



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118420750 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202410472145.5

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.19

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(71) 申请人 武汉生物制品研究所有限责任公司

地址 430000 湖北省武汉市江夏区郑店黄  
金工业园路1号

(72) 发明人 欧阳蕾 吴佩璇 师江龙 周建花  
潘勇兵

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 42242

专利代理师 张文静

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

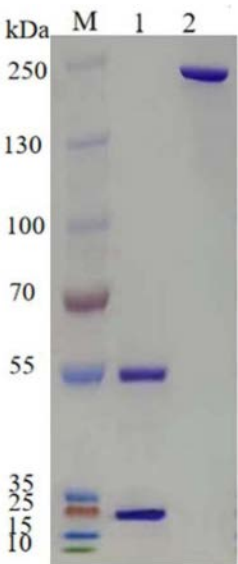
权利要求书1页 说明书5页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其  
抗体片段

(57) 摘要

本发明具体涉及一种抗猴痘病毒A35R蛋白  
的单克隆抗体8D7。本发明先将MPXV A35S基因序  
列通过linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>进行了重复串联,然后  
用其作为免疫原,筛选得到了抗猴痘病毒A35R蛋  
白的单克隆抗体8D7,该单克隆抗体重链包含如  
SEQ ID NO.1~3所示的氨基酸序列构成的CDR1、  
CDR2、CDR3,轻链包含如SEQ ID NO.4~6所示的  
氨基酸序列构成的CDR1、CDR2、CDR3。将其进一步  
实验研究发现,其特异性好,结合活性和亲和力  
较高,可用于胶体金快速检测试剂盒,为检测猴  
痘病毒A35R蛋白奠定了基础。



1. 一种抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段,其特征在于,重链包含如SEQ ID NO.1~3所示的氨基酸序列构成的CDR1、CDR2、CDR3,轻链包含如SEQ ID NO.4~6所示的氨基酸序列构成的CDR1、CDR2、CDR3。
2. 根据权利要求1所述的抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段,其特征在于,包含如SEQ ID NO.7所示的重链可变区和如SEQ ID NO.8所示的轻链可变区。
3. 根据权利要求1所述的抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段,其特征在于,所述单克隆抗体的重链氨基酸序列为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸序列后形成的具有同样功能的氨基酸序列或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有95%以上同源性且具有同样功能的氨基酸序列;和/或,所述单克隆抗体的轻链氨基酸序列为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸序列后形成的具有同样功能的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有95%以上同源性且具有同样功能的氨基酸序列。
4. 编码权利要求1或2或3所述的抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段的核苷酸分子。
5. 根据权利要求4所述的核苷酸分子,其特征在于,所述多核苷酸分子具有SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列;和/或,所述多核苷酸分子具有SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列。
6. 包含权利要求4或5所述的核苷酸分子的工程细胞、重组载体。
7. 用于检测猴痘病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1或2或3所述的单克隆抗体或抗体片段,或权利要求4或5所述的核苷酸分子编码的单克隆抗体或抗体片段。
8. 权利要求1或2或3所述的单克隆抗体或抗体片段,或权利要求4或5所述的核苷酸分子编码的单克隆抗体或抗体片段在制备检测猴痘病毒试剂盒中的应用。
9. 权利要求1或2或3所述的单克隆抗体或抗体片段,或权利要求4或5所述的核苷酸分子编码的单克隆抗体或抗体片段在制备抑制、预防、治疗猴痘病毒药物中的应用。

## 抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段

### 技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体技术领域,具体涉及一种抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7。

### 背景技术

[0002] 猴痘是由猴痘病毒(Monkeypox Virus,MPXV)引起的人畜共患病。猴痘病毒是一种双链DNA病毒,属痘病毒科、脊痘病毒亚科、正痘病毒属。猴痘患者的典型症状包括头部和身体疼痛、发烧、喉咙痛、疲劳、淋巴结肿大和典型的皮疹。2022年5月起,猴痘在多个国家迅速传播。

