

(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



(43) 国际公布日:
2004年2月5日(05.02.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 04/011633 A1

(51) 国际分类号⁷: C12N 5/12, C07K 16/08

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00551

(22) 国际申请日: 2002年8月9日(09.08.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02125371.4 2002年7月29日(29.07.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 清华大学
(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市
海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。北京清大英
华生物技术有限公司(BEIJING QINGDA YINGHUA
BIO-TECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区
中关村大街49号B408-2室, Beijing 100086 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 陈应华(CHEN, Yinghua)
[CN/CN]; 黄金(HUANG, Jin) [CN/CN]; 中国北京市
海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI &
PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街甲129
号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR),
OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE ANTIBODY DIRECTED AGAINST THE HIV STRAIN TYPE O, THE HYBRIDOMA CELL LINE
PRODUCING IT AND THE USES THEREOF

(54) 发明名称: 艾滋病病毒 O 型株的一种抗体及其生产细胞系与应用

(57) Abstract: This invention relates to an antibody directed against the HIV strain Type O, the hybridoma cell line producing it and the uses thereof. The present invention provides monoclonal antibodies, which bind specifically to the HIV strain Type O. The antibodies are specific for a DE epitope, particularly ELDEWA. The invention also relates to mouse hybridoma cell line 14D9 capable of producing the antibody which binds specifically to the HIV strain Type O. The cell line has been deposited with China General Microbiological Culture Collection Center. The monoclonal antibodies of the invention are widely useful for identification, diagnosis of the HIV-1 Type O, for preparing drug for passive immunization against the infection of the HIV strain Type O. The pharmaceuticals comprising the monoclonal antibodies of this invention as the active component are used for treating Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS).

WO 04/011633 A1



(57) 摘要

本发明公开了艾滋病病毒O型株的一个抗体及其生产细胞系与应用，本发明的目的是提供能与艾滋病病毒O型株专一结合的单克隆抗体，该抗体具有对表位DE，特别是表位ELDEWA的特异性。能够分泌与艾滋病病毒O型株专一结合的单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞系14D9，已于2002年06月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。本发明的单克隆抗体在鉴别、诊断HIV-1病毒O型株、制备用于HIV-1 O型毒株感染被动免疫药物中将得到广泛应用。以本发明单克隆抗体为活性成份的药物可望在治疗艾滋病中得到应用。

艾滋病病毒O型株的一种抗体及其生产细胞系与应用

技术领域

本发明涉及艾滋病病毒O型株的一个抗体及其生产细胞系与应用。

背景技术

5 获得性免疫缺陷综合症，又称艾滋病，是由人类免疫缺陷病毒 I 型（HIV-1）引起的一种免疫性疾病，目前尚无彻底治愈的有效药物，也没有疫苗可以预防。免疫缺陷病毒的高变异性一直是 HIV 疫苗和药物设计中的难题。

最近国外抗艾滋病药物临床研究结果证明，在被动免疫治疗中，组合
10 使用针对HIV-1 膜蛋白gp160（膜蛋白gp120及跨膜蛋白gp41的前体蛋白）上的几个特定中和表位的中和抗体（其中包括ELDKWA表位特异性的单克隆抗体2F5），能抑制HIV-1病毒的粘膜传染以及母婴传播，并能清除血液中的HIV-1病毒（Nature Medicine 1999, 5: 204; Nature Medicine 2000, 6:200; Nature Medicine 1999, 5: 211）；人免疫缺陷病毒（HIV-1）跨膜蛋白gp41
15 上的主要中和表位ELDKWA的表位特异性单克隆抗体能够体外抑制多种HIV-1病毒株感染靶细胞（J. Virology 1993, 67:6642; AIDS Res. Human Retroviruses 1994, 10:1651; AIDS 1996, 10:587）。研究证明，HIV-1能够通过中和表位的限制性变异逃脱中和抗体的中和作用（Immunity 10, 431-438, 1999）。ELDKWA是公认的重要的HIV-1中和表位，该表位的保守性很强，但在D或K位点的某些限制性变异，能够使病毒逃脱单抗的中和作用。
20

发明公开

本发明的发明人经研究发现了艾滋病病毒 O 型株的一个新的免疫学表位，该表位包括氮末端为天门冬氨酸，碳末端为谷氨酸的两个相邻氨基酸残基。
25 与该两个氨基酸残基相连的，通常氮末端连接的氨基酸残基为亮氨酸，碳末端连接的氨基酸残基为色氨酸，这时该免疫学表位的氨基酸残基序列为LDEW，在该序列的基础上，通常氮端连接的氨基酸残基为谷氨酸，碳端连接的氨基酸残基为丙氨酸，这时该免疫学表位的氨基酸残基序列为 ELDEWA。

