细胞,具体方法请参见授权公告号为CN107760690B的发明专利。选定VZV gH/gL蛋白复合物(CAMBRIDGEBIO,Cat No:01-11-0045)作为抗原进行血清抗体滴度ELISA检测,筛选出最高的抗体滴度倍数改变明显的样品(稀释50倍,OD值>2.0)进行流式分选。通过流式细胞仪,以CD3/CD14/CD16/cd235a-CD19+CD20+/-CD38hi CD27hi设门分选单个浆细胞,将特异性浆细胞群分离出来,并从中分离抗

VZV的全人源单克隆抗体的基因序列,具体方法请参见授权公告号为CN107760690B的发明专利。

[0102] 实施例2分离目的抗体的可变区基因

[0103] 先利用恒定区引物(参见CN107760690B中公开的引物信息)与Superscript III反转录酶(Invitrogen,Carlsbad,CA)从实施例1中获得的浆细胞中反转录合成cDNA第一条链。再通过下述PCR程序分离抗体基因:第一轮PCR:50ul体系中含有5ul的反转录反应产物,5个单位的Taq酶,0.2mM dNTPs,及0.5uM的各亚型重链与轻链抗体恒定区引物(序列),反应条件:预变性95℃5min,然后进行35个PCR循环,每个循环为:95℃×30s,55℃×60s,72℃×90s,最后用72℃延伸7min。第二轮PCR:50ul体系中含有2.5ul的第一轮PCR反应产物,5个单位的Taq Plus酶,0.2mM dNTPs,及0.5uM的各亚型重链与轻链抗体可变区引物,反应条件:预变性95℃5min,然后进行35个PCR循环,每个循环为:95℃×30s,58℃×60s,72℃×90s,最后用72℃延伸7min。获得的PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

[0104] 将鉴定为阳性、且重链与轻链可匹配成对的抗体基因PCR产物用Qiagen PCR产物纯化试剂盒进行纯化,并分别从正向与反向进行序列测定,用IMGT在线服务器(http://imgt.cines.fr/)来分析。

[0105] 实施例3构建重组抗体的表达

[0106] 将获得的抗体可变区基因的PCR产物利用TA克隆的方法连接到含人IgG1恒定区的pcDNA3.3载体上,构建抗水痘-带状疱疹病毒的全人源中和抗体的表达载体,然后将表达载体转化DH5α感受态细菌进行载体扩增并提取重组质粒。将获得的重组质粒与转染试剂PolyFect共转染HEK293细胞,37℃、8%CO_2培养箱中培养,配对的重链与轻链基因表达载体在细胞中表达,培养96h后收集上清,离心弃去细胞碎片,利用Protein A亲和层析法对上清进行纯化。将纯化的抗体进行SDS-PAGE检验,结果如图1显示,抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026非还原条带在135-180KD之间,还原后均得到清晰的重链和轻链条带,即获得了目的抗体——重组的抗水痘-带状疱疹病毒的全人源中和抗体。

[0107] 实施例4重组抗体的结合活性检测

[0108] 本实验采用ELISA试验检测上述实施例获得的重组抗体的结合活性。以100ng/孔VZV gH/gL蛋白复合物包被ELISA 96孔板,4℃过夜,然后用封闭液常温封闭2个小时。然后向96孔板分别加入100uL本发明的重组抗体HEK293细胞培养上清和阴性对照(抗狂犬病毒抗体TRN006,即与VZV无关的抗体),37℃孵育1h。每孔加100μL用封闭液按1:10000进行稀释的Goat-Anti-IgG-Fab-HRP,37℃孵育1h。终止后反应检测OD值,计算结果。最终筛选出能与VZV gH/gL蛋白结合的三株全人源VZV单克隆抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026,EC50低至0.002ug/mL(图2所示),表明本发明获得的抗体能够特异性结合VZV gH/gL蛋白。

[0109] 实施例5重组抗体的亲和力检测

[0110] 使用表面等离子体共振技术(仪器为BIACORE3000)测定来测量本发明的抗体的KD值。使用CM5芯片偶联捕获分子,活化芯片的葡聚糖表面,以进样时间确定偶联量。将制备的抗体作为配体,以计算得到的信号值确定单抗的进样浓度及接触时间。用HBS-EP缓冲液稀释VZV gH/gL蛋白复合物(CAMBRIDGEBIO,Cat No:01-11-0045)作为分析物,将分析物以逐渐增高的浓度依次流过芯片,分别得到信号曲线。每个浓度作为1个循环,完成1次循环后用10mmol/L的甘氨酸—盐酸再生芯片以回复到原始未结合抗原的状态。用BiaCore X-

