



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119751663 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 04

(21) 申请号 202411991671.9

(22) 申请日 2024.12.31

(71) 申请人 兰州大学

地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水南路222号

(72) 发明人 朱启运 徐帅 申汶涛 徐洁
吉艳红

(74) 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心代理有限公司 62100

专利代理师 王梦娜

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体及其应用,属于生物技术领域,解决了临床上现有抗流感病毒药物存在广谱性不足、出现耐药性及存在毒副作用的问题。本发明纳米抗体包含有三个互补决定区以及四个恒定区,互补决定区CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3。本发明还提供一种核酸片段。本发明还提供一种生物材料。本发明还提供一种用于预防或治疗流感病毒的制品。本发明所筛选的纳米抗体对流感病毒具有高度特异的识别和结合能力,并对不同亚型流感病毒具有广谱中和作用,具有制备流感病毒的预防治疗制品或检测试剂的应用前景。

1. 一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体,其特征在于:所述纳米抗体包含有三个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3以及四个恒定区FR1、FR2、FR3、FR4;其中,互补决定区CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3。

2. 根据权利要求1所述的一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体,其特征在于:恒定区FR1、FR2、FR3、FR4的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7。

3. 根据权利要求1或2所述的一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体,其特征在于:所述纳米抗体的氨基酸序列为SEQ ID NO:8。

4. 一种编码权利要求1-3中任一项所述的抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体的核酸片段。

5. 根据权利要求4所述的一种核酸片段,其特征在于:所述核酸片段的序列为SEQ ID NO:9。

6. 一种权利要求1-3中任一项所述的抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体相关的生物材料,其特征在于:所述生物材料为A1)至A12)中的任一种:

- A1) 编码权利要求1-3中任一项所述的抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体的核酸分子;
- A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒;
- A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体;
- A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体;
- A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物;
- A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物;
- A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;
- A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物;
- A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因细胞;
- A10) 含有A2)所述表达盒的转基因细胞;
- A11) 含有A3)所述重组载体的转基因细胞;
- A12) 含有A4)所述重组载体的转基因细胞。

7. 一种用于预防或治疗流感病毒的制品,其特征在于:包含有权利要求1-3中任一项所述的抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体,或者权利要求4或5所述的核酸片段,或者权利要求6所述的生物材料。

一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体及其应用。

背景技术

[0002] 流行性感(简称“流感”)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒可分为甲、乙、丙、丁四种类型,引起流感季节性流行的主要是甲型和乙型流感病毒。流感病毒主要通过感染者打喷嚏和咳嗽等产生的呼吸道飞沫传播,也可经口腔、鼻腔、眼睛等黏膜直接或间接接触感染。流感病毒抗原性易变,传播迅速。同时流感病毒也是重要的人兽共患病原体,大多数的家禽、野禽及水禽都可感染,禽类感染禽流感病毒后,发病率和死亡率都很高。

[0003] 临床上现有抗流感病毒药物主要作用靶点为病毒血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)或离子通道M2等病毒囊膜蛋白。由于不同亚型间HA、NA蛋白差异较大,容易产生突变,作用于这两种蛋白的药物不具有广谱性而且很容易失效。作用于M2离子通道的药物虽具有广谱性,但已被证实产生了严重的耐药性及毒副作用。因此,开发更为有效且毒副作用小的抗流感药物,需求尤为迫切。

[0004] 核蛋白(nucleoprotein, NP)是由NP基因编码的蛋白,包含498个氨基酸。NP蛋白是AIV感染细胞后表达最丰富的蛋白,具有RNA聚合酶活性,在病毒mRNA、cRNA、vRNA合成过程中发挥重要作用,还具有核输入、核输出和RNA合成等重要功能。NP蛋白在不同亚型中高度保守,是流感病毒防治理想的作用靶点。

[0005] 在骆驼科及鲨鱼科动物血清中偶然发现天然缺失轻链的抗体,其重链可变区(variable domain of the heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)是已知完整抗原结合片段的最小单位,即纳米抗体(Nanobodies, Nbs)。纳米抗体分子量12~15 kDa,晶体直径2.5 nm,长4 nm,由4个骨架区(framework region, FR)和3个互补决定区(complementarity determining region, CDR)组成。

