

乙型肝炎病毒表面抗原的抗体及其应用

技术领域

本申请属于抗体技术领域，涉及一种结合乙型肝炎病毒表面抗原的抗体或其抗原结合片段，以及该抗体或其抗原结合片段在检测乙型肝炎病毒，或治疗与乙型肝炎病毒感染相关的疾病中的用途。

背景技术

乙型肝炎病毒（HBV）感染呈世界性流行，但不同地区HBV感染的流行强度差异很大。据世界卫生组织报道，全球约20亿人曾感染HBV，其中2.4亿人为慢性HBV感染者，每年约有65万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌（HCC）。全球肝硬化和HCC患者中，由HBV感染引起的比例分别为30%和45%。

乙型肝炎患者经抗病毒治疗后，虽可降低体内病毒载量，延缓严重疾病进程，但很多人不能完全清除乙型肝炎病毒。乙型肝炎患者需要长期服药，患者经济负担严重。根据中国疾控动态公布的数据显示，慢性肝炎患者的年平均诊疗费用占家庭年均总收入的56.24%，代偿性肝硬化占81.53%，失代偿性肝硬化占157.21%，肝癌占96.76%。沉重的经济负担造成很多患者或者放弃治疗或者导致家庭因病返贫。此外，从近十余年肝病的诊疗费用演变过程看，肝病的诊疗费用呈现逐年递增势态，每年增幅10%~20%左右，个人承担部分也随之增加。

研究显示乙型肝炎患者血液中大量存在的由HBsAg组成的亚病毒颗粒是抑制免疫系统使感染肝细胞无法清除的主要原因。依靠某种技术降低血液中HBsAg水平10-100倍，可激活人体自身的T细胞免疫，使得机体自身免疫系统可开始有效杀伤被感染肝细胞。因此有效降低血液中的HBsAg水平不但是乙型肝炎重要的治愈标准之一，更是治疗乙型肝炎清除被感染细胞的前提。

最新的临床研究结果显示，经过核苷酸类似物治疗清除病毒DNA的患者，如果HBsAg低于某个水平（如HBsAg <1500 IU/mL），其干扰素清除HBsAg的几率可超过50%，远大于我们通常认为的干扰素治愈率只有5-10%的比例。

但由于目前缺少有效降低HBsAg的药物，绝大部分患者（超过90%）HBsAg水平均超过这个指标，导致干扰素无法治愈这些病人（这就是干扰素治愈率只有5-10%的原因）。这些新的临床证据对降低HBsAg的治疗方法有了更现实更迫切的需要。

目前研究发现降低表面抗原主要有3种途径：抑制HBsAg的表达（siRNA）、阻止HBsAg从细胞释放（NAPs）、HBsAg抗体。

发明概述

本申请的目的之一在于提供与乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）特异性结合的抗体或其抗原结合片段。体外抗原亲和力体外试验证明了本申请的抗体具有特异性结合HBsAg的能力。而体内试验进一步证明了本申请的抗体可以作为乙型肝炎病毒（HBV）的中和抗体，有效降低HBsAg水平，抑制HBV增殖。

具体地，本申请涉及：

1、一种特异性结合乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH）序列和轻链可变区（VL）序列，其中：

VH包含如下所示的互补决定区(CDR)氨基酸序列：

HCDR1: GYTFTGYY (SEQ ID NO:1),

HCDR2: INPNSGGT (SEQ ID NO:2),

HCDR3: ARDLWX1X2X3X4X5DYGX6DV;

VL包含如下所示的CDR氨基酸序列：

LCDR1: X7SIX8TX9,

LCDR2: AAS (SEQ ID NO:28),

LCDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:29);

其中：

X1选自N、D、Y、I、S、V或M,

X2选自F、H、E、W、R、Q、M、P或D,

X3选自V、Q、P、R、H、T或Y,

X4选自S、T、D、L、Y、F或H,

X5选自D、Q或E,

X6选自M、I或L,

X7选自Q、S、H、Y、P、L、I或E,

X8选自S或D,

X9选自Y、F、D、T、S或V。

2、根据项1所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体包含如下所示的互补决定区(CDR)氨基酸序列:

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:15所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:4所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:16所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:5所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:17所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:6所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:18所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:7所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:19所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:8所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:20所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:21所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:10所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:22所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:23所示的LCDR1, 如SEQ ID

NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:12所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:24所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:13所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:25所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:14所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:26所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:6所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:27所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

3、项1-2中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段, 包含人类通用框架区(FR)。在一些实施方案中, 所述VH包含人类亚组III通用框架区(FR)。在一些实施方案中, 所述VL包含人类亚组κI通用框架。在一些实施方案中, 包含人类通用框架区(FR)和在人类通用框架区(FR)基础上的一个或多个氨基酸取代。

在一些实施方案中, 所述框架区为全人抗体的通用框架区, 并且包含一个或多个(例如1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3个)氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述框架区为全人抗体的通用框架区或与全人抗体的通用框架区具有70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%同一性。

4. 根据项1-3中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段, 其中,

VH包含如下所示的FR氨基酸序列:

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVCKAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:63)

HFR4: WGKGTLLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列:

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

5. 根据项1-3任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中，

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: YYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:69)

HFR4: WGKGTLLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

6. 根据项1-3中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中，

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: HYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:70)

HFR4: WGKGTLLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID

NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

5、项1的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中VH序列选自SEQ ID NO:31-44中的任一序列，或与SEQ ID NO:31-44中的任一序列具有至少80%、85%、90%、95%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

6、项1或5的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中VL序列选自SEQ ID NO:46-58中的任一序列，或与SEQ ID NO:46-58中的任一序列具有至少80%、85%、90%、95%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

7、项1-6任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中VH序列与VL序列选自如下任一组的氨基酸序列或与如下任一组中VH序列和VL序列分别具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列：

- 1) SEQ ID NO:31与SEQ ID NO:46,
- 2) SEQ ID NO:32与SEQ ID NO:47,
- 3) SEQ ID NO:33与SEQ ID NO:48,
- 4) SEQ ID NO:34与SEQ ID NO:49,
- 5) SEQ ID NO:35与SEQ ID NO:50,
- 6) SEQ ID NO:36与SEQ ID NO:51,
- 7) SEQ ID NO:37与SEQ ID NO:52,
- 8) SEQ ID NO:38与SEQ ID NO:53,
- 9) SEQ ID NO:39与SEQ ID NO:54,
- 10) SEQ ID NO:40与SEQ ID NO:55,
- 11) SEQ ID NO:41与SEQ ID NO:56,
- 12) SEQ ID NO:42与SEQ ID NO:57,
- 13) SEQ ID NO:43与SEQ ID NO:58, 或者
- 14) SEQ ID NO:44与SEQ ID NO:58。

8、根据项1-7中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自：Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Fv、Fd、dAb、双体抗体 (diabody)、或多体抗体 (multibody)。

9、根据项1-8中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为全人抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合抗体或纳米抗体。

10、根据项1-9中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其为单特异性抗体、双特异性抗体、或多特异性抗体。

11、根据项1-10中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体还包含重链恒定区和轻链恒定区，优选，所述重链恒定区选自IgG的重链恒定区，所述轻链恒定区选自κ链或λ链。

