



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106188282 A

(43) 申请公布日 2016. 12. 07

(21) 申请号 201510219606. 9

(22) 申请日 2015. 04. 30

(71) 申请人 中国科学院上海巴斯德研究所
地址 200025 上海市黄浦区合肥路 411 号

(72) 发明人 黄忠 王晓黎

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

C07K 16/10(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12P 21/08(2006. 01)

A61K 39/42(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页

序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

抗诺如病毒 GI. 1 型鼠源单克隆抗体的制备和应用

(57) 摘要

本发明提供了抗诺如病毒 GI. 1 鼠型源单克隆抗体的制备和应用。本发明获得一种抗诺如病毒 GI. 1 型鼠源单克隆抗体, 实验结果表明, 所述单克隆抗体具有极高的对诺如病毒 GI. 1 的中和活性, 而且该抗体不存在与 GII. 4 病毒样颗粒的交叉反应, 能够特异性识别 GI. 1 病毒样颗粒。

1. 一种抗体的重链可变区,其特征在于,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区 CDR:

SEQ ID NO:8 所示的 CDR1,

SEQ ID NO:9 所示的 CDR2,和

SEQ ID NO:10 所示的 CDR3;

优选地,所述重链可变区具有 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

2. 一种抗体的重链,其特征在于,所述的重链具有如权利要求 1 所述的重链可变区和重链恒定区。

3. 一种抗体的轻链可变区,其特征在于,所述轻链可变区具有选自下组的互补决定区 CDR:

SEQ ID NO:14 所示的 CDR1',

SEQ ID NO:15 所示的 CDR2',和

SEQ ID NO:16 所示的 CDR3';

优选地,所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

4. 一种抗体的轻链,其特征在于,所述的轻链具有如权利要求 3 所述的轻链可变区和轻链恒定区。

5. 一种抗体,其特征在于,所述抗体具有:

(1) 如权利要求 1 所述的重链可变区;和/或

(2) 如权利要求 3 所述的轻链可变区;

或者,所述抗体具有:

如权利要求 2 所述的重链;和/或如权利要求 4 所述的轻链。

6. 一种重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白具有:

(i) 如权利要求 1 所述的重链可变区、如权利要求 2 所述的重链、如权利要求 3 所述的轻链可变区、如权利要求 4 所述的轻链、或如权利要求 5 所述的抗体;以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

7. 一种多核苷酸,其特征在于,它编码选自下组的多肽:

(1) 如权利要求 1 所述的重链可变区、如权利要求 2 所述的重链、如权利要求 3 所述的轻链可变区、如权利要求 4 所述的轻链、或如权利要求 5 所述的抗体;或

(2) 如权利要求 6 所述的重组蛋白。

8. 一种载体,其特征在于,它含有本发明权利要求 7 所述的多核苷酸。

9. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求 8 所述的载体或基因组中整合有权利要求 7 所述的多核苷酸。

10. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中包括:

权利要求 5 所述的抗体。

11. 一种免疫偶联物,其特征在于,该免疫偶联物含有:

(a) 权利要求 5 所述的单克隆抗体或权利要求 6 所述的重组蛋白;和

(b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

12. 一种药物组合物,其特在于,所述组合物包含权利要求 5 所述的抗体、权利要求 6 所述的重组蛋白、或权利要求 12 所述免疫偶联物;以及

药学上可以接受的载体。

13. 一种重组多肽的制备方法,其特征在于,该方法包含:

(a) 在适合表达的条件下,培养权利要求 9 所述的宿主细胞;

(b) 从培养物中分离出重组多肽,所述的重组多肽是权利要求 5 所述的抗体或权利要求 6 所述的重组蛋白。

抗诺如病毒 GI.1 型鼠源单克隆抗体的制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及抗诺如病毒 GI.1 型鼠源单克隆抗体的制备和应用。

背景技术

[0002] 诺如病毒 (NoVs) 是单股正链 RNA 病毒,属于杯状病毒科。诺如病毒的基因组含有 3 个开放阅读框 (ORF),其中 ORF2 编码主要衣壳蛋白 VP1,单独的 VP1 蛋白可组装成病毒样颗粒。根据 VP1 衣壳蛋白的氨基酸序列,诺如病毒可以分为 6 个基因组 (GI-GVI),但只有 GI, GII 和 GIV 可以感染人类。诺如病毒是病毒性肠胃炎的主要致病原之一。尽管诺如病毒感染后引起的症状一般比较温和,有自限性,病程持续 1-3 天左右,但是在小孩、老人以及免疫功能不全的人中仍可引起较为严重的症状,甚至引起死亡。人类诺如病毒的感染主要由 GI 型和 GII 型引起,其中诺如病毒 GI.1 是人类诺如病毒的原型,1968 年曾引起学校范围内的肠胃炎的暴发流行。

[0003] 诺如病毒缺少细胞培养模型,也没有小动物模型,这给疫苗和抗病毒药物的研究带来了很大的阻碍。目前,病毒样颗粒疫苗已经达到临床 II 期,但疫苗的上市仍需若干年的时间。

[0004] 因此,本领域技术人员致力于开发具有良好临床应用前景的抗诺如病毒药物和/或检测试剂。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种抗诺如病毒 GI.1 型鼠源单克隆抗体的制备和应用。

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种抗体的重链可变区,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区 CDR:

[0007] SEQ ID NO:8 所示的 CDR1,

[0008] SEQ ID NO:9 所示的 CDR2,和

[0009] SEQ ID NO:10 所示的 CDR3;

[0010] 优选地,所述重链可变区具有 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

[0011] 本发明的第二方面,提供了一种抗体的重链,所述的重链具有如本发明第一方面所述的重链可变区和重链恒定区。

[0012] 在另一优选例中,所述抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO.:3 所示。

[0013] 本发明的第三方面,提供了一种抗体的轻链可变区,所述轻链可变区具有选自下组的互补决定区 CDR:

[0014] SEQ ID NO:14 所示的 CDR1',

[0015] SEQ ID NO:15 所示的 CDR2',和

[0016] SEQ ID NO:16 所示的 CDR3';

[0017] 优选地,所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明的第四方面,提供了一种抗体的轻链,所述的轻链具有如本发明第三方面所述的轻链可变区和轻链恒定区。

[0019] 在另一优选例中,所述抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO. :5 所示。

[0020] 本发明的第五方面,提供了一种抗体,所述抗体具有:

[0021] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区;和/或

[0022] (2) 如本发明第三方面所述的轻链可变区;

[0023] 或者,所述抗体具有:

[0024] 如本发明第二方面所述的重链;和/或如本发明第四方面所述的轻链。

[0025] 本发明的第六方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白具有:

[0026] (i) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或如本发明第五方面所述的抗体;以及

[0027] (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0028] 本发明的第七方面,提供了一种多核苷酸,它编码选自下组的多肽:

[0029] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或如本发明第五方面所述的抗体;或

[0030] (2) 如本发明第六方面所述的重组蛋白。

[0031] 在另一优选例中,所述多核苷酸的序列具有如 SEQ ID NO. :2 和/或 SEQ ID NO. :4 所示的多核苷酸序列。

[0032] 本发明的第八方面,提供了一种载体,它含有本发明第七方面所述的多核苷酸。

[0033] 本发明的第九方面,提供了一种遗传工程化的宿主细胞,它含有本发明第八方面所述的载体或基因组中整合有本发明七方面所述的多核苷酸。

[0034] 本发明的第十方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒中包括:

[0035] 本发明第五方面所述的抗体。

[0036] 在另一优选例中,所述试剂盒为酶联免疫检测试剂盒。

[0037] 本发明的第十一方面,提供了一种免疫偶联物,该免疫偶联物含有:

[0038] (a) 本发明第五方面所述的抗体或本发明第六方面所述的重组蛋白;和

[0039] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

[0040] 本发明的第十二方面,提供了一种药物组合物,所述组合物包含本发明第五方面所述的抗体、本发明第六方面所述的重组蛋白、或本发明第十一方面所述的免疫偶联物;以及

[0041] 药学上可以接受的载体。

[0042] 本发明的第十三方面,提供了一种重组多肽的制备方法,该方法包含:

[0043] (a) 在适合表达的条件下,培养本发明第九方面所述的宿主细胞;

