



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108137675 B

(45) 授权公告日 2022. 03. 22

(21) 申请号 201680055161.8
(22) 申请日 2016.10.07
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108137675 A
(43) 申请公布日 2018.06.08
(30) 优先权数据
 PCT/EP2015/001970 2015.10.07 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.03.22
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2016/074114 2016.10.07
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/060504 EN 2017.04.13
(73) 专利权人 胡默波斯生物医学公司
 地址 瑞士, 贝林佐纳
(72) 发明人 D·柯蒂
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
 代理人 张全信 董志勇
(51) Int.Cl.
 C07K 16/08 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 101878037 A, 2010.11.03
 CN 104955837 A, 2015.09.30
 WO 2006076640 A1, 2006.07.20
 WO 9829442 A1, 1998.07.09
 WO 9740164 A1, 1997.10.30
 WO 2009069917 A1, 2009.06.04
 WO 2015107126 A1, 2015.07.23
 Forough Golsaz Shirazi et al..
 “Monoclonal antibodies to various
 epitopes of hepatitis B surface antigen
 inhibit hepatitis B virus infection”.
 《Journal of Gastroenterology and
 Hepatology》.2013, 第29卷第1083-1091页.
 曹树正 等. 自制乙型肝炎病毒表面抗原中
 和抗体的临床应用. 《国际检验医学杂志》. 2012,
 第33卷 (第11期), 第1349-1350页.
 审查员 陈阜

权利要求书3页 说明书67页
序列表33页 附图35页

(54) 发明名称
 中和乙型肝炎病毒的抗体和其用途

(57) 摘要
 本发明涉及抗体或其抗原结合片段, 其结合至乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抗原环区并强力地中和乙型肝炎病毒 (HBV) 和丁型肝炎病毒 (HDV) 二者的感染。本发明还涉及与抗体和抗原结合片段结合的表位, 以及编码这些抗体和抗体片段的核酸和产生这些抗体和抗体片段的细胞。此外, 本发明涉及本发明的抗体和抗体片段在诊断、预防和治疗乙型肝炎和丁型肝炎中的用途。

CN 108137675 B

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合至HBsAg的抗原环区并且中和乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒的感染,其中所述抗体或所述抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) 其分别如SEQ ID NO:34-37、39和40所示;或(ii) 其分别如SEQ ID NO:34-37、39和58所示;或(iii) 其分别如SEQ ID NO:34、66、36-37、39和40所示;或(iv) 其分别如SEQ ID NO:34、66、36-37、39和58所示。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或所述抗原结合片段包括Fc部分。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或所述抗原结合片段是IgG型。

4. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或所述抗原结合片段是IgG1型。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或所述抗原结合片段是单克隆抗体或其单克隆抗原结合片段和/或人抗体或其人抗原结合片段。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于所述抗体或所述抗原结合片段包括(i) 与SEQ ID NO:41共享至少95%序列同一性的重链可变区(VH)氨基酸序列;和(ii) 与SEQ ID NO:42、59或65共享至少95%序列同一性的轻链可变区(VL)氨基酸序列,其中如权利要求1的(i)、(ii)、(iii)或(iv)中所限定的所述CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和所述CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列被保持。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于所述抗体或所述抗原结合片段包括如SEQ ID NO:41所示的重链可变区(VH)氨基酸序列和如SEQ ID NO:42、59或65所示的轻链可变区(VL)氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于所述抗体或其抗原结合片段是纯化抗体。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于所述抗体或其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

10. 一种核酸分子,其包括编码根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

11. 根据权利要求10所述的核酸分子,其中所述多核苷酸序列包括与SEQ ID NO:43-51、60-64和69-78中任一种共享至少90%、至少95%和至少98%或99%或100%序列同一性的核酸序列,或由其组成,其中所述多核苷酸编码如权利要求1的(i)、(ii)、(iii)或(iv)中所限定的所述CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和所述CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

12. 一种载体,其包括根据权利要求10或11所述的核酸分子。

13. 一种细胞,其表达根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;或包括根据权利要求12所述的载体。

14. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体和/或根据权利要求13所述的细胞,和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或运载体。

15. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求

14所述的药物组合物在制备用于(i)预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎;或(ii)体外诊断乙型肝炎和/或丁型肝炎的药物中的用途。