[0003] 猴痘病毒A35R蛋白是细胞外包膜病毒粒子(Extracellular Enveloped Virions,EEV)的包膜成分,控制肌动蛋白尾部的产生,是病毒在细胞间扩散传播中所必须的。猴痘病毒A35R蛋白是刺激机体产生中和抗体的主要抗原位点之一,是疫苗主要的保护性位点,同时也是血清学检测的潜在靶点,可用于病毒的特异性鉴定和疾病诊断。抗猴痘病毒A35R单克隆抗体可用于胶体金快速检测试剂盒,作为现有猴痘病源检测方法的补充,辅助检测疑似患者,筛查重点人群,填补部分落后地区MPXV检测的空白。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于提供一种抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段,其重链包含如SEQ ID NO.1~3所示的氨基酸序列构成的CDR1、CDR2、CDR3,轻链包含如SEQ ID NO.4~6所示的氨基酸序列构成的CDR1、CDR2、CDR3。

[0005] 作为一种优选的实施方式,所述抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段包含如SEQ ID NO.7所示的重链可变区和如SEQ ID NO.8所示的轻链可变区。

[0006] 作为一种优选的实施方式,所述抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段的重链氨基酸序列为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸序列后形成的具有同样功能的氨基酸序列或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有95%以上同源性且具有同样功能的氨基酸序列;和/或,所述单克隆抗体的轻链氨基酸序列为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸序列后形成的具有同样功能的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有95%以上同源性且具有同样功能的氨基酸序列。

[0007] 该单克隆抗体8D7特异性好,结合活性和亲和力较高,可用于胶体金快速检测试剂盒,为检测猴痘病毒A35R蛋白奠定了基础。

[0008] 本发明的目的之二还在于保护编码上述抗猴痘病毒A35R蛋白的单克隆抗体8D7或其抗体片段的核苷酸分子。

[0009] 优选的,所述多核苷酸分子具有SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列;和/或,所述多核苷酸分子具有SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列。

[0010] 本发明的目的之三还在于保护包含上述核苷酸分子的工程细胞、重组载体。

[0011] 本发明的目的之四还在于保护用于检测猴痘病毒的试剂盒,所述试剂盒包括上述的单克隆抗体或抗体片段,或上述核苷酸分子编码的单克隆抗体或抗体片段。

[0012] 本发明的目的之五还在于保护上述单克隆抗体或抗体片段在制备检测猴痘病毒试剂盒中的应用。

[0013] 本发明的目的之六还在于保护上述单克隆抗体或抗体片段在制备抑制、预防、治疗猴痘病毒药物中的应用。

## 附图说明

[0014] 图1为实施例1中纯化猴痘病毒A35R蛋白的SDS-PAGE和Western blot检测结果图;其中,A为猴痘病毒A35R蛋白的SDS-PAGE图,B为猴痘病毒A35R蛋白的Western blotting图,M为marker,1为猴痘病毒A35R蛋白;

[0015] 图2为实施例2中获得的单克隆抗体8D7的SDS-PAGE电泳检测结果;泳道1为非还原SDS-PAGE电泳,泳道2为还原SDS-PAGE电泳;

[0016] 图3为单克隆抗体8D7特异性结合猴痘病毒A35R蛋白及灭活猴痘病毒的Western blot检测结果图;其中,A为猴痘病毒A35R蛋白的WB图,B为灭活猴痘病毒的WB图,M为marker,1:一抗为8D7,2:阳性对照;

[0017] 图4为单克隆抗体8D7结合活性检测结果;