[0006] 与常规抗体及抗体片段相比Nbs具有较长CDR3区域,组成了抗原决定簇的主要部分,由于其独特的结构和更小的尺寸,能够识别传统抗体无法到达的靶抗原内部、深处狭小裂缝处。Nbs内部的二硫键使其具有耐热性和蛋白水解抗性,在极端的温度和pH、有机溶剂和蛋白酶环境仍能保持稳定构象,表明其可以实现口服或雾化的给药方式,在胃肠道和呼吸道疾病的治疗方面具有良好应用前景。此外,Nbs在结构和化学组成方面比传统抗体简单得多,更易于编辑和功能修饰,可以根据不同需求实现多价、多副表位和多特异性工程化改造,便于增加亲和力、结合多种抗原或体外亲和力成熟。其具有的强亲水性和溶解性使之更容易在不同表达系统中大量表达,例如细菌、酵母或哺乳动物细胞,成为适合进行工程化、规模化生产的潜在抗体类型。

[0007] 因此,具有广谱抗流感病毒作用的NP蛋白特异性纳米抗体,是流感防治与药物开发的优势候选抗体。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体,以解决临床上现有抗流感病毒药物存在广谱性不足、出现耐药性及存在毒副作用的问题。本发明所提供的纳米抗体可以有效地结合流感病毒NP蛋白,同时具有稳定的流感病毒中和活性,为流感防治提供了一种有效的生物分子制品。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体的应用。

[0010] 本发明的技术方案如下:

第一方面,本发明提供一种抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体,纳米抗体包含有三个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3以及四个恒定区FR1、FR2、FR3、FR4;其中,互补决定区CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列信息如下:

CDR1序列:GYIFSVD RMG (SEQ ID NO:1);

CDR2序列:DIFESGSLKSEN YADFVEG (SEQ ID NO:2);

CDR3序列:RRLRSGTWYDY (SEQ ID NO:3)。

[0011] 优选地,恒定区FR1、FR2、FR3、FR4的氨基酸序列信息如下:

FR1:QVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAAS (SEQ ID NO:4);

FR2:WYRQAPGKQRELVA (SEQ ID NO:5);

FR3:RFTISRENAKNTVYLQMNSLPEDTAVYYCNL (SEQ ID NO:6);

FR4:WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:7)。

[0012] 优选地,纳米抗体的氨基酸序列信息如下:

QVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGYIFSVD RMGWYRQAPGKQRELVADIFESGSLKSEN YADFVEGRFTISRENAKNTVYLQMNSLPEDTAVYYCNLRRLRSGTWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:8)。

[0013] 第二方面,本发明提供一种编码上述抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体的核酸片段。

[0014] 优选地,核酸片段的一种具体的序列如下:

CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCGGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGCTACATCTTCAGTGTGGATCGCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAATTGGTCGCAGATATCTTCGAAAGTGGTAGCCTGAAGTCTGAGAACTATGCAGACTTCGTGGAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGAGAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAA TTTGAGGCGACTTCGATCAGGGACCTGGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:9)。

[0015] 第三方面,本发明提供一种抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体相关的生物材料,生物材料为A1)至A12)中的任一种:

A1) 编码抗流感病毒NP蛋白中和纳米抗体的核酸分子;

A2) 含有A1)核酸分子的表达盒;

A3) 含有A1)核酸分子的重组载体;

A4) 含有A2)表达盒的重组载体;

A5) 含有A1)核酸分子的重组微生物;

A6) 含有A2)表达盒的重组微生物;

A7) 含有A3)重组载体的重组微生物;

- A8) 含有A4) 重组载体的重组微生物;
- A9) 含有A1) 核酸分子的转基因细胞;
- A10) 含有A2) 表达盒的转基因细胞;
- A11) 含有A3) 重组载体的转基因细胞;
- A12) 含有A4) 重组载体的转基因细胞。

[0016] 第四方面,本发明提供一种用于预防或治疗流感病毒的制品,包含有上述抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体,或者上述核酸片段,或者上述生物材料。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明提供了一种能够特异识别中和流感病毒的纳米抗体,所筛选的纳米抗体对流感病毒具有高度特异的识别和结合能力,并对不同亚型流感病毒具有广谱中和作用,具有制备流感病毒的预防治疗制品或检测试剂的应用前景。

附图说明

- [0018] 图1是单价纳米抗体纯化SDS-PAGE鉴定图;
图2是纳米抗体亲和力检测结果图;
图3是纳米抗体特异性鉴定图;
图4是纳米抗体中和活性检测结果图;
图5是纳米抗体抑制不同亚型流感病毒复制能力检测图;
图6是RNA水平检测纳米抗体抑制流感病毒复制能力图。

