



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115160433 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202210747403.7

(22) 申请日 2022.06.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115160433 A

(43) 申请公布日 2022.10.11

(73) 专利权人 吉林大学
地址 130000 吉林省长春市南关区人民大街5988号
专利权人 北京安奇生物医药科技有限公司

(72) 发明人 刘镇宁 李玉敏 章文羿 黄清瑞
程焕义 刘宗明 王丽

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470
专利代理师 陈伟

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

审查员 陈晋

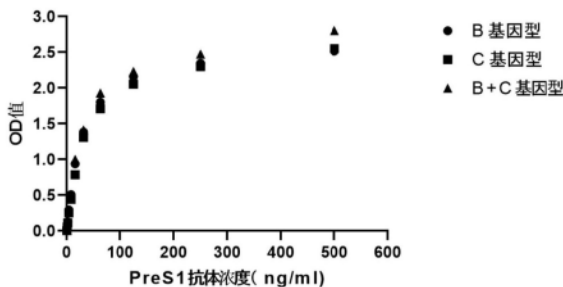
权利要求书1页 说明书13页
序列表8页 附图2页

(54) 发明名称

人源化HBV B和C基因型前S1蛋白抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种乙型肝炎病毒前S1蛋白抗体及其制备方法和应用,属于生物医药领域。本发明联合Balb/c小鼠抗原免疫、外周血单个核细胞(PBMC)分离技术、B细胞单克隆测序、PCR和Gibson质粒连接技术,构建重组抗体表达质粒,并通过转染HEK293F细胞获得了人源化Fc区段的HBV PreS1抗体。本发明所述的HBV PreS1抗体可用于乙型肝炎的预防、治疗或检测,为乙型肝炎的预防、治疗或检测提供了一种新的思路。



1. 一种HBV PreS1抗体,其特征在于:所述的抗体包含:如SEQ ID NO:1所示的HCDR1,如SEQ ID NO:2所示的HCDR2,如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和如SEQ IDNO:6所示的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于:所述的抗体包含:

(1)、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区VH;和/或包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区VL;

(2)、与(1)中VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH;和/或,与(1)中VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL;

(3)、与(1)中VH相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VH;和/或,与(1)中VL相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VL;所述的置换是保守置换。

3. 根据权利要求2所述的抗体,其特征在于:所述的抗体包含:

(1) 包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链HC;和/或包含SEQ IDNO:10所示的氨基酸序列的轻链LC;

(2) 重链和轻链,其中,与(1)中的重链HC和轻链LC相比,所述重链具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;和/或,所述轻链具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于:所述的抗体包括全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、双特异性抗体和/或多特异性抗体,或由所述的抗体制得的单克隆抗体和/或多克隆抗体。

5. 编码权利要求1-4任一项所述的抗体的核酸分子。

6. 一种包含权利要求5所述的核酸分子的载体。

7. 一种包含权利要求5所述的核酸分子或权利要求6所述的载体的宿主细胞。

8. 一种抗体衍生物,其特征在于:所述的抗体衍生物包含权利要求1-4任一项所述的抗体和可检测的标记分子。

9. 一种抗体药物偶联物,其特征在于:所述的抗体药物偶联物包括抗体部分和偶联部分,所述抗体部分包含权利要求1-4任一项所述的抗体,所述偶联部分包括可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合,所述抗体部分和偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

10. 权利要求1-4任一项所述的抗体、权利要求5所述的核酸分子、权利要求6所述的载体、权利要求7所述的宿主细胞、权利要求8所述的抗体衍生物、和/或权利要求9所述的抗体药物偶联物在制备用于预防和/或治疗乙型肝炎疾病的药物、试剂盒和/或给药装置中的应用。

人源化HBV B和C基因型前S1蛋白抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种人源化乙型肝炎 (HBV) 病毒B基因型和C基因型前S1蛋白抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 乙型肝炎 (hepatitis B) 是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的以肝脏病变为主的一种传染病。临床上以食欲减退、恶心、上腹部不适、肝区痛、乏力为主要表现,部分患者有黄疸发热和肝大伴有肝功能损害,还有些患者存在慢性肝炎,甚至发展成肝硬化,少数可发展为肝癌。乙型肝炎的治疗通常包括抗病毒治疗 (例如给予干扰素、拉米夫定、泛昔洛韦等抗病毒药物进行治疗),免疫调节剂治疗 (例如采用胸腺素或免疫核糖核酸等进行治疗),导向治疗 (例如基因治疗等),护肝药物 (例如促肝细胞生长素、水飞蓟宾或甘草酸二铵等药物治疗),及中药治疗 (例如茵陈、栀子、赤芍、丹参等中药) 等方法。

[0003] 乙型肝炎病毒为 (HBV) 属嗜肝DNA病毒科,属于有包膜的DNA病毒,基因组是双链、环形、不完全闭合DNA。病毒最外层是病毒的外膜或称衣膜,其内层为核心部分,核蛋白即是核心抗原,不能在血清中检出。HBV基因组全长约3.2Kb,共有4个开放读码框,第3个读码框架为HBsAg编码区S区,由前S1、前S2和S基因组成。有研究发现HBV通过前S1蛋白 (PreS1) 与肝细胞膜上的钠离子-牛磺胆酸-协同转运蛋白 (NTCP) 受体相结合侵入肝细胞中。血液中的PreS1抗体与肝细胞的损害和病毒清除相关:当人体感染HBV后,随着血液中PreS1抗体的出现,HBsAg及HBeAg消失,而HBsAg及HBeAg持续阳性患者血液中PreS1抗体阳性率低,在暴发性肝炎中存在高水平的PreS1抗体。因此,PreS1抗体可作为HBV被清除和感染趋于恢复,病情趋向好转的新标志。同时,开发针对HBVPreS1抗原的中和抗体进行HBV治疗也逐渐受到重视。基于上述原因,在临床诊断和治疗以及HBVPreS1抗体药物研发过程中,迫切需要进行HBVPreS1抗体的活性检测和表征,但是现阶段市场却没有统一的抗HBVPreS1抗体标准品。

[0004] 根据HBV全基因序列异质性 $\geq 8\%$ 或者S区基因序列异质性 $\geq 4\%$ 的标准,可将HBV分为9个主要的基因型,其中B基因型和C基因型是主要流行株,目前市场人源化HBV抗体基因型单一,不能较好的同时识别B基因型和C基因型,导致应用受限,甚至很多研发出的HBV抗体未曾考虑过基因型不同带来的抗体识别差异,如CN1569898A与CN1421531A公开的人源化HBV抗体均是来自于随机乙肝表面抗体阳性的健康人外周血单个核细胞的分离,制备的抗体基因型不确定并且不能覆盖多基因型的抗体检测。