[0018] 图5为单克隆抗体8D7亲和力检测结果。

## 具体实施方式

[0019] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。

[0020] 以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0021] 在本发明实施例中,若无特殊说明,所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市售产品;在本发明实施例中,若未具体指明,所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0022] 试剂来源:BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京索莱宝科技有限公司;SPF级BALB/c小鼠,雌性,6~8周龄,由武汉生物制品研究所有限责任公司实验动物室提供并饲养;RPMI 1640培养基及胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自美国Gibco公司;尿素、小鼠抗HIS标签抗体 (HRP标记) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司;抗猴痘病毒A35R鼠单克隆抗体购自北京义翘神州科技股份有限公司;杂交瘤培养添加因子购自Frdbio福因德科技 (武汉) 有限公司;蛋白Maker (Protein Ladder)、BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo公司;牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 购自美国Sigma公司;TMB显色液购自美国BD公司;HAT、HT、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、Protein G重力柱及IPTG均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;腹水专用佐剂及小鼠单抗亚型鉴定试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司;Scientz-IID超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技有限公司,ELx800吸收光酶标仪购自美国Biotek公司。

[0023] 实施例1猴痘病毒A35R蛋白的原核表达

[0024] 从NCBI上获取猴痘病毒A35R(GenBank登录号:AAL40603.1)基因组序列,保留非跨膜区序列,通过linker(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>将基因序列重复串联,在基因序列的3'端、5'端分别引入NcoI和XhoI酶切位点并对序列进行优化,优化序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并构建在pET22b(+)载体上。

[0025] 优化后的序列为:CCATGGATGTAAGGCAAAACCAGTGTATGTCAGC TAATGAGGCTGCCATCAC TGATAGTGCGGTAGCGGTGCGCGCTGCTTCGTCTACCCATCGTAAGGTTGCAAGCAGTACAACCCAATACGACCAC AAAGAAAGCTGTAACGGCCTGTACTACCAGGGTTCTTGTTACATCCTGCATAGCGACTACAAATCCTTTGAGGATG CAAAAGCGAACTGTGCGGCGGAGTCCTCTACCCTGCCGAACAAGTCCGACGTGTTGACCACTTGGCTCATTGATTA TGTCGAGGACACCTGGGGTTCGGACGGCAACCCGATCACGAAAACCACGAGCGACTACCAAGACAGCGACGTGAGC CAAGAGGTTGCAAGTACTTTTGACCGGTGGCGGAGGCTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGTGGTGGCGGTTCCGTGC GCCAAAATCAGTGTATGAGCGCAAATGAAGCCGCGATCACTGATAGCGCGGTTGCTGTGGCTGCGGCGTCTCCAC CCACCGCAAGGTGGCGAGCAGCACCACCCAGTATGACCACAAGGAGAGCTGCAATGGTCTGTATTACCAGGGTTCT TGCTATATCCTGCACTCCGACTATAAGAGCTTCGAGGACGCCAAGGCGAACTGCGCCGCGGAAAGCTCCACCTTAC CGAATAAAAGCGACGTCTTGACGACCTGGCTGATCGATTACGTGGAAGACACCTGGGGTTCGATGGTAATCCGAT TACCAAGACCACGAGCGACTACCAAGATTCGGATGTTAGCCAGGAGGTTTCGTAAATACTTCTGCACTGGTGGCGGT GGCTCCGGCGGTGGTGGCAGCGGTGGCGGCGGCAGTGTTTCGTAGAACCAGTGTATGAGCGGAACGAAGCAGCGA TTACCGATAGCGCGGTGGCGGTGCTGCGGCTAGCTCTACGCATCGTAAAGTGGCAAGCAGCACCACACAGTATGA TCACAAAGAATCATGCAACGGTCTGTATTATCAAGGTTCTTGCTATATCCTGCATAGCGACTATAAGAGCTTTGAA GATGCAAAAGCAAACCTGCGCAGCGGAATCCAGCACCTTCCAAATAAAAGCGACGTTTTGACCACCTGGCTGATTG ATTACGTTGAAGATACCTGGGGTTCGACGGCAACCCGATTACGAAAACCACGAGCGACTACCAGGATTCTGATGT TAGCCAAGAGGTGCGTAAGTATTTCTGCACCCTCGAG(SEQ ID NO.11)。