[0044] (b) 从培养物中分离出重组多肽,所述的重组多肽是本发明第五方面所述的抗体或本发明第六方面所述的重组蛋白。

[0045] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0046] 图1显示了聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化的抗GI.1单抗。6种纯化的抗体分别经含有还原剂的上样缓冲液处理后上样到12%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,并以考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。M, 蛋白分子量标准;1,1F7单抗;2,2E12单抗;3,4H12单抗;4,6B7单抗;5,7H7单抗;6,9C2单抗。

[0047] 图2显示了酶联免疫吸附实验(Elisa)鉴定单抗与不同抗原的结合能力。在Elisa板上每孔分别包被100ng GI.1(A)或者GII.4(B)病毒样颗粒,每孔分别加不同浓度的纯化的单抗在37℃孵育2小时,接着用HRP标记的抗鼠二抗进行孵育。抗乙肝表面抗原(HBsAg)单抗被用来做无关对照。图中每个点显示了三个重复样品测定的OD450nm平均值。

[0048] 图3显示了Westernblot分析。GI.1病毒样颗粒经处理后,在12%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,接着转印到PVDF膜上,用纯化的单抗进行杂交。M, 蛋白分子量标准;1,1F7单抗;2,2E12单抗;3,4H12单抗;4,6B7单抗;5,7H7单抗;6,9C2单抗;7,control mAb;8,鼠抗GI.1病毒样颗粒多克隆抗体。

[0049] 图4显示了夹心Elisa检测GI.1和GII.4病毒样颗粒。在Elisa板上每孔分别包被50ul 1:5000稀释的兔抗GI.1(A)或者兔抗GII.4(B),每孔分别加不同浓度的GI.1病毒样颗粒(A)和GII.4病毒样颗粒(B)在37℃孵育2小时,接着每孔加入10ng的纯化的单抗,最后用HRP标记的抗鼠二抗进行孵育。抗乙肝表面抗原(HBsAg)单抗被用来做无关对照。

[0050] 图5显示了中和替代实验检测纯化后单抗抑制GI.1病毒样颗粒与PGM作用的活性。在Elisa板上每孔包被50ul 10ug/ml PGMII,将不同浓度的单抗与0.5ug/ml GI.1病毒样颗粒在室温孵育1小时后加入Elisa板中,接着加入兔抗GI.1,最后用HRP标记的抗兔二抗进行孵育。抗乙肝表面抗原(HBsAg)单抗被用来做无关对照。

[0051] 图6显示了基因重组表达的单克隆抗体的鉴定。在Elisa板上每孔分别包被100ngGI.1病毒样颗粒,每孔分别加不同浓度的纯化的单抗在37℃孵育2小时,接着用HRP标记的抗鼠二抗进行孵育。未转染质粒的细胞的培养上清作为空白对照。图中柱状图显示了三个重复样品测定的OD450nm平均值和标准差。

具体实施方式

[0052] 本发明人通过广泛而深入的研究,获得一种抗诺如病毒GI.1型鼠源单克隆抗体,实验结果表明,所述单克隆抗体具有极高的对诺如病毒GI.1的潜在中和活性,而且该抗体不存在与GII.4病毒样颗粒的交叉反应,能够特异性识别GI.1病毒。本发明还提供了上述单克隆抗体的用途。

[0053] 具体地,本发明用GI.1病毒样颗粒作为免疫原制备了能特异性识别GI.1的单克隆抗体4H12。Elisa和替代中和实验等方法说明该抗体可以用来检测和分析GI.1,更重要的是该单抗还具有很强的中和活性。

[0054] 在描述本发明之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案,并且不意图是限制性的,本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

[0055] 除非另外定义,否则本文中使用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0056] 虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料,本文在此处例举优选的方法和材料。

[0057] 诺如病毒 GI.1

[0058] 诺如病毒 GI.1 属于杯状病毒科,是引发非细菌性胃肠炎暴发和散发的重要病原之一。诺如病毒在发达国家和发展中国家均有流行,各年龄阶段人群对其普遍易感,而且在儿童、老人和免疫功能不全的人中可引起较为严重的症状,甚至导致死亡。到目前为止,没有特异性的疫苗和治疗药物。

[0059] 本发明利用重组 GI.1 病毒样颗粒作为免疫原来制备了 GI.1 单克隆抗体。本发明制备的抗体不仅是制备治疗性人源化单抗的可靠候选者,而且是开发诊断方法的有用试剂。

[0060] 本发明中使用诺如病毒 GI.1VP1 制备了病毒样颗粒,其氨基酸序列为:

[0061] MASKDATSSVDGASGAGQLVPEVNASDPLAMDPAVGSSTAVATAGQVNPIDPWIINNFVQAPQGEFTIS
PNNTPGDVLFDLSLGPLHNPFLHLSQMYNGWVGNMRVRIMLAGNAFTAGKIIIVSCIPPGFGSHNLIAQATLFP
IADVRTLDPIEVPLEDVRNVLFHNDRNQQTMRVLCMLYTPLRTGGGTGDSFVAVGRVMTCPSPDFNLFVLPPTVE
QKTRPFTLPNLPLSSLSNSRAPLPISSMGISPDNVQSVQFQNGRCTLGRLVGTTPVSLSHVAKIRGTSNGTVINLT
ELDGTPTFHPFEGPAPIGFPDLGGCDWHINMTQFGHSSQTQYDVTTPDTFVPHLGSIQANGIGSGNYVGVLSWISPP
SHPSGSQVDLWKIPNYGSSI TEATHLAPSVYPPGFGEVLVFFM SKMPGPGAYNLPCLLPQEYI SHLASEQAPTVEA
ALLHYVDPDTGRNLGEFKAYPDGFLTCVPNGASSGPQQLPINGVFVFSWVSRFYQLKPVGTASSARGRLGLRR (S
EQ ID NO. :1, NP_056821.2)

[0062] 本发明中使用诺如病毒 GII.4VP1 制备了病毒样颗粒,其氨基酸序列为:

[0063] MASSDANPSDGSAAANLVPEVNNVMALEPVVGAIIAAPVAGQQNVIDPWIRNNNFVQAPGGEFTVSPRNA
PGEILWSAPLGPDLNPLYSHLARMYNGYAGGFVQVILAGNAFTAGKVIFAAPVPPNFPTEGLSPSQVTMFPHIVVDV
RQLEPVLIPDPVRNNFYHYNQSNDPITKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDFIFLVPPTVESRTK
PFSVPVLTVEEMTNSRFPIPLEKLFPTGSSAFVVPQNGRCTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHITGSRNYTMN
LASQNWNNYDPTTEEIPAPLGTDFVVGKIQQVLTQTTRTDGSTRGHKATVYTGSAFAPKLGRVQFETDTHDFEANQ
NTKFTPVGVIQDQSTTHRNEPQQWVLPYSYGRNTPNVHLAPAVAPTFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMDLDCLLPQE
WVQYFYQEAAPAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVAHGTQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGNG
TGRRRAL (SEQ ID NO. :20, GenBank ID:KC631827.1),309 位丝氨酸 (Ser) 突变为天冬酰胺
(Asn)。

[0064] 抗体

[0065] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一

个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区 (VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区 (VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0066] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区 (CDR) 或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个 CDR 相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位(参见 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷 I, 647-669 页 (1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0067] 脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有 5 类免疫球蛋白: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0068] 如本文所用,术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0069] 本发明还包括具有所述的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体的相应氨基酸序列的单克隆抗体、具有所述的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体可变区链的单克隆抗体,以及具有这些链的其他蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物。具体地,本发明包括具有含超变区(互补决定区, CDR)的轻链和重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该超变区与本发明的轻链和重链的超变区相同或至少 90% 同源性,较佳地至少 95% 同源性。

[0070] 如本领域技术人员所知,免疫偶联物及融合表达产物包括:药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与所述的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体或其片段结合的而形成的偶联物。本发明还包括与所述的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

[0071] 本发明不仅包括完整的单克隆抗体,还包括具有免疫活性的抗体片段,如 Fab 或 (Fab')₂ 片段;抗体重链;抗体轻链。

[0072] 如本文所用,术语“重链可变区”与“ V_H ”可互换使用。

[0073] 如本文所用,术语“可变区”与“互补决定区 (complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

[0074] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区 CDR:

[0075] CDR1,其氨基酸序列为 SFSGFSLSTSGMGVG (SEQ ID NO:8),其编码核苷酸序列为,

[0076] TCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGC (SEQ ID NO.:11);

[0077] CDR2,其氨基酸序列为 HIWDDVKRYNPALKS (SEQ ID NO.:9),

[0078] 其编码核苷酸序列为, CACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCGCTATAACCCAGCCCTGAAGAGC (SEQ ID NO.:12);