具体实施方式

[0019] 以下结合附图和具体实施方式对本发明进行进一步详细说明。

[0020] 本发明中的术语“纳米抗体”指一种天然缺失轻链,仅含有重链的抗体(重链抗体)。该类抗体的可变区约12-15 kDa,可以识别结合抗原,且亲和力极高,是最小的活性抗原结合片段。纳米抗体具有分子量小、亲和力高、高稳定性和水溶性的特点。

[0021] 本发明抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体包括互补决定区CDR和恒定区(也称为框架区)FR。互补决定区CDR包括CDR1、CDR2和CDR3,恒定区FR包括FR1、FR2、FR3和FR4。恒定区与互补决定区相比,其氨基酸序列更保守。但由于互补决定区存在氨基酸序列变异,导致不同的纳米抗体存在不同的抗体效价。

[0022] 三个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3和四个恒定区FR1、FR2、FR3、FR4的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:1-7。

[0023] 本发明抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体的氨基酸序列为SEQ ID NO:8。

[0024] 在可选的实施方式中,氨基酸序列包含SEQ ID NO: 1-8任一项所示,或与SEQ ID NO: 1-8任一项具有至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%、或100%的序列同一性。

[0025] 本发明还提供用于编码上述纳米抗体的核酸片段,其序列如SEQ ID NO:9所示。

[0026] 在可选的实施方式中,核酸序列与SEQ ID NO: 9所述核苷酸具有至少90%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%、或100%的序列同一性。

[0027] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或制造厂商所建议的条件。

[0028] 实施例1、
抗流感病毒NP蛋白的中和纳米抗体特性鉴定及抑制病毒复制能力检测。

[0029] 1. 实验方法

1.1 纳米抗体的克隆与表达

将抗体序列克隆至pcDNA3.1-Fc(包含人Fc的CH2和CH3基因片段)真核表达载体,提取质粒并转染至293F悬浮细胞,5 d后收集上清,PBS缓冲液透析过夜,利用Protein A介质纯化出目的抗体,进行SDS-PAGE试验,分析结果。

[0030] 1.2 纳米抗体特异性检测

(1) 将灭活的不同亚型流感病毒按10 $\mu\text{g/mL}$ 包被ELISA板,同时包被灭活坦布苏病毒(TMUV)作为对照,孵育过夜。洗板,加入3%BSA进行封闭,之后加入1 $\mu\text{g/孔}$ 纯化的纳米抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,清洗后加入辣根过氧化物酶标记的Fc抗体,TMB显色后检测在450 nm处的OD值。

[0031] (2) 铺细胞板,感染不同亚型流感病毒24 h后,4%多聚甲醛固定细胞,0.05% Triton X100通透细胞膜,10%脱脂乳封闭过夜。加入纯化的纳米抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,清洗后加入Cy3标记的Fc荧光二抗,DAPI封片后共聚焦显微镜采集图像。

[0032] 1.3 纳米抗体亲和力检测

将流感病毒NP蛋白经亲和层析后获得纯化蛋白,利用生物膜干涉层析技术,收集纳米抗体与NP蛋白的动力学曲线数据与稳定性数据,软件计算 K_a 、 K_d 值及亲和力 KD 值。

[0033] 1.4 纳米抗体抑制不同亚型流感病毒复制能力检测

A549细胞铺12孔板,待密度至60%-70%转染纳米抗体重组质粒,转染24 h后感染不同亚型流感病毒,24 h后收取细胞及上清。上清梯度稀释感染鸡胚,48 h后收取鸡胚尿囊液进行滴定,计算 EID_{50} 值。细胞进行RNA提取,使用NP及M特异性引物测定病毒的RNA复制水平。

[0034] 2. 实验结果

2.1 纳米抗体的克隆与表达试验结果

纳米抗体构建至pcDNA3.1-Fc载体后,通过测序确定序列正确重组至载体上。将构建后的质粒转染293F细胞培养5天后,离心收集上清,使用Protein A亲和层析纯化纳米抗体。结果如图1所示,成功纯化获得大小为40 kDa的纳米抗体。

[0035] 2.2 纳米抗体特异性检测结果

在抗原包被后,加入纳米抗体,并设置阴性对照。结果如图2所示,纳米抗体可与不同亚型流感病毒反应,而与坦布苏病毒(TMUV)无反应。细胞感染不同亚型流感病毒后,使用纳米抗体作为一抗检测。结果显示,纳米抗体可识别不同亚型流感感染的细胞,如图3所示。