100System软件进行分析。具体步骤如下：

[0111] 通过氨基偶联方式偶联抗人IgG(Fc)到CM5芯片的两个通道上。捕获的TRN1024、TRN1025和TRN1026浓度为1μg/mL，结合时间为60s。结合的VZV gH/gL蛋白复合物浓度如图3所示，最低为1.56μg/mL，最高达200μg/mL，结合时间为90s，解离时间为600s。再生溶液为3M $MgCl_2$，再生时间为30s。

[0112] 通过同时拟合缔合和解离传感图(图3)，计算缔合速率(ka)、解离速率(kd)、平衡解离常数，结果如下表所示，TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体均具有较高的亲和力，即本发明抗体能够高效的结合抗原。

[0113]

配体	分析物	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
TRN1026	gHgL-Cambridge	1.03E+05	2.74E-04	2.66E-09
TRN1025	gHgL-Cambridge	3.11E+04	4.16E-04	1.34E-08
TRN1024	gHgL-Cambridge	1.69E+04	6.21E-04	3.67E-08

[0114] 实施例6重组抗体体外中和活性的鉴定

[0115] 以人胚肺成纤维细胞(MRC-5)检测抗体的中和活性。根据常规方法，在VZV病毒感染细胞后，通过酶联免疫斑点法检测被感染的细胞。带有信号的阳性细胞数即被感染细胞数，可以被认为是在该次感染实验中使用了多少感染单位的VZV病毒。以梯度稀释斑点计数方法检测VZV病毒的滴度。将上述被感染MRC-5细胞通过常规方法消化，之后铺96孔板进行常规培养，以备用于次日中和实验。实验当日，从100ug/mL开始，以PBS溶液依次二倍稀释各个抗体TRN1024、TRN1025、TRN1026共10个梯度，将各个梯度的抗体PBS溶液以50uL/孔的浓度依次加入新的96孔板，之后每孔加入50uL体积的100个细胞培养半数感染量(CCID50)的VZV Oka标准株，37℃中和一小时，然后将中和溶液分别加入到前一日培养的MRC-5细胞的96孔板中，每孔补加100uL病毒培养液，逐日观察细胞病变情况。

[0116] 结果显示，本发明的抗体可以明显中和VZV Oka标准株的活性，抑制MRC-5细胞凋亡；而不添加抗体的对照不能中和病毒的活性。经过计算，TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体的中和效价可达1.56ug/mL。表明这三株抗体能够特异性识别VZV病毒感染的细胞，并起到中和病毒的作用，抑制病毒在细胞间传播。

[0117] 实施例7重组抗体抗核抗性检测

[0118] Hep-2细胞是人的喉癌上皮细胞，因其抗原谱丰富(约100-150种)，抗原特异性强以及抗原含量高等特点，国际上检测抗核抗体的标准方法通常是选用Hep-2细胞作为底物的间接免疫荧光法。本实施例通过免疫荧光法检测抗体对Hep2细胞染色反应用于判定抗体是否具有自身免疫反应。利用抗核抗体(ANA)检测试剂盒(200人份)进行检测，荧光显微镜观察。结果如图4所示，TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体(100ug/ml)的实验组和阴性对照组的Hep-2细胞均没有特异性荧光(GFP)，即抗体不与Hep-2细胞的抗原结合；而在阳性对照组，则观察到明显的GFP荧光。由此，表明本发明的抗体对Hep-2细胞没有自身免疫反应。

[0119] 实施例8临床样本病毒的体外中和实验

[0120] 采集水痘或带状疱疹病毒患者的疱疹液,进行临床样本病毒分离(分离方法参照Liu J,Wang M,Gan L等人.Genotyping of Clinical Varicella-Zoster Virus Isolates Collected in China[J].Journal of Clinical Microbiology,2009,47(5):1418-1423./Liu J J,Wang M L,Gan L等人[Seroepidemiology of varicella-zoster virus infection measured by the fluorescent antibody to membrane antigen test][J].Zhonghua liu xing bing xue za zhi＝Zhonghua liuxingbingxue zazhi,2009,30(4):371.),分离获得10株VZV临床分离株。将这些VZV临床分离株进行病毒培养,制备无细胞病毒(CFV)。采用常规蚀斑减少中和实验(金标准)检测TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体的体外中和能力,以VariZIG(Cangene,免疫球蛋白)为阳性对照,无关抗体TRN006为阴性对照。结果表明TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体均能特异性识别并中和这10株innVZV临床分离株,具有临床意义。