[0079] CDR3,其氨基酸序列为 TRSNYDYDPFPY (SEQ ID NO.:10),其编码核苷酸序列为,ACTCGATCTAACTATGATTACGACCCGTTTCCTTAC (SEQ ID NO.:13)。

[0080] 在另一优选例中,所述重链可变区的氨基酸序列为:

[0081] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRL
TISKDTSSSQVFLTIASVDTTDTATYYCTRSNYDYDPFPYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO.:6)。

[0082] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区,所述重链恒定区可以为鼠源或人源。

[0083] 在另一优选例中,所述抗体的重链氨基酸序列为:

[0084]

MGRLTSSFLLLIVPAYVLS QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSG

KGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLTIASVDTTDTATYYCTRSNYDYDPFPYWG
QGLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
SDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK
DVLTITLTPKVTCVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN
GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIPKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQ
WNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

(SEQ ID NO.:3)

[0085] 如本文所用,术语“轻链可变区”与“ V_L ”可互换使用。

[0086] 在本发明的一个优选的实施方式中,根据本发明的抗体的轻链可变区,具有选自下组的互补决定区 CDR:

[0087] CDR1',其氨基酸序列为 RASSVTSRYLH (SEQ ID NO:14),其编码核苷酸序列为,AGGCCAGCTCAAGTGTAACCTCCCGTTACTTGAC (SEQ ID NO.:17);

[0088] CDR2',其氨基酸序列为 GTSNLAS (SEQ ID NO:15),其编码核苷酸序列为,GGCACATCCAACCTGGCTTCT (SEQ ID NO.:18)

[0089] CDR3',其氨基酸序列为 QQFSGYPFT (SEQ ID NO:16),其编码核苷酸序列为, CAGCAGTTCAGTGGTTACCCATTACG (SEQ ID NO.:19)

[0090] 在另一优选例中,所述的轻链可变区的氨基酸序列为:

[0091] ENVLTQSPAIMSASLGEKVTLTCRASSSVTSRYLHHWYQQKSGASPKLWISGTSNLASGVPARFSGSGS
TSYSLTSSVEAEDAATYYCQQFSGYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO.:7)。

[0092] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的轻链包括上述轻链可变区和轻链

恒定区,所述轻链恒定区可以为鼠源或人源。

[0093] 在另一优选例中,所述抗体的轻链氨基酸序列为:

[0094] MDFLVQIFSFLVISASVALSRG *ENVLTQSPAIMASLGEKVTLTCRASSSVTSRYLHWYQQKS*
GASPKLWISGTSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTSSVEAEDAATYYCQQFSGYPFTFGSGTKLEIK
RADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDQSKDSTYS
MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO. :5)

[0095] 在本发明中,术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用,都指特异性结合抗 GI.1 病毒的抗体,例如具有重链(如 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列)和/或轻链(如 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列)的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

[0096] 在另一优选例中,所述的抗体为抗抗 GI.1 病毒的鼠或人鼠嵌合单克隆抗体,它的重链恒定区和/或轻链恒定区可以是人源化的重链恒定区或轻链恒定区。更优选地,所述的人源化的重链恒定区或轻链恒定区为人 IgG1、IgG2 等的重链恒定区或轻链恒定区。

[0097] 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链和轻链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链和轻链的可变区相同或至少 90% 同源性,较佳地至少 95% 同源性。

[0098] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的 3 个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成 4 个框架区域(FR),4 个 FR 的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些 CDR 形成环状结构,通过其间的 FR 形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的 CDR 和相应轻链上的 CDR 构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了 FR 或 CDR 区域。

[0099] 本发明抗体的重链和/或轻链的可变区特别令人感兴趣,因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此,本发明包括那些具有带 CDR 的单克隆抗体轻链和重链可变区的分子,只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90% 以上(较佳地 95% 以上,最佳地 98% 以上)的同源性。

[0100] 本发明不仅包括完整的单克隆抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0101] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0102] 本发明抗体指具有抗 GI.1 病毒结合活性的、包括上述 CDR 区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述 CDR 区的多肽的变异形式。这些变异形式包括

(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

[0103] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0104] 本发明还提供了其他多肽,如包含人抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0105] 在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0106] 表A

[0107]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0108] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。

DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO. :2、或 4 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有与本发明的多肽相同的氨基酸序列,但与 SEQ ID NO. :2、4、11、12、13、17、18、19 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

[0109] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0110] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0111] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格条件”是指:(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 0.2×SSC, 0.1% SDS, 60℃;或(2) 杂交时加有变性剂,如 50% (v/v) 甲酰胺,0.1% 小牛血清 /0.1% Ficoll, 42℃等;或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上,更好是 95% 以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO. :12 和/或 SEQ ID NO. :22 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0112] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外,还可将重链的编码序列和表达标签(如 6His) 融合在一起,形成融合蛋白。

[0113] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

[0114] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0115] 本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0116] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞;CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

[0117] 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl₂法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

[0118] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)

诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0119] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0120] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0121] 用于诊断目的的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0122] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0123] 本发明的药物组合物可直接用于结合GI.1病毒,因而可用于预防和治疗诸如病毒(NoVs)是导致急性肠胃炎。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0124] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0125] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约8毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约1毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0126] 杂交瘤细胞株

[0127] 本发明还提供了可生产本发明针对抗GI.1病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株;优选的,本发明提供了高效价的针对抗GI.1病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0128] 在获得生产本发明的抗GI.1病毒单克隆抗体的杂交瘤之后,本领域技术人员可以方便地利用该杂交瘤细胞株制备抗体。此外,本领域技术人员还可很方便地获知本发明的抗体的结构(比如抗体的重链可变区和轻链可变区),然后可通过重组方法来制备本发明的单克隆抗体。

[0129] 单克隆抗体的制备

[0130] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,本发明抗原,可被施用于动物以诱导单克隆抗体的产生。对于单克隆抗体,可利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981) 或可用重组 DNA 法(美国专利号 4,816,567) 制备。

[0131] 代表性的骨髓瘤细胞是有效融合、通过选择的抗体产生细胞支持抗体的稳定高水平产生、且对培养基(HAT 培养基基质)敏感的那些骨髓瘤细胞,包括骨髓瘤细胞株,例如鼠类的骨髓瘤细胞株,包括衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞株(可购自 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣地亚哥,加利福尼亚,美国)以及 SP-2、NZO 或 X63-Ag8-653 细胞(可购自 American Type Culture Collection, 洛克维尔,马里兰,美国)。人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞株也已被描述用于产生人单克隆抗体 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等, 单克隆抗体的生产技术和应用 (Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications), 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987)]。

[0132] 对杂交瘤细胞生长于其中的培养基进行分析以检测具有所需特异性的单克隆抗体的产生,如,通过体外结合分析例如,酶联免疫吸附分析 (ELISA) 或放射免疫分析 (RIA)。表达抗体的细胞的位置可用 FACS 进行检测。然后,可将杂交瘤克隆通过有限稀释步骤形成亚克隆 (subcloned), 并通过标准方法生长 (Goding, 单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies): 原则和实践 (Principles and Practice), Academic Press (1986) 59-103 页)。为了达到这一目的而使用的适合的培养基包括,例如,DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可在动物体内作为腹水瘤生长。

[0133] 由亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基、腹水或血清中通过常规的免疫球蛋白纯化工艺适当地得到分离,这些纯化工艺为例如,蛋白 A-琼脂糖法 (protein A-Sepharose)、羧基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0134] 本发明提供了一种针对 GI.1 病毒的单克隆抗体。在本发明的一个优选的方案中,单克隆抗体采用培养杂交瘤细胞方法制备。取杂交瘤细胞培养的上清液,经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG, 再将粗提的抗体经亲和层析柱 (Protein G-Sepharose) 纯化。

[0135] 本发明的一个优选的方案中,单克隆抗体采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内,10 天左右可见腹部明显胀大。抽取腹水,经饱和硫酸铵沉淀法粗提后,再将粗提的抗体经亲和层析柱 (Protein G-Sepharose) 纯化。

[0136] 标记的免疫球蛋白(抗体)

[0137] 在本发明的一个优选例中,所述免疫球蛋白带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:胶体金标记物、辣根过氧化物酶标记、有色标记物或荧光标记物。

[0138] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,抗 GI.1 病毒的单克隆抗体用胶体金标记,得到胶体金标记的单克隆抗体。

