



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104628853 B

(45)授权公告日 2017. 10. 10

(21)申请号 201510063977.2

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2015.02.06

C12N 15/85(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 5/10(2006.01)

申请公布号 CN 104628853 A

A61K 39/395(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(43)申请公布日 2015.05.20

(73)专利权人 中国人民解放军南京军区军事医学研究所

地址 210002 江苏省南京市玄武区中山东路293号

(72)发明人 朱进 熊四平 冯振卿

(74)专利代理机构 北京精金石专利代理事务所(普通合伙) 11470

代理人 强红刚

(56)对比文件

CN 1829525 A, 2006.09.06,

CN 101679523 A, 2010.03.24,

Strausberg, R. L. et al. Acession

Number: BC16381.1, Homo sapiens

immunoglobulin heavy constant mu, mRNA

(cDNA clone IMAGE: 4688865.《Genbank》. 2009,

Features和Origin部分.

审查员 王奇

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

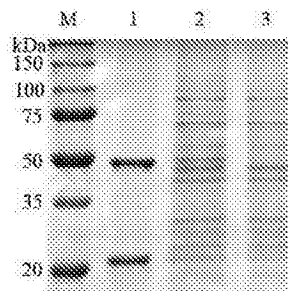
序列表6页 附图5页

(54)发明名称

人源抗炭疽保护性抗原PA的抗体IgG及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗炭疽保护性抗原的全分子人源单克隆抗体及其应用,该抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示.对该全分子人源抗体做功能鉴定和体外细胞中和实验,结果显示其能够与炭疽保护性抗原PA特异性结合,并有效的阻断炭疽毒素的致病作用,因此本发明的全分子人源单克隆抗体可应用于有关炭疽病的诊断、治疗及预防工作中。



1. 一种抗炭疽保护性抗原的全分子人源单克隆抗体, 包含重链可变区、恒定区, 和轻链可变区、恒定区, 其特征在于:

(1) 所述的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

且(2)所述的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

2. 根据权利要求1所述的全分子人源单克隆抗体, 其特征在于:

(1) 所述的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;

且(2)所述的轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

3. 一种DNA分子, 其编码权利要求1所述的全分子人源单克隆抗体的重链可变区、重链恒定区、轻链可变区和轻链恒定区, 编码重链可变区的核酸序列为SEQ ID NO.1所示, 编码轻链可变区的核酸序列为SEQ ID NO.3所示, 编码重链恒定区的核酸序列为SEQ ID NO.5所示, 编码轻链恒定区的核酸序列为SEQ ID NO.7所示。

4. 一种表达载体, 包含有权利要求3所述的DNA分子。

5. 根据权利要求4所述的表达载体, 其特征在于: 所述载体为抗体IgG1亚型分泌型真核表达载体。

6. 一种含有权利要求4所述的表达载体的宿主细胞, 宿主细胞为FreeStyle™ 293-F cells。

7. 权利要求1所述的全分子人源单克隆抗体在制备预防或治疗炭疽病的药物中的应用。

8. 一种预防或治疗炭疽病的药物组合物, 其特征在于: 该药物组合物的活性成分为权利要求1所述的全分子人源单克隆抗体。

人源抗炭疽保护性抗原PA的抗体IgG及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于单克隆抗体药物技术领域,涉及一种抗炭疽保护性抗原的全分子人源单克隆抗体及其被编码的DNA分子、包含该DNA分子的表达载体、含有该表达载体的宿主细胞,以及该全分子人源单克隆抗体在制备炭疽治疗或预防性药物中的应用。

背景技术

[0002] 炭疽病是一种由炭疽芽孢杆菌引起的人畜共患的急性烈性传染病,牛、羊等食草动物的发病率最高,人可通过接触患炭疽的动物及其畜产品或通过存在于空气、土壤中的炭疽杆菌芽胞而被感染。炭疽杆菌具有高度致病性、其芽胞在恶劣环境中有较强的生存能力,可通过气溶胶途径感染,在世界范围内广泛分布等特点,临床上依据感染途径不同将炭疽分为3型,即皮肤炭疽、吸入性炭疽和消化道炭疽。吸入性炭疽,又称肺炭疽,其致死率接近100%。炭疽芽孢杆菌在血液中可产生并释放三种蛋白:保护性抗原(protective antigen,PA)、致死因子(lethal factor,LF)、水肿因子(edema factor,EF)。实验证实,炭疽毒素是一种AB(active-binding)的模式,PA是复合物中的“B”,与细胞膜上的炭疽毒素受体(2型毛细血管形成蛋白CMG2或肿瘤肉皮细胞标志STEM8)结合,由位于细胞膜上的Furin蛋白酶切除其氨基端20kD片段PA₂₀,余下的63kD片段(PA₆₃)发生寡聚化,在膜上形成七聚体((PA₆₃)₇)。LF和EF是“A”,能够结合七聚体形成的复合物通过受体介导的内吞进入细胞。在内吞小体酸性pH的环境下,PA七聚体发生构象改变,形成一个管道,使EF和LF进入细胞液,分别发挥毒性作用。这三种蛋白本身是无毒的,但PA和LF的混合物称为致死毒素,PA和EF的混合物称为水肿毒素。在体外实验研究中,单纯使用高纯度的致死毒素或水肿毒素可以使动物死亡。通过阻断PA与受体结合或是与LF及EF,以及影响其寡聚化,都可以有效防止炭疽毒素的致病作用。而且PA能诱导机体的保护性免疫,是目前唯一获美国食品药品监督管理局批准的人用炭疽吸附疫苗(anthrax vaccine absorbed,AVA)的主要活性成分。因此,保护性抗原PA是炭疽病治疗的理想靶点。