[0036] 2.3 纳米抗体亲和力检测

亲和力试验表明,纳米抗体与NP蛋白的 K_a 值为 $6.35 \times 10^4/\text{Ms}$, K_d 值为 $7.08 \times 10^{-4}/\text{s}$,亲和力值为11.2 nM,如图4所示。

[0037] 2.4 纳米抗体抑制不同亚型流感病毒复制能力检测结果

表达纳米抗体的A549细胞感染不同亚型流感病毒24 h后,收取细胞进行qPCR检测病毒复制水平,上清进行病毒滴定。结果显示,纳米抗体对H1N1、H3N2、H6N6、H9N2亚型流感病毒具有显著的抑制作用,并且能够显著抑制病毒RNA的复制,结果如图5和图6所示。

[0038] 本发明纳米抗体可以有效结合流感病毒NP蛋白,同时具有稳定的抑制流感病毒复

制的特性,对流感病毒具有高度特异的识别和结合能力,具有制备流感病毒预防治疗药物或检测试剂的应用前景。

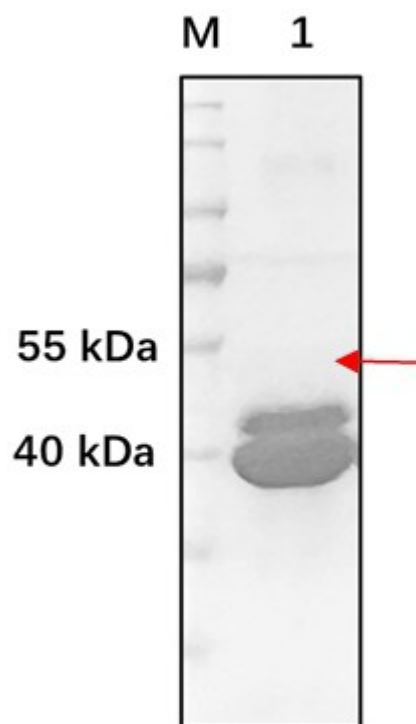


图1