12、一种用于诊断HBsAg感染的诊断试剂，其包含被标记的项1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段。

13、根据项12所述的诊断试剂，其中所述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段是被选自如下的一种或多种标记物标记的：放射性标记物、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。

14、一种分离的核酸分子，其包含编码项1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列。

15、一种构建体，其包含项14所述的核酸分子。

16、根据项15所述的构建体，其选自质粒、噬菌粒、病毒载体、或线性核酸。

17、一种细胞，其表达项1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，或包含项14所述的核酸，或项15或16所述的构建体。

18、一种药物组合物，其包含项1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段或项14所述的核酸。

19、一种诊断试剂盒，其包含项12或13的诊断试剂。

20、一种治疗或预防乙型肝炎病毒感染的方法，其包含向患者施用有效量的项18所述的药物组合物。

21、一种治疗乙型肝炎的方法，其包含向患者施用有效量的项18所述的药物组合物。

22、一种检测乙型肝炎病毒的方法，其包括使项12或13的诊断试剂与来自受试者的体液接触。

23、根据项22所述的方法，其中所述来自受试者的体液为受试者的血浆或血清。

附图说明

图1显示为本申请抗体在不同pH下与抗原的结合活性。

图2显示为本申请不同抗体对HBV小鼠血浆HBsAg含量影响图。

图3显示为本申请抗体KW027-021、KW027-2-055、KW027-2-055-HD、KW027-2-055-YD对HBV小鼠血浆中HBsAg含量影响图。

发明详述

本申请旨在提供一种全新的可与乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）特异性结合的抗体或其抗原结合片段，其通过所述结合降低患者血液中HBsAg的表达水平，激活人体自身的T细胞免疫，使得机体自身免疫系统得以开始有效杀伤被感染的肝细胞，抑制HBV增殖。通过所述特异性结合的抗体或其抗原结合片段，本申请为HBV的防治提供了新的选项和思路，同时为HBV的检测和诊断提供了新的工具。

定义

如本文所用，术语“抗体”也称为“免疫球蛋白”，涵盖具有天然抗体结构特征的抗体和具有不同于天然抗体的结构特征但表现出对抗原分子的结合特异性的抗体样分子。术语抗体旨在包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即含有抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型（例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY）或亚型（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。

在本文中，抗体的“抗原结合片段”可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促切割或化学切割产生。抗原结合片段尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单结构域抗体、嵌合抗体、双体抗体和这样的多肽，其至少含有免疫球蛋白足以赋予该多肽特异性抗原结合的部分。本文所述的抗原抗体片段实例包括但不限于：(i)具有VL、CL、VH和CH1结构域的Fab片段；(ii)Fab'片段，即在CH1结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段；(iii)具有VH和CH1结构域的Fd片段；(iv)具有VH和CH1结构域以及在CH1结构域的C-末端的一个或多个半胱氨酸残基的Fd'片段；(v)具有抗体单臂的VL和VH结构域的Fv片段；(vi)由VH结构域组成的dAb片段(Ward等，Nature 341, 544-546(1989))；(vii)分

离的CDR区；(viii)F(ab')₂片段，包含在铰链区通过二硫键桥接的两个Fab'片段的二价片段；(ix)单链抗体分子(例如，单链Fv；scFv) (Bird等，Science 242: 423-426(1988)；和Huston等，PNAS(USA)85: 5879-5883(1988))；(x)具有两个抗原结合位点的“双抗体”，其包含与同一多肽链中的轻链可变区(VL)连接的重链可变区(VH)(参见，例如，EP404,097；WO93/11161；和Hollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448(1993))；(xi)“线性抗体”，其包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)，所述Fd区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等，Protein Eng. 8(10): 1057-1062(1995)；和美国专利No.5,641,870)。

术语“重链”(“CH”)、“轻链”(“CL”)、“轻链可变区”(“VL”)、“重链可变区”(“VH”)、“框架区”(“FR”)是指天然存在的免疫球蛋白中的结构域和合成(例如重组)结合蛋白(例如人源化抗体)的相应结构域。天然存在的免疫球蛋白(例如IgG)的基本结构单元是具有两条轻链和两条重链的四聚体。每条链的氨基末端(“N”)部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。羧基末端(每条链的“C”部分定义了一个恒定区，轻链具有单个恒定区，重链通常具有三个恒定区和一个铰链区。因此，天然存在的轻链结构IgG分子为N'-VL-CL-C'，IgG重链结构为N'-VH-CH1-H-CH2-CH3-C'(其中H为铰链区)。IgG分子的可变区包含互补决定区(CDR)，其负责识别与接触抗原，非CDR片段，即框架区(FR)，框架区维持可变区结构并决定CDR环的位置。因此，VL和VH域具有结构N'-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C'。在本申请中，VH的3个CDR分别称为HCDR1、HCDR2、和HCDR3；VH的4个框架区分别称为HFR1、HFR2、HFR3、HFR4；VL的3个CDR分别称为LCDR1、LCDR2、和LCDR3；VL的4个框架区分别称为LFR1、LFR2、LFR3、LFR4。

在本申请中，所述CDR和FR根据ImMunoGeneTics(IMG)编号系统(参见，例如，Lefranc M. P. The IMG unique numbering for immunoglobulins, T-cell receptors, and Ig-like domains. The immunologist 7, 132-136, 1999 (1999))进行确定。

在本文中，术语“纳米抗体”，即仅由抗体重链的可变区组成的单域抗体。由于其相对分子尺寸为纳米级，故被称为纳米抗体。纳米抗体能像正常抗体一样与抗原紧密结合，但不像单链抗体那样容易相互粘连聚集成块。术

语“单域抗体”是由一个可变区或一个仅协助靶标结合的工程化的恒定结构域组成的独立的抗原结合单元。术语“双体抗体”是scFv的二聚体，两个scFv片段通过VH和VL结构域的链间配对（交叉配对）共表达形成双体抗体。同样的，由多条scFv形成的多聚体称为多体抗体。例如，由三条scFv形成的三体抗体，由四条scFv形成的四体抗体等。其中，各scFv可以具有相同的抗原特异性，也可以具有不同的抗原特异性。

如本文所用，“单特异性抗体”、“双特异性抗体”和“多特异性抗体”分别指可以与一个、两个和多个不同抗原或同一抗原的一个、两个和多个不同抗原表位相结合的单个抗体分子。

如本文所用，术语“嵌合抗体”是指组合有来自不同物种的抗体片段的抗体。具体的，例如来自一个物种（例如小鼠）的一种单克隆抗体，其Fc恒定区经由DNA重组技术替换为来自一个物种（例如人）的Fc恒定区。参见例如专利申请PCT/US86/02269；EP/173,494。

如本文所用，术语“人源化抗体”是指包含人免疫球蛋白框架区和来自非人（例如小鼠、大鼠、兔或合成）免疫球蛋白的一个或多个CDR的抗体。除CDR以外，人源化抗体中的所有其他部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。通过基因工程构建人源化抗体的方法参见例如专利申请US/5,585,089。