[0121] 实施例9体内预防实验

[0122] 本实施例探讨了TRN1024、TRN1025、TRN1026三株抗体在体内对VZV Oka株病毒感染的预防功能。选择4周龄、300-350g的豚鼠,设置空白组、对照组(VariZIG)和实验组(TRN1026,5mg/kg)。先给予等量生理盐水、VariZIG、TRN1026,1天后每只动物静脉注射50uL $1x10^6$感染VZV Oka株病毒(购自ATCC)的PBMC,在第1、3、7天分别抽血检测血液的病毒载量(检测病毒基因拷贝数)。病毒基因拷贝数结果显示,实验组和对照组的病毒载量显著低于空白组,表明低剂量的抗体能够保护豚鼠抵抗VZV病毒的攻击,即本发明的重组抗VZV抗体具有体内活性及保护作用。

[0123] 实施例10重组抗体可变区序列的同一性分析

[0124] 针对本发明发现的抗体序列,申请人发现在其重链可变区和/或轻链可变区序列的框架区中引入一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列修饰,将不实质上影响该可变区对抗原的结合能力。本申请中抗体TRN1026的重链可变区序列(VH)如SEQ ID NO:23所示,轻链可变区序列(VL)如SEQ ID NO:24所示。作为示例,在抗体TRN1026的可变区的框架区中引入一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸序列修饰,所获得的衍生抗体仍然保留所述抗VZV抗体的结合活性。例如,具有如SEQ ID NO:25所示VH,如SEQ ID NO:26所示VL的抗体TRN1026的衍生抗体,表达后取其培养上清进行EILISA实验以检测其结合活性。结果显示,上述TRN1026抗体衍生物与VZV gH/gL蛋白复合物仍然保持结合活性,EC50低至0.05ug/mL,可见对抗体可变区中的框架区进行一个或多个取代(例如保守性取代)、插入或缺失的氨基酸修饰将不影响重组抗体的活性和功能。

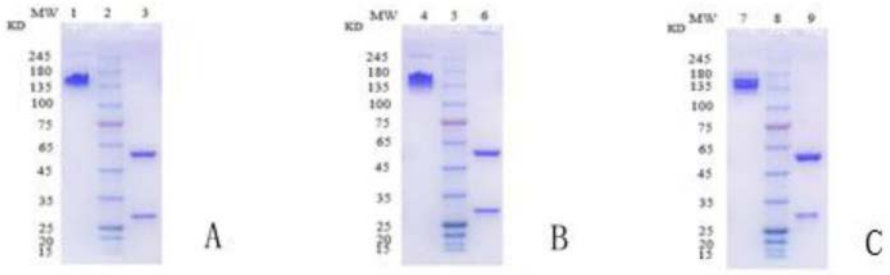

MW
KD
245
180
135
100
75
65
45
35
25
20
15
A
B
C

图1

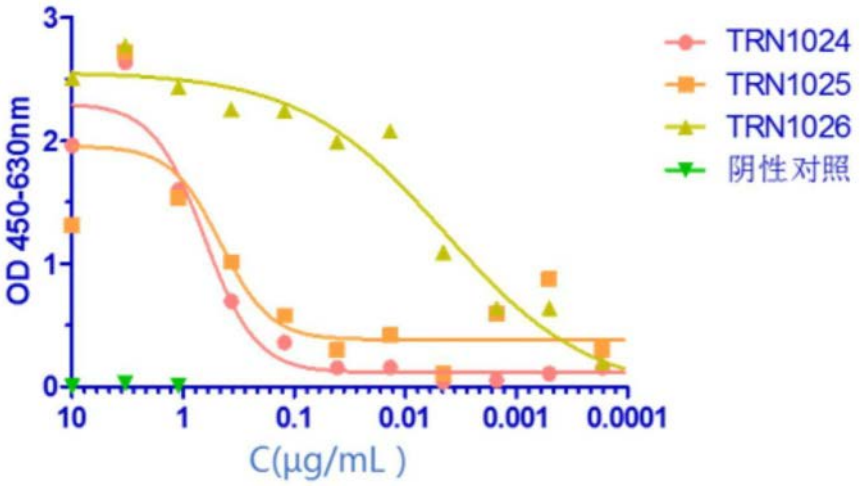

OD 450-630nm
3
2
1
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
C(μg/mL)
TRN1024
TRN1025
TRN1026
阴性对照