16.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于治疗或减轻慢性乙型肝炎的药物中的用途。

17.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于在肝脏移植之后预防乙型肝炎感染或乙型肝炎再感染的药物中的用途。

18.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于预防乙型肝炎引发的肝功能衰竭的药物中的用途。

19.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于预防新生儿中的乙型肝炎的药物中的用途。

20.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于预防非免疫对象中或血液透析患者中的乙型肝炎的药物中的用途。

21.根据权利要求15-20中任一项所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述核酸分子、所述载体、所述细胞或所述药物组合物与聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂组合施用。

22.根据权利要求20所述的用途,其中所述聚合酶抑制剂是拉米夫定。

23.下列的组合:

(i)根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物;和

(ii)聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂,
在制备用于预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎的药物中的用途。

24.根据权利要求23所述的用途,其中所述乙型肝炎和/或丁型肝炎是慢性乙型肝炎和/或慢性丁型肝炎。

25.一种试剂盒,其包括:

(i)根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物;和

(ii)聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂。

26.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物用于通过体外检查抗乙型肝炎或抗丁型肝炎疫苗的抗原包含正确构

象的特定表位来监测所述疫苗的质量的用途。

27. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求10或11所述的核酸分子、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的细胞或根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于测定分离的血液样品是否被乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的药物中的用途。

中和乙型肝炎病毒的抗体和其用途

[0001] 本发明涉及针对乙型肝炎病毒 (HBV) 和针对丁型肝炎病毒 (HDV) 的抗体和其用途的领域。本发明的强力的抗乙型肝炎抗体结合至位于HBV包膜蛋白 (HBsAg) 的S结构域的抗原环区中的表位,如在本发明中确认的。本发明还涉及编码这样的抗体和抗体片段的核酸和产生这样的抗体和抗体片段的无限增殖化B细胞和培养的浆细胞。另外地,本发明涉及本发明的抗体和抗体片段在筛选方法以及在诊断、预防和治疗疾病,具体而言乙型肝炎和丁型肝炎中的用途。

[0002] 乙型肝炎病毒 (HBV) 由 (i) 包含三种相关表面蛋白 (乙型肝炎表面抗原, HBsAg) 和脂质的包膜和 (ii) 包围病毒DNA基因组和DNA聚合酶的二十面体核衣壳组成。HBV衣壳在RNA前基因组复制复合体的包装期间在受感染细胞的胞质溶胶中形成并且在病毒DNA基因组的合成期间通过在颗粒的腔中前基因组的反转录获得出芽的能力。三种HBV包膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg在内质网成形复杂的跨膜折叠,并且形成二硫键-连接的同源二聚体和异源二聚体。在细胞内膜处的出芽期间,胞质前S区域中的短线性结构域与衣壳表面上的结合位点相互作用。病毒粒子随后被分泌至血液中。另外地,表面蛋白可以在不存在衣壳的情况下出芽并且形成亚病毒颗粒 (SVP's), 其也以超过病毒粒子 $3-4\log$ 被分泌。高水平的HBsAg可以耗尽HBsAg特异性T细胞应答,并且被认为患有慢性乙型肝炎 (CHB) 的患者中的病毒免疫耐受的重要因子。

[0003] 乙型肝炎病毒引起潜在地威胁生命的急性和慢性肝脏感染。急性乙型肝炎由病毒血症表征,其有或没有症状,处于爆发型肝炎发生的风险下 (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [在印刷出版前电子出版])。尽管自1982年以来可以利用针对乙型肝炎的有效疫苗,但是WHO报道 2.4×10^8 个人长期地感染有乙型肝炎并且超过780,000个人每年死于乙型肝炎并发症。大约1/3的慢性乙型肝炎 (CHB) 患者发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝细胞癌,导致每年600,000例死亡 (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [在印刷出版前电子出版])。