如本文所用，术语“全人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本申请的全人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。然而，如本文所用，术语“全人抗体”不旨在包括其中源自另一哺乳动物物种（例如兔）的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。因此，如本文所用，术语“全人抗体”是指其蛋白质分子的几乎各个部分（例如，CDR、FR、CL、HC结构域（例如，CH1、CH2、CH3）、铰链、VL、VH）在人体中几乎无免疫原性，其相对于人天然免疫球蛋白只有很小的序列变化或变异。因此，全人抗体不同于嵌合或人源化抗体。需要指出的是，全人抗体可由能够表达功能重排的人免疫球蛋白（例如重链和/或轻链）基因的非人动物或原核或真核细胞产生。

如本文所用，术语“特异性结合”是指由抗原决定簇和抗体分子可变区空间构象决定的以高亲和力互补结合的特性。这种高亲和力决定了所述抗体

分子一旦与所述抗原结合，便可发挥其相应的生理功能，例如，在本申请的一些实施例中，所述抗体结合并帮助清除所述抗原的功能。

如本文所用，术语“人类通用框架”为代表在选择人类免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常存在的氨基酸残基的框架。一般而言，人类免疫球蛋白VL或VH序列选自于可变域序列的亚组。一般而言，序列亚组为如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD(1991)，第1-3卷中的亚组。在一些实施方案中，对于VL而言，所述亚组为如Kabat等人（同上）描述的亚组κ人。在一些实施方案中，对于VH而言，所述亚组为如Kabat等人（同上）描述的亚组III。

两氨基酸序列或核苷酸序列间的“同源性”或“同一性”指两序列间氨基酸残基或核苷酸残基完全相同的百分数。如果待相互比较的两序列长度有别，则序列“同源性”或“同一性”优选是指较短序列中与较长序列氨基酸残基或核苷酸残基完全相同的核苷酸残基的百分数。序列同一性可以通过使用本领域常用的序列分析软件，诸如Wisconsin序列分析包等常规确定。

如本文所用，术语“多核苷酸”或“核酸”、“核酸分子”可互换使用，包括但不限于DNA、RNA、cDNA(互补DNA)、mRNA(信使RNA)、rRNA(核糖体RNA)、shRNA(小发夹RNA)、snRNA(小核RNA)、snoRNA(短核仁RNA)、miRNA(微小RNA)、基因组DNA、合成DNA、合成RNA和/或tRNA。

如本文所用，术语“构建体”是指通过其可以将多核苷酸序列(例如外来基因)引入宿主细胞中，以转化宿主并促进引入序列的表达(例如转录和翻译)的载体，包括质粒、噬菌粒、病毒载体等。

如本文所用，术语“噬菌粒”是丝状噬菌体衍生的载体，其基本成分主要包括质粒的复制起点、选择标记、基因间隔区（IG区），通常还包含负链和正链的包装序列和复制起点、噬菌体外壳蛋白的基因、限制性内切酶识别位点、启动子和编码信号肽的DNA片段。此外，噬菌粒还可以包含一个分子标签，以方便筛选基于噬菌粒的文库。噬菌粒无法独立完成子代噬菌体颗粒的组装，完成其生命周期所需的其他结构和功能蛋白质由辅助噬菌体提供。而辅助噬菌体是一种自身DNA复制效率极低的丝状噬菌体突变型，因此辅助噬菌体与噬菌粒包装形成的噬菌体共同感染宿主菌时，可包装大量含有噬菌粒的噬菌体，而仅包装少量辅助噬菌体。

如本文所用，“质粒”是指细菌、酵母菌和放线菌等生物中染色体（或

拟核)以外的DNA分子,存在于细胞质或细胞核中,具有自主复制能力,使其在子代细胞中也能保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。

如本文所用,“病毒载体”是指以病毒为基础的基因载体,是一种经过基因工程改造的病毒基因组,其可携带外源基因和相关基因元件,并被包装成病毒颗粒,通过病毒侵染将其携带的外源基因导入细胞中。

除非本文另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

抗体或其抗原结合片段

一方面,本申请提供了一种特异性结合乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的抗体或其抗原结合片段。通常本申请的抗体包含重链可变区(VH)序列和轻链可变区(VL)序列,其中:

VH包含如下所示的互补决定区(CDR)氨基酸序列:

HCDR1: GYTFTGYY (SEQ ID NO:1),

HCDR2: INPNSGGT (SEQ ID NO:2),

HCDR3: ARDLWX1X2X3X4X5DYGX6DV;

VL包含如下所示的CDR氨基酸序列:

LCDR1: X7SIX8TX9,

LCDR2: AAS (SEQ ID NO:28),

LCDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:29);

其中:

X1选自N、D、Y、I、S、V或M,

X2选自F、H、E、W、R、Q、M、P或D,

X3选自V、Q、P、R、H、T或Y,

X4选自S、T、D、L、Y、F或H,

X5选自D、Q或E,

X6选自M、I或L,

X7选自Q、S、H、Y、P、L、I或E,

X8选自S或D,

X9选自Y、F、D、T、S或V。

在一些实施方案中,所述抗体包含如下所示的互补决定区(CDR)氨基

酸序列：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:15所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:4所示的HCDR3，如SEQ ID NO:16所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:5所示的HCDR3，如SEQ ID NO:17所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:6所示的HCDR3，如SEQ ID NO:18所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:7所示的HCDR3，如SEQ ID NO:19所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:8所示的HCDR3，如SEQ ID NO:20所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:9所示的HCDR3，如SEQ ID NO:21所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:10所示的HCDR3，如SEQ ID NO:22所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:11所示的HCDR3，如SEQ ID NO:23所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:12所示的HCDR3，如SEQ ID NO:24所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:13所示的HCDR3，如SEQ ID NO:25所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:14所示的HCDR3，如SEQ ID NO:26所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:6所示的HCDR3，如SEQ ID NO:27所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗体包含人类通用框架区（FR）。

在一些实施方案中，VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: NYAQKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:63)

HFR4: WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWFYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID

NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

在一些实施方案中, VH包含如下所示的FR氨基酸序列:

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: YYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:69)

HFR4: WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列:

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

在一些具体的实施方案中, VH包含如下所示的FR氨基酸序列:

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: HYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:70)

HFR4: WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列:

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

在一些具体的实施方案中, 其中VH序列选自选自SEQ ID NO:31-44中的任一序列, 或与SEQ ID NO:31-44中的任一序列具有至少80%、85%、90%、95%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中, 其中VL序列选自SEQ ID NO:46-58中的任一序列, 或与SEQ ID NO:46-58中的任一序列具有至少80%、85%、90%、9

5%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:31与SEQ ID NO:46，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:32与SEQ ID NO:47，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列为SEQ ID NO:33与SEQ ID NO:48，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:34与SEQ ID NO:49，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:35与SEQ ID NO:50，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:36与SEQ ID NO:51，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:37与SEQ ID NO:52，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:38与SEQ ID NO:53，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:39与SEQ ID NO:54，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:40与SEQ ID NO:55，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:41与SEQ ID NO:56，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:42与SEQ ID NO:57，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:43与SEQ ID NO:58，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，VH序列和VL序列分别为SEQ ID NO:44与SEQ ID NO:58，或与上述VH序列或VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