[0005] 因此亟需开发一种可同时识别HBV B基因型和C基因型的乙型肝炎病毒前S1蛋白抗体,从而用于乙型肝炎的预防、治疗或检测。

发明内容

[0006] 针对上述不足,本发明首次提供了一种新的乙型肝炎病毒B基因型和C基因型前S1蛋白抗体 (HBV PreS1抗体) 及其制备方法和应用。本发明联合Ba1b/c小鼠抗原免疫、外周血单个核细胞 (PBMC) 分离技术、B细胞单克隆测序、PCR和Gibson质粒连接技术,构建重组抗体

表达质粒,并通过转染HEK293F细胞获得了人源化Fc区段的HBV PreS1抗体。本发明所述的HBV PreS1抗体可用于乙型肝炎的预防、治疗或检测,为乙型肝炎的预防、治疗或检测提供了一种新的思路。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一方面,本发明提供了一种HBV PreS1抗体。

[0009] 具体地,所述的抗体包含:如SEQ ID NO:1所示的HCDR1,如SEQ ID NO:2所示的HCDR2,如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,和/或如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0010] 进一步具体地,所述的抗体包含:

[0011] (1)、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区VH;和/或包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区VL;

[0012] 或者(2)、与(1)中VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH;和/或,与(1)中VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL;

[0013] 或者(3)、与(1)中VH相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VH;和/或,与(1)中VL相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VL;所述的置换是保守置换。

[0014] 进一步具体地,所述的抗体包含:

[0015] (1)包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链HC;和/或包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链LC;

[0016] 或者(2)重链和轻链,其中,与(1)中的重链和轻链相比,所述重链具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性;和/或,所述轻链具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0017] 进一步具体地,上述抗体包括嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

[0018] 进一步具体地,上述抗体包括全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、di-scFv、双特异性抗体、多特异性抗体、重链抗体和/或单域抗体,或由上述抗体制得的单克隆抗体和/或多克隆抗体。

[0019] 另一方面,本发明提供了一系列编码所述抗体的核酸分子。

[0020] 具体地,所述的核酸分子包含一种或多种经密码子优化的核酸分子。

[0021] 又一方面,本发明提供了一系列载体,所述的载体包含本申请所述的一个或多个核酸分子。

[0022] 具体地,所述的载体包括但不限于质粒、病毒、噬菌体。

[0023] 又一方面,本发明提供了一系列包含上述核酸分子或上述载体的宿主细胞。

[0024] 具体地,所述的宿主细胞包括但不限于微生物、植物或动物细胞,可通过本领域技术人员已知的方法将本发明所述的载体引入所述宿主细胞中,例如电穿孔、lipofectine转

染、lipofectamin转染等方法。

[0025] 又一方面,本发明提供了一种抗体衍生物,所述的抗体衍生物包含上述抗体和可检测的标记分子。

[0026] 具体地,所述的可检测的标记分子为酶(例如辣根过氧化物酶)、放射性核素、荧光染料、发光物质(如化学发光物质)或生物素。

[0027] 又一方面,本发明提供了一种抗体药物偶联物,所述的抗体药物偶联物包括抗体部分和偶联部分,所述抗体部分包含上述抗体,所述偶联部分包括但不限于可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合,所述抗体部分和偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

[0028] 又一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述的药物组合物包含上述抗体、核酸分子、载体、宿主细胞、抗体衍生物和/或抗体药物偶联物。

[0029] 具体地,所述的药物组合物还包含任选的药学上可接受的载体。

[0030] 进一步具体地,所述的药学上可接受的载体包括但不限于:稀释剂、赋形剂、填充剂、润湿剂、崩解剂、矫味剂和粘合剂。

[0031] 具体地,所述的药物组合物还包含组合治疗剂,所述的组合治疗剂包括但不限于化学治疗剂、放射治疗剂、免疫抑制剂、细胞毒性药物。

[0032] 又一方面,本发明提供了上述抗体的生产方法,所述的方法包括在使得所述抗体表达的情况下,培养上述宿主细胞。

[0033] 又一方面,本发明提供了所述的抗体、核酸分子、载体、宿主细胞、抗体衍生物、抗体药物偶联物和/或药物组合物在制备用于预防和/或治疗乙型肝炎疾病的药物、试剂盒和/或给药装置中的应用。

[0034] 又一方面,本发明提供了所述的抗体、抗体衍生物在制备HBV病毒检测试剂或试剂盒中的用途。

[0035] 又一方面,本发明提供了HBV病毒检测方法,利用上述抗体定性或定量分析检测HBV病毒,所述的检测方法用于非疾病诊断或治疗目的。

[0036] 又一方面,本发明提供了乙型肝炎的治疗方法,所述的治疗方法为向有需要的受试者施用有效量的上述抗体、抗体衍生物,抗体药物偶联物和/或药物组合物。

[0037] 又一方面,本发明提供了一种乙型肝炎药物,所述的药物包括所述的抗体、核酸分子、载体、宿主细胞、抗体衍生物、抗体药物偶联物和/或药物组合物。

[0038] 又一方面,本发明提供了一种试剂盒,所述的试剂盒包括所述的抗体、核酸分子、载体、宿主细胞、抗体衍生物、抗体药物偶联物和/或药物组合物,及任选地,说明书。

[0039] 与现有技术相比,本发明的积极和有益效果在于:

[0040] (1) 本发明首次提供了一种新的乙型肝炎病毒B基因型和C基因型前S1蛋白抗体(HBV PreS1抗体)。本发明联合Balb/c小鼠抗原免疫、外周血单个核细胞(PBMC)分离技术、B细胞单克隆测序、PCR和Gibson质粒连接技术,构建重组抗体表达质粒,并通过转染HEK293F细胞获得了人源化Fc区段的HBV PreS1抗体,所述的抗体具有较好的亲和力及结合活性。

[0041] (2) 本发明所述的HBV PreS1抗体可用于乙型肝炎的预防、治疗或检测,为乙型肝炎的预防、治疗或检测提供了一种新的思路。

附图说明

- [0042] 图1为抗原特异性B细胞的流式细胞分选结果图。
- [0043] 图2为PreS1抗体质粒图谱。
- [0044] 图3为PreS1抗体纯度鉴定的SDS-PAGE考马斯亮蓝染色结果图,其中,Lane M: Protein Marker,Lane 1:非还原处理,Lane 2:DTT还原处理。
- [0045] 图4为PreS1抗体分别与HBV PreS1 B基因型蛋白和C基因型蛋白结合的Western-blot结果图。
- [0046] 图5为PreS1抗体活性鉴定结果图。

具体实施方式

[0047] 下面结合具体实施例,对本发明作进一步详细的阐述,下述实施例不用于限制本发明,仅用于说明本发明。以下实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0048] 术语定义

[0049] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学用语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有的其他技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0050] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968,IUPAC-IUB委员会)中所述。

