(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
2017 年 6 月 8 日 (08.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/092645 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/107658

(22) 国际申请日: 2016 年 11 月 29 日 (29.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510867051.9 2015 年 11 月 30 日 (30.11.2015) CN
201611036424.9 2016 年 11 月 23 日 (23.11.2016) CN

(71) 申请人: **天津昊免生物技术有限公司 (ELITEIMMUNE INC.)** [CN/CN]; 中国天津市开发区洞庭路 220 号国际生物医药联合研究院 S1406, Tianjin 300457 (CN)。

(72) 发明人: **赵雪莲 (ZHAO, Xuelian)**; 中国天津市开发区洞庭路 220 号国际生物医药联合研究院 S1406, Tianjin 300457 (CN)。 **刘国华 (LIU, Guohua)**; 中国天津市开发区洞庭路 220 号国际生物医药联合研究院 S1406, Tianjin 300457 (CN)。 **王全英 (WANG, Quanying)**; 中国天津市开发区洞庭路 220 号国际生物医药联合研究院 S1406, Tianjin 300457 (CN)。

(74) 代理人: **北京布瑞知识产权代理有限公司 (BRIGHTHEAD INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.)**; 中国北京市朝阳区广顺北大街 5 号院内 32 号 B228, Beijing 100102 (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, JP, KE, KG, 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, 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)。

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))。

(54) **Title**: FULL HUMAN ANTIBODY AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

(54) **发明名称** : 一种抗呼吸道合胞病毒的全人源抗体

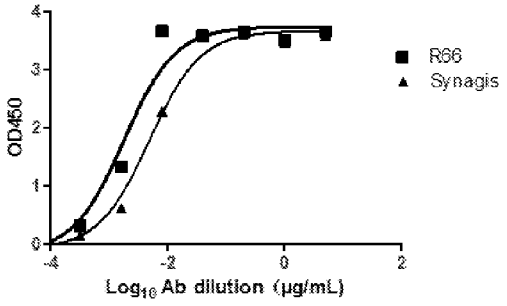


图 2

(57) **Abstract**: Disclosed are an antibody (preferably a full human antibody R66) against respiratory syncytial virus RSV, encoding nucleic acids thereof, a vector and a host cell comprising the same, and a preparation method therefor. Disclosed are also a use of the antibody (preferably a full human antibody R66) against RSV in the prevention and treatment of RSV-related diseases, and a use of the same in detecting RSV. The above antibody against RSV is preferably a full human monoclonal antibody. Compared with other animal-derived (e.g., murine) anti-RSV antibodies, the immunogenicity caused by specie differences is greatly reduced. With good specificity and affinity, if used for clinic, it will greatly reduce side effects.

(57) **摘要**: 针对 RSV 的抗体(优选为全人源抗体 R66)、其编码核酸、包含它的载体和宿主细胞以及它的制备方法。上述针对 RSV 的抗体(优选为全人源抗体 R66)在预防和治疗 RSV 相关疾病中的应用，以及它们在检测 RSV 中的应用。上述针对 RSV 的抗体优选为是全人源的单克隆抗体，与其它动物源性(如鼠源性)的抗 RSV 抗体相比，因物种差异导致的免疫原性大大减少，且特异性好、亲和力高，如果用于临床将大大降低副作用。

WO 2017/092645 A1

说 明 书

一种抗呼吸道合胞病毒的全人源抗体

技术领域

本发明涉及抗呼吸道合胞病毒抗体或其抗原结合片段，特别是全人源的抗呼吸道合胞病毒（RSV）单克隆抗体。

背景技术

人源化抗体可以通过用人源抗体的相应部分，取代小鼠抗体对抗原特异性不重要的区域而制备得到。由此得到的重组抗体由于其含有残余的鼠类序列，因此在将其给予病人时，往往会在病人中引发免疫应答反应(人抗鼠反应)。因此，希望制备出不含非人类序列的全人源抗体。人源化抗体已经有过报道，例如利用噬菌体展示技术构建和筛选人源抗体文库，以获得人源化抗体，或者将来自免疫人类供体的淋巴细胞植入重度联合免疫缺陷小鼠(SCID)，以获得人源化抗体，或者利用基因工程技术构建表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠，以获得人源化抗体。针对致病抗原的完全人源化抗体，也可以通过对脐带血的大量筛选，将包含 IgM 天然全组分的脐带血进行分离而得到(例如，参见美国专利No.6,391,635)。然而上述这些方法，或者得到的是亲和力低的抗体，或者需要依赖具有特定免疫应答的人类供体。

呼吸道合胞病毒(RSV，简称合胞病毒，也属副粘病毒科)是引起小儿病毒性肺炎最常见的病原，可引起间质性肺炎，及毛细支气管炎。在北京，48％的病毒性肺炎和 58％的毛细支气管炎系由合胞病毒引起(1980～1984)；在广州，小儿肺炎及毛细支气管炎的31.4％由合胞病毒引起(1973～1986)；在美国，20％～25％的婴幼儿肺炎和 50％～75％的毛细支气管炎由合胞病毒引起。