[0026] 将重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞中,接种于含卡那霉素的LB液体培养基,37℃,200rpm,振荡培养3h,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,继续培养3~4h,收获菌液并通过超声波细胞粉碎机破碎菌体,离心弃上清,将沉淀溶解后通过Ni-NTA亲和柱纯化蛋白,纯化后的蛋白分别在含6/4/2/0M尿素的复性缓冲液(2mM还原型谷胱甘肽GSH,0.2mM氧化型谷胱甘肽GSSG,20mM Tris,1%甘氨酸,5%甘油,0.1%PEG 6000,6/4/2/0M尿素,pH 8.0)中进行梯度透析,每次4℃透析6~12h,将纯化复性后的蛋白通过还原性SDS-PAGE及Western blot进行鉴定,猴痘病毒A35R蛋白加入还原性5×SDS Loading Buffer,样品100℃煮10min后经SDS-PAGE电泳,转印至硝酸纤维素膜(NC膜),用5%脱脂奶粉4℃过夜封闭,用PBST洗膜后,用1:10000稀释的小鼠抗HIS标签抗体(HRP标记)37℃孵育1h,洗膜后加入显色液,曝光拍照,见图1。

[0027] 实施例2抗猴痘病毒A35R蛋白单克隆抗体的制备

[0028] 将纯化后的猴痘病毒A35R蛋白免疫小鼠,免疫途径均为腹腔加四肢皮下免疫,首次免疫为100μg/只,辅以等体积弗氏完全佐剂;21天后进行第二次免疫,50μg/只,辅以等体积弗氏不完全佐剂;14天后进行第三次免疫,50μg/只。免疫完成后通过间接ELISA检测血清效价,选择血清效价最高的小鼠进行尾静脉冲击免疫,50μg/只,3天后取小鼠脾细胞,采用PEG融合法将脾细胞与SP2/0进行融合,通过HAT培养基筛选融合细胞,间接ELISA法对融合的杂交瘤细胞培养上清进行检测,以0.1μg/mL猴痘病毒A35R蛋白为抗原包被酶标板,1%

BSA封闭后加入杂交瘤细胞培养上清,37℃孵育1h后加入1:20000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体,37℃孵育1h,加入TMB显色液,37℃孵育15min后,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止,酶标仪读取A<sub>450 nm</sub>值。挑取A<sub>450 nm</sub>值>2.0的阳性杂交瘤细胞孔进行亚克隆,将杂交瘤细胞接种小鼠体内,制备腹水,通过Protein G蛋白纯化重力柱纯化腹水,得抗猴痘病毒A35R蛋白单克隆抗体8D7。

[0029] SDS-PAGE检测纯化效果,采用还原性及非还原性SDS-PAGE鉴定抗体纯度。将纯化后的抗体加入还原性5×SDS Loading Buffer及非还原性4×SDS Loading Buffer,样品100℃煮10min后经SDS-PAGE电泳,SDS-PAGE结果见图2,显示在非还原条件下,鼠源SARS-CoV-2抗体呈现分子量约为200kDa的条带;在还原条件下呈现分子量约为55kDa和25kDa的两条带,分别对应抗体的重链和轻链。测序可知,单克隆抗体8D7的序列信息如下:

[0030] 重链CDR1(VHCDR1)为如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列:GYAFTTYN;

[0031] 重链CDR2(VHCDR2)为如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列:IDPYNGGT;

[0032] 重链CDR3(VHCDR3)为如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列:ARRGSFDY;

[0033] 轻链CDR1(VLCDR1)为如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列:QDINKY;

[0034] 轻链CDR2(VLCDR2)为如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列:YTS;

[0035] 轻链CDR3(VLCDR3)为如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列:LQYDNLWT。

[0036] 重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示:LVKPGASVKVSCKAS GYAFTTYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTTYNQKFKGKATLTVD KSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARRGSFDYWGQGTTLTSS;

[0037] 轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示:LSASLGKVTITCKAS QDINKYLAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISISN LEPEDIATYYCLQYDNLWTFGGGTKLEIK。

[0038] 重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示:CTGGTGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGTTATGCATTCACTACCTACAACATGTACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAGGGGATCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA;