[0051] 本发明所述的“抗体”通常是指包含结合抗原部分的蛋白质,以及任选地允许结合抗原的部分采用促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或骨架部分。可典型地包含抗体轻链可变区(VL)、抗体重链可变区(VH)或上述两者。VH和VL区可进一步被区分为称为互补决定区(CDR)的高变区,它们散布在称为框架区(FR或FWR)的更保守的区域中。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的实例包括但不限于抗体、抗原结合片段(Fab,Fab',Fv片段,F(ab')₂,scFv,di-scFv和/或dAb)、免疫缀合物、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物、嵌合抗原受体或融合蛋白等,只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

[0052] 本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键链接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA、IgE,其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、 ϵ 链。同一类Ig根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可以分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 κ 链或 λ 链。

[0053] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL或LCVR)和重链可变区(VH或HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成,从氨基端到羧基端依

次排列的顺序为:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2和LCDR3,重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0054] 术语“互补决定区”(CDR)指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。通常每个重链可变区中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。CDR可根据本领域已知的各种编号系统确定,例如Kabat、Chothia或,AbM或IMGT编号系统。本发明中使用“Kabat编号规则”(参见Kabat等(1991))确定CDR的氨基酸序列边界。

[0055] 术语“构架区”或“FR”残基是指,抗体可变区中除了如上定义的CDR残基以外的那些氨基酸残基。

[0056] 术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”是指从基本上均质抗体的群里获得的抗体,即除可能的变体抗体外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同的表位。与通常包含针对不同决定簇的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此。“单克隆”是指从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。本发明所述的单克隆抗体可通过各种本领域技术人员已知的技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法及转基因方法等。

[0057] 术语“人源化单克隆抗体”是指将鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体,可以克服由于嵌合抗体携带大量鼠蛋白成分,从而诱导的异源性反应。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变(或回复突变),以保持活性。为制备人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人源框架序列(参见Winter的美国专利No.5,225,539;Queen等人的美国专利Nos.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370;以及Lo, Benny, K.C., editor, in *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004)。或者,还可以利用转基因动物,其能够在免疫后不产生内源性免疫球蛋白、并且能够产生完整人抗体库(参见例如, Jakobovits等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits等, 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggermann等, 1993, *Year in Immunology* 7:33; 和 Duchosal等, 1992, *Nature* 355:258; Lonberg等人(1994) *Nature* 368(6474):856-859; W002/43478)。其他抗体人源化改造的方法还包括噬菌体展示技术(Hoogenboom等, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks等, *J. Mol. Biol.* 1991, 222:581-597; Vaughan等, 1996, *Nature Biotech* 14:309)。

[0058] 术语“同一性”通常是指在比对序列后,查询序列中氨基酸残基或核苷酸与第二参考多肽序列或其部分中相同的残基所占百分比,必要时引入空位(GAPS)以实现最大序列同一性百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸/核苷酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域已知的各种方式来实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,例如BLAST, BLAST-2, ALIGN, NEEDLE或Megaalign(DNASTAR)。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。同一性百分比可以在整个确定的多肽/多核苷酸序列的长度上测定,或者可以在较短的长度上,例如在从较大的确定的多肽/多核苷酸序列中获得的片段的长度上测定。应当理解,在表,附图或序列表中,本文所示的序列所支持的任何片段长度可用于作为可测量同

一性百分比的长度。具有“%同一性”的序列保留与其比较或来源的序列的重要生物活性，如抗体结合特异性。具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列保留与其比较或来源的序列的重要生物活性，如抗体结合特异性。具有“%同一性”的核苷酸序列或相差不超过3、6、15、30或45个核苷酸的核苷酸序列能够实现与其比较或来源的核苷酸序列近似的功能，如所表达的蛋白都能特异地结合同一抗原或分子。

[0059] 术语“保守置换”指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似（例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等）的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 β 分支侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的（参见，例如，Brummell等人，*Biochem.* 32:1180-1187 (1993)；Kobayashi等人 *Protein Eng.* 12 (10) :879-884 (1999)；和Burks等人 *Proc. Natl Acad. Set USA* 94:412-417 (1997)，其通过引用并入本文）。

[0060] 术语“载体 (vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或P1来源的人工染色体 (PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

[0061] 术语“宿主细胞”，通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段的个体细胞、细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的、意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如COS细胞，中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，HeLa细胞，HEK293细胞，COS-1细胞，NS0细胞或骨髓瘤细胞）。在某些情形中，所述细胞可以是哺乳动物细胞。例如，所述哺乳动物细胞可以是CHOK1细胞。

[0062] 术语“药学上可接受的载体”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体，是本领域公知的（参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by

Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。例如, pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水, 水性缓冲液(如缓冲盐水), 醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如硫柳汞, 2-苯氧乙醇, 对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义, 其能够稳定药物中的活性成分的期望活性, 包括但不限于谷氨酸钠, 明胶, SPGA, 糖类(如山梨醇, 甘露醇, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 葡聚糖, 或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

[0063] 发明详述

[0064] 抗体

[0065] 本发明制备了HBV PreS1抗体, 该抗体通过免疫小鼠、分子生物学和抗体工程技术制备得到。

[0066] 在某些实施方式中, 本发明提供的抗原结合蛋白包括以下互补决定区: 如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:3所示的HCDR3, 和/或如SEQ ID NO:4所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2, 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0067] 在某些实施方式中, 本发明提供的抗原结合蛋白包含如下重链可变区VH和轻链可变区VL:

[0068] (1)、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区VH; 和/或包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区VL;

[0069] 或者(2)、与(1)中VH相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VH; 和/或, 与(1)中VL相比具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VL;

[0070] 或者(3)、与(1)中VH相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VH; 和/或, 与(1)中VL相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的VL; 所述的置换是保守置换。

[0071] 在某些实施方式中, 本发明提供的抗原结合蛋白包括如下重链HC和轻链LC:

[0072] (1) 包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链HC; 和/或包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链LC;

[0073] 或者(2)重链和轻链, 其中, 与(1)中的重链和轻链相比, 所述重链具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性; 和/或, 所述轻链具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0074] 在某些具体的实施方式中,本发明制备获得的HBV PreS1抗体包括下表1所述的重链及轻链的组合。

[0075] 表1.HBV PreS1抗体的序列特征

序列编号	HBV PreS1抗体
HCDR1	SEQ ID NO:1
HCDR2	SEQ ID NO:2
HCDR3	SEQ ID NO:3
LCDR1	SEQ ID NO:4
LCDR2	SEQ ID NO:5
LCDR3	SEQ ID NO:6
VH	SEQ ID NO:7
VL	SEQ ID NO:8
HC	SEQ ID NO:9
LC	SEQ ID NO:10