然而本领域技术人员应当知晓，并非所有的抗体或其抗原结合片段均包含完整的重链可变区和轻链可变区。并且，在很多情况下，仅包含抗体抗原结合片段的蛋白分子，依然具有特异性结合和/或中和抗原的能力。在一些实施方案中，所述抗体可以仅包含抗体的VH和/或VL，例如dAb，只含有轻链可变区的单域抗体，纳米抗体等。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段可以不含恒定区，例如scFv，其包含前述HCDR和LCDR。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、Fd、双体抗体（diabody）、或多体抗体（multibody）。其中所述双体抗体及多体抗体包含所述一个、两个或多个前述scFv，并且可以包括其它特异性结合HBsAg或其它抗原的scFv。在一些实施方案中，所述抗体为单特异性抗体、双特异性抗体、或多特异性抗体。此外，作为本申请所述抗体的抗原结合片段，本申请公开的各种CDR、所述CDR的组合、以及包含所述CDR（例如HCDR3和/或LCDR3等）且保有对HBsAg特异性识别能力的抗体或抗体结合片段也涵盖在本申请的保护范围中。

在一些实施方案中，本申请所述抗体为全人抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合抗体或纳米抗体。

在一些实施方案中，本申请所述的抗体进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。在一些实施方案中，所述重链恒定区和/或轻链恒定区源自天然免疫球蛋白，例如所述重链恒定区可源自，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY，或

亚型，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。轻链恒定区可选自κ链或λ链。

在一些具体的实施方案中，所述重链恒定区为人IgG1的重链恒定区，包含如SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:59具有70%或以上序列同一性，例如与SEQ ID NO:59具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述轻链恒定区源自κ链，包含如SEQ ID NO:60中所示的氨基酸序列，或包含与SEQ ID NO:60具有70%或以上序列同一性的氨基酸序列，例如与SEQ ID NO:60具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

在某些实施例中，本申请所公开的抗体或抗原结合片段，可与HBsAg的抗原环区结合。乙型肝炎病毒的包膜一般含有三种“HBV包膜蛋白”（也称为“HBsAg”、“乙肝表面抗原”）：S蛋白（也称为S-HBsAg）、M蛋白（也称为M-HBsAg）、和L蛋白（也称为L-HBsAg）。S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg共享相同的C末端（也称为“S结构域”，226个氨基酸，Salisse J.和Sureau C., 2009,《病毒学杂志》83:9321-9328），其对应于S-HBsAg并且对于病毒组装和感染性至关重要。

当本文提及HBsAg的S结构域的氨基酸序列中的位置时，此类位置参考如SEQ ID NO: 73 中阐述的氨基酸序列或其天然或人工序列变体得到。然而，本领域技术人员应理解，突变或变异(包括但不限于取代、缺失和/或添加，如不同基因型的HBsAg或不同的HBsAg突变体)可能自然发生在HBsAg的S结构域的氨基酸序列中或人工引入到HBsAg的S结构域的氨基酸序列中，而不影响其生物学特性。因此，如本文所使用的，术语“HBsAg”涵盖所有此类多肽，包括例如根据SEQ ID NO:73的多肽和其天然或人工突变体。

MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVC
LGQNSQSPTSNSHPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQ
GMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIP
SSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWY
WGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLWVYI (SEQ ID NO:73)

在一个特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，其可以特异性地结合S-HBsAg、M-HBsAg或L-HBsAg。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合S-HBsAg。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合M-HBsAg。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合L-HBsAg。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合S结构域。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合包含如SEQ ID NO:73所示氨基酸序列的HBsAg。在一些特定的实施方案中，本申请所述的抗体或抗原结合片段，特异性地结合结合包含如SEQ ID NO: 73所示氨基酸序列、或者与SEQ ID NO: 73所示氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%的序列同一性的HBsAg。

诊断试剂

一方面，本申请还提供一种诊断试剂，其包含其包含被标记的前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段。其中，抗体的标记方式可以采用本领域已知的方法进行。在一些具体的实施方案中，标记所使用的标记物选自放射性标记物、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。

核酸、构建体、细胞

一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列。在一些实施方案中，所述核酸分子为RNA或DNA分子。在一些实施方案中，所述核酸为单链或双链。在一些实施方案中，所述核酸为线状或环状。所述核酸可以由细胞合成，亦可由化学合成。在一些实施方案中，所述核酸为经过化学修饰的核酸分子。

一方面，本申请还提供了一种构建体，其包含前述核酸分子，所述构建体选自：质粒、噬菌粒、病毒载体、或线性核酸。本申请还提供了一种构建体的组合物，包含前述构建体，其中组合物中的各构建体可以分别包含编码前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段的核酸分子的一个部分。例如，一种构建体的组合物，所述构建体为质粒，且所述构建体的组合物包含分别包含编码前述抗体分子重链和轻链的质粒。

一方面，本申请还提供了一种细胞，其表达或含有前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，或包含前述核酸、前述构建体或前述构建体的组合物。所述细胞可选自，例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、细菌、真菌等。

此外，本申请还包括将核酸、构建体、细胞用于生产所述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段的用途。

药物组合物及疗法

本申请还提供了一种药物组合物，其包含前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段或前述核酸。在一些实施方案中，所述药物组合物进一步包含适当含量的药学上可接受的辅料。这些制剂纳入配方是为了改善递送和耐受性等。在所有药剂化学家熟知的药典：雷氏药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA)中可找到大量适当的配方。在本文中，药学上可接受的辅料指无毒的填充剂、稳定剂、稀释剂、载体、溶剂或其他制剂辅料。其中，稀释剂、赋形剂，如微晶纤维素、甘露醇等；填充剂，如淀粉、蔗糖等；粘合剂，如淀粉、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和/或聚乙烯吡咯烷酮；崩解剂，如碳酸钙和/或碳酸氢钠；吸收促进剂，如季铵化合物；表面活性剂，如十六烷醇；载体、溶剂，如水、生理盐水、高岭土、皂粘土等；润滑剂，如滑石粉、硬脂酸钙/镁、聚乙二醇等。另外，本申请的药物组合物优选为注射剂。

在本申请的一些实施方案中，本申请药物组合物中的抗体或其抗原结合片段以1mg/ml至1000mg/ml的浓度存在，优选以10mg/ml至1000mg/ml的浓度存在，更优选以50mg/ml至500mg/ml的浓度存在，更优选以100mg/ml至300mg/ml的浓度存在。

本申请的药物组合物优选具有3.0至9.0的pH。其中，可进一步包含缓冲系统、防腐剂、表面张力剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本申请的一个实施方案中，本申请的药物组合物是含水制剂。这种制剂通常是溶液或悬浮。本申请的具体实施方案中，该药物组合物是稳定的含水溶液。在本申请的另一个具体实施方案中，该药物组合物是一种冻干制剂，在使用前医师或患者加入溶剂和/或稀释液溶解所述冻干制剂。

一方面，本申请还提供了一种治疗乙型肝炎的方法的方法，其包含向患者施用有效量的前述药物组合物。

一方面，本申请还提供治疗或预防乙型肝炎病毒感染的方法，其包含向患者施用有效量的前述药物组合物。

所述有效量随受试者年龄和体型大小、目标疾病、症状、施用途径等不同而调整。当本申请的药物组合物为包含前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段用来治疗成人的各种与乙型肝炎病毒感染相关的病症和疾病时，可采用静脉施用所述药物组合物，通常单剂按每公斤体重计约0.01至约20mg抗体给药，例如约0.1至约15、约1至约10，约3至约10mg/kg体重（mpk），约12mpk体重。根据病症的严重性，可对治疗的频度和持续时间进行调整。例如每周对患者施用一次。