发明人通过对 HIV 数据库(<http://hiv-web.lanl.gov>)的检索发现，所

有 HIV-1 病毒 O 型株的跨膜蛋白 gp41 均带有 ELDEWA 表位（如表 1 所示），而其它 HIV-1 病毒亚型不带有此表位，进一步证实 ELDEWA 是 HIV-1 病毒 O 型株的特有表位，可用于 HIV-1 病毒 O 型株鉴别和诊断的靶位点，也可以作为治疗药物的靶位点。

5

表 1: HIV-1 病毒 O 型株带有特征性的 ELDEWA 表位

	登录号	序列	氨基酸残基的序号
1	AF009033	LELDEWAS	668-675
2	AF407418	LELDEWAS	675-682
3	AJ302646	LELDEWAS	680-687
4	AJ302647	LELDEWAS	669-676
5	L20571	LELDEWAS	674-681
6	L20587	LELDEWAS	660-667
7	NC_002787	LELDEWAS	680-687
8	U82990	LELDEWAS	658-665
9	U82991	LELDEWAS	670-677
10	U82992	LELDEWAS	668-675
11	U82993	LELDEWAS	669-676
12	X96522	LELDEWAS	674-681
13	X96526	LELDEWAS	677-684

本发明的目的是提供能与艾滋病病毒 O 型株专一结合的单克隆抗体，该抗体具有对表位 DE，特别是表位 ELDEWA 的特异性。

能够分泌与艾滋病病毒 O 型株专一结合的单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞系 14D9，已于 2002 年 06 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC），保藏号为 CGMCC No.0753。

10

小鼠杂交瘤细胞系 14D9 产生的单克隆抗体 14D9 能够特异性识别 HIV-1 病毒 O 型株跨膜蛋白 gp41 特有的 ELDEWA-表位，而不识别其它 HIV-1 病毒亚型所携带 ELDKWA-、ELNKWA- 和 ELEKWA-表位。

下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。

15 附图说明

图1为本发明单克隆抗体与带有不同表位的重组、可溶性gp41融合蛋白

反应后的电泳图。

实施发明的最佳方式

实施例1、鼠类来源的杂交瘤细胞系14D9的制备过程：

1、人工合成一条含有HIV-1 O型株跨膜蛋白gp41特有的ELDEWA-表位的
5 表位多肽，该表位多肽含有4次重复的ELDEWA-免疫学表位，其氨基酸残基序
列为：CELDEWAGELDEWAGELDEWAGELDEWA；

2、利用MBS (m -maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester) 将上述表位
多肽与载体蛋白BSA耦联；

3、将上述耦联物与福氏佐剂混合（两种物质的重量比为，耦联物：福
10 氏佐剂=1：1）免疫Balb/c小鼠，每两周免疫一次。首次使用完全福氏佐
剂，以后使用不完全福氏佐剂。每次免疫抗原剂量为：含10微克表位多肽的
耦联物/次/只，共免疫3次；

4、将免疫后的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞采用常规细胞融合技术融
合，并制备杂交瘤，从杂交瘤细胞中筛选出能分泌ELDEWA-表位特异性单克
15 隆抗体的杂交瘤；

5、克隆杂交瘤，获得能分泌ELDEWA-表位特异性单克隆抗体的克隆杂交
瘤细胞系14D9。

实施例2、本发明抗体对 HIV-1 病毒 O 型株 ELDEWA-表位的特异性识别
将杂交瘤细胞系14D9分泌的单克隆抗体与带有不同表位的重组、可溶性gp41
20 融合蛋白进行温浴反应，结果如图1所示，从图中的结果可以看出，杂交瘤
细胞系14D9分泌的单克隆抗体对HIV-1病毒O型株ELDEWA-表位具有特异性识
别，图中，A：分子量蛋白；B：本发明单克隆抗体识别带有ELDEWA表位的
rsgp41(GST-rsgp41_{ELDEWA}) (42KD)；C：本发明单克隆抗体不识别带有
ELDKWA表位的rsgp41(GST-rsgp41_{ELDKWA})；D：本发明单克隆抗体不识别
25 GST；E：本发明单克隆抗体识别含有ELDEWA表位的GST-ELDEWA (26KD)。