[0004] 用于慢性乙型肝炎的当前可利用的治疗包括 (聚乙二醇化) 干扰素- α (IFN- α 或 pegIFN- α) 和核苷 (酸) 类似物——抑制乙型肝炎病毒 (HBV) DNA聚合酶的直接作用抗病毒药物 (DAA) (“聚合酶抑制剂”)。聚合酶抑制剂包括拉米夫定 (Lamivudine)、阿德福韦 (Adefovir)、恩替卡韦 (Entecavir)、替比夫定 (Telbivudine) 和替诺福韦 (Tenofovir)。聚合酶抑制剂 (拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦 (Entecavir)、替比夫定、替诺福韦) 抑制HBV DNA聚合酶的反转录酶功能并且因此干扰由前基因组RNA合成病毒DNA。这种治疗不阻止病毒传播、cccDNA的形成并且不影响HBsAg释放。而且,聚合酶抑制剂限制疾病进展,但是很少地清除病毒。因而,在停止治疗后经常观察到病毒复发,并且因此,聚合酶抑制剂应当被终身使用。另外地,在长时间治疗之后出现耐药性突变体。PEG-IFN- α 间接地通过免疫调节

作用并且直接地通过降低HBV转录物的稳态水平(增加的cccDNA结合组蛋白的乙酰化)来抑制HBV。但是,PEG-IFN- α 具有有限的效力并且引起严重的副作用。

[0005] 虽然pegIFN- α 在大约1/3的治疗患者中是有效的,但是聚合酶抑制剂显著地降低绝大多数治疗的那些患者中的病毒量(Timothy M.Block,Robert Gish,Haitao Guo,Anand Mehta,Andrea Cuconati,W.Thomas London,Ju-Tao Guo Chronic hepatitis B: What should be the goal for new therapies?Antiviral Research 98(2013)27-34)。干扰素 α 与许多不良反应相关联并且不能被用在患有晚期肝硬化或医学/精神病学禁忌症的患者中(Liang TJ,Block TM,McMahon BJ,Ghany MG,Urban S,Guo JT,Locarnini S,Zoulim F,Chang KM,Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B:From discovery to cure.Hepatology.2015Aug 3.doi: 10.1002/hep.28025.[在印刷出版前电子出版])。虽然聚合酶抑制剂比如恩替卡韦和替诺福韦似乎具有较少的副作用,但是HBeAg血清转化率和HBsAg损失率对于那些药物而言是低的。因此,大多数患者通常需要终身治疗,伴随相关的成本以及不良反应、耐药性和不依从(non-adherence)的风险。因而,用于慢性乙型肝炎的当前可利用的治疗仍然被多种限制阻碍并且不能被视为有疗效的。因此,虽然对于HBV的治疗已经得到改善,但是HBV患者常常需要终身治疗并且治愈仍然是有挑战性的目标(Liang TJ,Block TM,McMahon BJ, Ghany MG,Urban S,Guo JT, Locarnini S,Zoulim F,Chang KM,Lok AS.Present and future therapies of hepatitis B:From discovery to cure.Hepatology.2015Aug 3.doi: 10.1002/hep.28025.[在印刷出版前电子出版])。治愈慢性乙型肝炎(CHB)的最接近的结果和治疗的理想端点将是实现乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的失去,但是其尚未利用当前可利用的慢性乙型肝炎的治疗有效地实现(对于综述,参见Gish R.G.et al.,2015,Antiviral Research 121:47-58)。

[0006] 患有急性肝炎或肝细胞癌的严重代偿失调的HBV患者适用于原位肝移植(OLT)。在OLT之后,在没有预防的情况下乙型肝炎复发率>80%,同时>90%的移植受者在临床上利用组合的乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)和核苷(酸)类似物治疗来控制。乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)是从接种疫苗的供体纯化的多克隆免疫球蛋白。但是,长期HBIG施用伴随有数个未解决的问题,包括有限利用度和极其高的成本(Takaki A,Yasunaka T,Yagi T.Molecular mechanism to control post-transplantation hepatitis B recurrence.Int J Mol Sci.2015Jul 30;16(8):17494-513)。而且,不得不施用极其高的剂量,即在移植期间通过静脉输注给受者施用10克(基于结合分析包含10,000IU)。随后,每日静脉内施用2克持续8天并且每1-3个月进行进一步输注以维持抗HB血清水平高于100IU/ml。再者,需要终身治疗。