[0003] 炭疽的医学防护措施主要有预防和治疗二大方面。目前,有效的预防措施主要是接种炭疽疫苗,接触前1-2个月进行预防接种,能为人群提供免疫防护。有效的治疗措施主要有二大类:一类是根据炭疽病理模型设计的毒素抑制剂,主要包括炭疽毒素的中和抗体、可溶性受体、毒素突变体和小分子拮抗剂;另一类是炭疽杆菌的抑菌剂和杀菌剂,其中包括抗菌素和噬菌体的溶菌成分。抗菌素治疗主要指炭疽感染时高剂量静脉注射和口服抗生素以对炭疽杆菌产生杀伤作用,例如青霉素、环丙沙星、四环霉素、红霉素、和万古霉素等,但对于已释放的毒素是没有效果的,而且目前已发现具抗药性的菌株。

[0004] 国内外的研究表明,在暴露于炭疽芽孢之前使用抗PA抗体,能够起到预防炭疽感染保护机体的作用。而且,在孢子攻毒后一定时间给药(24-48h)仍能起到保护作用,即使是在出现体征后给药也可以起到一定的治疗作用。因此,进行人源炭疽抗体的研究显得尤为重要和迫切。

发明内容

[0005] 鉴于现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种抗炭疽保护性抗原的全分子人源单克隆抗体及其被编码的DNA分子、包含该DNA分子的表达载体、含有该表达载体的宿主细胞,以及该全分子人源单克隆抗体在制备炭疽治疗或预防性药物中的应用。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,本发明人通过大量试验研究和不懈探索,最终采用噬菌体抗体库技术筛选到了对炭疽保护性抗原PA具有高度亲和力的人源Fab抗体,并获取了赋予所述抗体优异特性的重链和轻链可变区的氨基酸序列和核苷酸序列,并将所述抗体的重链和轻链可变区与含有抗体恒定区的表达载体连接,最终获得了具有特异的抗原结合性、优异的毒素中和活性以及良好的动物保护功能的全分子人源抗体。

[0007] 具体地,本发明第一方面提供了如下全分子人源单克隆抗体的技术方案:

[0008] 一种抗炭疽保护性抗原的全分子人源单克隆抗体,包含重链可变区、恒定区,和轻链可变区、恒定区,其中:

[0009] (1)所述的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,或者是该序列经一个或多个氨基酸添加、删除、替换、修饰的保守性突变而获得的保守性变异体;

[0010] 且(2)所述的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,或者是该序列经一个或多个氨基酸添加、删除、替换、修饰的保守性突变而获得的保守性变异体。

[0011] 需要说明的是,该抗体的重链可变区和轻链可变区均为人源抗体,并将其与人源抗体的恒定区连接,因此称之为全分子人源抗体。

[0012] 进一步优选地,如上所述的全分子人源单克隆抗体,其中:

[0013] (1)所述的重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示,或者是该序列经一个或多个氨基酸添加、删除、替换、修饰的保守性突变而获得的保守性变异体;

[0014] 且(2)所述的轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示,或者是该序列经一个或多个氨基酸添加、删除、替换、修饰的保守性突变而获得的保守性变异体。

[0015] 本发明第二方面提供一种DNA分子,其编码上述的全分子人源单克隆抗体的至少如下一个区域:重链可变区、重链恒定区、轻链可变区、轻链恒定区。

[0016] 进一步优选地,如上所述的DNA分子,其编码重链可变区的核酸序列为SEQ ID NO.1所示,编码轻链可变区的核酸序列为SEQ ID NO.3所示。

[0017] 再进一步优选地,如上所述的DNA分子,其编码重链恒定区的核酸序列为SEQ ID NO.5所示,编码轻链恒定区的核酸序列为SEQ ID NO.7所示。

[0018] 本发明第三方面提供一种表达载体,该表达载体中包含有上述的任意一种DNA分子。所述载体优选为抗体IgG1亚型分泌型真核表达载体。比如,在一个最优选的实施例中,本发明提供的IgG质粒表达载体为pFUSE-CHIg-hG1和pFUSE-CLIg-hk,其包含人源IgG1亚型的重链和轻链(Kappa)的恒定区核苷酸序列,编码重链恒定区的具体核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,编码轻链恒定区的具体核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0019] 本发明第四方面提供一种含有上述表达载体的宿主细胞,宿主细胞为FreeStyle™293-F cells。

[0020] 由于本发明提供的全分子人源单克隆抗体可以作为药物分子特异性识别和结合炭疽保护性抗原PA,从而抑制PA装配或与细胞结合来发挥作用,预防炭疽感染或者治疗炭

疽感染性疾病。因此,本发明第五方面还提供了上述全分子人源单克隆抗体在制备预防或治疗炭疽病的药物中的应用,以及提供了一种以该全分子人源单克隆抗体为活性成分的预防或治疗炭疽病的药物组合物。

[0021] 与现有技术相比,本发明提供了一种具有高保护性、高特异性、良好亲和力的抗PA的全分子人源单克隆抗体(IgG-PA21)。对该全分子人源抗体PA21做功能鉴定,结果显示该全分子人源抗体能够与炭疽保护性抗原PA特异性结合;体外细胞中和实验结果证实,人源抗PA抗体能够有效的阻断炭疽毒素的致病作用。以Fischer 344大鼠为模型,体内试验证实PA21抗体在毒素给予前或是毒素给予后一定时间内都具有良好的保护效果。PA是炭疽芽孢杆菌在血液中释放的蛋白,因此本发明的单克隆抗体可应用于有关炭疽病的诊断、治疗及预防工作中。

附图说明

[0022] 图1为纯化IgG抗体PA21的SDS-PAGE检测结果,M,marker;1,PA21抗体;2,细胞培养上清;3,流穿;可见纯化的抗体纯度很高,且用Pro.A柱纯化效果较好;