[0077] 抗体衍生物

[0078] 如上部分所述的本发明提供的抗体包括抗体片段或抗原结合片段,其可进行衍生化(例如被连接至另一个分子,例如另一个多肽或蛋白)。通常,抗体或其抗原结合片段的衍生化(例如,标记)不会对其与HBV病毒PreS1蛋白的结合产生不利影响。因此,本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如,可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接于一个或多个其它分子基团,形成检测试剂,药用试剂,和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽(例如,抗生物素蛋白或多组氨酸标签)。

[0079] 抗体药物偶联物

[0080] 抗体药物偶联物包括本发明提供的抗体部分以及偶联部分。抗体部分包括如上所述的“抗体”,以及在“抗体”基础上获得的抗原结合片段。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab,Fab',Fv片段,F(ab')₂,scFv,di-scFv和/或dAb等。偶联部分可以包含至少一个载荷药物。所述载荷药物可以包含药物活性物成分和/或前述的标记分子。载荷药物是一类具有药理学活性的小分子化合物或者毒素或其他药物分子形式,可以是但不局限于小分子化合物、毒素分子、寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合体(PROTAC)、亲和配体、荧光基团、核素基团等。

[0081] 核酸、载体、宿主细胞及抗体的制备

[0082] 本发明的抗体可通过本领域已知的各种方法来制备,例如通过基因工程重组技术来获得。例如,通过化学合成或PCR扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的DNA分子。将所得DNA分子插入表达载体内,然后转染宿主细胞。然后,在特定条件下培养转染后的宿主细胞,并表达本发明的抗体。

[0083] 在某些具体的实施方式中,本发明提供了分离的核酸分子,包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段、或其重链可变区和/或轻链可变区、或其一个或多个CDR的核苷酸序列。根据本领域已知的密码子简并性,在某些实施方案中,所述核苷酸序列是可以根据密码子简并性进行替换的。在某些实施方案中,所述核苷酸序列是密码子最优化的。

[0084] 在某些实施方式中,本发明提供了包含本发明的分离的核酸分子的克隆载体或表达载体。在某些实施方案中,所述的载体是例如质粒,粘粒,噬菌体,慢病毒等。在某些实施

方案中,所述的载体能够在受试者(例如哺乳动物,例如人)体内表达本发明的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,本发明提供了包含本发明的分离的核酸分子或本发明的载体的宿主细胞。宿主细胞可以是真核细胞(例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞)或原核细胞(例如大肠杆菌)。合适的真核细胞包括但不限于NS0细胞、Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞、和MDCKII细胞。适宜的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。在某些实施方案中,本发明的宿主细胞是哺乳动物细胞,例如CHO(例如CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44)。

[0085] 在某些实施方式中,本发明提供了制备本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括,在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养本发明的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0086] 本发明使用串联表达的HBV B基因型和C基因型PreS1蛋白作为抗原,制备了一种抗HBV B和C基因型的人源化PreS1抗体,并分别使用HBV B基因型PreS1和C基因型PreS1作为抗原对本发明制备的抗体进行活性验证,确定成功构建了识别HBVB基因型和C基因型的PreS1抗原的抗体。本发明包括以下技术方案:

[0087] 实施例1. 抗原免疫动物抗体制备

[0088] 一、Balb/c小鼠免疫和抗体滴度测定

[0089] 1. 小鼠免疫:从维通利化订购4-6周的Balb/c小鼠6只,饲养1周后,留取本底血浆。免疫抗原来自吉林大学与北京安必奇生物科技有限公司合作制备的串联表达的HBVB基因型和C基因型PreS1蛋白,HBV B基因型和C基因型核酸序列扩增引物设计分别参照已经发表的GeneBank序列库中核酸序列,B基因型病毒序列参考AB819611.1,C基因型病毒序列参考AB298720.1,利用Overlap PCR技术构建了HBVB基因型和C基因型PreS1抗原串联表达的pcDNA3.1(-)质粒,该质粒在HEK293F细胞中表达HBV B基因型和C基因型PreS1蛋白,相关方法在发明专利CN202110113419.8中已经详述。用B基因型和C基因型串联表达的HBVPreS1蛋白和从北京博奥龙有限公司购买的弗氏不完全佐剂按照体积比1:2混合充分乳化抗原,按照每只小鼠5 μ g的PreS1抗原用量对6只小鼠进行接种免疫,并间隔两周进行增强免疫。小鼠第三次免疫饲养一周后,对小鼠进行眼眶静脉取血,离心收集小鼠血浆。

[0090] 2. 小鼠抗体滴度检测:

[0091] 1) 酶标板制备:用磷酸盐缓冲溶液(PBS)稀释B、C基因型串联表达的HBVPreS1蛋白(抗原)至2 μ g/mL,按照100 μ L/孔包被96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜后,使用洗涤液(含0.05% Tween20的磷酸盐缓冲溶液)300 μ L/孔洗涤酶标板3次,去除未与酶标板结合的抗原;将含0.05% Tween20,2% BSA的磷酸盐缓冲溶液作为封闭液,按照200 μ L/孔加入酶标板孔中,37 $^{\circ}$ C封闭2h,弃去封闭液,使用洗涤液300 μ L/孔洗涤酶标板3次,4 $^{\circ}$ C保存酶标板备用;

[0092] 2) 样本检测:用含2% BSA、0.05% Tween20的PBS溶液作为样本稀释液,将采集的免疫前小鼠血浆用样本稀释液按照1:100稀释作为阴性对照;将待测血浆使用样本稀释液按照1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷、1:10⁸七个梯度进行稀释。将稀释好的阴性对照血浆和免疫后的血浆按照100 μ L/孔加入到包被抗原的酶标板孔中,37 $^{\circ}$ C孵育1h;使用洗涤液300 μ L/孔洗涤酶标板5次;将含0.05% Tween20,2% BSA的PBS作为二抗稀释液,将Abcam的HRP标记的羊抗鼠二抗(货号:ab97240)按照1:12000稀释后,100 μ L/孔加入到酶标板中,37 $^{\circ}$ C孵育30min;使用洗涤液300 μ L/孔洗涤酶标板5次;加入100 μ L/孔的TMB显色液,放置于37

℃下孵育15min,使用50μL/孔的2M稀硫酸终止反应。

[0093] 3) 抗体滴度计算:将反应后的酶标板,使用450nm的波长进行检测,当1:10⁸稀释的血浆检测OD值大于阴性血浆检测OD值时,则表明免疫后小鼠血浆中的抗体滴度高于10⁸,小鼠免疫成功,可进行后续实验。