已知有各种药物递送系统可用来施用本申请的药物组合物，例如包裹在脂质体、微颗粒、微胶囊中的胶囊化，能够表达变异病毒的重组细胞，受体介导的胞吞作用(参阅如Wu等人(1987), J.Biol.Chem.262: 4429-4432)等。给予药物的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜，和口腔等途径。该药物组合物可采用任何方便的途径施用，如通过灌注或静脉团注、上皮和粘膜层(如口腔粘膜、直肠和小肠粘膜)吸收，并可与其它生物活性药剂一起施用。施用方式可为全身性或局部性施用。

该药物组合物也可通过液囊递送，尤其是通过脂质体液囊递送(参阅 Langer (1990) Science249: 1527-1533; Treat等人(1989) in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler (编著), Liss, New York,第353-365页; Lopez-Berestein, 同上, 第317-327 页)。

在某些情况下，该药物组合物可以通过受控释放系统递送。在一个实施方案中，可使用泵(参阅Langer, 如上; Sefton(1987)CRC Crit.Ref.Biomed. Eng.14: 201)。在另一个实施方案中，可采用聚合物材料(参阅Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(编著), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974)。关于其它受控释放系统的讨论见Langer(1990) Science249: 1527-1533。

所述药物组合物可以单独施用亦可联合施用，并使通过降低乙型肝炎病毒表面抗原的载量而使患者症状得到改善。在一些实施方案中，所述施用为联合施用，其中HBsAg抗体或其抗原结合片段与一种或多种治疗药剂（或称第二种治疗药剂）联合施用。共同给药和联合治疗并不限于同时给药，而是还包括在涉及给予患者至少一种其它治疗药剂的疗程中至少给予一次抗HBs

Ag抗体或或其抗原结合片段的治疗方案。第二种治疗药剂可能为另一种HBV治疗药物，如另一种抗体/抗体片段，或可溶的细胞因子受体（如干扰素、细胞介素、胸腺法新等）、核苷类似物(替诺福韦、恩替卡韦、阿德福韦等)。

本申请还提供本文所述的任何抗HBsAg抗体或抗原结合片段在制备治疗或预防乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

本申请还提供本文所述的任何抗HBsAg抗体或抗原结合片段在制备治疗或预防乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

本申请还提供本文所述的任何抗HBsAg抗体或抗原结合片段在制备治疗乙型肝炎的药物中的用途。

本申请还包括本文所述的任何抗HBsAg抗体或抗原结合片段在制备治疗疾病或症状的药物中的应用，其中的疾病或症状是通过降低人体内HBsAg水平而得到改善的。

诊断试剂、试剂盒、检测方法

一方面，本申请提供了一种诊断试剂，其包含标记的前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段、前述核酸的互补链或所述互补链的片段、或前述构建体、病毒、噬菌体或细胞。

在一些实施方案中，标记所使用的标记物选自如下的一种或多种：放射性标记物、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。在一些实施方案中，标记物可选自如下的一种或多种：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记分子，荧光蛋白分子，荧光素分子，生物素分子，同位素等显影剂。在一些实施方案中，所述标记物与所述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段、前述核酸的互补链或所述互补链的片段耦合，形成复合物。

另一方面，本申请还提供了一种诊断试剂盒。在一些实施方案中，所述试剂盒包含前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述试剂盒包含前述核酸、所述核酸片段，或所述核酸的互补链或所述互补链的片段。在一些实施方案中，所述试剂盒包含前述诊断试剂。在一些实施方案中，所述试剂盒是体外检测试剂盒。在一些实施方案中，所述试剂盒是免疫检测试剂盒，例如ELISA试剂盒或免疫组化试剂盒，其包含前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述试剂盒是体内无创诊断试剂盒，其包含前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结

合片段，且所述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段与标记分子形成复合物。在一些实施方案中，所述体内无创诊断试剂盒，可用于选自以下的显像方法：放射免疫显像或靶向超声造影。当用于放射免疫显像时，所述标记分子为放射性核素。当用于靶向超声造影时，所述标记分子为超声造影剂。

此外，本申请还提供了一种使用前述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段、前述诊断试剂或试剂盒检测HBV、诊断HBV感染或判断HBV相关疾病进程的方法，其包括使上述诊断试剂与来自受试者的体液接触。

在一些实施方案中，所述来自受试者的体液为受试者的血浆或血清。

以上详细描述了本申请的优选实施方案，但是，本申请并不限于此。在本申请的技术构思范围内，可以对本申请的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本申请所公开的内容，均属于本申请的保护范围。

应当理解，以上描述以及随后的实施例旨在说明而不是限制本申请的范围。在本申请范围内的其他方面，优点和修改对于本申请所属领域的技术人员将是显而易见的。基于本申请的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

实施例

实施例1：HBsAg抗体表达载体的构建

将HindIII酶切位点、Kozak序列、分泌信号肽基因和HBsAg抗体重链编码基因（包括VH氨基酸序列的编码基因和人源IgG1的恒定区编码基因）、终止码和EcoRI编码基因依次串联融合，并使用化学合成的方式获得基因片段。通过EcoRI和HindIII位点，将上述片段插入真核表达质粒pCDNA 3.1(+)（购自Invitrogen Corporation，货号V790-20）中并测序验证，得到用于HBsAg抗体重链的表达质粒pCDNA3.1(+)-DH。

将HindIII酶切位点、Kozak序列、分泌信号肽基因和HBsAg轻链编码基因（包括VL氨基酸序列的编码基因和κ链恒定区的编码基因）、终止码和EcoRI编码基因依次串联融合，并使用化学合成的方式获得基因片段。通过EcoRI和HindIII位点，将上述片段插入真核表达质粒pCDNA 3.1(+)中并测序验证，得到用于抗体轻链的表达质粒pCDNA3.1(+)-DL。

本申请实施例中测试的HBsAg抗体中，编号分别为KW027-021、KW02

7-2-032、KW027-2-033、KW027-2-042、KW027-2-055、KW027-2-060、KW027-2-085、KW027-2-088、KW027-2-094、KW027-2-100、KW027-2-112、KW027-2-113、KW027-2-116、KW027-2-055-YD、KW027-2-055-HD的抗体，HCDR1的序列均如SEQ ID NO:1所示，HCDR2的序列均如SEQ ID NO:2所示，LCDR2的序列均如SEQ ID NO:28所示，LCDR3均如SEQ ID NO:29所示。HCDR3和LCDR1的序列如表1所示，其中HCDR3符合通式ARDLWX1X2X3X4X5DYGX6DV，LCDR1符合通式X7SIX8TX9。