[0139] 本发明的抗 GI.1 病毒单克隆抗体具有很好的特异性,很高的效价。

[0140] 检测板及其材料

[0141] 本发明的检测板可采用本领域常用的检测板材料,采用常规的检测板制备方法制成。

[0142] 本发明检测 GI. 1 病毒的免疫检测板,包括测试条和支撑测试条的支撑板,如可采用 PVC 聚脂胶板等;所述的测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成,搭接部位可以采用常规的方法,如胶带等固定连接;其中:层析材料预包被胶体金标记或有色标记的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体或多克隆抗体,优选被胶体金标记的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体,硝酸纤维素膜上吸附检测线和质控线;

[0143] 在一个优选的方案中:层析材料上预包被胶体金标记的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体是采用浓度为 0.5-1.5mg/ml 胶体金标记的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体溶液进行预包被的,包被量为 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为 0.5 或 1.5mg/ml, $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0144] 检测方法与结果判定

[0145] 平放检测板,将试样滴在滤样纸上,试样约 $120 \mu\text{l}$, 3 ~ 5min 内观察层析结果。根据出现的条纹位置来判断结果。

[0146] 阴性:质控区、检测区均出现明显的色带,示为阴性;

[0147] 阳性:只在质控区出现明显色带,而在检测区无色带,示为阳性;

[0148] 无效:质控区、检测区无任何色带或在质控区未出现色带而在检测区出现色带,表明检测方法错误或检测板变质或失效,应重新换取检测板检测。

[0149] 方法和样本

[0150] 本发明涉及用于在以细胞和 / 或组织溶解的样本检测诺如病毒方法。该方法步骤大致如下:获得细胞和 / 或组织样本;将样本溶解在介质中;检测在所述溶解的样本中 GI. 1 病毒的水平。本发明方法所使用的样本可以是存在于细胞保存液中的包括细胞的任何样本,正如在液基细胞检测法中所使用的。

[0151] 试剂盒

[0152] 本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)或本发明的检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

[0153] 本发明进一步设计用于检测 GI. 1 病毒水平的检测试剂盒,该试剂盒包括识别抗 GI. 1 病毒的抗体,用于溶解样本的裂解介质,检测所需的通用试剂和缓冲液,如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

[0154] 本发明进一步设计开发用于对来自溶液样本的 GI. 1 病毒感染相关情况诊断评估的试剂盒,该试剂盒可以检测存在于样本溶液中的 GI. 1 病毒,其中保存样本的细胞保存液可以是诸如液基细胞检测法中的细胞保存液。

[0155] 本发明的抗 GI. 1 病毒单克隆抗体具有高亲和力、高特异性等优点,可广泛应用在制备 GI. 1 病毒的检测领域,如检测试剂或检测设备的制备领域等,在特异性、灵敏度和检测率等方面较之传统的检测方法或检测试剂具有显著的优势。

[0156] 本发明的主要优点在于:

[0157] (1) 本发明的单克隆抗体 4H12 能够特异性的识别诺如病毒;

[0158] (2) 本发明的单克隆抗体 4H12 能够特异性的结合诺如病毒 GI. 1, 与诺如病毒 GII. 4 无交叉反应,从而实现诺如病毒 GI. 1 和诺如病毒 GII. 4 的鉴定。

[0159] (3) 本发明的单克隆抗体 4H12 对诺如病毒具有强大的中和活性。

[0160] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0161] 材料和方法

[0162] 1 抗原制备及小鼠免疫

[0163] 利用杆状病毒-昆虫表达系统,通过表达诺如病毒 GI.1 VP1 制备了病毒样颗粒^[1]。将 50ug 的病毒样颗粒(50ul 体积)与等体积的铝佐剂(500ug)混合后腹腔免疫 6 周雌性 Balb/c 小鼠,在 0 周、2 周、4 周各免疫一次。在第 6 周时,采取小鼠血清检测中和滴度。第 7 周时,中和滴度最高的一只小鼠通过尾静脉加强免疫 7.5ug GI.1 病毒样颗粒。3 天后,取小鼠脾脏用于制备杂交瘤细胞。

[0164] 2 杂交瘤细胞株的制备和筛选

[0165] 小鼠尾静脉加强免疫 3 天后,取小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 通过 PEG1500 融合,制备杂交瘤细胞。9 天之后,通过酶联免疫吸附试验筛选特异性分泌针对 GI.1 病毒样颗粒的抗体。简言之,GI.1 病毒样颗粒包被 96 孔板,每孔 100ng,4℃ 包被过夜,用含有 5% 脱脂牛奶的 PBST 封闭,每孔加 50ul 杂交瘤培养液在 37℃ 孵育 2 小时,接着用 HRP 标记的二抗(sigma)孵育 1 小时,最后进行显色反应,读取 OD450 的吸光值。

[0166] 3 腹水制备和抗体纯化

[0167] 雌性 Balb/c 小鼠腹腔注射 500ul 液体石蜡油,两周后,每只小鼠腹腔注射 30 万个杂交瘤细胞。7 天后,12 号针头收集腹水,10,000rpm 离心 10min,去除上层油脂和下层沉淀,取澄清的腹水进行抗体纯化。根据说明书,利用 HiTrap HiTrapTM Protein G 亲和柱(GE health care)纯化腹水获得抗体。

[0168] 4 酶联免疫吸附实验鉴定单克隆抗体

[0169] 用每孔 100ng GI.1 或 GII.4 病毒样颗粒 4℃ 过夜包被 96 孔 Elisa 板,鉴定单抗的结合能力。Elisa 板经含 5% 脱脂牛奶的 PBST 在 37℃ 封闭 1 个小时后,按每孔 50ul 将不同浓度(5ug/ml、2.5ug/ml、1.25ug/ml 和 0.625ug/ml)加入单抗 37℃ 孵育 2 小时,接着用 HRP 标记的抗鼠二抗进行孵育,最后读取吸光值 OD450。

[0170] 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 western blot 分析

[0171] 蛋白样品与 SDS-PAG 上样缓冲液混合后,煮沸处理 10min,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白样品。通过考马斯亮蓝染色显示蛋白条带或者将蛋白转移到 PVDF 膜上进行 western blot 分析。单克隆抗体按最终浓度 1ug/ml 稀释到含 1% 脱脂牛奶的 PBST 中。鼠抗 GI.1 病毒样颗粒多克隆抗体 1:1000 稀释使用,接着用 HRP 标记的鼠二抗(sigma)进行孵育,最后用 LAS-400 发光图像分析仪进行记录。

[0172] 6 兔抗 GI.1 病毒样颗粒或 GII.4 病毒样颗粒多克隆抗体的制备

[0173] GI.1 病毒样颗粒或 GII.4 病毒样颗粒与弗氏完全佐剂等体积混合充分乳化,皮下注射健康兔子 150ug/只。3 周和 6 周后将 150ug 的 GI.1 病毒样颗粒或 GII.4 病毒样颗粒与等量弗氏不完全佐剂混合,充分乳化后进行加强免疫。最后一次免疫后 2 周收集血

清,分装后 -80°C 保存备用。

[0174] 7 夹心 Elisa 检测 GI.1 和 GII.4 病毒样颗粒

[0175] 分别用兔抗 GI.1 病毒样颗粒的多克隆抗体(制备方法同上)和兔抗 GII.4 病毒样颗粒的多克隆抗体(制备方法同上)1:5000 稀释度(50ul/孔)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被 96 孔 Elisa 板,Elisa 板经含 5%脱脂牛奶的 PBST 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 个小时后,将病毒样颗粒加入 Elisa 板中,40ng/50ul/孔始起,2 倍比稀释 12 个浓度,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 个小时,然后将病毒样颗粒特异的单抗 10ng/50ul/孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时,接着用 HPR 标记的鼠二抗进行孵育,最后读取吸光值 OD450。

[0176] 8 体外替代中和实验

[0177] 用 10ug/ml 的猪胃粘液素 III (PGM) (上海远慕生物科技有限公司) (50ul/孔) 室温包被 96 孔 Elisa 板,Elisa 板经含 5%脱脂牛奶的 PBST 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜后备用。将 GI.1 病毒样颗粒特异性单抗 4ug/ml 始起,2 倍比稀释 12 个梯度,与等体积 0.5ug/ml 的 GI.1 病毒样颗粒室温孵育 1 个小时后加到包被有 PGM 的 96 孔 Elisa 板上,室温孵育 1 个小时,然后加入兔抗 GI.1 病毒样颗粒的多克隆抗体(制备方法同上)1:1000 稀释液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时,接着用 HPR 标记的兔二抗(sigma) 进行孵育,最后读取吸光值 OD450。