[0023] 图2为IgG抗体PA21的酶联免疫吸附试验检测结果,可见PA21抗体与PA83蛋白的结合能力较强;

[0024] 图3为IgG抗体PA21与减毒株来源的抗原免疫印迹鉴定结果,M,marker;1,减毒株裂解上清;2,炭疽无关蛋白表达细菌裂解上清。可见PA21抗体对减毒株保护性抗原PA蛋白有特异性结合能力;

[0025] 图4为IgG抗体PA21免疫共沉淀的SDS-PAGE结果,M,marker;1,PA21与减毒株细菌裂解上清共孵育;2,PA21;3,减毒株PA83蛋白;4,阴性对照(无关IgG与减毒株细菌裂解上清共孵育);

[0026] 图5为IgG抗体PA21的免疫共沉淀的质谱结果,证实抗体PA21结合的83kDa大小的蛋白即为PA;

[0027] 图6为IgG抗体PA21的亲合力检测结果,KD值 $1.0003 \times 10^{-9} \text{M}$ (从上至下的曲线依次代表80nM、40nM、20nM、10nM、5nM);

[0028] 图7为IgG抗体PA21的体外细胞保护性试验的结果,可见抗体PA21在浓度只有 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 而毒素LF浓度达到 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的时,细胞保护率仍能够达到90%以上;

[0029] 图8为IgG抗体PA21与毒素同时注射动物体内试验的结果,该抗体在每只(重约150g/只)大鼠给予 $10 \mu\text{g}$ 抗体时对大鼠保护率达100%;

[0030] 图9为IgG抗体PA21于毒素注射后5min时再注射的动物体内试验的结果,该抗体在 $20 \mu\text{g}/\text{只}$ 时可以在毒素注射5min后再注射,对大鼠保护率达100%;

[0031] 图10为IgG抗体PA21以 $20 \mu\text{g}/\text{只}$ 的量分别在毒素注射前后不同时间注射,结果显示与毒素注射后5min注射抗体一样,于毒素注射前24h注射抗体 $20 \mu\text{g}/\text{只}$ 对大鼠保护率达100%。

具体实施方式

[0032] 本发明以保护性抗原PA为靶分子,在噬菌体抗体库技术的基础上制备出人源抗PA抗体IgG。下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而

更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的,不对本发明的保护范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神下可以对技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0033] 实施例1人源抗PA抗体Fab的筛选

[0034] 1) 用纯化的重组PA83蛋白包被固相筛选ELISA板,每孔2 μ g,洗涤,加封闭液,洗涤,加入本实验室制备的天然噬菌体抗体库抗体,洗涤去除未结合的噬菌体抗体。

[0035] 2) 加入胰蛋白酶,洗脱特异性结合的噬菌体抗体,感染增值,辅助噬菌体VCSM13超感染。

[0036] 3) 重复以上筛选步骤,共进行五轮“吸附-洗脱-扩增”富集筛选。

[0037] 4) 将最后一轮筛选且增值得到的噬菌体稀释后铺于加入100 μ g/mL的氨苄青霉素培养板上培养过夜,挑取60个单菌落于细胞培养板中,振摇培养过夜。

[0038] 5) 过夜后从第一块板各孔中分别转移5 μ L菌液至第二块板,振摇培养。

[0039] 6) 加辅助噬菌体VCSM13超感染,振摇培养;离心,培养基重悬沉淀,振摇培养过夜。

[0040] 7) 离心取上清进行ELISA检测,测定每孔450nm和650nm吸光值,按A450nm~A650nm计算每孔吸光值。当P/N值(Positive/Negative)大于4时,该菌株为阳性单克隆噬菌体菌株。

[0041] 8) 将阳性克隆进行核酸序列分析,编码重链可变区的核酸序列为序列表中的SEQ ID NO.1所示,编码轻链可变区的核酸序列为序列表中的SEQ ID NO.3所示,从而得到一种基因序列正确的Fab,命名为Fab-PA21。

[0042] 实施例2人源抗PA的IgG抗体PA21的制备

[0043] 1) 根据已获得抗体的可变区序列,设计Infusion PCR的引物

[0044] 根据Infusion PCR原理设计PA21抗体的重、轻链PCR扩增引物,此引物需要包括表达载体上的15bp的碱基以及插入目的片段的至少15bp碱基,插入目的片段处碱基按照普通引物设计的原则设计。

[0045] 重、轻链PCR扩增引物:

[0046] 重链扩增引物:

[0047] F: 5' -GGTGTCCACTCGCTAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAG-3'

[0048] R: 5' -GCCCTTGGTGGATGCTGGGGAGACGGTGACCAGGGT-3'

[0049] 轻链扩增引物:

[0050] F: 5' -ACAGACGCTCGCTGCGAGCTCGTGATGACTCAGTCTCCAGAC-3'

[0051] R: 5' -TGCAGCCACCGTACGTTTGTATCTCCAGCTTGG-3'

[0052] 2) 扩增人源抗PA的IgG抗体PA21重链、轻链

[0053] 以实施例1制备的人源Fab-PA21为模板,分别以上述涉及的重链和轻链的上下游引物扩增全分子人源抗体重链、轻链基因。

[0054] ①PCR

[0055] 反应体系:

	10× Buffer	5 μL
	50mM MgCl ₂	3 μL
	10mM dNTPs	4 μL
	引物 (10 μM)	1.5/1.5 μL
[0056]	模板	1 μL
	ExTaq(5 U/μL)	1 μL
	ddH ₂ O	33 μL
<hr/>		
	Total	50 μL

[0057] 反应条件:

	94 °C	5 min	
	94 °C	30 s	} × 30
[0058]	58 °C	40 s	
	72 °C	45 s	
	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

[0059] ②2%琼脂糖凝胶电泳,紫外下观察目的条带,切胶回收。

[0060] ③胶回收试剂盒纯化目的DNA片段,去离子水洗脱。

[0061] 3) 双酶切IgG表达质粒

[0062] IgG表达质粒pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hk(购自Invivogen公司)包含IgG1型人源的重链和轻链(Kappa)恒定区碱基编码序列,编码重链恒定区的具体核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,编码轻链恒定区的具体核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0063] ①pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hk模板载体的双酶切

[0064] 反应体系:

	Cut Smart buffer 10×	5μL
	EcoR I	1.5μL
	Nhe I /BsiW I	2μL
[0065]	Vector	3.3μL (1 μg)
	ddH ₂ O	38.2μL
<hr/>		
	Total	50 μL

[0066] 反应条件:37°C酶切过夜。

[0067] ②1%琼脂糖凝胶电泳,紫外下切胶回收。

[0068] ③胶回收试剂盒纯化目的DNA片段,去离子水洗脱。

[0069] 4) Infusion PCR重组表达质粒

[0070] 反应体系:

	5× In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μL
	Linearized Vector	2μL
[0071]	VH/VL	4 μL
	ddH ₂ O	2 μL
<hr/>		
	Total	10 μL

[0072] 反应条件:50℃孵育15min。

[0073] 取5 μ L反应液转化感受态细菌,铺于相应抗性的平板上,次日挑克隆送测序。将测序结果正确的克隆保存菌种并扩大培养,提取质粒。

[0074] 5) 人源抗PA的IgG抗体PA21的表达

[0075] ①取250 μ L pFUSE-CHIg-hG1-PA21H(即50 μ g)于1mL的Opti-MEM培养基中,取250 μ L pFUSE-CLIg-hk-PA21K(即50 μ g)于1mL的Opti-MEM培养基中,取200 μ L的293Fectin于2.8mL的Opti-MEM培养基中,将上述三种混合液室温静置5min。

[0076] ②然后将两个质粒混合液混合均匀后,补加500 μ L的Opti-MEM培养基混合均匀后直接加入转染试剂293Fectin的混合液,混合均匀后静置20min。期间处理293F细胞,将293F细胞离心后用293F Expression Medium重悬,然后计数以及用台盼蓝计算细胞活力比,吸取 100×10^6 个细胞于培养瓶中,用293F Expression Medium定容为94mL。

[0077] ③20min结束后将6mL的DNA、293Fectin的复合物加入准备好的293F细胞中。

[0078] ④将细胞放在摇床培养箱中培养,培养条件8%CO₂,120rpm,37℃,6天后收集细胞上清。

[0079] 6) 人源抗PA的IgG抗体PA21的纯化

[0080] 将收集的细胞上清用0.22 μ m的滤膜过滤,同时将平衡液和洗脱液过滤膜。用AKATA纯化仪按照Protein A纯化的标准步骤纯化,以1mL/min的速度上样,以1.5mL/min的速度洗脱。结果成功表达并纯化IgG抗体PA21。SDS-PAGE见图1。

[0081] 实施例3人源抗PA的IgG抗体PA21的功能活性鉴定

[0082] 1) 酶联免疫法

[0083] 用包被液(0.1M碳酸盐缓冲液,pH9.6)稀释减毒株PA83蛋白(中国疾病预防控制中心鼠疫室赠送)至2 μ g/mL包被ELISA 96孔板,每孔加入100 μ L,4℃过夜;PBST(PBS含0.5% Tween20)5%脱脂牛奶-洗涤缓冲液封闭,37℃孵育2h;PBST洗涤5次后,每个孔中加入100 μ L PA21抗体(2 μ g/mL起始浓度,14个浓度梯度稀释)37℃2h;以1:4000稀释的羊抗人二抗100 μ L/孔加入到孔内,37℃孵育1h;过氧化物酶底物显色液100 μ L/孔,室温下10分钟后用2M硫酸中止反应,上机检测比色采用双波长450nm/690nm。结果如图2示,人源抗PA的IgG抗体PA21能与PA83蛋白起抗原抗体反应。

[0084] 2) Western blot

[0085] 以表达其他蛋白的大肠杆菌株为阴性对照,分别将减毒株和炭疽无关蛋白细菌株裂解上清进行10%SDS-PAGE电泳并电转到硝酸纤维素膜上,将此膜与2 μ g/mL PA21抗体室温孵育1h,1:4000稀释HRP-羊抗人IgG(北京中杉公司)和ECL发光试剂盒(美国Pierce公司)曝光于凝胶成像系统(Bio-Rad公司)。结果如图3所示:PA21抗体与减毒株PA83蛋白有特异性结合。

[0086] 3) 免疫共沉淀

[0087] 用含有PA83抗原的蛋白混合液和5 μ g PA21抗体,混合液体积用PBS调整到300 μ L,在4℃冰箱旋转共孵育2h后加入Pro.A免疫磁珠继续共孵育1h后4000rpm离心10min去上清,离心法用PBST洗5遍后,加入50 μ L柠檬酸洗脱液,离心收集上清,并加入10 μ L Tris-base中和。将3/4上清跑SDS-PAGE,并将考兰染色可见条带送质谱。免疫共沉淀SDS-PAGE结果见图4,考染条带质谱结果见图5。