表1

组合名称	HCDR3	LCDR1
KW027-021	ARDLWNDDVDYYGMDV (SEQ ID NO:71)	QSISTY (SEQ ID NO:72)
KW027-2-032	X1 为 N, X2 为 F, X3 为 V, X4 为 S, X5 为 D, X6 为 I (ARDLWNFVSDDYGIDV, SEQ ID NO:3)	X7 为 S, X8 为 S, X9 为 F (SSISTF, SEQ ID NO:15)
KW027-2-033	X1 为 D, X2 为 H, X3 为 Q, X4 为 S, X5 为 Q, X6 为 I (ARDLWDHQSDYGIDV, SEQ ID NO:4)	X7 为 H, X8 为 S, X9 为 D (HSISTD, SEQ ID NO:16)
KW027-2-042	X1 为 Y, X2 为 F, X3 为 P, X4 为 S, X5 为 E, X6 为 M (ARDLWYFPSEDYGMDV, SEQ ID NO:5)	X7 为 Y, X8 为 S, X9 为 D (YSISTD, SEQ ID NO:17)
KW027-2-055	X1 为 I, X2 为 E, X3 为 R, X4 为 T, X5 为 E, X6 为 M (ARDLWIERTEDYGMDV, SEQ ID NO:6)	X7 为 S, X8 为 S, X9 为 D (SSISTD, SEQ ID NO:18)
KW027-2-060	X1 为 S, X2 为 W, X3 为 H, X4 为 D, X5 为 E, X6 为 M (ARDLWSWHEDEDYGMDV, SEQ ID NO:7)	X7 为 P, X8 为 S, X9 为 T (PSISTT, SEQ ID NO:19)
KW027-2-085	X1 为 D, X2 为 R, X3 为 Q, X4 为 L, X5 为 D, X6 为 M (ARDLWDRQLDDYGMDV, SEQ ID NO:8)	X7 为 Y, X8 为 S, X9 为 S (YSISTS, SEQ ID NO:20)
KW027-2-088	X1 为 D, X2 为 Q, X3 为 T, X4 为 Y, X5 为 D, X6 为 L (ARDLWDQTYDDYGLDV, SEQ ID NO:9)	X7 为 Q, X8 为 S, X9 为 V (QSISTV, SEQ ID NO:21)
KW027-2-094	X1 为 D, X2 为 Q, X3 为 T, X4 为 F, X5 为 D, X6 为 L (ARDLWDQTFDDYGLDV, SEQ ID NO:10)	X7 为 Q, X8 为 S, X9 为 F (QSISTF, SEQ ID NO:22)
KW027-2-100	X1 为 V, X2 为 M, X3 为 Q, X4 为 S, X5 为 D, X6 为 M (ARDLWVMQSDDYGMDV, SEQ ID NO:11)	X7 为 Y, X8 为 S, X9 为 T (YSISTT, SEQ ID NO:23)
KW027-2-112	X1 为 S, X2 为 P, X3 为 Y, X4 为 S, X5 为 D, X6 为 M (ARDLWSPYSDDYGMDV, SEQ ID NO:12)	X7 为 L, X8 为 S, X9 为 Y (LSISTY, SEQ ID NO:24)
KW027-2-113	X1 为 M, X2 为 E, X3 为 R, X4 为 T, X5 为 D, X6 为 M (ARDLWMERTDDYGMDV, SEQ ID NO:13)	X7 为 I, X8 为 S, X9 为 D (ISISTD, SEQ ID NO:25)
KW027-2-116	X1 为 S, X2 为 D, X3 为 Q, X4 为 H, X5 为 D, X6 为 I (WSDQHDDYGIDV, SEQ ID NO:14)	X7 为 E, X8 为 S, X9 为 Y (ESISTY, SEQ ID NO:26)
KW027-2-055-YD	X1 为 I, X2 为 E, X3 为 R, X4 为 T, X5 为 E, X6 为 M (SEQ ID NO:6)	X7 为 S, X8 为 D, X9 为 D (SSIDTD, SEQ ID NO:27)
KW027-2-055-HD	X1 为 I, X2 为 E, X3 为 R, X4 为 T, X5 为 E, X6 为 M (SEQ ID NO:6)	X7 为 S, X8 为 D, X9 为 D (SEQ ID NO:27)

抗体KW027-021、KW027-2-032、KW027-2-033、KW027-2-042、KW027-2-055、KW027-2-060、KW027-2-085、KW027-2-088、KW027-2-094、KW027-2-100、KW027-2-112、KW027-2-113、KW027-2-116的FR氨基酸序列为：

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:63)

HFR4: WGKGTTLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

抗体KW027-2-055-YD的FR氨基酸序列为：

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: YYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:69)

HFR4: WGKGTTLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

抗体KW027-2-055-HD的FR氨基酸序列为：

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: HYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:70)

HFR4: WGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列:

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

上述各抗体的VH和VL序列如表2所示。

表2

组合名称	VH	VL
KW027-021	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWNDDVDYGMVWVGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:45)
KW027-2-032	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWNFVSDDYGIDVWVGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:31)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQSYSTPLTFGGGTK VDIKR (SEQ ID NO:46)
KW027-2-033	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWDHQSQDYGIDVWVGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:47)
KW027-2-042	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWYFPSEDYGMVWVGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:48)
KW027-2-055	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWIERTEDYGMVWVGKGTLLTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQSYSTPLTFGGGTK VDIKR (SEQ ID NO:49)

KW027-2-060	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWSWHDDEYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASPSISTTLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:50)
KW027-2-085	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWDRQLDDYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASYSISTSLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:51)
KW027-2-088	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWDQTYDDYGLDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQSISTVLNWWYQKPK GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:52)
KW027-2-094	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWDQTFDDYGLDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASYSISTFLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:53)
KW027-2-100	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWVMQSDDYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASYSISTTLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:54)
KW027-2-112	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWSPYSDDYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:40)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASLSISTYLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:55)
KW027-2-113	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWMERTDDYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:41)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASISISTDLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:56)
KW027-2-116	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWSDQHDDYGLDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASESISTYLNWWYQKPKG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGK VDIKR (SEQ ID NO:57)
KW027-2-055- YD	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTYAAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CARDLWIERTEDYGMDEVWGKGLTVTVSS (SEQ ID NO:43)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASISIDTLNWWYQKPK GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:58)
KW027-2-055- HD	QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTGY YMHWRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTHYAAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASISIDTLNWWYQKPK GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE

	CARDLWIERTEDYGMDVWGKGLVTVSS (SEQ ID NO:44)	DFATYYCQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO:58)
--	--	--

各抗体的重链恒定区如SEQ ID NO:59所示,轻链恒定区如SEQ ID NO:60所示。

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:59)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC (SEQ ID NO:60)

实施例2: 抗HBsAg抗体的表达和纯化

使用实施例1所述的表达质粒pCDNA3.1(+)-DH和pCDNA3.1(+)-DL,通过真核表达细胞ExpiCHO-S™ cells(ThermoFisher, A29127)表达目的抗体。按照ExpiCHO-S ExpressionSystem操作手册,在质粒转染前一天将细胞密度调整至 1×10^6 个/毫升。在质粒转染当天,将质粒按照重链与轻链对应的关系组合(即同一编号抗体的轻链与抗体重链组合)后,与转染试剂混合,加入细胞培养基中。37℃,8% CO₂培养约22小时后补料,并于32℃,5%CO₂条件下持续培养10-12天,收集细胞培养上清进行抗体纯化。