[0094] 表2. 免疫第6周后Balb/c小鼠血清和健康Balb/c小鼠血清PreS1抗体滴度

血清 稀释倍数	OD450		
	免疫前 (3 复孔均值)	免疫 6 周后 (3 复孔均值)	P/N
1:10 ²	0.168	2.682	15.964
1:10 ³	0.147	2.140	14.558
[0095] 1:10 ⁴	0.119	1.654	13.899
1:10 ⁵	0.103	1.226	11.903
1:10 ⁶	0.113	0.871	7.708
1:10 ⁷	0.109	0.589	5.404
1:10 ⁸	0.107	0.247	2.308

[0096] *P/N:Positive/Negative

[0097] 二、全血采集及外周血单个核细胞 (PBMC) 分离

[0098] 1. 全血采集:将抗体滴度高于10⁸的小鼠,再次皮下注射5μg PreS1 B+C串联表达抗原进行加强免疫,免疫一周后,摘取眼球,使用肝素钠抗凝管收集小鼠的全血,每只小鼠收集全血约1mL;

[0099] 2. PBMC分离:采用Ficoll密度梯度离心法分离小鼠的PBMC,首先将5mL无菌分离介质Ficoll-Paque加入到15mL离心管中,轻轻加入等体积的小鼠全血,不要将Ficoll-Paque与全血进行混合;室温下500g离心30min,使用无菌移液管轻轻将分层后的白膜层即为PBMC取出;将收集的PBMC移到另一支干净的移液管中,使用6mL RPMI1640细胞培养基对PBMC进行洗涤,每次500g离心10min,重复两次,收集纯净的PBMC备用。

[0100] 三、抗原特异性B细胞流式细胞术分选

[0101] 1. PBMC染色:将串联表达的HBV B基因型和C基因型PreS1蛋白标记异硫氰酸荧光素酯 (FITC) 荧光染料,用于识别与抗原结合的PBMC;购买商业化的PE标记的兔抗小鼠CD19抗体识别特异性的B细胞。细胞染色时,用含0.05% Tween20, 2% BSA的PBS溶液作为封闭液与重悬液,首先用封闭液对PBMC进行室温下封闭2h, 500g离心10min,再用重悬液重新悬浮细胞后,将FITC标记的PreS1蛋白和PE标记的抗小鼠CD19抗体终浓度分别调整至10μg/mL和2μg/mL,室温下孵育2h对细胞充分染色;染色完毕使用1mL含0.05% Tween20的PBS溶液洗涤细胞, 500g离心5min,重复两次;洗涤完毕后,使用500μL重悬液重新悬浮细胞,准备分选,全程注意无菌操作,防止细胞被微生物污染。

[0102] 2. 流式细胞术分离抗原特异性B细胞:使用BD流式细胞分选仪对染色后的PBMC进行分选,选取PE和FITC双阳性的细胞,直接使用流式细胞分选仪选择如图1所示Q2区域的双阳性细胞,按照1个细胞/孔接种到装有10μL细胞裂解液的96孔板中,分选5板单细胞进行后续实验。

[0103] 四、mRNA提取和抗体序列扩增

[0104] 1. mRNA提取:使用Thermo-Fisher的Ambion Single Cell-to-CT Kit,用10μL混合

DNase I的细胞裂解液,将流式分选的单细胞室温孵育5min充分使细胞裂解;然后加入1 μ L的终止液,室温放置2min终止裂解反应。

[0105] 2. mRNA逆转录:向加入终止液后的反应液中加入4.5 μ L的购自北京百奥莱博科技有限公司的反转录混合液,使用PCR仪按照如下程序进行逆转录:25 $^{\circ}$ C 10min、42 $^{\circ}$ C 60min、85 $^{\circ}$ C 5min,逆转录获得单细胞cDNA。逆转录完成后,将产物-20 $^{\circ}$ C存放备用。

[0106] 3. 扩增引物设计:小鼠的IgG重链可变区信号肽序列主要有四类,分别设计四条正向引物,一条反向引物;小鼠的轻链可变区信号肽序列设计两条正向引物和一条反向引物。将设计的以下引物送擎科生物进行引物合成。

[0107] 表3. 小鼠的IgG重链可变区与轻链可变区引物

引物		序列	
小鼠的 IgG 重链可变区 引物	正向引物	mHG-F1	AGGAACTGCAGGTGTCC
		mHG-F2	CAGCTACAGGTGTCCACTCC
		mHG-F3	TGGCAGCARCAGCTACAGG
		mHG-F4	CTGCCTGGTGACATTCCCA
	反向引物	mHG-R	AGAAGGTGTGCACACCGCTGGAC
小鼠的 IgG 轻链可变区 引物	正向引物	mLG-F1	ACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTC
		mLG-F2	CTCTTCTTCTTCTTTGTTCTTCATTGC
	反向引物	mLG-R	GTACCATYTGCCCTCCAGKCCACT

[0109] 4. 抗体核酸序列的扩增与电泳鉴定:将正向引物和反向引物的序列与模板cDNA混合后,使用高保真酶对抗体的轻重链按照表4与表5体系进行扩增,获取轻链和重链核酸序列。

[0110] 表4. 重链扩增体系

组分	单管体积
模板 cDNA	4 μ L
mHG-F1 (10 μ M)	2 μ L
mHG-F2 (10 μ M)	2 μ L
mHG-F3 (10 μ M)	2 μ L
mHG-F4 (10 μ M)	2 μ L
mHG-R (10 μ M)	2 μ L
2 \times Hieff [®] HotStart PCR 酶	25 μ L
ddH ₂ O	11 μ L
Total	50 μ L

[0112] 表5. 轻链扩增体系

组分	单管体积
模板 cDNA	4 μ L
mLG-F1 (10 μ M)	2 μ L
mLG-F2 (10 μ M)	2 μ L
mLG-R (10 μ M)	2 μ L
2 \times Hieff [®] HotStart PCR 酶	25 μ L
ddH ₂ O	15 μ L
Total	50 μ L

[0114] PCR产物扩增完毕后,使用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,将分开的单一条带切取,使用天根生物的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行PCR产物回收,获取PCR片段,送至北京生工生物工程有限公司进行测序,在GeneBank核酸数据库中进行同源性分析,经分析抗体的重链核酸如SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列,抗体的轻链核酸序列如SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列。

[0115] 5. PCR产物的表达载体构建:以含有HSA信号肽和人源抗体IgG1 Fc段的pcDNA3.1载体作为骨架,将回收后的VH、VL核酸序列PCR产物,通过Gibson连接的方法连接到含有HSA信号肽的表达载体中,最终连接形成的载体图谱如图2。

[0116] 其中,HSA信号肽氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,核酸序列如SEQ ID NO:14所示,人源抗体IgG1 Fc段序列如SEQ ID NO:15所示。