RSV 感染的潜伏期为 2～8 天(多为 4～6 天)。合胞病毒肺炎的典型所见是单核细胞的间质浸润。主要表现为肺泡间隔增宽和以单核细胞为主的间质渗出，其中包括淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞。此外肺泡腔充满水肿液，并可见肺透明膜形成。在一些病例，亦可见细支气管壁的淋巴细胞浸润。在肺实质出现伴有坏死区的水肿，导致肺泡填塞、实变和萎

陷。少数病例在肺泡腔内可见多核融合细胞，形态与麻疹巨细胞相仿，但找不到核内包涵体。

RSV 有两个主要的表面糖蛋白，F 和 G。两个糖蛋白(90KDa 和 68KDa)暴露于病毒粒子表面。90KDa 的高度糖基化的 G 蛋白负责将病毒颗粒结合到靶细胞上。68KDa 的 F 蛋白介导病毒被膜与细胞融合和合胞体形成。所述的 F 和 G 表面糖蛋白为主要的保护性抗原，核蛋白 N 和被膜蛋白 M2 具有较小的保护性活性。抗 G 糖蛋白的单克隆抗体比抗 F 糖蛋白的单克隆抗体不太可能中和病毒，且不具有抑制融合活性。F 糖蛋白的氨基酸序列在与人感染有关的 RSV 亚组间有大约 90%的保守性。

目前唯一上市的抗 RSV 单克隆抗体只批准用于预防早产儿感染 RSV，是抗 F 蛋白的抗体，该抗体的名称是帕利珠单抗 Synagis (MedImmune 制造)，是一种人源化的鼠单克隆抗体，该药通过呼吸道合胞病毒融合蛋白阻止病毒向下呼吸道扩散。

发明内容

本发明的目的是提供抗 RSV 抗体或其抗原结合片段，优选为全人源抗 RSV 单克隆抗体或其抗原结合片段。

根据本发明的一个方面，涉及抗 RSV 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

至少一个重链 CDR，其具有选自 SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列；和/或

至少一个轻链 CDR，其具有选自 SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14 和 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列。

进一步地，对于所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

选自具有如 SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列的三个重链 CDR；和/或

选自具有如 SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14 和 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列的三个轻链 CDR。

优选地，对于所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

具有如 SEQ ID NO：3 所示的氨基酸序列的重链可变区和/或具有如 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列的轻链可变区，所述抗体是全人源抗 RSV 单克隆抗体 R66。

任选地，本发明所述的抗原结合片段选自 Fab、Fab'、$F(ab)_2$、单链 Fv(scFv)、Fv、dsFv、

双抗体、Fd 和 Fd'片段。

根据本发明的另一个方面，涉及全人源抗 RSV 单克隆抗体 R66。单克隆抗体 R66 的重链、轻链(KAPPA)的核酸序列分别如 SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：2 所示，其相应的重链、轻链(KAPPA)的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 所示。

本发明还涉及通过对上述 R66 抗体的重链和/或轻链氨基酸序列的插入、取代和/或缺失形成的并具有相同功能的抗体。

本发明还涉及上述 R66 抗体的抗原结合片段，特别是选自 Fab、Fab'、$F(ab)_2$、单链 Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd 和 Fd'片段的抗原结合片段。

本发明还涉及含有上述抗体（优选为 R66）的单个重链和/或单个轻链的单域抗体、嵌合抗体、抗体融合蛋白抗体、抗体/抗体片段-因子融合蛋白或抗体/抗体片段-化学偶联物。

本发明提供编码上述抗体的核酸，其包含：

至少一个编码重链 CDR 的核苷酸序列，其选自 SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：7 和 SEQ ID NO：9；和/或

至少一个编码轻链 CDR 的核苷酸序列，其选自 SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：15。

优选地，对于本发明所述的核酸，其包含：

如 SEQ ID NO：1 所示的编码重链可变区的核酸和/或如 SEQ ID NO：2 所示的编码轻链可变区的核酸。

根据本发明的另一个方面，提供制备抗 RSV 抗体（优选为全人源抗 RSV 单克隆抗体）的方法，包括如下步骤：

(1)提供表达载体，所述表达载体含有编码本发明的抗 RSV 抗体（优选为全人源抗 RSV 单克隆抗体）的 DNA 分子，以及与所述 DNA 分子可操作相连的表达调控序列；

(2)用所述表达载体转化宿主细胞；

(3)在适合所述抗 RSV 抗体（优选为全人源抗 RSV 单克隆抗体）表达的条件下培养所述宿主细胞；

(4)分离纯化获得所述的抗 RSV 抗体（优选为全人源抗 RSV 单克隆抗体）。

根据本发明的另一个方面，提供包含本发明的抗RSV抗体（优选为全人源抗RSV单克隆抗体）的核酸序列的载体以及包含所述核酸序列或载体的宿主细胞。

所述载体可以是重组表达载体。

所述宿主细胞可以是293T细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝癌细胞、549A细胞、3T3细胞、以及许多其他细胞系。