图2

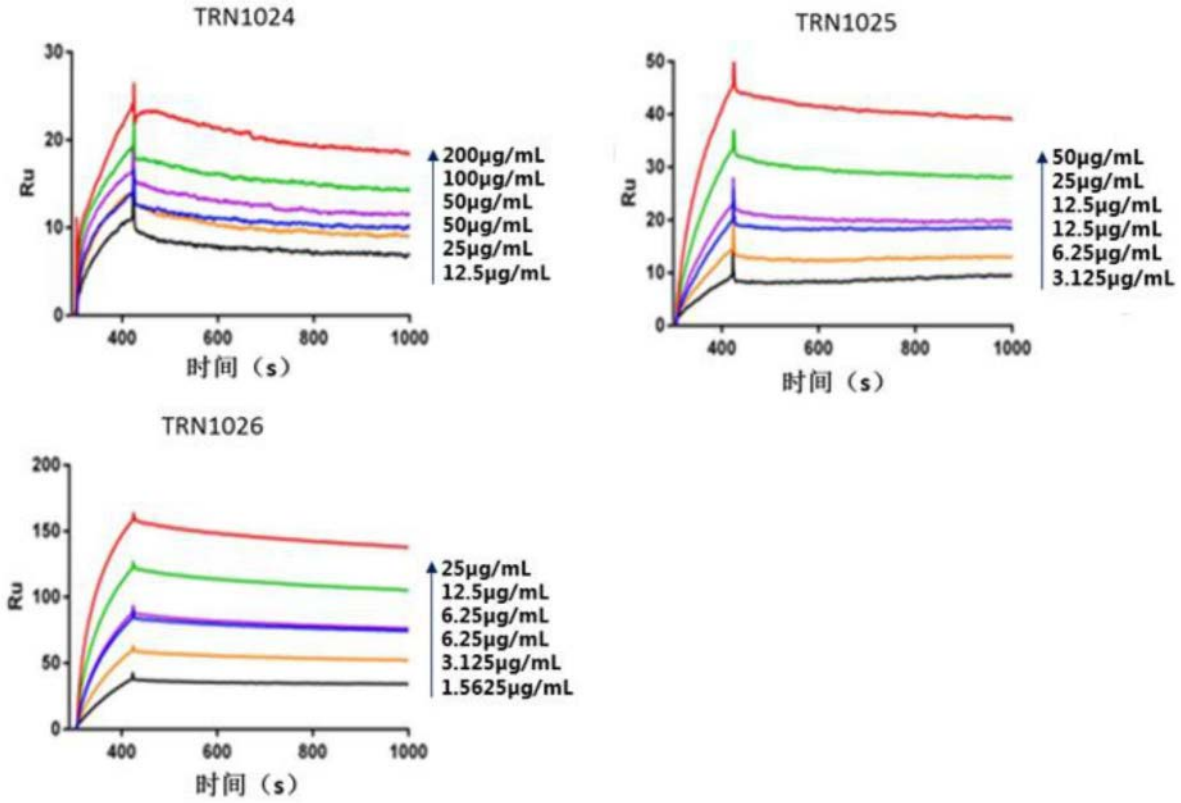

TRN1024
Ru
时间（s）
200μg/mL
100μg/mL
50μg/mL
50μg/mL
25μg/mL
12.5μg/mL
TRN1025
Ru
时间（s）
50μg/mL
25μg/mL
12.5μg/mL
12.5μg/mL
6.25μg/mL
3.125μg/mL
TRN1026
Ru
时间（s）
25μg/mL
12.5μg/mL
6.25μg/mL
6.25μg/mL
3.125μg/mL
1.5625μg/mL

图3

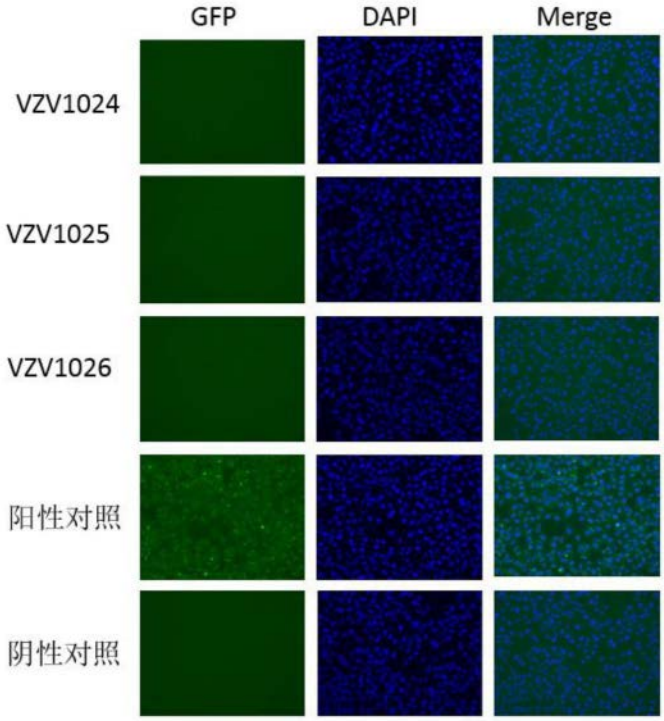

GFP
DAPI
Merge
VZV1024
VZV1025
VZV1026
阳性对照
阴性对照

图4