[0088] 4) 亲和力检测

[0089] 根据PA等电点以及按照BiacoreX100control soft的protocol优化偶联条件,斜率优化选择醋酸钠作为偶联稀释缓冲液。用此缓冲液稀释PA样品至25ug/ml后偶联到CM5芯片上。预设偶联水平1500RU。然后用pH7.4的Running buffer稀释PA21样品,稀释一系列浓度至0uM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM。设置进样时间为180s,解离时间10min,再生缓冲液用50mM pH2.2Gly-HCl。按照BiacoreX100control soft的protocol进行上机测试。亲和力检测结果见图6,KD值为 1.0003×10^{-9} M。

[0090] 5) 体外细胞保护性实验

[0091] 将被试细胞(J774A.1)培养在含有10%小牛血清(FBS)和1%抗生素(P/S)的DMEM(DuLbecco Modified Eagle Medium)培养基中,37°C5%二氧化碳条件下培养。待细胞培养良好后转种在96微孔细胞培养板上,过夜培养当细胞生长在96微孔细胞培养板上达70%时,无菌条件下按不同剂量加按比例稀释好的炭疽致死毒素(PA:0.1μg/mL,LF:10μg/mL)和人源抗PA抗体IgG(4μg/mL),继续培养3小时,显微镜下观察细胞死亡情况并照相,然后加Cell Titer 96 aqueous nonradioactive cell Proliferation assay(Promega MI)检查LDH,计算分析细胞死亡百分数,实验重复三次。结果见图7,示:人源抗PA的IgG抗体PA21的保护率高,在抗体浓度为4μg/mL而LF10μg/mL的时候保护率仍能达到90%以上。

[0092] 6) 动物保护性实验

[0093] 使用体重150g左右的雌性Fischer344(F344)大鼠,每组6只大鼠,攻毒剂量为30μgPA+30μgLF(30μgLT)/大鼠,每次给予毒素或抗体的体积为300μl,不足用无菌PBS定容,攻毒及抗体给予方式均以尾静脉注射。

[0094] ①将毒素30μgLT和不同剂量的人源抗PA的IgG抗体PA21混合后用无菌PBS定容至总体积300μl,尾静脉注射至大鼠体内。观察大鼠的存活情况。结果见图8,可见抗体剂量在5μg/只,时可以明显延长大鼠生存时间,当抗体剂量达到10μg/只(即0.067mg/kg)时即可将大鼠完全保护。结果具有统计学意义。

[0095] ②先尾静脉注射毒素30μgLT,5min后注射不同剂量的IgG抗体PA21,观察大鼠的存活情况。结果见图9,可见IgG抗体PA21在10μg/只时可以明显延长大鼠生存时间。当IgG抗体PA21剂量达到20μg/只(即0.133mg/kg)时可以完全保护大鼠。与同时注射的结果比较,需要更多抗体,但是仍能保护大鼠免于死亡。可见IgG抗体PA21具有较好的中和保护作用,结果具有统计学意义。

[0096] ③基于同时注射毒素和IgG抗体PA21的实验结果,分别在毒素注射前后不同时间注射IgG抗体PA2120μg/只,观察大鼠的存活情况。结果见图10,显示于毒素注射前24h注射IgG抗体PA21可将大鼠完全保护,毒素注射后5min注射IgG抗体PA21也可将大鼠完全保护。而提前更长时间或是退后更长时间仍可以延长生存时间。

[0097] 以上动物实验结果显示人源抗PA的IgG抗体PA21具有良好的动物保护作用,且提示可以用于炭疽病的预防保护。

[0001]

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军南京军区军事医学研究所

<120> 人源抗炭疽保护性抗原 PA 的抗体 IgG 及其应用

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggagge gtggtcacgc ctgggaggtc cctgagactc      60
tectgtgcag cgtctggatt caccttcagt agetaeggea tgcactgggt ccgccagget      120
ccaggcaagg ggetggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat      240
ctgcaaatga acagccigag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaacga      300
aactactttg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcccca      348

```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45

```

[0002]

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Pro
 115

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gagctcgiga tgactcagtc tccagactcc ctggetgigt ctctgggcga gagggccaec 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgittta tacagetcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggfaccage agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttiactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cacteteacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 cegtacaatt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

[0003]

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 5

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

```

gcatecacca agggcccate tgtcttcccc ctggcccctt cctccaagag cacctctgge      60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttec ctgagcctgt gacagtgtec      120
tggaactctg gcgccctgac cagcggcgtg cacacettec ctgctgtgct ccagtcctct      180
ggcctgtact ccctgagcag cgtggtgaca gtgccatcca gcagcctggg caccagacc      240
tacatctgca atgtgaacca caagcccage aacaccaagg tggacaagcg ggtggagccc      300
aagtccctgtg acaagaccca caectgcccc ccatgccccg ccctgagct gctgggcggc      360
ccatctgtct tctgttccc ccccaagccc aaggacacce tgatgatctc ccggaccccc      420
gagtgacct gtgtggtggt ggatgtgagc catgaggacc ccgaggtgaa gttcaactgg      480
tatgtggatg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaage cccgggagga gcagtacaac      540
agcacctacc ggggtggtgag cgtgctgaca gtgctgcatc aggaactggt gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgectgccc ccattgagaa gaccatctcc      660

```

[0004]

```

aaggccaagg gccagccccc ggagccccag gtcctacacc tgcceccctc ccgggaggag      720
atgaccaaga accaggtgag cctgacctgc ctggatgaagg gcttctacce cagcgacatt      780
gctgtggagt gggagagcaa eggccagcct gagaacaact acaagaccac cccctctgtg      840
ctggactctg atggctcctt ctctctgtac agcaagctga cagtggacaa gagccgggtg      900
cagcagggca atgtcttctc ctctctgtg atgcatgagg cctgcacaa ccactacacc      960
cagaagagcc tgctcctgtc ccccgcaag                                     990

```

<210> 6

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
           20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
           35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
           50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
           85           90           95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
           100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
           115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
           130          135          140