根据本发明的另一个方面，提供本发明的抗RSV抗体（优选为全人源抗RSV单克隆抗体）、核酸、载体或宿主细胞在制备用于预防或治疗RSV相关疾病的治疗剂中的应用。

根据本发明的另一方面，提供用于治疗RSV相关疾病的药物组合物，药物组合物中包含治疗有效量的本发明的抗RSV抗体（优选为全人源抗RSV单克隆抗体）、核酸、载体或宿主细胞，和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。药学上可接受的载体或赋形剂是本领域技术人员熟知的，包括生理相容的水性和非水性载体、稳定剂、防腐剂、增溶剂、抗氧化剂、溶剂、分散介质、外衣层、缓冲液、血清蛋白等。

所述RSV相关疾病选自由病毒性肺炎、间质性肺炎、毛细支气管炎组成的组。

根据本发明的另一方面，涉及本发明的抗RSV抗体（优选为全人源抗RSV单克隆抗体）、核酸、载体或宿主细胞在制备用于检测RSV的检测试剂中的应用。

本发明提供的抗RSV抗体（优选为抗RSV单克隆抗体）优选是全人源的，与其它动物源性(如鼠源性)的抗RSV抗体相比，因物种差异导致的免疫原性大大减少，且特异性好、亲和力高，如果用于临床将大大降低副作用。此外，由于本发明中的抗RSV抗体（优选为单克隆抗体）可以和RSV F抗原特异性结合，在RSV的诊断和检测中也有很好的应用。应用于人时不会产生类似鼠抗体所产生的副作用。

附图说明

图1是R66纯化后的电泳图；

图2是ELISA实验检测单克隆抗体R66与RSV-F（Strain A2）的结合；

图3是ELISA实验检测单克隆抗体R66与RSV-F（Strain RSS-2）的结合；

图4是单克隆抗体R66的CDR的分析结果，其中R66_HC为R66的重链，R66_KC

为 R66 的轻链。

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了，下面结合具体实施方式并参照附图，对本发明进一步详细说明。应该理解，这些描述只是示例性的，而并非要限制本发明的范围。此外，在以下说明中，省略了对公知结构和技术的描述，以避免不必要地混淆本发明的概念。

实施例 1　全人源抗 RSV 抗体 R66 的制备

1、人工合成 R66 的重链可变区和轻链可变区

按照序列如 SEQ ID NO:1 所示的单克隆抗体 R66 的重链可变区、序列如 SEQ ID NO:2 所示的单克隆抗体 R66 的轻链(KAPPA)可变区的核酸序列送 GENEWIZ 公司人工合成。

将人工合成得到的 R66 重链可变区、轻链可变区作为模板，分别加入 Taq 酶和 dNTPs，以及引物，进行 PCR，得到 PCR 产物。

2、重组抗体的表达载体的构建

利用快速 DNA 产物纯化试剂盒(购自康为世纪)回收 PCR 产物，得到 40μl PCR 产物待用。

分别对 R66 的重链可变区、轻链可变区目的片段进行双酶切，双酶切体系为：*Nhe* I/*Not* I各 0.5μl、10*FastDigest Green Reaction Buffer 3μl 以及 PCR 产物 26μl，37℃恒温 5h。

对改造好的表达载体（表达载体为 pcDNA3.1-Zeo(+)(Invitrogen 公司)，由 GENEWIZ 公司预先将人抗体重链/轻链的恒定区改造到此表达载体中）进行双酶切，双酶切体系为：*Nhe* I/*Not* I各 0.5μl、10*FastDigest Green Reaction Buffer 3μl、载体 1μg、用 H_2O 补齐 30μl，37℃恒温 30 min。然后加入 2μl 碱性磷酸酶和 3.5μl 10*buffer(NEB)混匀，37℃恒温水浴 2h。

上述目的片段和载体的双酶切体系中所使用的 *Nhe* I、*Not* I、10*FastDigest Green Reaction buffer 均购自 Thermo Scientific。

对将酶切后的 R66 的重链可变区、轻链可变区目的片段分别进行 1%琼脂糖凝胶电泳，并通过紫外仪观察结果。用小刀将目的条带切下放入一个称量好重量的 Ep 管中，利用快

速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(购自康为世纪)回收各个目的片段。

将各个目的片段分别和载体进行连接，连接体系为：载体 2μl、目的片段 15μl、T4 DNA Ligase(购自 NEB)1μl、缓冲液 2μl，混匀后 16℃恒温水浴保持 2h。

将每个目的片段的所有连接产物加入到 *E.coli* DH5α 感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 30min。42℃热激 90s 后，迅速置于冰浴 5min。然后加入 800μL 培养基，37℃振荡（100r/min）温育 1h。将培养菌液 10000rpm 离心 15s，去除 800ul 上清，重悬沉淀，全部涂布于含氨苄青霉素钠 (100μg/mL)的 LB 固体培养基上，正向放入 37℃培养箱中培养 1h，再倒置培养过夜至菌落清晰。挑取单菌落接种到 5ml 含氨苄青霉素钠 (100μg/mL)的 LB 液体培养基中，37℃振荡培养 15h。利用高纯度质粒小提试剂盒(购自康为世纪)提取质粒，获得分别含有 R66 的重链(RH66)、R66 的轻链(RK66)的质粒，并送样测序。