工业应用

本发明的单克隆抗体在鉴别、诊断 HIV-1 病毒 O 型株、制备用于 HIV-1
O 型毒株感染被动免疫药物中将得到广泛应用。以本发明单克隆抗体为活性
成份的药物可望在治疗艾滋病中得到应用。

关于微生物保藏的说明
(细则 13 之二)

A. 对说明书第 2 页, 第 8-10 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项 其他保藏在补充页中 ☐	
保藏单位名称 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CHINA GENERAL MICROBIOLOGICAL CULTURE COLLECTION CENTER	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 中国北京市海淀区中关村北一条 13 号 邮编: 100080 No13, North 1 Lane, Zhongguancun Street, HaiDian District, Beijing100080, CHINA	
保藏日期 2002 年 06 月 27 日	保藏编号 CGMCCN ₀ 753
C. 补充说明(必要时) 本栏内容有补充页 ☐	
D. 本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	
由受理局填写 ☒ 本页已经和国际申请一起收入到	由国际局填写 ☐ 本页已经和国际申请一起收入到
受权官员	受权官员

权利要求书

- 1、鼠类来源的杂交瘤细胞系 14D9，CGMCC №0753。
- 2、由保藏号为 CGMCC №0753 的杂交瘤细胞系 14D9 产生的单克隆抗
5 体。
- 3、根据权利要求 2 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述抗体具有艾
滋病毒 0 型株 DE 表位特异性。
- 4、根据权利要求 3 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述抗体具有艾
滋病毒 0 型株 LDEW 表位特异性。
- 10 5、根据权利要求 3 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述抗体具有艾
滋病毒 0 型株 ELDEWA 表位特异性。
- 6、权利要求 2—5 中任意一项所述的单克隆抗体在鉴别、诊断 HIV-1 病
毒 0 型株中的应用。
- 7、权利要求 2—5 中任意一项所述的单克隆抗体在制备用于 HIV-1 0 型
15 毒株感染被动免疫药物中的应用。
- 8、以权利要求 2—5 中任意一项所述的单克隆抗体为活性成份的药物。

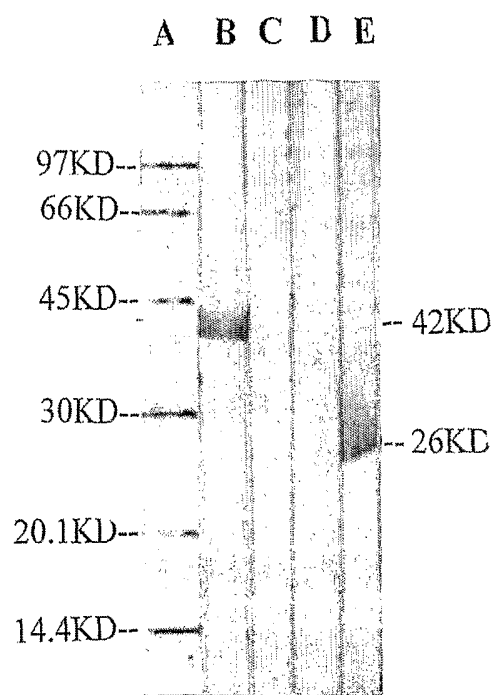


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N5/12, C07K16/08

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)

IPC⁷ C12N5/12, C07K16/08

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

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

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	EP, A, 0492560(BIOCLONETICS INC et al) 01 July 1992, See the whole document	1-8
A	WO, A2, 9945969 (BERGTER I et al) 16. September 1999, See the whole document	1-8



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 document 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

08 November 2002(08.11.02)

Date of mailing of the international search report

13 MAR 2003 (13.03.03)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

PAN, aiquan

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00551

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A-0492560	01-07-92	US-A-5459060	17-10-95
WO-A2- 9945969	16-09-99	AU-A-3698199	27-09-99

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN02/00551

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: C12N5/12, C07K16/08

按照国际专利分类表(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(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: C12N5/12, C07K16/08

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, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,CNPT, BIOSIS,CA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	EP, A, 0492560(BIOCLONETICS INC 等) 01.7 月 1992, 参见全文	1-8
A	WO, A2, 9945969 (BERGTER I 等) 16.9 月 1999, 参见全文	1-8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的
“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

08.11 月 2002(08.11.02)

国际检索报告邮寄日期

13. 3月 2003(13.03.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

授权官员:

潘爱群

电话号码: 86-10-62093906



国际申请号
PCT/CN02/00551

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
EP-A-0492560	01-07-92	US-A-5459060	17-10-95
WO-A2- 9945969	16-09-99	AU-A-3698199	27-09-99