[0117] 6. 表达载体转化与筛选:取1管感受态大肠杆菌,将5 μ L连接产物加入到大肠杆菌感受态细胞中,轻轻吹打混匀,按照感受态细胞转化标准操作规程进行质粒的转化;pcDNA3.1载体带有氨苄筛选标记,完成转化后,选择涂布氨苄抗性的细菌培养板进行涂布培养;将菌板37 $^{\circ}$ C过夜培养。将生长的菌落进行菌落PCR筛选,获取连入轻重链序列的菌落克隆,并将阳性的菌落送北京生工生物工程有限公司进行测序,对测序正确的质粒进行扩增提取后用于转染细胞。

[0118] 五、重组人源化抗体细胞表达

[0119] 1. 重组质粒的扩增:将测序正确的pcDNA3.1质粒,分别进行摇菌培养扩增,获取大量的pcDNA3.1质粒准备进行HEK293F细胞转染。

[0120] 2. HEK293F细胞的转染:准备20mL HEK293F细胞,到细胞密度生长到 1×10^6 个/mL时,进行质粒转染。转染时,使用PEI按照质粒:PEI=2:1的量进行转染,转染时每1mL培养基使用1 μ g质粒转染,转染4天后收取细胞培养上清,分别包被PreS1 B基因型和C基因型蛋白,检测染组中抗体的表达量,选择与B基因型、C基因型均具有较高亲和力的抗体进行大量表达。该抗体编号为HB2抗体。

[0121] 实施例2.HB2抗体纯化

[0122] 1. 抗体表达:大量表达时,使用600mL的HEK293F细胞进行表达,当细胞密度生长到 1×10^6 个/mL时,将携带HB2抗体重链和轻链序列的质粒,用PEI转染到HEK293F细胞中,继续在37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中振荡培养7天,之后离心收集上清进行抗体纯化。

[0123] 2. 抗体纯化:将离心收集的细胞培养上清液,使用Protein A的琼脂糖纯化柱子进行纯化,PBS洗涤后,用pH=2.8的甘氨酸溶液进行柱洗脱,分离获得抗体,PBS充分透析除去甘氨酸,使用Nandrop300测定A280吸光度,确定抗体浓度为3.7mg/mL。

[0124] 实施例3.HB2抗体纯度和活性

[0125] 1. 抗体的纯度鉴定: 配制4%的SDS-PAGE浓缩胶和12%的分离胶, 将纯化后的抗体取2 μ g进行电泳, 电泳完毕后进行考马斯亮蓝染色1h和脱色过夜。如图3所示, 纯化后的抗体在非还原条件下电泳后考马斯亮蓝染色, 在150kDa处只有一条单一的条带, 经DTT还原处理、电泳、考马斯亮蓝染色后, 在50kDa和25kDa处分别为单一条带, 即分离纯化后的抗体纯度在90%以上。

[0126] 2. 抗体的反应活性鉴定: 将PreS1 B基因型、C基因型蛋白进行4%的浓缩胶和12%的分离胶SDS-PAGE电泳, 蛋白上样量为100ng, HB2抗体1:1000稀释, 羊抗人二抗(购自于洛阳百奥通实验材料中心) 1:2000稀释, 用Western-blot对PreS1抗体进行反应性分析, 如图4所示, HB2抗体可以与B、C基因型蛋白均有较好的反应性。同时, 使用ELISA定量验证HB2抗体与PreS1 B基因型、C基因型和B+C基因型蛋白的反应性, 分别包被PreS1 B基因型、C基因型和B+C基因型蛋白(浓度为2 μ g/mL), 对分离纯化后的抗体从500ng/mL作为第一个浓度梯度, 按照2倍的梯度稀释10点, 进行活性检测, 确定抗体与抗原的亲合性, 结果如图5所示, PreS1抗体在纳克级别仍可以显色, 表明该抗体对PreS1 B基因型、C基因型和B+C基因型蛋白均具有良好的亲和性。

[0127] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本发明的保护范围。因此, 本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 吉林大学 北京安奇生物医药科技有限公司
- [0003] <120> 人源化HBV B和C基因型前S1蛋白抗体及其应用
- [0004] <130> 20220617
- [0005] <160> 23
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 7
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] Pro Val Thr Val Ser Val Gly
- [0013] 1 5
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 16
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0018] <400> 2
- [0019] Leu Ile Tyr Trp Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Lys Ser
- [0020] 1 5 10 15
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 9
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0025] <400> 3
- [0026] His Ser Ile Ser Thr Ile Phe Asp His
- [0027] 1 5
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 14
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0032] <400> 4
- [0033] Val Ala Val Glu Ser Asp Val Gly Asp Tyr Asn Tyr Val Ser
- [0034] 1 5 10
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 7
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 人工序列(artificial sequence)

[0039] <400> 5
 [0040] Glu Val Ser Asp Arg Pro Glu
 [0041] 1 5
 [0042] <210> 6
 [0043] <211> 9
 [0044] <212> PRT
 [0045] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0046] <400> 6
 [0047] Ser Ser Tyr Val Val Ser Glu Ala Val
 [0048] 1 5
 [0049] <210> 7
 [0050] <211> 120
 [0051] <212> PRT
 [0052] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0053] <400> 7
 [0054] Gln Val Ile Thr Leu Lys Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 [0055] 1 5 10 15
 [0056] Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 [0057] 20 25 30
 [0058] Val Thr Val Ser Val Gly Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
 [0059] 35 40 45
 [0060] Glu Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 [0061] 50 55 60
 [0062] Pro Ser Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Lys Asp Thr Leu
 [0063] 65 70 75 80
 [0064] Met Ile Ser Arg Thr Pro Asn Ile Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr
 [0065] 85 90 95
 [0066] Tyr Cys Ala His His Ser Ile Ser Thr Ile Phe Asp His Trp Gly Gln
 [0067] 100 105 110
 [0068] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0069] 115 120
 [0070] <210> 8
 [0071] <211> 109
 [0072] <212> PRT
 [0073] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0074] <400> 8
 [0075] Gln Ile Ala Leu Val Cys Pro Ala Glu Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0076] 1 5 10 15
 [0077] Ser Ile Val Ile Ser Cys Val Ala Val Glu Ser Asp Val Gly Asp Tyr

[0078]	20	25	30
[0079]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0080]	35	40	45
[0081]	Met Ile Phe Glu Val Ser Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Asn Arg Phe		
[0082]	50	55	60
[0083]	Ser Gly Glu Lys Ser Gly Asn Val Ala Ser Leu Val Ile Glu Gly Leu		
[0084]	65	70	75
[0085]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Val Val Ser		
[0086]	85	90	95
[0087]	Glu Ala Val Phe Gly Gly Gly Val Lys Leu Val Val Leu		
[0088]	100	105	
[0089]	<210> 9		
[0090]	<211> 217		
[0091]	<212> PRT		
[0092]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0093]	<400> 9		
[0094]	Gln Val Ile Thr Leu Lys Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
[0095]	1	5	10
[0096]	Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
[0097]	20	25	30
[0098]	Val Thr Val Ser Val Gly Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu		
[0099]	35	40	45
[0100]	Glu Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
[0101]	50	55	60
[0102]	Pro Ser Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Lys Asp Thr Leu		
[0103]	65	70	75
[0104]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Asn Ile Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr		
[0105]	85	90	95
[0106]	Tyr Cys Ala His His Ser Ile Ser Thr Ile Phe Asp His Trp Gly Gln		
[0107]	100	105	110
[0108]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val		
[0109]	115	120	125
[0110]	Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr		
[0111]	130	135	140
[0112]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr		
[0113]	145	150	155
[0114]	Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[0115]	165	170	175
[0116]	Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser		