测序结果显示单克隆抗体 R66 的重链可变区、轻链(KAPPA)可变区的核酸序列分别如 SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：2 所示，其相应的重链可变区、轻链(KAPPA)可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 所示。

实施例 2　单克隆抗体 R66 的表达和纯化

用实施例 1 中获得的含有 R66 的重链(RH66)的质粒和含有 R66 的轻链(RK66)的质粒分别转染 293T 细胞。先用 Opti-MeM（1X）buffer 分别稀释质粒和 PEI，然后将 PEI-Opti-MeM 混合物缓慢加入到质粒-Opti-MeM 混合物管中，室温静置 20 分钟后，再将 PEI 和质粒混合物加入到细胞悬液中。转染时细胞浓度为 0.25~0.5×10^6 个细胞/ml，每孔细胞的转染使用 2.5μg 含有 R66 重链的质粒+2.5μg 含有 R66 轻链的质粒+10μg PEI。转染结束后在 37℃培养 48h 后收获上清，用 ELISA 检测上清。

使用 rProtein A Sepharose Fast Flow(GE)纯化表达的抗体蛋白。分别收集表达 R66 的 293T 细胞培养物上清，10000rpm，4℃离心 10min，取上清，将该上清加入到已用平衡缓冲液(20mM 磷酸盐缓冲液，150mM 氯化钠，pH7.4)平衡好的 rProtein A Sepharose Fast Flow 柱上，用同样的平衡缓冲液洗 10 个床体积，再用洗脱缓冲液(0.1M Gly-HCl 缓冲液，pH2.5)流洗 5 个床体积，收集前 3 个床体积，向收集的洗脱液中加入 1/10 提及的中和液(1M Tris-HCl 缓冲液，pH9.0)混匀，加入到 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters(Merck Millipore)中，5000G、4℃离心 20min，浓缩蛋白，再向 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters 中加入

上述平衡缓冲液，5000G、4℃离心 20min，更换新的平衡缓冲液，重复 3 次，分别获得浓缩后的R66抗体蛋白，将其分别转到1.5ml离心管中，取样测定蛋白质含量，然后置于4℃保存。

分别取纯化的R66抗体进行电泳，结果如图1所示，其中泳道M是标准蛋白；泳道R66是纯化的R66抗体，有两个明显条带，分别是约50KDa的重链和约22KDa的轻链。

实施例 3　R66 抗体的 ELISA 检测

所用试剂包括：

PBS（1X）：用 PBS（10X）和去离子水配置。

PBST：PBS(1X)加 Tween-20 至终浓度为 0.05%。

封闭液：PBS(1X)+2%BSA+2%新生小牛血清，现用现配。

稀释液：PBST+1%BSA，稀释抗体用。

终止液：将 6ml 95%-98%的浓硫酸慢慢加入 180ml 水中，冷却后备用。

一抗：本发明制备得到的R66抗体，稀释成工作浓度为10μg/ml。

二抗：Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG(H+L)(购自 Jackson Immuno Research)，取 1.5ml 的无 RNase 水完全溶解后，备用。

用 PBS（1X）（pH7.4）缓冲液稀释 RSV-F(Strain A2)和 RSV-F(Strain RSS-2)（购自 Sino Biological Inc.）作为包被抗原，使包被抗原溶液的终浓度为 2ng/μl，吸取 100μl 包被抗原溶液加入到 96 孔板的每孔中，2-8℃包被过夜，用 PBST 清洗 5 次，然后每孔加入 200μl 封闭液，37℃封闭 2h，封闭结束后用 PBST 清洗 5 次，每次停留 1 分钟。

用抗体稀释液（PBST+1%BSA)将一抗做 10 倍稀释：即取 7 个高压灭菌的 1.5ml 离心管，每一管加入 270μl 的抗体稀释液，从工作溶液中取 30μl 一抗溶液，涡旋震荡混匀后，标记为 1:10 稀释，从 1:10 稀释的溶液中取 30μl 放入下一管中，以此类推，分别为：1:10，1:100，1:1000，1:10000，1:100000，1:1000000，1:10000000，分别加到相应的孔中，每孔 100μl，做两个平行，并设立两个空白孔用 PBST 代替一抗，37℃孵育 90min，然后用 PBST 清洗 5 遍。

用抗体稀释液（PBST+1%BSA)将二抗做 5000 倍稀释，每孔加入 100μl，37℃孵育 1h，然后用 PBST 清洗 5 遍，加入 TMB 显色液，100μl/孔，室温孵育 15min，孵育结束后加入

H_2SO_4终止液终止反应。在酶标仪上读取OD_{450}读数。

通过GraphPad Prism软件分析上述ELISA结果，获得R66抗体以及Synagis抗体的EC_{50}值。

结果显示，表达和纯化的R66抗体与RSV-F(Strain A2)和RSV-F(Strain RSS-2)的结合具有剂量依赖性，说明R66抗体与RSV-F(Strain A2)和RSV-F(Strain RSS-2)的结合是特异性的。