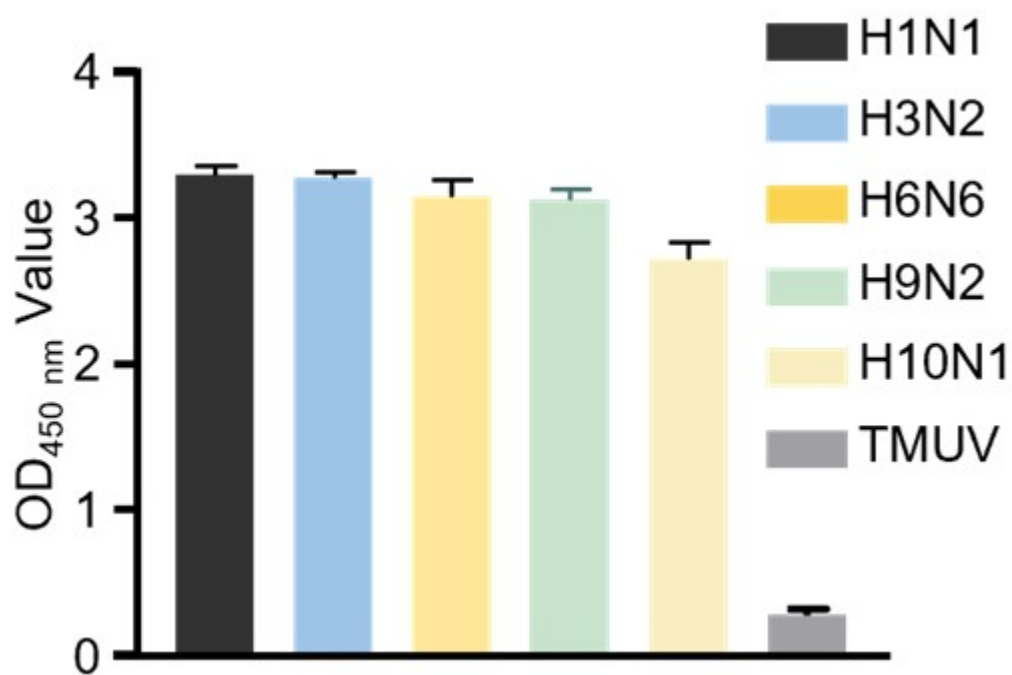


图2

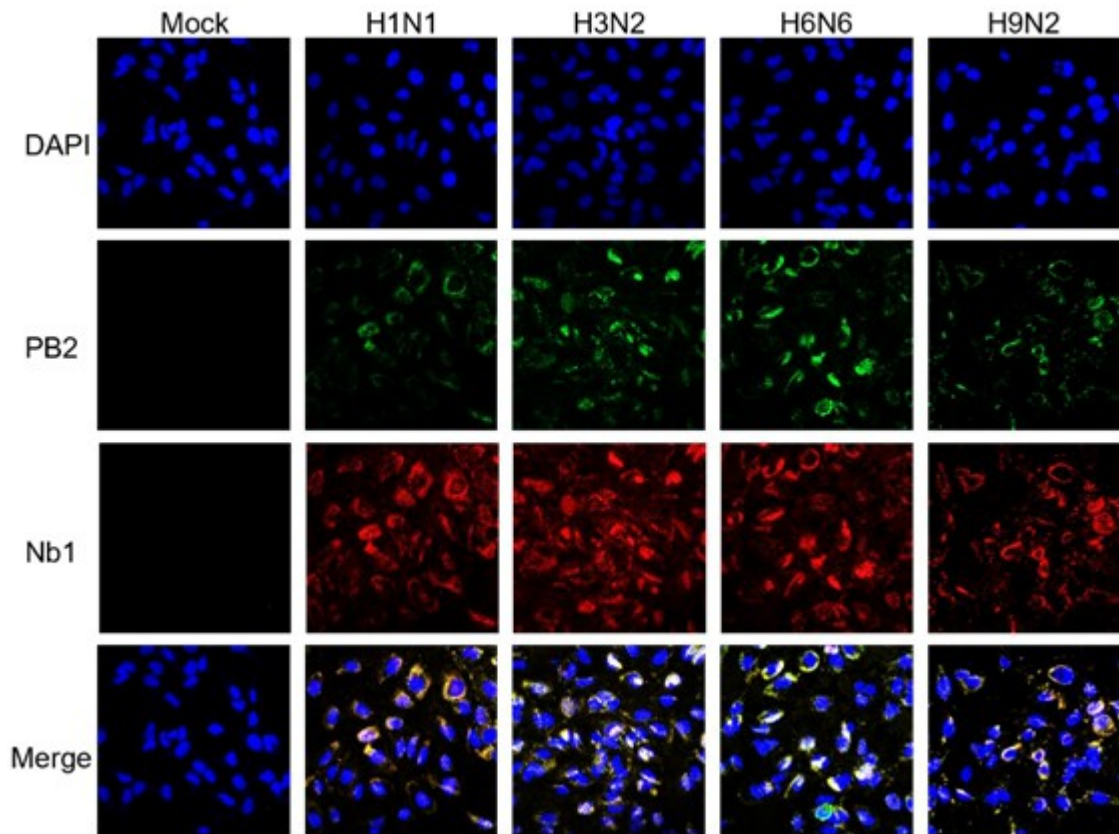


图3

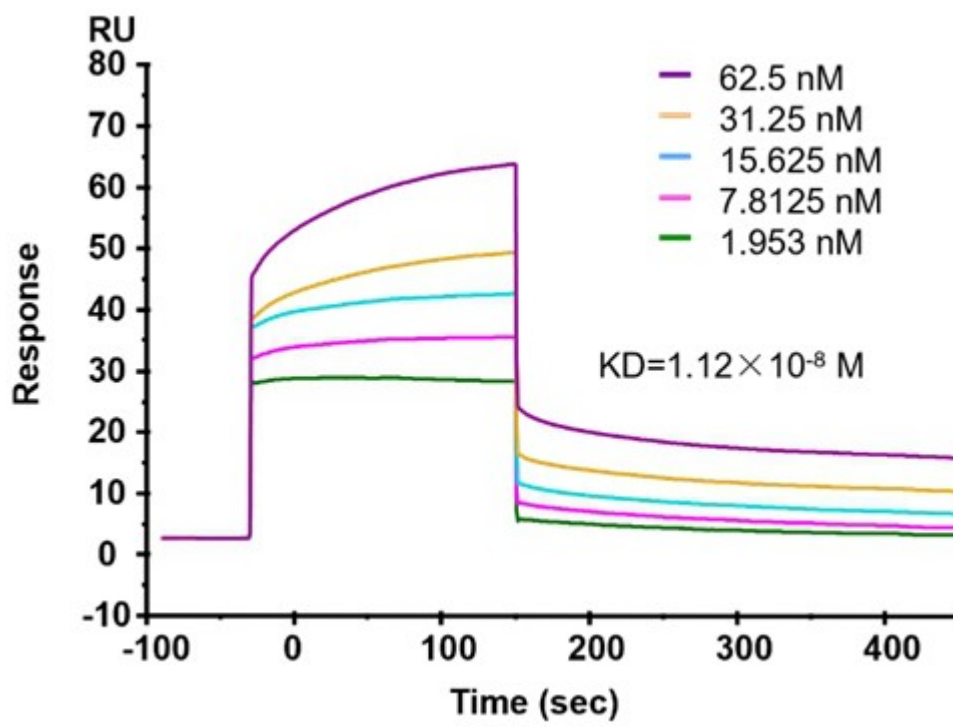


图4

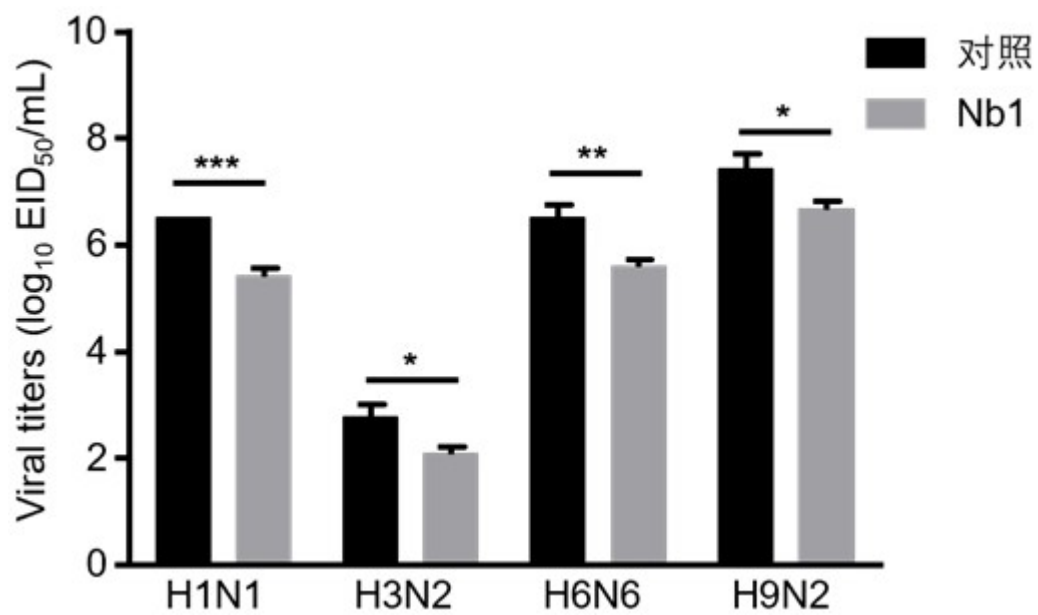


图5

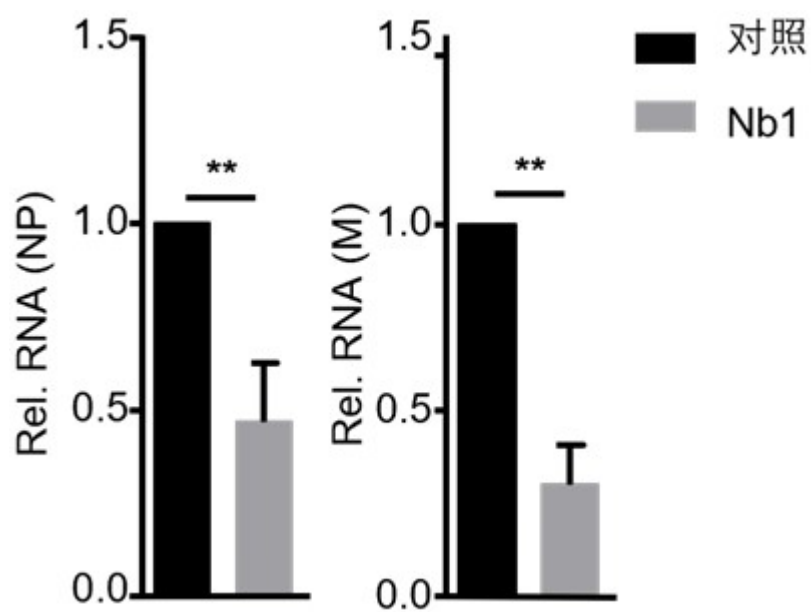


图6