[0039] 轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示:CTTTCTGCATCTCTG GGAGGCAAAGTCA CCATCACTTGCAAGGCAAGCCAAGACATTAACAAGTATCTGGCTTGGTACCAACACAAGCCTGGAAAAGGTCTTAGCTGCTCATACATTACACATCTACATTACAGCCAGGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTATGATAATCTGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA。

[0040] 实施例3抗体的功能分析

[0041] (1)鼠源抗猴痘病毒A35R抗体8D7与抗原的特异性检测

[0042] 采用Western blot鉴定抗体特异性。猴痘病毒A35R抗原蛋白及灭活猴痘病毒(毒株为猴痘病毒西非株的IIb B.1分支,见参考文献:The assessment on cross immunity with smallpox virus and antiviral drug sensitivity of the isolated mpox virus strain WIBP-MPXV-001in China.)进行SDS-PAGE后,转印至NC膜,用5%脱脂奶粉4℃过夜封闭,用PBST洗膜后以纯化后的8D7为一抗37℃孵育1h,同时以购自北京义翘神州科技股份有限公司的抗猴痘病毒A35R鼠单抗为阳性对照孵育;洗膜后加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG

抗体,37℃孵育1h,洗膜后加入显色液,曝光拍照。

[0043] 结果如图3所示。由图3可知,8D7可与猴痘病毒A35R蛋白及灭活猴痘病毒特异性结合。注:由于MPXV A35R蛋白分子量较小,为增强其免疫原性,本实验将MPXV A35R基因序列通过linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>进行了重复串联,因此在Western blot鉴定实验中,原核表达的MPXV A35R蛋白分子量与灭活MPXV中的天然A35R蛋白分子量不同。

[0044] (2) 鼠源抗猴痘病毒A35R抗体8D7与抗原的结合活性检测

[0045] 采用ELISA法测定抗体与猴痘病毒A35R蛋白结合能力,步骤为:以0.1μg/mL MPXV A35R蛋白为抗原包被酶标板,4℃过夜。1% BSA封闭2h后,将8D7从125μg/mL开始进行5倍系列稀释,稀释12个梯度,37℃孵育1h。加入1:20000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体,100μL/孔,37℃孵育1h。加入TMB显色液,37℃孵育15min后,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止,酶标仪读取A<sub>450 nm</sub>值。通过GraphPad Prism 8软件进行曲线拟合计算其半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC<sub>50</sub>),即为该株单抗的结合活性。

[0046] 结果如图4所示。由图4可知,单克隆抗体8D7针对A35R蛋白的结合活性为EC<sub>50</sub>=25.34ng/mL。

[0047] (3) 鼠源抗猴痘病毒A35R抗体8D7的亲和力检测

[0048] 利用GE公司的Biacore 8K仪器进行表面等离子共振实验,检测抗体亲和力。将抗鼠源IgG Fc抗体(购自Cytiva(思拓凡)公司,货号:BR100838)偶联到CM5芯片表面,以1μL/min的流速,将10μg/mL的单克隆抗体8D7用抗鼠源IgG Fc抗体捕获,捕获时间20s。分析物抗原猴痘病毒A35R蛋白分别稀释至以125、62.5、31.25、15.625nM的浓度,以30μL/min的流速,注入芯片通道,设置结合时间180s,解离时间大于600s。最后均使用pH 1.5的甘氨酸对芯片再生,再生时间30s,流速30μL/min。打开Biacore Evaluation Software程序,对实验数据进行拟合分析。

[0049] 结果如图5所示。由图5可知,8D7结合常数ka值为2.272E+5 1/Ms,解离常数kd值为2.452E-4 1/s,亲和力常数KD值为1.0808E-9M。