从附图2可以看出，R66抗体与RSV-F(Strain A2)结合的EC_{50}值为0.001791μg/mL，均低于Synagis的EC_{50}值(0.004881μg/mL，用Synagis以相同条件进行ELISA并用GraphPad Prism软件分析获得)。从附图3可以看出，R66抗体与RSV-F(Strain RSS-2)结合的EC_{50}值分别为0.001463μg/mL，也低于Synagis的EC_{50}值(0.001878μg/mL，用Synagis以相同条件进行ELISA并用GraphPad Prism软件分析获得)。由此说明，本发明的R66抗体比Synagis具有更高的灵敏度。

实施例4　单克隆抗体R66的CDR的测定：测定单克隆抗体R66的重链CDR和轻链CDR

将抗体可变区域序列信息导入IgBLAST程序(version 1.6.1)中与人类可变区域原始序列文库进行对比分析，抗体的可变区域被进一步划分出3个构架区（FRs）和2个互补性决定区（CDRs）。然后将抗体序列导入IMGT High V-Quest系统中使用之前相同的文库进行比对确定出CDR3和FR4。所有抗体序列的数字标定都是基于KABAT系统。分析比对结果如图4所示。

结果表明，该单克隆抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：8和SEQ ID NO：10，其对应的核苷酸序列分别为SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：7和SEQ ID NO：9；轻链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14和SEQ ID NO：16，其对应的核苷酸序列分别为SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：13和SEQ ID NO：15。

应当理解的是，本发明的上述具体实施方式仅仅用于示例性说明或解释本发明的原理，而不构成对本发明的限制。因此，在不偏离本发明的精神和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。此外，本发明所附权利要求旨在涵盖落入所附权利要求范围和边界、或者这种范围和边界的等同形式内的全部变化

和修改例。

序列表

<110> 天津昊免生物技术有限公司
<120> 一种抗呼吸道合胞病毒的全人源抗体
<130> 1

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 378
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cagggcggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cttctggatt cacctttgct gattattcta tgacttgggt ccgccaggct 120
ccaggaaagg ggctggagtg ggtaggtctc attaaaagga atgcttatgg tgggaccaca 180
gaatacgccg cgtctgtgag aggcagattc accatctcaa gagatgattc cagaagcatc 240
gcctatctac aaatgcacag cctgaaaagt gaggatacag ccgtctattt ctgtcttcga 300
ggatatagtg gctatgattg ggaaggtctt gatgcttttg aagtctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378

<210> 2
<211> 321
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2
gacatccaga tgacccagtc tccatctgcc atgtctgcat ctgtaggaga cagggtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggcagtagc acttatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaagcgcct gatctatgct gtatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattctg caacttatta ctgtctacaa cataatagtt tcccgttgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 3
<211> 126
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
            20                  25                  30
Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly Leu Ile Lys Arg Asn Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Ile
65                  70                  75                  80
Ala Tyr Leu Gln Met His Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Phe Cys Leu Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Glu Gly Leu Asp Ala
            100                 105                 110
Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ser Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Ala Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Leu
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 5
<211> 15
<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5
gattattcta tgact 15

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Asp Tyr Ser Met Thr
1 5

<210> 7
<211> 57
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7
ctcattaaaa ggaatgctta tggtgggacc acagaatacg ccgcgtctgt gagaggc 57

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8

Leu Ile Lys Arg Asn Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15
Val Arg Gly

<210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

ggatatagtg gctatgattg ggaaggtctt gatgcttttg aagtc 45

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Glu Gly Leu Asp Ala Phe Glu Val
1 5 10 15

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11
cgggcgagtc agggcagtag cacttattta gcc 33

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13
gctgtatcca gtttgcaaag t 21

<210> 14
<211> 7

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

Ala Val Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15
ctacaacata atagtttccc gttgacg 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 16

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

权 利 要 求 书

1.抗 RSV 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

至少一个重链 CDR，其具有选自 SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列；和/或

至少一个轻链 CDR，其具有选自 SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14 和 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列。

2.根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

选自具有如 SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列的三个重链 CDR；和/或

选自具有如 SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14 和 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列的三个轻链 CDR。

3.根据权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

具有如 SEQ ID NO：3 所示的氨基酸序列的重链可变区和/或具有如 SEQ ID NO：4 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

4.根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、$F(ab)_2$、scFv、Fv、dsFv、双抗体、Fd 和 Fd'片段。

5.包含权利要求 1-4 中任一项所述的的抗体的单个重链、单个轻链或其抗原结合片段的单域抗体、嵌合抗体、抗体融合蛋白抗体、抗体/抗体片段-因子融合蛋白或抗体/抗体片段-化学偶联物。

6.编码权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的核酸。

7.根据权利要求 6 所述的核酸，其包含：

至少一个编码重链 CDR 的核苷酸序列，其选自 SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：7 和 SEQ ID NO：9；和/或

至少一个编码轻链 CDR 的核苷酸序列，其选自 SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：15。