[0178] 9 单克隆抗体的基因序列扩增及表达载体的构建

[0179] 先将杂交瘤细胞株的细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA,然后按照 5' RACE 试剂盒说明书扩增出重链和轻链全长基因。利用 PCR 扩增的方法在重链和轻链的 5' 端和 3' 端分别引入 HindIII 和 EcoRI 酶切位点,并将扩增出来的重链和轻链全的基因分别克隆到 pGEM-T(Promage) 中,筛选出阳性克隆测序,然后将序列正确的克隆用 HindIII 和 EcoRI 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳纯化出目的片段后,与同酶切的质粒 pcDNA3.1 (Promage) 用 T4DNA 连接酶连接,构建成真核表达载体 pcDNA3.1-(m4H12H) 和 pcDNA3.1-(m4H12L)。

[0180] 10 单克隆抗体基因的重组表达鉴定

[0181] 利用脂质体的方法共转染 pcDNA3.1-(m4H12H) 和 pcDNA3.1-(m4H12L) 到 CHO 细胞,72 小时后收取培养上清进行分析,采用 ELISA 确定培养上清中的抗体的表达:用 GI.1 病毒样颗粒包板,用含 5%牛奶的 PBST 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 小时,加入不同稀释度的待测培养上清 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时,接着用 HRP 标记的抗鼠 IgG 二抗进行孵育,最后读取吸光值 OD450。

[0182] 实施例 1 分泌 GI.1 特异抗体的杂交瘤细胞的筛选

[0183] 免疫了 GI.1VLP 小鼠的脾脏细胞用来制备杂交瘤细胞。通过 Elisa 实验筛选杂交瘤细胞上清,从而获得能够分泌具有结合病毒能力的杂交瘤细胞株。最终,六株单抗被筛选出来,他们都能够结合 GI.1VLP。亚型鉴定显示,1F7、2E12、4H12 和 9C2 属 IgG1,6B71 和 7H7 分别属 IgG2b 和 IgG2a。

[0184] 表 1. 分泌单抗的杂交瘤细胞株鉴定

[0185]

杂交瘤细胞株	重链	轻链	与 GI.1VLP 结合能力*
1F7	IgG1	kappa	+++
2E12	IgG1	kappa	+++

4H12	IgG1	kappa	+++
6B7	IgG2b	kappa	+++
7H7	IgG2a	kappa	+++
9C2	IgG1	kappa	++

[0186] 用于分析的样品均为 50u1 杂交瘤培养细胞。

[0187] *,+ :OD450 > 0.15 ;++ :OD450 > 0.3 ;+++ :OD450 > 0.5。

[0188] 实施例 2 抗 GI.1 单抗的特异性分析

[0189] 首先通过 SDS-PAGE 鉴定从腹水中纯化的 GI.1 单抗的纯度和完整性。图 1 显示了六种单抗的重链和轻链分别为 50KD 和 25KD 左右。接着,通过 Elisa 方法检测了单抗与不同抗原的反应活性,包括 GI.1 病毒样颗粒和 GII.4 病毒样颗粒。图 2 显示 1F7、2E12、4H12 和 9C2 可以特异性识别 GI.1VLP,不存在与 GII.4 病毒样颗粒的交叉反应,而有些单抗(如 6B7 和 7H7)同时识别 GI.1 病毒样颗粒和 GII.4 病毒样颗粒,无法特异性识别 GI.1 病毒。

[0190] 最后,通过 Western blot 分析单抗与 GI.1 的结合情况,图 3 显示,6 种抗体均不识别变性后的 GI.1 病毒样颗粒,提示这 6 种单抗识别的表位是构象表位。

[0191] 实施例 3 基于单抗的夹心 Elisa 可以特异灵敏地检测到 GI.1 和 GII.4 病毒样颗粒

[0192] 通过夹心 Elisa 测定对单抗对病毒样颗粒的最低检出限度。图 4 显示了 1F7、2E12、4H12、6B7、7H7 和 9C2 六种单抗均可特异灵敏地检测到 GI.1 病毒样颗粒,最低检出限度(当 OD450 > 0.15 时,判为阳性)分别为 :0.3125ng、0.15625ng、0.15625ng、0.3125ng、0.625ng、0.625ng。

[0193] 实施例 4 单克隆抗体的潜在中和活性

[0194] 组织血型抗原 (HBGA) 是表达与粘膜组织和红细胞上的糖类,是诺如病毒感染所需的受体。HBGA 的结合抑制试验被广泛用作为抗体介导的诺如病毒的替代中和试验。猪胃粘液素 III (PGM) 中含有 HBGA,已经被验证可以用于替代中和试验^[2]。通过替代中和试验分别对 1F7、2E12、4H12、6B7、7H7 和 9C2 六种单抗的潜在中和活性进行检测。图 5 显示,仅单抗 2E12 和 4H12 对 GI.1 具有潜在中和活性,它们阻止病毒样颗粒与 PGM 结合的 EC50 分别是 :1.831ug/ml 和 0.5965ug/ml。结果表明,4H12 单抗显示了及其优异的对 GI.1 的中和活性,要远优于其它的抗体株。

[0195] 实施例 5 单克隆抗体的基因序列分析

[0196] 克隆出来的 4H12 的单抗的重链和轻链序列如下(其中,单下划线部分为信号肽序列,斜体部分为可变区序列,虚线下划线为恒定区序列):

[0197] 4H12 单抗重链核苷酸序列:

[0198] atgggcaggccttacttcttcattcctgctactgattgtccctgcatatgtcctgtcc *caggtt*

*actctgaaagagtctggeccctgggatattgcagcccteccagaccctcagctctgacttgttctttct
ctgggttttcaactgagcacttctgggatgggtgtaggctggattcgtcagccatcaggggaagggtct
ggaatggctggcacacatttgggtgggatgatgtcaagcgtataaccagccctgaagagccgactg
actatctccaaggatacctccagcagccagggttttctcaccatcgccagtgtggacactacagata
ctgccacatactactgtactcgatctaactatgattaacgacccgttttcttactggggccaaggga
tctggteactgtctctgcagccaaaacgacacccccatctgtctatecactggccccctggatctgct
gccccaaactaactccatgggtgaccctgggatgccctgggtcaagggtatttccctgagccagtgacag
tgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctctgacct
ctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcaccctggcccagcagaccgtcaccctgcaac
gttggccaccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgcccagggtattgtggttgaagc
cttgcataatgtacagctccagaagtatcctgtcttctcttccccccaaagcccaaggatgtgct
caccattactctgactcctaaggtcacgtgtgttggtagacatcagcaaggatgatcccagggtc
cagttcagctgggtttagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaacccccgggaggagcagt
tcaacagcactttccgetcagtcagtgaaacttccatcctgaccaggactggctcaatggcaagga
gttcaaatgcagggtcaacagtcagcttccctgcccccatcgagaaaaccatccccaaaaccaa
ggcagaccgaaggctccacaggtgtacaccattccaceteccaaggagcagatggccaaggataaag
tcagctctgacctgcatgataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaacgg
gcagccagcggagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttacttctgtctac
agcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggeaggaaatactttcacttgetctgtgttacatg
agggectgcacaaccaccatactgagaagagcctctccactctctctggtaaa (SEQ ID NO. :2)*

[0199] 4H12 单抗重链氨基酸序列：

[0200]

MGRLTSSFLLLIVPAYVLS QVTLKESGPGILQPSQTLSSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWRQPSG

*KGLEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLTIASVDTTDTATYYCTRSNYDYDPFPYWG
QGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
SDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPK
DVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN
GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQ
WNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK*

[0201] (SEQ ID NO. :3)

[0202] 4H12 单抗轻链核苷酸序列：

ATGGAATTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGGTAATCAGTGCCTCAGTTGCATTGTCCAGAG
GA GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAAAAGGTCACCTTGA

CCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAACCTCCCGTTACTTGCCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGTGCCTC
CCCCAAACTCTGGATTTCTGGCACATCCAACCTGGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGT
GGCTCTGGGACCTCTTACTCTCTAACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACT
GCCAGCAGTTCAGTGGTTACCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGA
TGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTC
GTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAAC
GACAAAATGGCGTCCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAG
CACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATAACCTGTGAGGCCACTCACAAAG
ACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO. :4)