[0117]	180	185	190
[0118]	Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala		
[0119]	195	200	205
[0120]	Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile		
[0121]	210	215	
[0122]	<210> 10		
[0123]	<211> 215		
[0124]	<212> PRT		
[0125]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0126]	<400> 10		
[0127]	Gln Ile Ala Leu Val Cys Pro Ala Glu Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
[0128]	1	5	10
[0129]	Ser Ile Val Ile Ser Cys Val Ala Val Glu Ser Asp Val Gly Asp Tyr		
[0130]	20	25	30
[0131]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0132]	35	40	45
[0133]	Met Ile Phe Glu Val Ser Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Asn Arg Phe		
[0134]	50	55	60
[0135]	Ser Gly Glu Lys Ser Gly Asn Val Ala Ser Leu Val Ile Glu Gly Leu		
[0136]	65	70	75
[0137]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Val Val Ser		
[0138]	85	90	95
[0139]	Glu Ala Val Phe Gly Gly Gly Val Lys Leu Val Val Leu Gly Arg Val		
[0140]	100	105	110
[0141]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		
[0142]	115	120	125
[0143]	Lys Ser Gly Val Ala Glu Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
[0144]	130	135	140
[0145]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
[0146]	145	150	155
[0147]	Asn Glu Gln Glu Ser Val Val Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Val Tyr		
[0148]	165	170	175
[0149]	Ser Leu Ser Ser Val Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
[0150]	180	185	190
[0151]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Thr Lys		
[0152]	195	200	205
[0153]	Ser Phe Pro Arg Gly Glu Cys		
[0154]	210	215	
[0155]	<210> 11		

- [0156] <211> 651
 [0157] <212> DNA
 [0158] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0159] <400> 11
 [0160] caggtgatca ctctgaagct ggcaccttct tctaagagca ccagcgggtca aactctgacc 60
 [0161] ctacttgta ctttctctga ctattttcct gaaccgggtga ccgtgtccgt ggggtggctg 120
 [0162] aggcagcctc caggcaaagc tctcgaatgg ttggcactga tctactggta catttgcaat 180
 [0163] gtgaaccaca agccaagtaa aagcagactc accatctcca aggacacaaa agatactttg 240
 [0164] atgatcagca gaactcccaa tattgatcct gtagatacag ctacttacta ctgcgccccat 300
 [0165] cacagcatta gtacaatfff tgaccattgg ggccaaggga ccctgggtgac agttagttcc 360
 [0166] gcgaagacta ctcccccttc tgtctacccc ctggccccctg gaagcgtgac acaaaccaac 420
 [0167] agcatgggtga cctcgggatg cctgggtaag ggctatfftc ctgaaccctg gaccgtcacc 480
 [0168] tggaacagcg ggtccttgte cagcggagtc cacacattcc ctgccgtcct gcagagcgac 540
 [0169] ctgtacacct tgtcatcate agtcacagtc cccagcagcc cccggccttc agagacgggtg 600
 [0170] acctgcaatg tggccccacc tgcaagttcc accaaagtgc ataagaagat c 651
 [0171] <210> 12
 [0172] <211> 651
 [0173] <212> DNA
 [0174] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0175] <400> 12
 [0176] cagattgctc tggtttgtcc cgcagaagtt tctggaagtc caggacagag cattgtcatt 60
 [0177] agctgcgtgg ctgtggaaag cgacgtgggc gattacaact acgtttcttg gtaccaacag 120
 [0178] caccaggca aggctcccaa gctgatgate ttcgaggtga gtgacaggcc cgagggaatc 180
 [0179] gaaaatcggg ttagcgggga gaagtcagga aacgtggcaa gtctgggtcat cgaggggttg 240
 [0180] caagctgagg atgaagccga ctattactgt tcctcctacg tcgtgagtga ggctgtgttt 300
 [0181] ggcggaggtg tgaagctggt tgtgttgga agagttgtgg ccgcccccttc tgtgttcate 360
 [0182] ttcccccat ctgatgaaca gctgaagtca ggcgtggccg aagtgggtgtg cctgctgaat 420
 [0183] aacttttata ctcgggaggc taaggtgcaa tggaaagtcg ataatgctct tcagagtgga 480
 [0184] aacgagcagg aatctgtttgt ggaacaggat tctaaggaca gcgtgtactc cctctccagt 540
 [0185] gtattgactc tttctaaggc cgactacgag aagcacaaag tttacgcatg cgaggtgacc 600
 [0186] cagggtacga catccgtgac caaatccttt ccccgcggcg aatggtgata a 651
 [0187] <210> 13
 [0188] <211> 18
 [0189] <212> PRT
 [0190] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0191] <400> 13
 [0192] Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 [0193] 1 5 10 15
 [0194] Tyr Ser

[0195] <210> 14
 [0196] <211> 54
 [0197] <212> DNA
 [0198] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0199] <400> 14
 [0200] atgaagtggg taacctttat ttccttctt tttctcttta gctcggetta ttcc 54
 [0201] <210> 15
 [0202] <211> 330
 [0203] <212> PRT
 [0204] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0205] <400> 15
 [0206] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [0207] 1 5 10 15
 [0208] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0209] 20 25 30
 [0210] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [0211] 35 40 45
 [0212] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0213] 50 55 60
 [0214] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 [0215] 65 70 75 80
 [0216] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 [0217] 85 90 95
 [0218] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 [0219] 100 105 110
 [0220] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 [0221] 115 120 125
 [0222] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 [0223] 130 135 140
 [0224] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 [0225] 145 150 155 160
 [0226] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 [0227] 165 170 175
 [0228] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 [0229] 180 185 190
 [0230] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 [0231] 195 200 205
 [0232] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 [0233] 210 215 220

- [0273] <211> 23
[0274] <212> DNA
[0275] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0276] <400> 20
[0277] agaaggtgtg cacaccgctg gac 23
[0278] <210> 21
[0279] <211> 25
[0280] <212> DNA
[0281] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0282] <400> 21
[0283] acttatactc tctctcctgg ctctc 25
[0284] <210> 22
[0285] <211> 27
[0286] <212> DNA
[0287] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0288] <400> 22
[0289] ctctttcttct tctttgttct tcattgc 27
[0290] <210> 23
[0291] <211> 24
[0292] <212> DNA
[0293] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0294] <400> 23
[0295] gtaccatytg ccttccagkc cact 24