8.根据权利要求 7 所述的核酸，其包含：

如 SEQ ID NO：1 所示的编码重链可变区的核酸和/或如 SEQ ID NO：2 所示的编码轻链可变区的核酸。

9.含有权利要求 6-8 任一项所述的核酸的载体。

10.含有权利要求 6-8 任一项所述的核酸或权利要求 9 所述的载体的宿主细胞。

11.根据权利要求 10 所述的宿主细胞，其是用权利要求 9 所述的载体转化的宿主细胞。

12.权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 5 所述的抗体或融合蛋白或偶联物、权利要求 6-8 任一项所述的核酸、权利要求 9 所述的载体或权利要求 10-11 任一项所述的宿主细胞在制备用于预防或治疗 RSV 相关疾病的治疗剂中的应用。

13.根据权利要求 12 所述的应用，其中所述 RSV 相关疾病选自由病毒性肺炎、间质性肺炎、毛细支气管炎组成的组。

14.权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6-8 任一项所述的核酸、权利要求 9 所述的载体或权利要求 10-11 任一项所述的宿主细胞在制备用于检测 RSV 的检测试剂中的应用。

15.用于治疗 RSV 相关疾病的药物组合物，包含治疗有效量的权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6-8 任一项所述的核酸、权利要求 9 所述的载体或权利要求 10-11 任一项所述的宿主细胞，和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

16.制备抗 RSV 抗体或其抗原结合片段的方法，包括如下步骤：

(1)提供表达载体，所述表达载体含有编码权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子，以及与所述 DNA 分子可操作相连的表达调控序列；

(2)用所述表达载体转化宿主细胞；

(3)在适合所述抗 RSV 抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养所述宿主细胞；

(4)分离纯化获得所述的抗 RSV 抗体或其抗原结合片段。

17.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述抗 RSV 抗体是全人源抗 RSV 单克隆抗体。