[0204] 4H12 单抗轻链氨基酸序列：

[0205] MDFLVQIFSFLVISASVALSRG ENVLTQSPAIMASLGEKVTLTCRASSSVTSRYLHWYQQKS
GASPKLWISGTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQFSGYPFTFGSGTKLEIK
RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFYPKDIVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS
MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO. :5)

[0206] 进一步分析 4H12 单抗重链可变区和轻链可变区序列,4H12 单抗重链可变区氨基酸如下(下划线标注的为重链 CDR 区)：

[0207] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRL
TISKDTSSSQVFLTIASVDTTDTATYYCTRSNYDYDPFPYWGQGLVTVSA

[0208] (SEQ ID NO. :6)

[0209] 上述重链可变区属于 IGHV8 亚群。

[0210] 4H12 单抗轻链可变区氨基酸如下(下划线标注的为重链 CDR 区)：

[0211] ENVLTQSPAIMASLGEKVTLTCRASSSVTSRYLHWYQQKSGASPKLWISGTSNLASGVPARFSGSGSG
TSYSLTISSVEAEDAATYYCQQFSGYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO. :7)

[0212] 上述轻链可变区属于 IGKV4 亚群。

[0213] 各 CDR 区氨基酸序列和核苷酸序列总结于表 2。

[0214] 表 2

[0215]

	氨基酸序列	SEQ ID NO. :	核苷酸序列	SEQ ID NO. :
重链 CDR1	SFSGFSLSTSGMGV	8	TCTTTCTCTGGGTTTCACTGAGC ACTTCTGGTATGGGTGTAGGC	11

[0216]

重链 CDR2	HIWDDVKRYNPALKS	9	CACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCGC TATAACCCAGCCCTGAAGAGC	12
重链 CDR3	TRSNYDYDPPFY	10	ACTCGATCTAACTATGATTACGACCC GTTTCCTAC	13
轻链 CDR1	RASSSVTSRYLH	14	AGGGCCAGCTCAAGTGTAAGT TCCCGTTACTTGAC	17
轻链 CDR2	GTSNLAS	15	GGCACATCCAACCTGGCTTCT	18
轻链 CDR3	QQFSGYPFT	16	CAGCAGTTCAGTGGTTACCCATTACAG	19

[0217] 实施例 6 单克隆抗体基因的重组表达及鉴定

[0218] 为了验证所克隆出的 4H12 单抗的基因是否正确,将重链和轻链的编码序列分别插入到 pcDNA3.1 中,构建表达载体 pcDNA3.1-(m4H12H) 和 pcDNA3.1-(m4H12L),然后共转染 CHO 细胞,并通过 ELISA 检测细胞上清中是否有特异性结合 GI.1 病毒样颗粒的抗体存在。图 6 显示,表达 4H12 单抗序列的细胞上清有很高的结合信号,而且与上清的稀释倍数相关;而没有转染相关质粒的对照细胞的上清不管是否稀释都没有结合信号。该结果说明了本发明的 4H12 单抗能够成功地在宿主细胞中表达。

[0219] 讨论

[0220] 本发明获得了具有良好中和活性的抗体 4H12,该抗体可以用来发展人源化治疗性单克隆抗体药物或用于特异性检测诺如病毒 GI.1。本发明所获得的单抗 4H12 通过夹心 Elisa 可检测到 GI.1 病毒样颗粒的最低限度为 0.15635ng,具有极高的灵敏度。而且,本发明的单抗 4H12 显示了针对诺如病毒 GI.1 的显著的潜在中和活性,因而能够用于制备治疗或预防诺如病毒 GI.1 的药物。

[0221] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0222] 参考文献:

[0223] 1. Xi, J. A., et al., Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein. *Journal of Virology*, 1992. 66(11):p. 6527-6532.

[0224] 2. Lindesmith, L. C., et al., Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog*, 2012. 8(5):p. e1002705.

[0001]

序列表

<110> 中国科学院上海巴斯德研究所

<120> 抗诺如病毒GI.1型鼠源单克隆抗体的制备和应用

<130> P2015-0468

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 528

<212> PRT

<213> 诺如病毒GI.1

<400> 1

```

Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser Gly Ala
1           5           10           15
Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala Met Asp
           20           25           30
Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln Val Asn
           35           40           45
Pro Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gln Gly
           50           55           60
Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Val Leu Phe Asp
           65           70           75           80
Leu Ser Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Leu His Leu Ser Gln
           85           90           95
Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Met Leu Ala
           100          105          110
Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Val Ser Cys Ile Pro Pro
           115          120          125
Gly Phe Gly Ser His Asn Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu Phe Pro
           130          135          140
His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Ile Glu Val Pro Leu
           145          150          155          160
Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Arg Asn Gln Gln
           165          170          175
Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr Gly Gly
           180          185          190
Gly Thr Gly Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Met Thr Cys Pro
           195          200          205
Ser Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Gln
           210          215          220
Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser Leu Ser
           225          230          235          240
Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser Pro Asp
           245          250          255
Asn Val Gln Ser Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly
           260          265          270
Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala Lys Ile
           275          280          285
Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu Asp Gly

```

[0002]

290	295	300
Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe Pro Asp		
305	310	315
Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly His Ser		
	325	330
Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe Val Pro		
	340	345
His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn Tyr Val		
	355	360
Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly Ser Gln		
	370	375
Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr Glu Ala		
385	390	395
Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Val Leu		
	405	410
Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn Leu Pro		
	420	425
Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu Gln Ala		
	435	440
Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp Thr		
	450	455
Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe Leu Thr		
465	470	475
Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro Ile Asn		
	485	490
Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu Lys		
	500	505
Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu Arg Arg		
	515	520
		525

- <210> 2
- <211> 1389
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 2

```

atgggcagge ttacttette attoctgeta ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcccag      60
gttactctga aagagtctgg cctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact      120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggetg gattctgcag      180
ccatcaggga agggctcggg atggetggca cacatttggg gggatgatgt caagegetat      240
aaccagccc tgaagagccg actgactatc tccaaggata cctccagcag ccaggttttc      300
ctcaccatcg ccagtgtgga cactacagat actgcccact actactgtac tcatctaac      360
tatgattacg acccgtttcc ttaactggggc caagggactc tggtaactgt cctctcagcc      420
aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gcccttggat ctgctgccc aactaactcc      480
atggtgacc tgggatgcct ggtaagggc tatttccctg agccagtac agtgactgg      540
aactctggat cctgtccag cgggtgtcac accttccag ctgtcctgca gcttgacete      600
tacaacttga gcagctcagt gactgtcccc tccagacct ggeccagega gaccgtcacc      660
tgeaacgttg cccaecggc cagcagcacc aaggtggaca agaaaattgt gcccagggat      720
tgtgtgtgta agcettgcat atgtacagtc ccagaagat catctgtctt catcttcccc      780
ccaagccca aggatgtgt caccattact ctgactccta aggtcaagtg tgttgggta      840
gacatcagca aggatgatec ctaggtccag ttcagetggt ttgtagatga tgtggaggtg      900
cacacagetc agacgaacc cgggaggag cagttaaca gcactttccg ctcagtcagt      960
gaacttccca tcatgacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaatg cagggtcaac     1020

```

[0003]

```

agtgagcgtt tccctgcccc catcgagaaa accatcccga aaaccaaagg cagaccgaag 1080
getccacagg tgtacacat tccacctccc aaggagcaga tggccaagga taagtcaagt 1140
ctgacctgca tgataacaga cttcttccct gaagacatta ctgtggagtg gcagtggaac 1200
gggcagccag eggagaacta caagaacaet cagcccatac tggacacaga ttgctcttac 1260
ttctctfaca geaagetcaa tgtgcagaag agcaactggg aggcaggaaa tactttcacc 1320
tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac caccatactg agaagagcct ctcccactet 1380
cctggtaaa 1389
<210> 3
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 3
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
85 90 95
Ser Gln Val Phe Leu Thr Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Asn Tyr Asp Tyr Asp Pro Phe Pro Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro
130 135 140
Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser
145 150 155 160
Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr
195 200 205
Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala
210 215 220
His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp
225 230 235 240
Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val
245 250 255
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr
260 265 270
Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu
275 280 285
Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln
290 295 300
Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser

```

[0004]

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110
 Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 130 135 140
 Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
 145 150 155 160
 Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
 165 170 175
 Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
 180 185 190
 Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
 195 200 205
 Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
 210 215 220
 Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235
 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 6
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Thr Arg Ser Asn Tyr Asp Tyr Asp Pro Phe Pro Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120
 <210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 7
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp

[0006]