表达上清用0.22 μM滤膜过滤,利用Protein A亲和层析法(购自Sepax公司,65008)从表达上清中捕获表达抗体,用平衡缓冲液(20mM Tris+100mM NaCl, pH7.5)平衡层析柱后,过亲和层析柱,用洗脱缓冲液(0.15M冰醋酸, pH3.0)洗脱。纯化后的抗体进行SDS PAGE、SEC检测,纯度在95%以上。

实施例3: 不同pH下与抗原结合活性测定

取包被有HBsAg抗原(500ng/mL, HBsAg抗原序列如SEQ ID NO:74所示)

的ELISA板,封闭后,每孔加入50 μ l待测抗体(浓度为2.5 μ g/ml),并在室温条件下孵育2h(每个抗体两孔)。随后,奇数列用PH7.4、偶数列用PH6.0的PBS洗板3次,3min/次;再分别用相应PH的PBST洗板3次,3min/次,最后整版用PH7.4 PBS洗板3次,3min/次。添加以1:5000稀释的anti M13-HRP 50 μ L,并在37 $^{\circ}$ C温育30min。随后,用PBS洗涤ELISA板4次,并添加底物TMB溶液。约15min至阳性对照孔显色,用H₂SO₄终止显色反应,并于OD₄₅₀测定读值。

MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTC
PGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLLFILLCLIFLLVLLDYQ
GMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIP
SSWAFARFLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWY
WGPSLYNILSPFLPLLPIFFCLWVYIH HHHHHH (SEQ ID NO:74)

结果如图1所示。结果显示,抗体032、033、042、055、060、085、088、094、100、112、113、116在中性条件(即pH7.4)下与抗原的结合活性不弱于阳性对照抗体021,且中性条件下与酸性条件(即pH6.0)下的结合活性差异不低于021。

实施例4: 体内药效试验

本实施例中的抗体的恒定区选用人源IgG1。

动物:

雄性C57BL/6 小鼠,5周龄,无特定病原体,购于上海斯莱克实验动物有限公司,并饲养于独立通风笼盒中。小鼠的饲养及使用药明康德IACUC批准的实验方案(IACUC #: ID01-013-2021v1.0)。小鼠度过4天的环境适应期后注射AAV/HBV病毒(即重组8型腺相关病毒载体携带1.3拷贝乙型肝炎病毒rAAV8-1.3HBV,在本文中“AAV/HBV病毒”与“rAAV8-1.3HBV”可互换使用)

溶剂: PBS。

受试抗体的剂量: 15mpk。

重组rAAV8-1.3HBV: rAAV8-1.3HBV(D型,ayw)由药明康德提供,批号为awy1-P4-200805, 1×10^{12} 病毒基因组(v.g.)/mL。实验前用无菌PBS稀释至 1×10^{10} v.g./ 200 μ L。每只小鼠注射200 μ L,即每只小鼠注射 1×10^{10} v.g.。

试验方法:

AAV/HBV小鼠模型建立

AAV/HBV注射. rAAV8-1.3HBV在注射前预先用无菌PBS配制成浓度为 $1 \times 10^{11} 1 \times 10^{10}$ v.g./200 μ L溶液。33只小鼠经尾静脉注射200 μ L rAAV8-1.3HBV溶液。

分组前采血: 病毒注射后第14和21, 所有感染的小鼠通过颌下静脉采血~60 μ L用于收集血浆。采集的静脉血用K2-EDTA抗凝, 在4 $^{\circ}$ C, 7000g/min条件下离心10分钟并收集血浆。血浆通过ELISA检测HBsAg。血浆样本保存于-80 $^{\circ}$ C直到送至药明康德生物部体外实验室检测相关项目。

第一次给药记为第0天, 感染后第24天即第0天。根据病毒注射后第14和21天采集的血浆HBsAg水平对小鼠进行分组, 从45只小鼠中挑选33只正式实验用的小鼠, 随机分为11组, 标记为第1组到第11组, 每组小鼠数量均为3。所有小鼠通过尾静脉注射PBS或测试抗体, 15mpk, 给药一次。所有小鼠给药前称量体重。

采血:

给药后第-14、-3、1、3、5、7、10、14、17、21、24和28天, 所有小鼠通过颌下静脉采血, 收集血浆, 用于检测HBsAg。

实验终点: 所有小鼠在第28天, 先经过颌下静脉采血~60 μ L用于收集血浆, 用于HBsAg检测, 然后进行安乐死。

体重记录: 体内实验过程中, 每天观察小鼠状态, 并在给药和感染当天, 以及安乐死当天记录小鼠体重。

样品保存和转移: 所有血浆样品置于-80 $^{\circ}$ C保存, 并用干冰转移至药明康德生物部体外实验室进行相应检测。

ELISA检测小鼠血浆中HBsAg的含量. 实验步骤参照HBsAg ELISA (安图生物, CL 0310) 试剂盒说明书。方法简述如下: 将血浆样品稀释20或600倍, 加入包被板中, 与酶结合物共同温育 (37 $^{\circ}$ C, 60分钟), 重复洗板5次, 加入发光底物, 室温避光反应10分钟, 用酶标仪检测发光强度。

各抗体在AAV/HBV小鼠模型中对HBV复制的抑制活性通过检测小鼠血浆中HBsAg的表达来进行评价, 结果如图2所示。

结果显示:

受试化合物对AAV/HBV小鼠血浆HBsAg的影响

溶剂组（组1）小鼠血浆HBsAg含量在实验中保持相对稳定，在4.27-4.73 log₁₀ IU/mL间波动（波动不超过0.46 log₁₀ IU/mL）；与溶剂组相比，治疗组2（抗体021，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.03 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.23 log₁₀ IU/mL；治疗组3（抗体033，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低2.40 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.23 log₁₀ IU/mL；治疗组4（抗体055，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低2.61 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为2.97 log₁₀ IU/mL；治疗组5（抗体060，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.00 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.02 log₁₀ IU/mL；治疗组6（抗体085，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.27 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.12 log₁₀ IU/mL；治疗组7（抗体088，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.98 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.23 log₁₀ IU/mL；治疗组8（抗体094，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.93 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为3.75 log₁₀ IU/mL；治疗组9（抗体100，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低2.46 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.53 log₁₀ IU/mL；治疗组10（抗体113，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低2.40 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.52 log₁₀ IU/mL；治疗组11（抗体116，15 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.05 log₁₀ IU/mL（ $p<0.01$ ），到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为4.04 log₁₀ IU/mL。同时，与治疗组2相比，受试抗体均可显著降低血浆中HBsAg含量，其中，治疗组4（抗体055，15 mpk）效果最为显著。给药后1天，平均降低1.58 log₁₀ IU/mL，且给药后28天，平均降低1.26 log₁₀ IU/mL。

实施例5：抗体021、055、055-YD、055-HD体内活性测定

实验方案同实施例4，分5组，每组小鼠4只，所用IgG1为鼠源IgG1。G2及G3组尾静脉注射抗体021及055（剂量9mpk），G4及G5组尾静脉注射抗体055-HD及055-YD（剂量9mpk），各组均给药一次，溶剂组注射给与15mpk PBS。HBsAg测试结果显示于图3。具体结果如下：