说 明 书 附 图

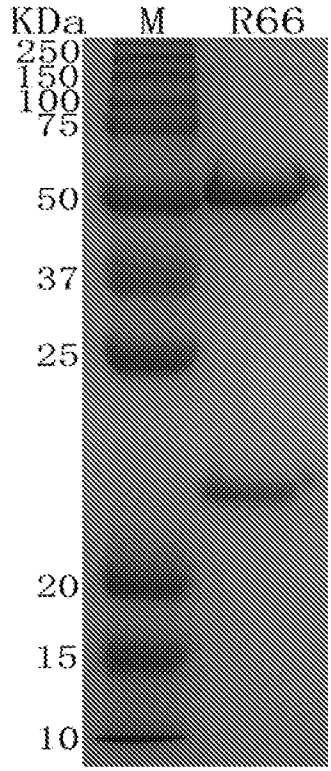

KDa
M
R66
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图 1

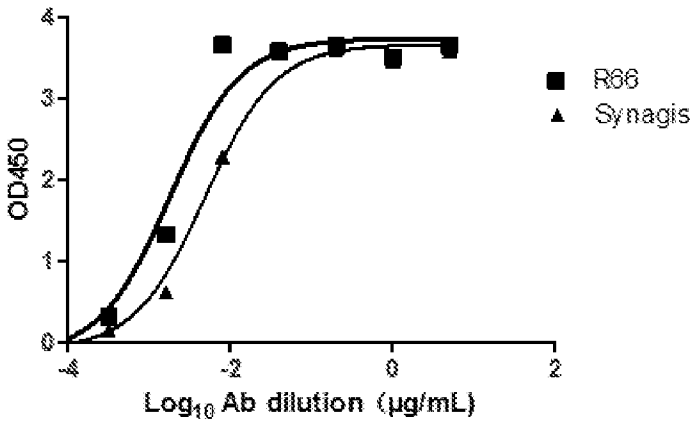

OD450
Log10 Ab dilution (μg/mL)
R66
Synagis

图 2

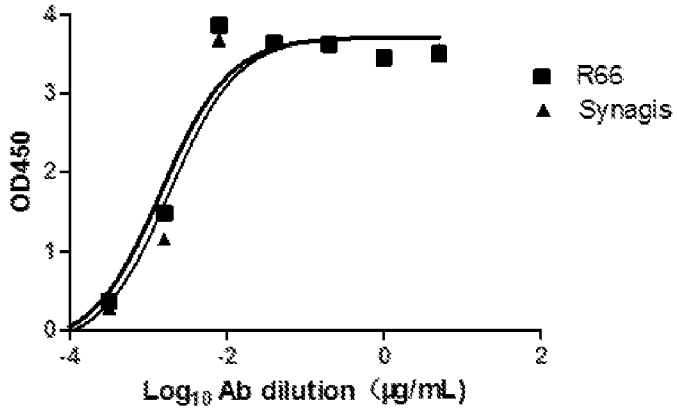


图 3

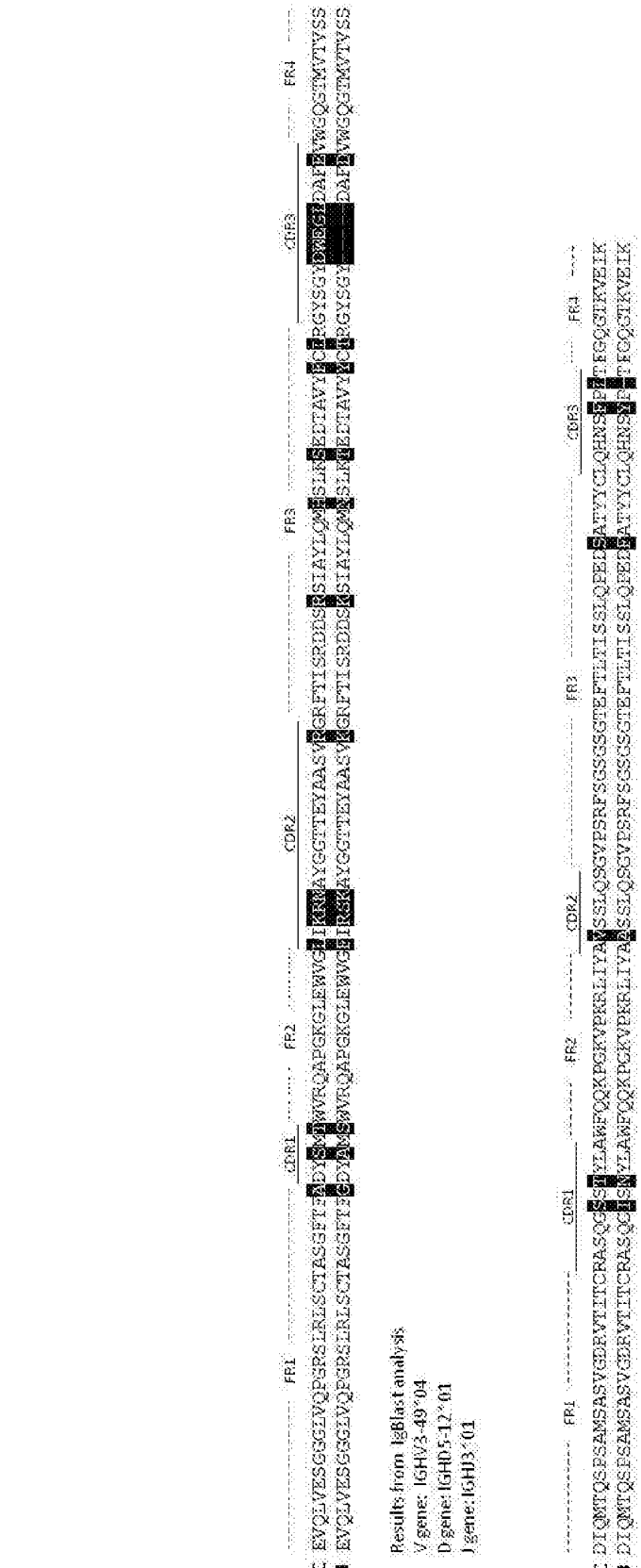

FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
FR4
R66_HC EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTMVTVSS
IGHV3-49*04 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGYSSGWYGGMDVWGQGTMVTVSS
Result: from IgBlast analysis
V gene: IGHV3-49*04
D gene: IGHD5-12*01
J gene: IGHJ3*01
FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
FR4
R66_KC DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWFQQKPGKVPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPFTFGQGTKVEIK
IGKV1-17*03 DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWFQQKPGKVPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPFTFGQGTKVEIK
Result: from IgBlast analysis
V gene: IGKV1-17*03
J gene: IGKJ1*01

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/107658

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61P 31/12 (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 16/-; A61K 39/-; C12N 15/-; A61P 31/-

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)

CNPAT, CNKI, WANFANG, GOOGLE, Pubmed, WPI, EPODOC, GenBank, EBI-EMBL: respiratory syncytial virus, monoclone, polyclonal, antibody fragment, antigenic determinant, variable region, RSV respiratory syncytial virus, Humanized, antibody, fab, Fd, IgG, IgM, mAb, CDR, FR, variable, phage library, SEQ ID NO: 1-15.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARBAS III, C.F. et al., "Human Monoclonal Fab Fragments Derived Form a Combinatorial Library Bind to Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein and Neutralize Infectivity", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA., volume 89, 30 November 1992 (30.11.1992), pages 10164-10168	1-17
X	JOHNSON, S. et al., "Development of a Humanized Monoclonal Antibody (MEDI-493) with Potent in Vitro and in Vivo Activity against Respiratory Syncytial Virus", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES., volume 176, 31 December 1997 (31.12.1997), pages 1215-1224	1-17
X	THE IMPACT-RS STUDY GROUP., "Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization from Respiratory Syncytial Virus Infection in High-Risk Infants", PEDIATRICS., volume 102, number 3, 30 September 1998 (30.09.1998), pages 531-537	1-17

☒ 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	Date of mailing of the international search report
16 January 2017 (16.01.2017)	**26 January 2017 (26.01.2017)**
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 **SHEN, Jingjing** Telephone No.: (86-10) **010-62413568**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/107658