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 [0005] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

[0006]

```

cgtacggtgg ctgcaccatc tgttcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagge caaagtacag      120
tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accttgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg t                                     321

```

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

```

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

```

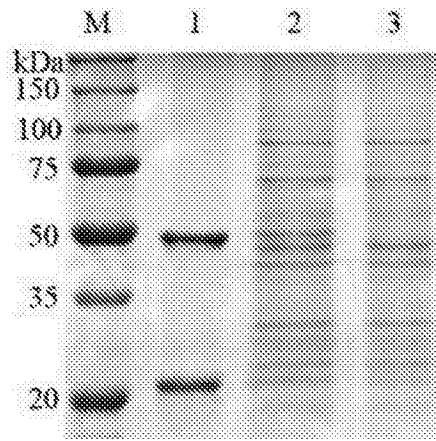


图1

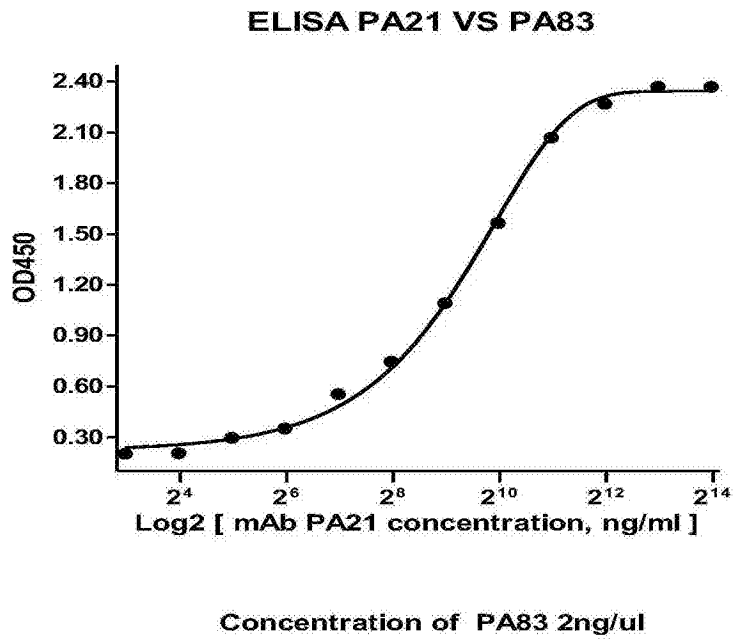


图2

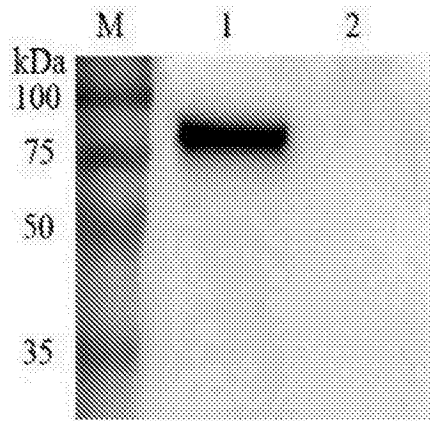


图3