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

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 8

Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 9

His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 10

Thr Arg Ser Asn Tyr Asp Tyr Asp Pro Phe Pro Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 11

tccttctctg ggttttcaact gacacttct ggtatgggtg taggc 45

<210> 12
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 12

cacatttggg gggatgatgt eaagcgtat aacceagccc tgaagagc 48

<210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 13

actgatcta actatgatta cgaccggtt cettac 36

<210> 14
 <211> 12
 <212> PRT

[0007]

<213> 人工序列
 <400> 14
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Ser Arg Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 15
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 16
 Gln Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 17
 agggccagct caagtgtaac itcccgttac ttgcac 36
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 18
 ggcacatcca acttggettc t 21
 <210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 19
 cagcagttca gtggttacc attcag 27
 <210> 20
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒GIL.4
 <400> 20
 Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala Ala Asn Leu
 1 5 10 15
 Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val Val Gly
 20 25 30
 Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile Asp Pro
 35 40 45
 Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe Thr Val
 50 55 60
 Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro Leu Gly
 65 70 75 80

[0008]

Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr Asn Gly
 85 90 95
 Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn Ala Phe
 100 105 110
 Thr Ala Gly Lys Val Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe Pro Thr
 115 120 125
 Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile Val Val
 130 135 140
 Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp Val Arg
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Pro Thr Ile Lys Leu
 165 170 175
 Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly Asp Asp
 180 185 190
 Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp Phe
 195 200 205
 Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr Lys Pro
 210 215 220
 Phe Ser Val Pro Val Leu Thr Val Glu Glu Met Thr Asn Ser Arg Phe
 225 230 235 240
 Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Phe Thr Gly Pro Ser Ser Ala Phe Val
 245 250 255
 Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Thr Gln Leu Ser Pro Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly Asp Val
 275 280 285
 Thr His Ile Thr Gly Ser Arg Asn Tyr Thr Met Asn Leu Ala Ser Gln
 290 295 300
 Asn Trp Asn Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro Leu Gly
 305 310 315 320
 Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Val Leu Thr Gln Thr Thr
 325 330 335
 Arg Thr Asp Gly Ser Thr Arg Gly His Lys Ala Thr Val Tyr Thr Gly
 340 345 350
 Ser Ala Asp Phe Ala Pro Lys Leu Gly Arg Val Gln Phe Glu Thr Asp
 355 360 365
 Thr Asp His Asp Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Phe Thr Pro Val
 370 375 380
 Gly Val Ile Gln Asp Gly Ser Thr Thr His Arg Asn Glu Pro Gln Gln
 385 390 395 400
 Trp Val Leu Pro Ser Tyr Ser Gly Arg Asn Thr Pro Asn Val His Leu
 405 410 415
 Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu Phe Phe
 420 425 430
 Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asp Leu Asp
 435 440 445
 Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln Tyr Phe Tyr Gln Glu Ala Ala
 450 455 460
 Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro Asp Thr
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr Val Thr

[0009]

				485					490					495	
Val	Ala	His	Thr	Gly	Gln	His	Asp	Leu	Val	Ile	Pro	Pro	Asn	Gly	Tyr
				500					505					510	
Phe	Arg	Phe	Asp	Ser	Trp	Val	Asn	Gln	Phe	Tyr	Thr	Leu	Ala	Pro	Met
				515					520					525	
Gly	Asn	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg	Ala	Leu						
				530					535						