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Gang et al., "Construction of a Large Naive Human Antibody Library", CHINESE JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, volume 18, number 1, 31 December 2002 (31.12.2002), pages 69-72	1-17
X	CN 1986569 A (CAPITAL INSTITUTE OF PEDIATRICS et al.), 27 June 2007 (27.06.2007), the whole document	1-17
A	CN 101808663 A (TRELLIS BIOSCIENCES, INC.), 18 August 2010 (18.08.2010), the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/107658

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1986569 A	27 June 2007	None	
CN 101808663 A	18 August 2010	CN 101808663 B	30 September 2015
		AU 2008316703 A1	30 April 2009
		AU 2008316703 A2	22 July 2010
		CA 2703667 C	29 December 2015
		MX 2010004482 A	06 July 2010
		US 7736648 B2	15 June 2010
		RU 2526517 C2	20 August 2014
		BR PI0819210 A2	23 June 2015
		JP 2015078231 A	23 April 2015
		EP 2214711 A2	11 August 2010
		US 2009130120 A1	21 May 2009
		WO 2009055711 A2	30 April 2009
		WO 2009055711 A3	24 September 2009
		EP 2214711 A4	21 December 2011
		KR 20100091195 A	18 August 2010
		AU 2008316703 B2	27 September 2012
		US 2013034564 A1	07 February 2013
		US 2010285022 A1	11 November 2010
		IL 205257 D0	30 December 2010
		NZ 585589 A	27 July 2012
		RU 2010120879 A	27 November 2011
		US 9321830 B2	26 April 2016
		JP 2011500091 A	06 January 2011
		US 8273354 B2	25 September 2012
		JP 5808536 B2	10 November 2015
		CA 2703667 A1	30 April 2009
		IL 205257 A	31 December 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/107658

A. 主题的分类

C07K 16/00(2006.01)i；A61K 39/395(2006.01)i；C12N 15/63(2006.01)i；A61P 31/12(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 16/-;A61K 39/-;C12N 15/-;A61P 31/-

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））

CNPAT，CNKI，万方，GOOGLE，Pubmed，WPI，EPODOC，GenBank，EBI-EMBL： 呼吸道合胞病毒，人源，人源化，人化，单克隆，多克隆，抗体，抗体片段，抗原决定簇，可变区，噬菌体抗体库，RSV respiratory syncytial virus，Humanized，antibody，fab，Fd，IgG，IgM，mAb，CDR，FR，variable，phage library，SEQ ID NO:1-15.

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
X	BARBAS III, C. F. et al. "Human monoclonal Fab fragments derived form a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA., 第89卷，1992年 11月 30日 (1992-11-30)，第10164-10168页	1-17
X	JOHNSON, S. et al. "Development of a Humanized Monoclonal Antibody (MEDI-493) with Potent In Vitro and In Vivo Activity against Respiratory Syncytial Virus." THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES., 第176卷，1997年 12月 31日 (1997-12-31)，第1215-1224页	1-17
X	THE IMPACT-RS STUDY GROUP. "Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants." PEDIATRICS., 第102卷，第3期，1998年 9月 30日 (1998-09-30)，第531-537页	1-17

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2017年 1月 16日	2017年 1月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
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	沈晶晶
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)010-62413568

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/107658

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
A	王刚 等. "人源性天然抗体库的构建及初步鉴定." 细胞与分子免疫学杂质., 第18卷, 第1期, 2002年 12月 31日 (2002 - 12 - 31), 第69-72页	1-17
X	CN 1986569 A (首都儿科研究所等) 2007年 6月 27日 (2007 - 06 - 27) 全文	1-17
A	CN 101808663 A (特雷利斯生物科学股份有限公司) 2010年 8月 18日 (2010 - 08 - 18) 全文	1-17

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/107658

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	1986569	A	2007年 6月 27日	无			
CN	101808663	A	2010年 8月 18日	CN	101808663	B	2015年 9月 30日
				AU	2008316703	A1	2009年 4月 30日
				AU	2008316703	A2	2010年 7月 22日
				CA	2703667	C	2015年 12月 29日
				MX	2010004482	A	2010年 7月 6日
				US	7736648	B2	2010年 6月 15日
				RU	2526517	C2	2014年 8月 20日
				BR	PI0819210	A2	2015年 6月 23日
				JP	2015078231	A	2015年 4月 23日
				EP	2214711	A2	2010年 8月 11日
				US	2009130120	A1	2009年 5月 21日
				WO	2009055711	A2	2009年 4月 30日
				WO	2009055711	A3	2009年 9月 24日
				EP	2214711	A4	2011年 12月 21日
				KR	20100091195	A	2010年 8月 18日
				AU	2008316703	B2	2012年 9月 27日
				US	2013034564	A1	2013年 2月 7日
				US	2010285022	A1	2010年 11月 11日
				IL	205257	D0	2010年 12月 30日
				NZ	585589	A	2012年 7月 27日
				RU	2010120879	A	2011年 11月 27日
				US	9321830	B2	2016年 4月 26日
				JP	2011500091	A	2011年 1月 6日
				US	8273354	B2	2012年 9月 25日
				JP	5808536	B2	2015年 11月 10日
				CA	2703667	A1	2009年 4月 30日
				IL	205257	A	2014年 12月 31日