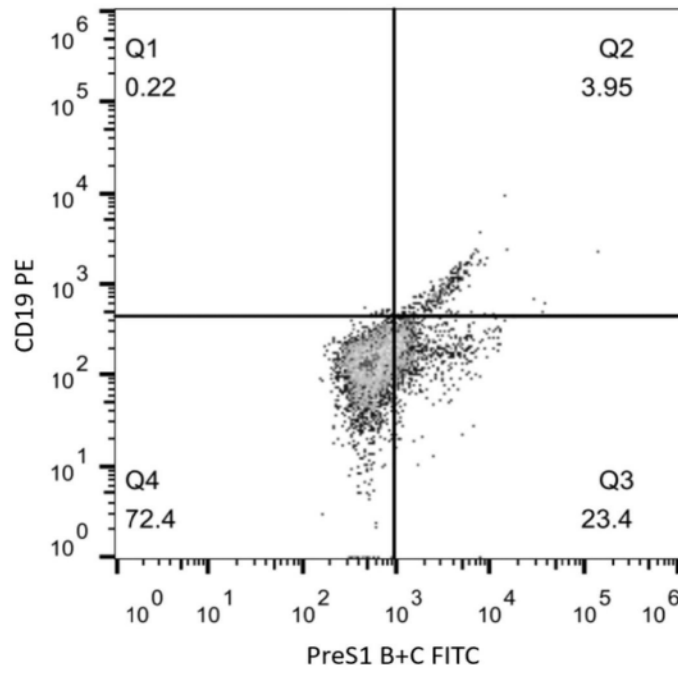


图1

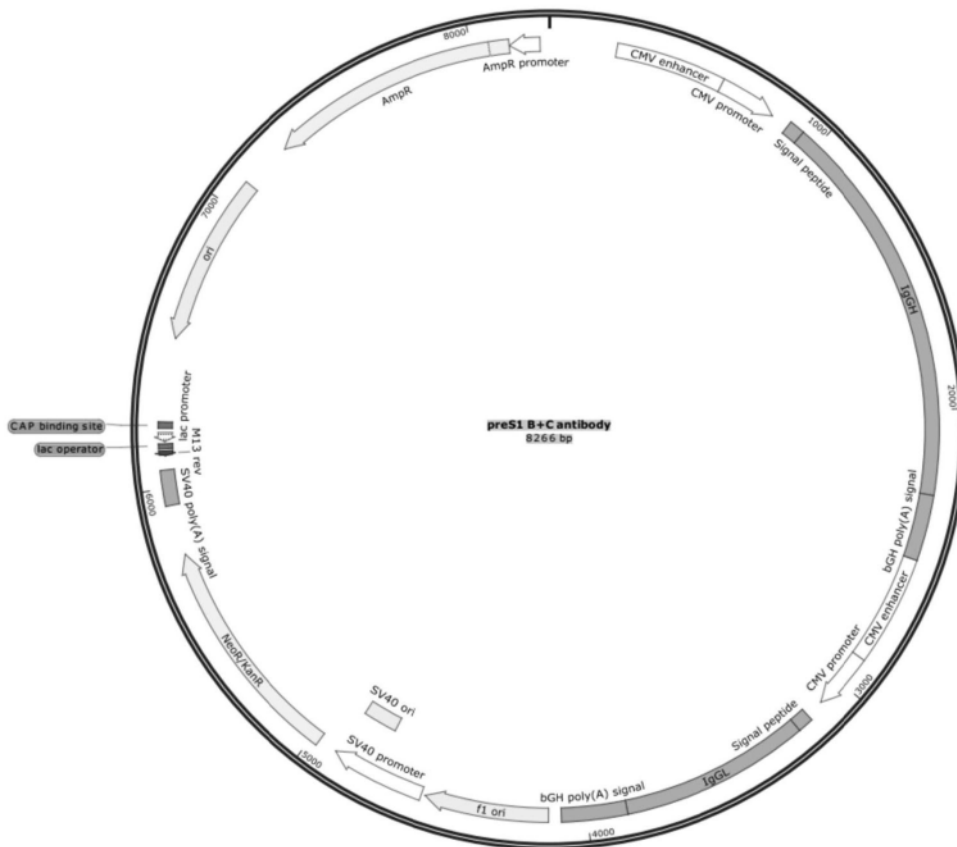


图2

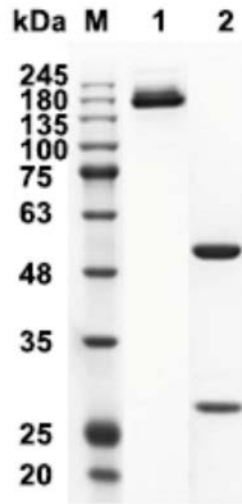


图3

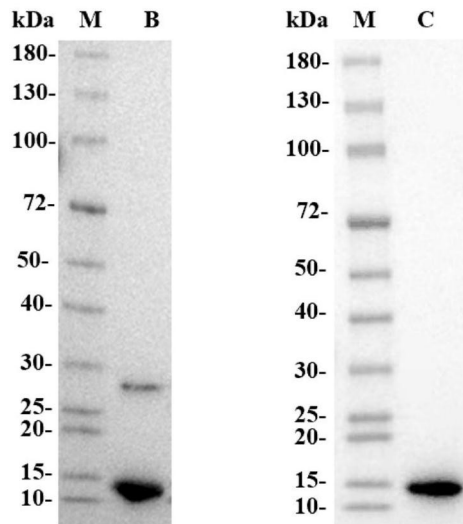


图4

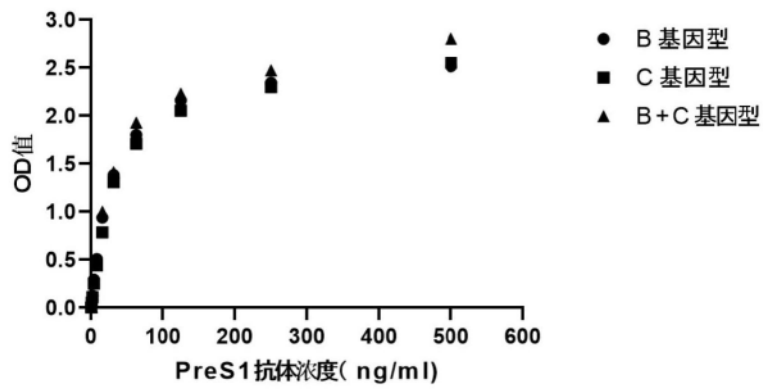


图5