[0050] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

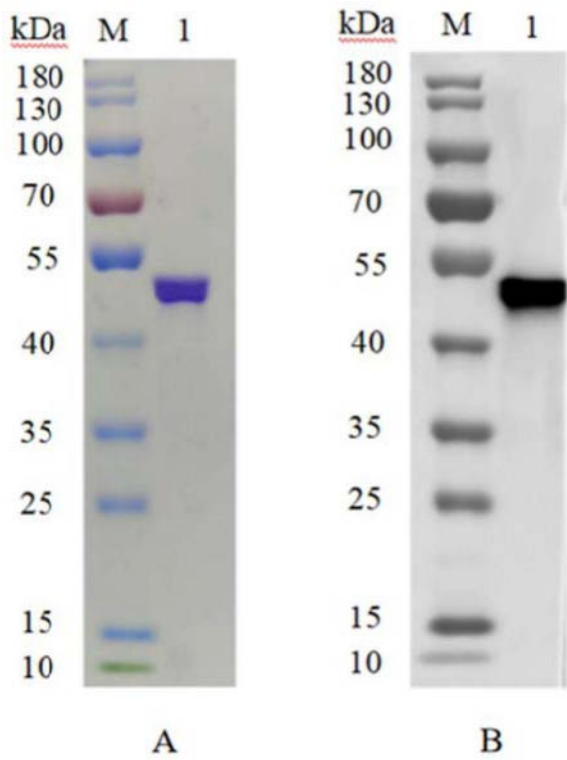


图1

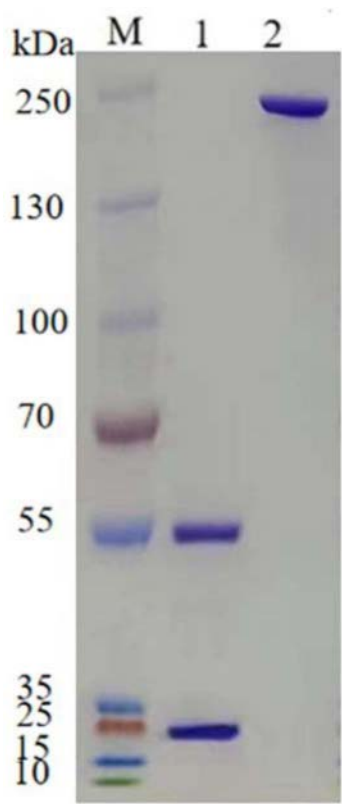