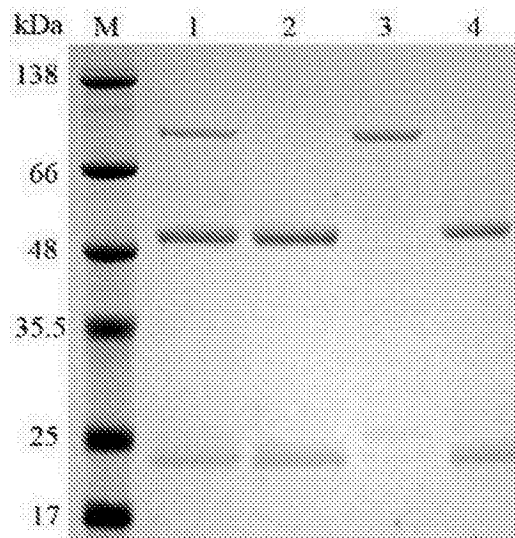


图4

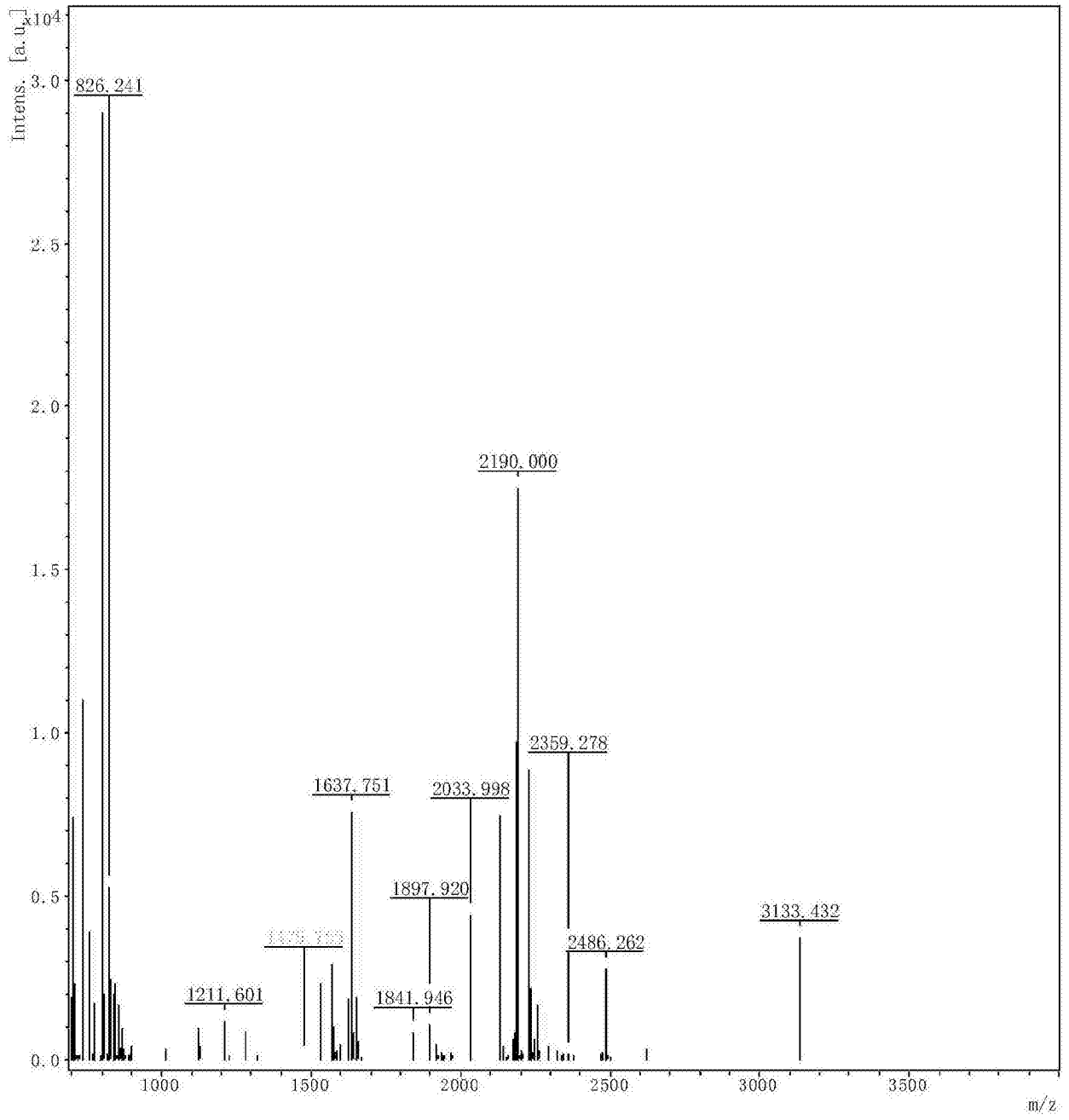


图5

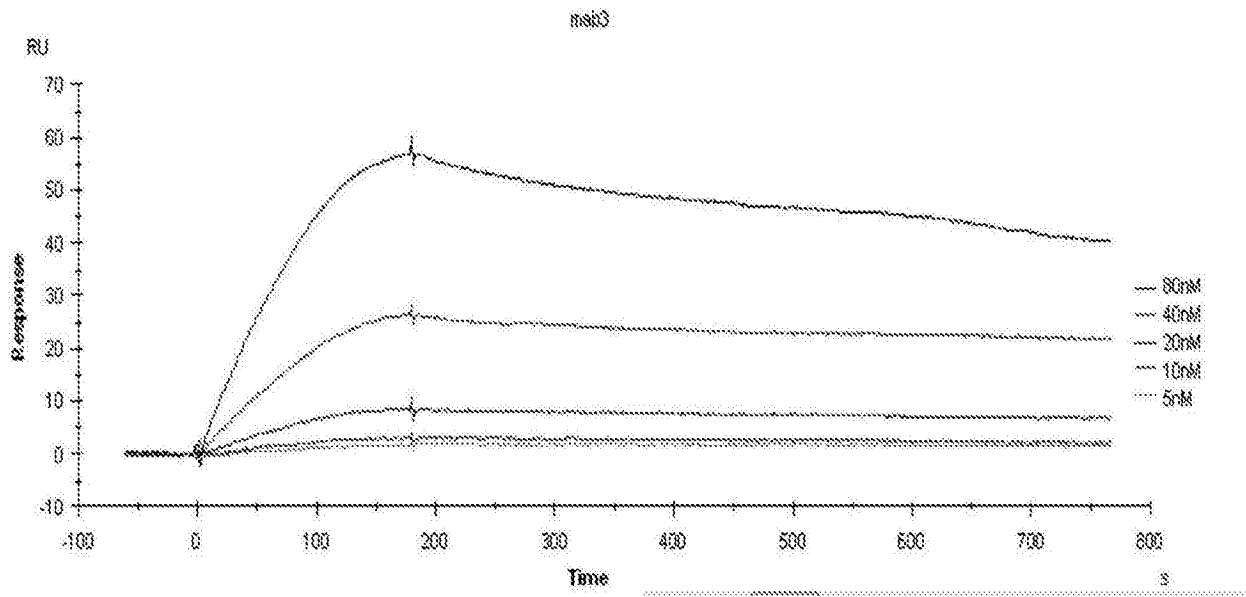


图6

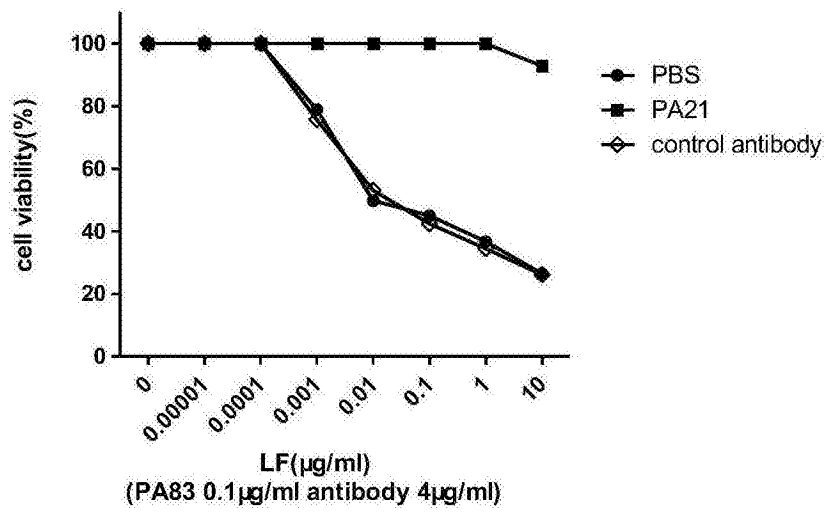


图7

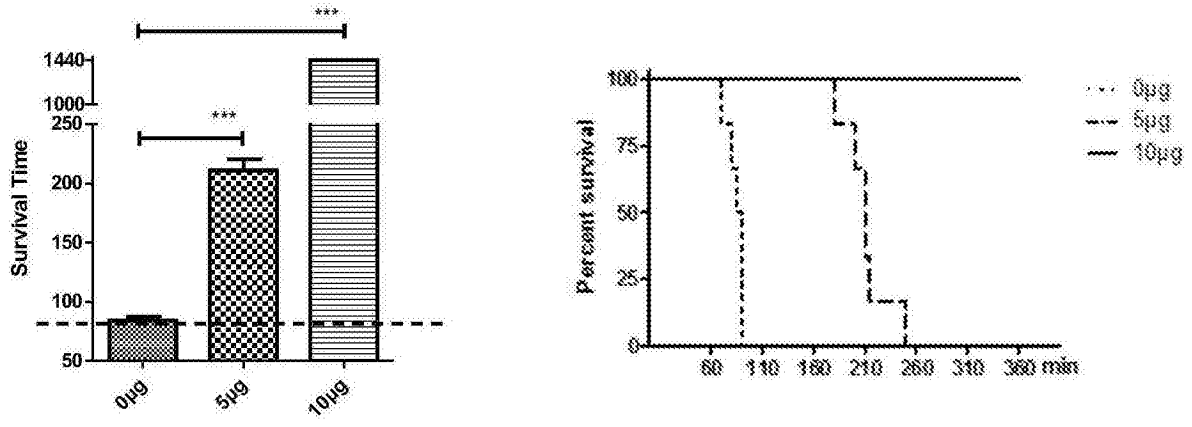


图8

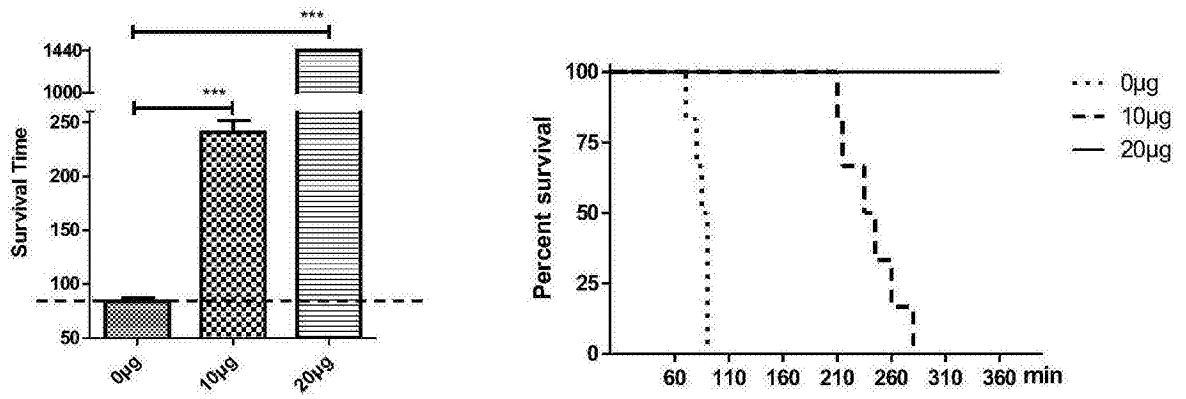


图9

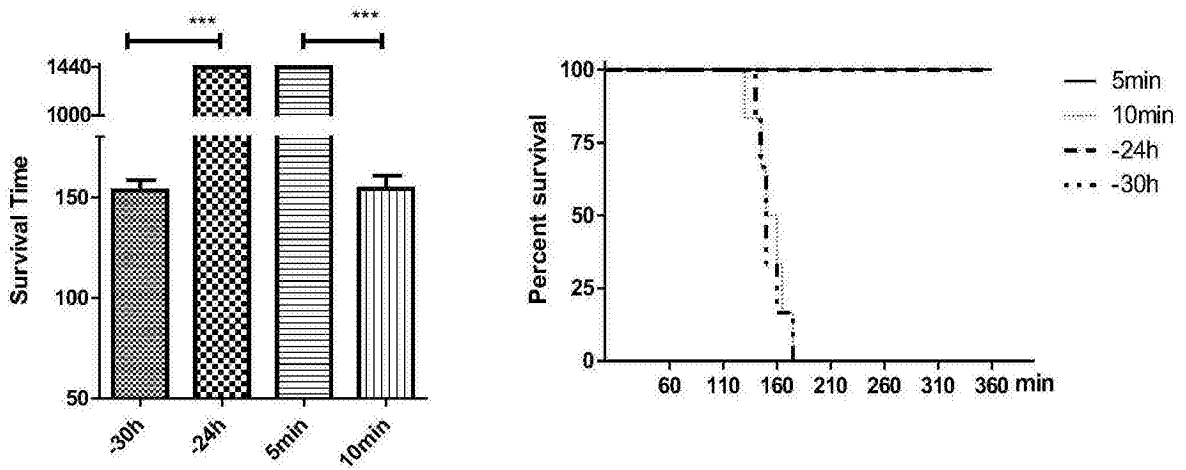


图10