[0007] 当同时感染或二次感染丁型肝炎病毒(HDV)发生时,观察到甚至更严重的并发症。根据WHO,丁型肝炎感染全世界的大约 1.5×10^7 个人。HDV被视为卫星亚病毒,因为其仅在HBV存在的情况下才可以增殖。HDV是最小的动物病毒之一(40nm),其中其基因组仅为1.6kb并且编码S和L HDAg。对于HDV的基因组复制需要的所有其它蛋白质——包括RNA聚合酶,由宿主细胞提供并且HDV包膜由HBV提供。换句话说,HDV是对于其复制需要同时感染HBV的缺陷病毒,因为其利用乙型肝炎包膜蛋白(HBsAg)作为其自身的病毒粒子外壳。当被引入允许细胞中时,HDV RNA基因组复制并联合HDV编码的蛋白质的多份拷贝来组装核糖

核蛋白 (RNP) 复合体。RNP通过能够组装脂蛋白囊泡的HBV包膜蛋白从细胞输出,这些脂蛋白囊泡在被分泌之前出芽进入前-高尔基体区室 (pre-Golgi compartment) 的腔。而且,HBV包膜蛋白也提供将HDV靶向至未感染细胞的机制,从而 确保HDV的传播。

[0008] 由HDV引起的并发症包括在急性感染中更大可能的经历肝功能衰竭和迅速进展为肝硬化,以及在慢性感染中增加发展为肝癌的机会。与乙型肝炎病毒结合,丁型肝炎具有所有肝炎感染的最高致死率,为20% (Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. Gut. 2000 Mar; 46 (3) :420-6)。唯一被批准的用于慢性HDV感染的疗法是干扰素- α 。但是,利用干扰素- α 治疗HDV是相对无效的并且不是耐受良好的。利用干扰素- α 的治疗在1/4的患者中在治疗后六个月导致持续病毒性应答。再者,核苷(酸)类似物 (NA) 已经在丁型肝炎中被广泛地测试,但是它们似乎是无效的。NA 与干扰素的组合治疗也证明了是令人失望的并且因此对于新型治疗选择存在需要 (Zaigham Abbas, Minaam Abbas Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic Options. World J Gastroenterol 2015 August 28; 21 (32) :9461-9465)。

[0009] 鉴于以上,本发明的目标是提供基于抗体的产品,其能够中和乙型肝炎病毒 (HBV) 和 丁型肝炎病毒 (HDV) 二者。其能够实现改善的预防和治疗乙型肝炎。而且,目前没有可用于丁型肝炎的治疗,因而,本发明的目标也是提供用于预防和治疗丁型肝炎的基于抗体的产品。本发明的进一步目标是提供基于抗体的产品,其能够更好地治疗慢性乙型肝炎。为了这个目的,如果一种基于单一抗体的产品以不同方式通过 (i) 强力地中和HBV, (ii) 促进HBsAg和HBV的清除和 (iii) 诱导血清转化——即对病毒的免疫应答——起作用,则其是有利的。而且,抗体也可以有利地促进抗原的改善的呈递,从而促进抗HBV T细胞应答的恢复。此外,本发明的目标是提供抗体或其抗原结合片段,其结合至乙型肝炎病毒表面抗原的不同的——优选地所有已知的——基因型并结合至乙型肝炎病毒表面抗原的不同的——优选地所有已知的——传染性突变体。总之,本发明的目标是提供改善的抗体或其抗原结合片段,以及相关的核酸分子、载体和细胞以及药物组合物,其克服上面讨论的现有技术的缺点。

[0010] 本发明的目标通过在下面和所附权利要求书中陈述的主题来解决。

[0011] 在下文中,将描述本发明的要素。这些要素与具体实施方式一起被列举,但是,应当理解,它们可以以任何方式和任何数目进行组合以产生另外的实施方式。本说明书应当被理解为支持和包含将明确地描述的实施方式与任意数目的公开的和/或优选的要素进行组合的实施方式。另外,在本申请中的所有描述的要素的任何排列与组合应当被视为被本申请的说明书公开,除非上下文另外指示。

[0012] 除非另有限定,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0013] 贯穿本说明书和所附权利要求书,除非上下文另外要求,术语“包括 (comprise)”和变型比如“包括 (comprises和comprising)”将被理解为暗示包含规定的成员、整数或步骤但不排除任何其它非规定的成员、整数或步骤。术语“由……组成”是术语“包括”的特定实施方式,其中任何其它非规定的成员、整数或步骤被排除。在本发明的背景下,术语