各组小鼠血浆HBsAg的含量。

溶剂组（组1）小鼠血浆HBsAg含量在实验中保持相对稳定，在4.41-4.61 log₁₀ IU/mL间波动（波动不超过0.20 log₁₀ IU/mL）；与溶剂组相比，治疗组2（抗体021m，9 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低1.65 log₁₀ IU/mL（p<0.01），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为3.62 log₁₀ IU/mL；治疗组3（抗体055，9 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低3.47 log₁₀ IU/mL（p<0.01），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为2.78 log₁₀ IU/mL；治疗组4（抗体055HD，9 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天均显著降低，平均降低3.25log₁₀ IU/mL（p<0.01），随后均呈现逐步回升趋势，在第28天，此时小鼠血浆HBsAg为2.68 log₁₀ IU/mL；治疗组5（抗体055YD，9 mpk）小鼠血浆HBsAg在给药后第1天即显著降低，平均降低3.21log₁₀ IU/mL（p<0.01），随后呈现逐步回升趋势，到第28天，此时小鼠血浆HBsAg为3.09 log₁₀ IU/mL。同时，与治疗组2相比，受试抗体均可显著降低血浆中HBsAg含量，其中，治疗组3（抗体055，9 mpk）效果最为显著。给药后1天，平均降低1.82 log₁₀ IU/mL，且给药后28天，平均降低0.84 log₁₀ IU/mL。

权 利 要 求 书

1、一种特异性结合乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中：

VH包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：

HCDR1: GYTFTGYG（SEQ ID NO:1），

HCDR2: INPNSGGT（SEQ ID NO:2），

HCDR3: ARDLWX1X2X3X4X5DYGX6DV；

VL包含如下所示的CDR氨基酸序列：

LCDR1: X7SIX8TX9，

LCDR2: AAS（SEQ ID NO:28），

LCDR3: QQSYSTPLT（SEQ ID NO:29）；

其中：

X1选自N、D、Y、I、S、V或M，

X2选自F、H、E、W、R、Q、M、P或D，

X3选自V、Q、P、R、H、T或Y，

X4选自S、T、D、L、Y、F或H，

X5选自D、Q或E，

X6选自M、I或L，

X7选自Q、S、H、Y、P、L、I或E，

X8选自S或D，

X9选自Y、F、D、T、S或V。

2. 根据权利要求1所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体包含如下所示的互补决定区（CDR）氨基酸序列：

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:15所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3；或者，

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:4所示的HCDR3，如SEQ ID NO:16所示的LCDR1，如SEQ ID NO:28所示的LCDR2，以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3；或者，

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1，如SEQ ID NO:2所示的HCDR2，如SEQ ID NO:5所示的HCDR3，如SEQ ID NO:17所示的LCDR1，如SEQ ID NO:29所示的LCDR3；或者，

O:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:6所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:18所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:7所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:19所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:8所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:20所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:21所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:10所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:22所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:23所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:12所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:24所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:13所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:25所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者,

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:14所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:26所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3; 或者

如SEQ ID NO:1所示的HCDR1, 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2, 如SEQ ID NO:6所示的HCDR3, 如SEQ ID NO:27所示的LCDR1, 如SEQ ID NO:28所示的LCDR2, 以及如SEQ ID NO:29所示的LCDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其包含人类通用框架区（FR）。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中，

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKAS（SEQ ID NO:61）

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW（SEQ ID NO:62）

HFR3: NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC（SEQ ID NO:63）

HFR4: WGKGTLLTVSS（SEQ ID NO:64）

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS（SEQ ID NO:65）

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY（SEQ ID NO:66）

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC（SEQ ID NO:67）

LFR4: FGGGTKVDIKR（SEQ ID NO:68）。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中，

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKAS（SEQ ID NO:61）

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW（SEQ ID NO:62）

HFR3: YYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC（SEQ ID NO:69）

HFR4: WGKGTLLTVSS（SEQ ID NO:64）

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS（SEQ ID NO:65）

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY（SEQ ID NO:66）

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC（SEQ ID NO:67）

LFR4: FGGGTKVDIKR（SEQ ID NO:68）。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原

结合片段，其中，

VH包含如下所示的FR氨基酸序列：

HFR1: QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO:61)

HFR2: MHWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO:62)

HFR3: HYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO:70)

HFR4: WGKGTLVTVSS (SEQ ID NO:64)

VL包含如下所示的FR氨基酸序列：

LFR1: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:65)

LFR2: LNWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:66)

LFR3: SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:67)

LFR4: FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO:68)。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中VH序列与VL序列选自如下任一组的氨基酸序列或与如下任一组中VH序列和VL序列分别具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列：

- 1) SEQ ID NO:31与SEQ ID NO:46,
- 2) SEQ ID NO:32与SEQ ID NO:47,
- 3) SEQ ID NO:33与SEQ ID NO:48,
- 4) SEQ ID NO:34与SEQ ID NO:49,
- 5) SEQ ID NO:35与SEQ ID NO:50,
- 6) SEQ ID NO:36与SEQ ID NO:51,
- 7) SEQ ID NO:37与SEQ ID NO:52,
- 8) SEQ ID NO:38与SEQ ID NO:53,
- 9) SEQ ID NO:39与SEQ ID NO:54,
- 10) SEQ ID NO:40与SEQ ID NO:55,
- 11) SEQ ID NO:41与SEQ ID NO:56,
- 12) SEQ ID NO:42与SEQ ID NO:57,
- 13) SEQ ID NO:43与SEQ ID NO:58, 或者
- 14) SEQ ID NO:44与SEQ ID NO:58。

8、根据权利要求1-7中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自：Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Fv、Fd、dAb、双体抗体（diabody）、或多体抗体（multibody）。

9、根据权利要求1-8中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为全人抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合抗体或纳米抗体。

10、根据权利要求1-9中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其为单特异性抗体、双特异性抗体、或多特异性抗体。

11、根据权利要求1-10中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体还包含重链恒定区和轻链恒定区，优选，所述重链恒定区选自IgG的重链恒定区，所述轻链恒定区选自κ链或λ链。

12、一种用于诊断HBsAg感染的诊断试剂，其包含被标记的权利要求1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段。

13、根据权利要求12所述的诊断试剂，其中所述特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段是被选自如下的一种或多种标记物标记的：放射性标记物、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。

14、一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列。

15、一种构建体，其包含权利要求14所述的核酸分子。

16、根据权利要求15所述的构建体，其选自质粒、噬菌粒、病毒载体、或线性核酸。

17、一种细胞，其表达权利要求1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段，或包含权利要求14所述的核酸，或权利要求15或16所述的构建体。

18、一种药物组合物，其包含权利要求1-11中任一项所述的特异性结合HBsAg的抗体或其抗原结合片段或权利要求14所述的核酸。

19、一种诊断试剂盒，其包含权利要求12或13的诊断试剂。

20、一种治疗或预防乙型肝炎病毒感染的方法，其包含向患者施用有效量的权利要求18所述的药物组合物。

21、一种治疗乙型肝炎的方法，其包含向患者施用有效量的权利要求18所述的药物组合物。

22、一种检测乙型肝炎病毒的方法，其包括使权利要求12或13的诊断试剂与来自受试者的体液接触。

23、根据权利要求22所述的方法，其中所述来自受试者的体液为受试者的血浆或血清。