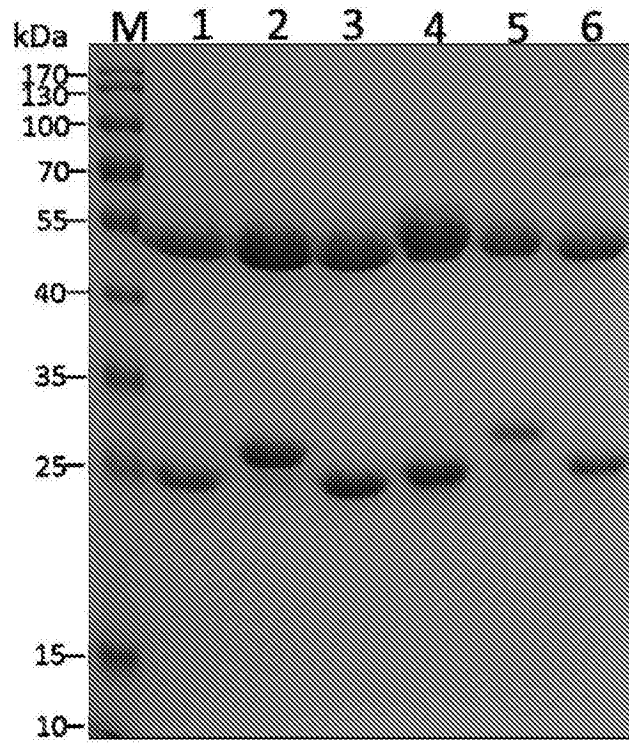


图 1

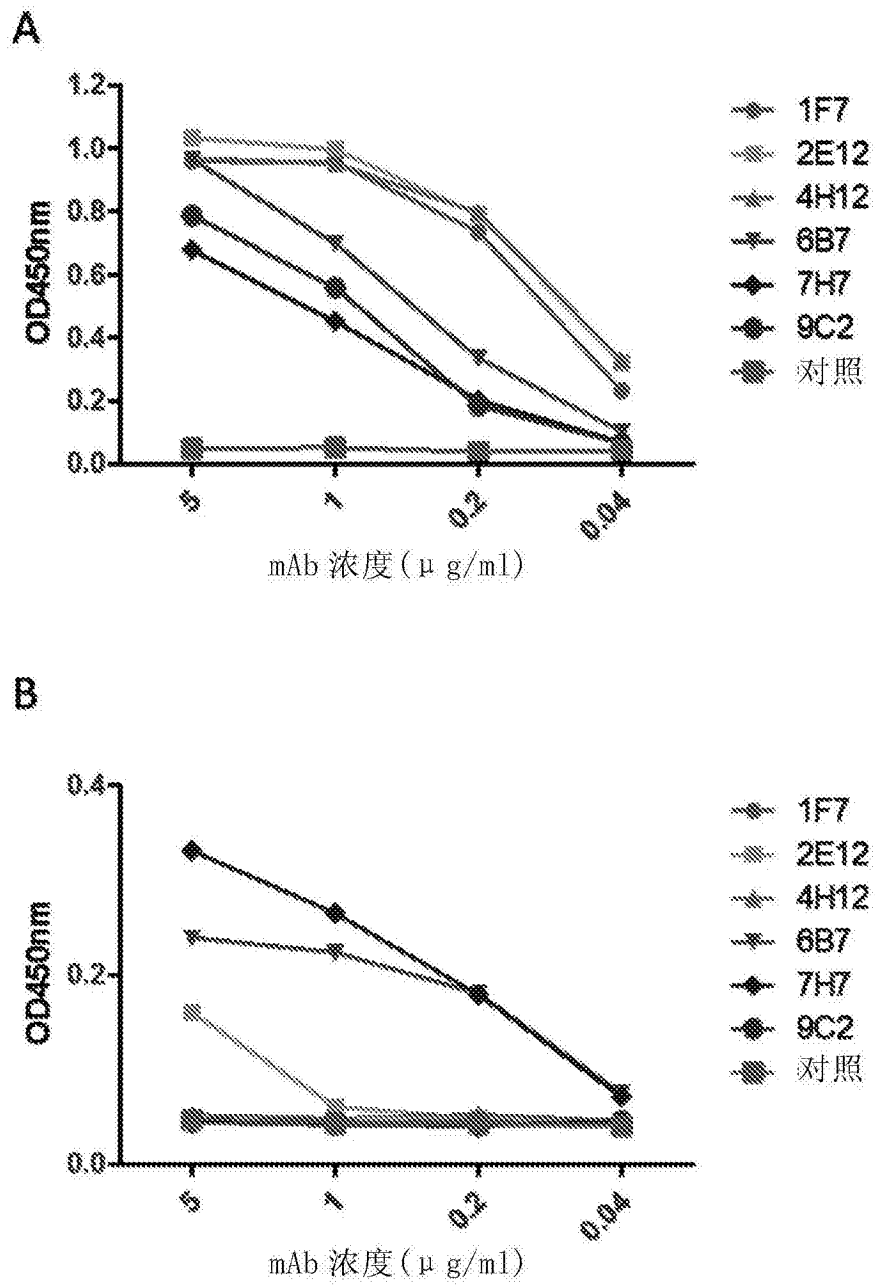


图 2

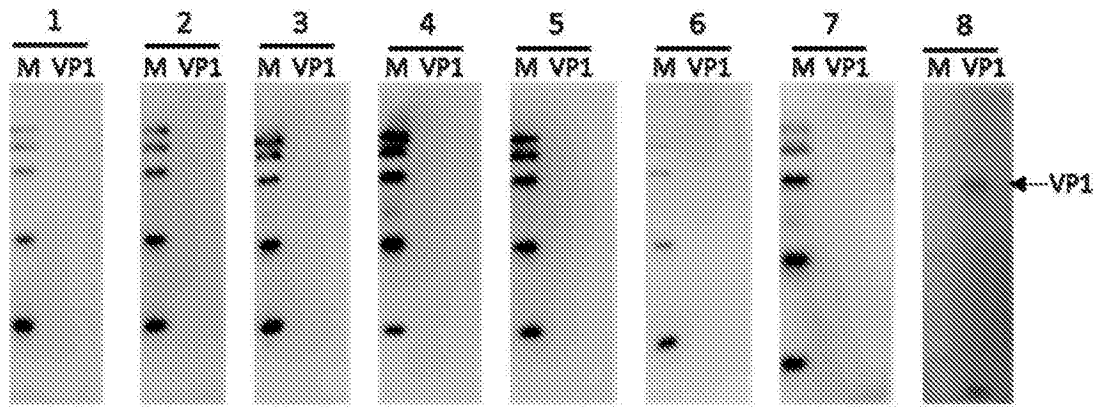


图 3

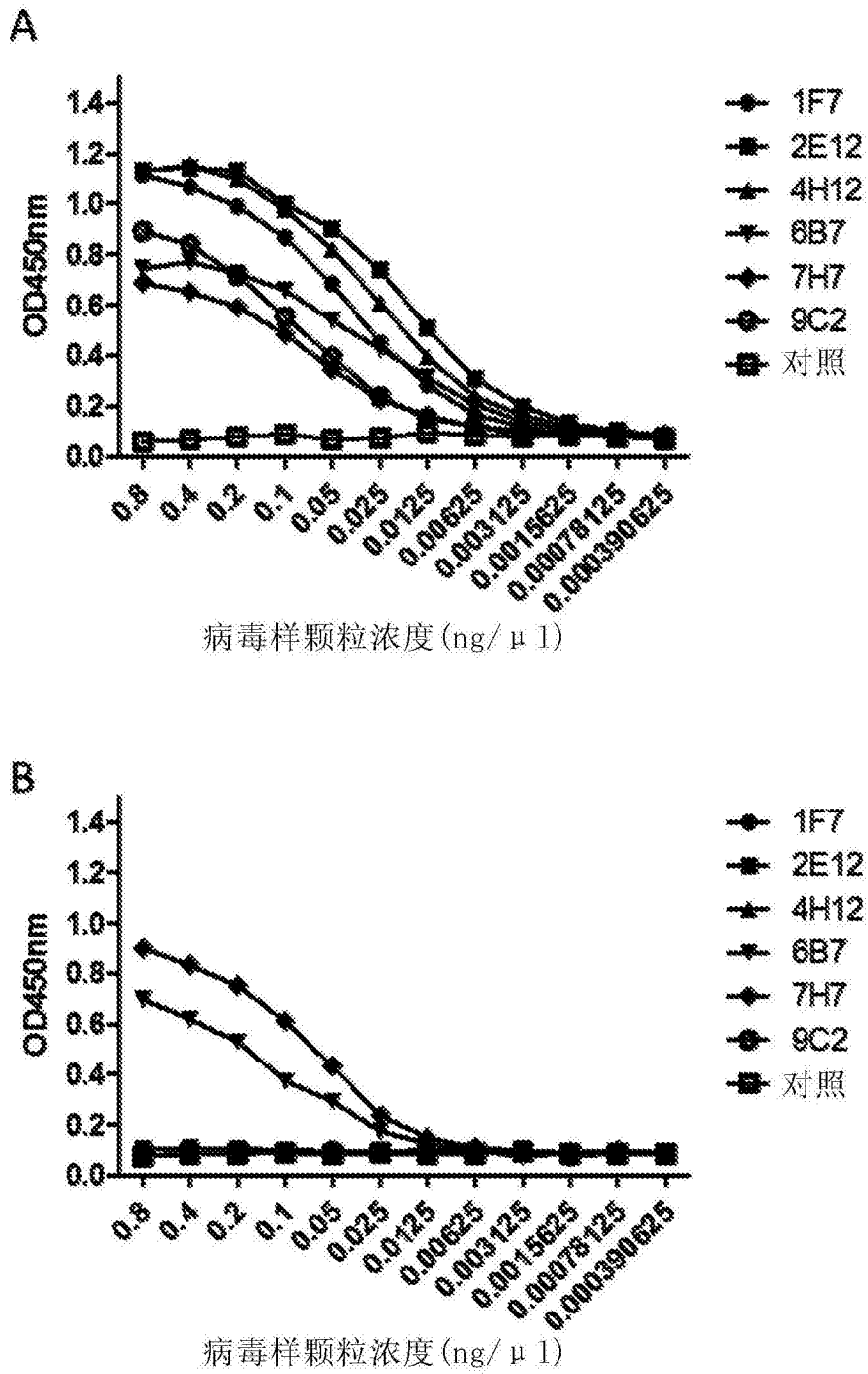


图 4

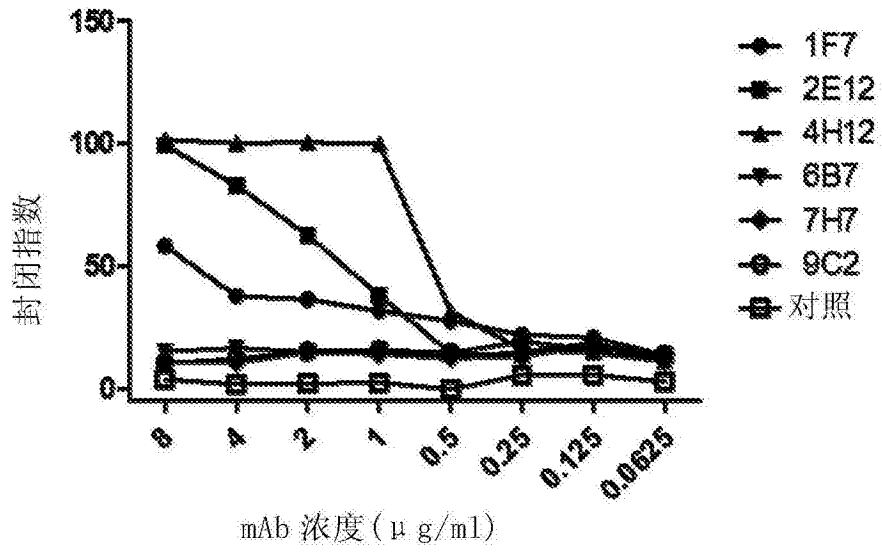


图 5

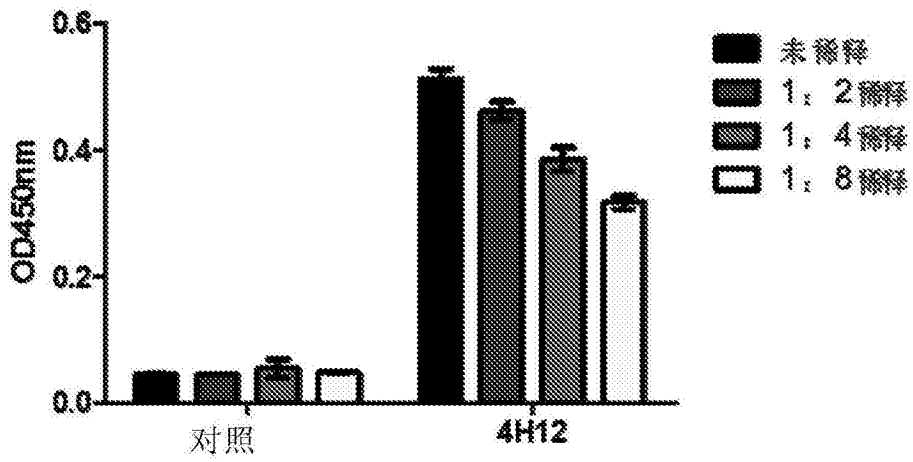


图 6