图2

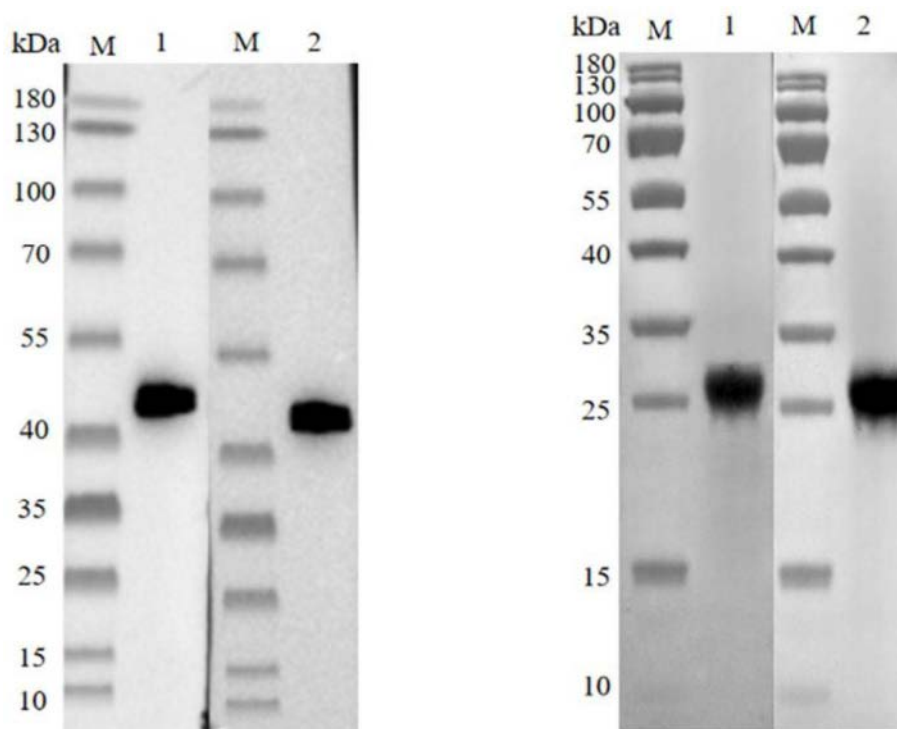


图3

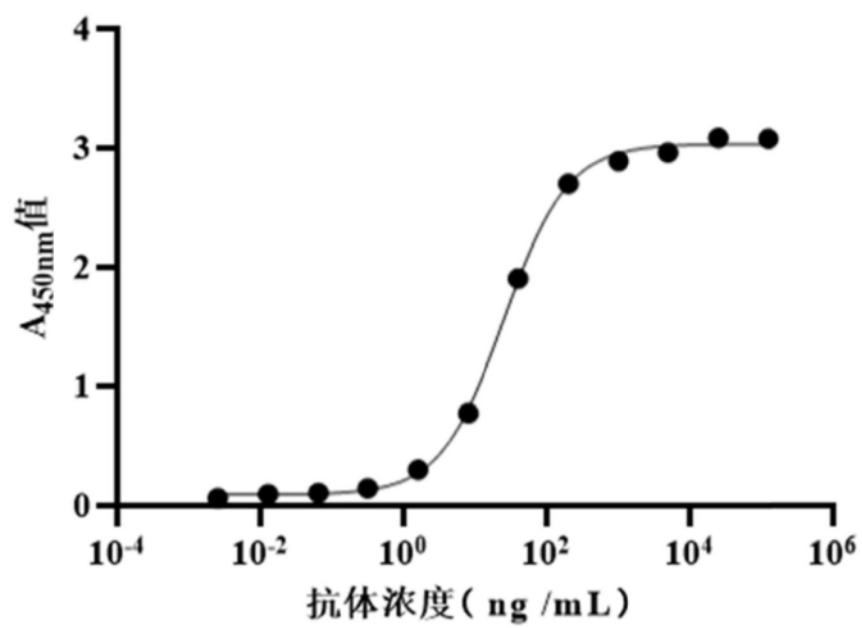


图4

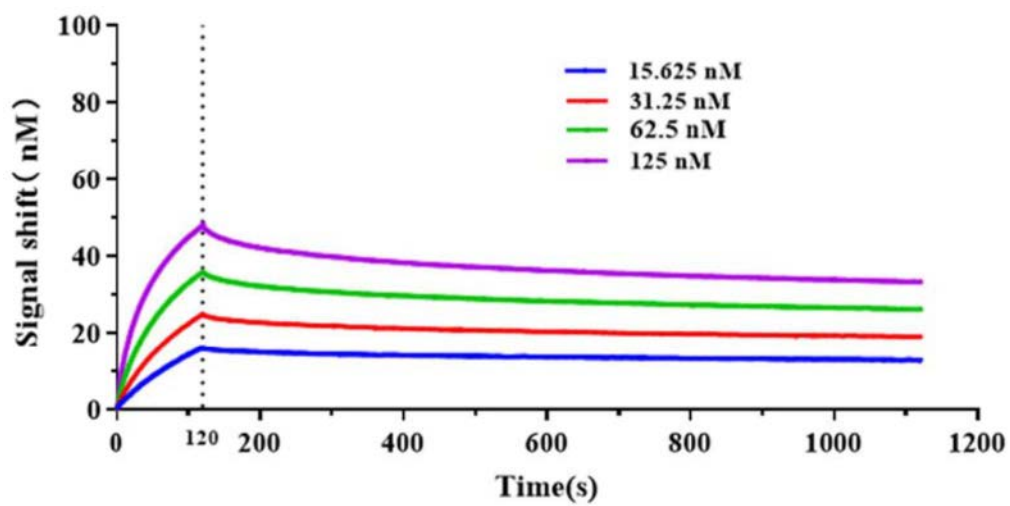


图5