“包括”涵盖术语“由……组成”。术语“包括 (comprising)”因而涵盖“包含 (including)”以及“由……组成”，例如，“包括”X的组合物可以唯一地由X组成或者可以包括一些另外的组成，例如X+Y。

[0014] 术语“一个 (a, an)”和“该 (the)”以及在描述本发明的背景下 (具体地在权利要求书的背景下) 使用的类似引用对象将被解释为涵盖单数和复数形式，除非本文中另有指示或者上下文明显矛盾。本文中值的范围的叙述仅意欲充当分别指落入该范围内的每个单独的值的速写方法。除非本文中另有指示，每个单个值被并入说明书，如同其在本文中单独叙述一样。说明书中语言不应当被解释为指示对实践本发明必不可少的任何非要求保护的要素。

[0015] 术语“基本上”不排除“完全”，例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时，术语“基本上”可以从本发明的限定中省略。

[0016] 涉及数值x的术语“大约”意思是 $x \pm 10\%$ 。

[0017] 如本文所使用，术语“疾病”与术语“紊乱”和“病症” (如在医疗状况下) 意欲是通常同义的，并且可互换地使用，因为它们都反映人或动物体或者其部位之一的异常状况，该异常状况损害正常功能，通常由有区别的征兆和症状显示，并且使得人和动物具有降低的寿命或生活质量。

[0018] 如本文所使用，提及对象或患者的“治疗”意欲包括阻止、预防、减轻、改善和疗法。术语“对象”或“患者”在本文中可互换地使用，意思是包括人在内的所有哺乳动物。对象的实例包括人、牛、狗、猫、马、山羊、绵羊、猪和兔。在一个实施方式中，患者是人。

[0019] 如本文所使用，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”以及这些术语的变体指的是分子，具体而言分别是肽、寡肽、多肽或包含融合蛋白在内的蛋白质，其包括通过正常肽键，或通过修饰的肽键——比如例如在等构肽的情况下——彼此接合的至少两个氨基酸。例如，肽、多肽或蛋白质优选地由选自遗传密码限定的20种氨基酸的氨基酸组成，其通过正常肽键 (“经典”多肽) 彼此连接。肽、多肽或蛋白质可以由L-氨基酸和/或D-氨基酸组成。具体而言，术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”也包括“模拟肽 (peptidomimetic)”，其被限定为包含非肽结构元件的肽类似物，该肽能够模拟或拮抗天然母体肽的生物学作用 (一种或多种)。模拟肽缺乏经典的肽特征，比如酶促易裂的肽键。具体而言，肽、多肽或蛋白质可以除了由遗传密码限定的20种氨基酸之外还包括非这些氨基酸的氨基酸，或者其可以由除了由遗传密码限定的20种氨基酸之外的氨基酸组成。具体而言，在本发明的背景下的肽、多肽或蛋白质可以同等地由通过天然过程——比如翻译后的成熟过程——或通过本领域技术人员熟知的化学过程修饰的氨基酸组成。这些修饰在文献中被充分地详细描述。这些修饰可以出现在多肽的任何地方：在肽骨架中、在氨基酸链中或者甚至在羧基或氨基末端处。具体而言，肽或多肽可以在泛素化之后支化或者可以是具有或不具有支化的环状的。该类型的修饰可以是对于本领域技术人员熟知的天然的或合成的翻译后加工的结果。在本发明的背景下的术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”具体地还包括修饰的肽、多肽和蛋白质。例如，肽、多肽或蛋白质修饰可以包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、核苷酸或核苷酸衍生物的共价固定、脂质或脂质衍生物的共价固定、磷脂酰肌醇的共价固定、共价或非共价交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、糖基化——包括聚乙二醇化、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、seneloylation、硫酸化、氨基酸加成

比如精氨酰化或泛素化。这些修饰在文献中被充分地详细描述 (Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2nd Ed., T.E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter et al. (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182:626-646 and Rattan et al., (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663:48-62)。因此, 术语“肽”、“多肽”、“蛋白质”优选地包括例如脂肽、脂蛋白、糖肽、糖蛋白等。

[0020] 如本文所使用, “(多) 肽”包括如上面所解释的通过肽键连接的氨基酸单体的单链。如 本文所使用, “蛋白质”包括一个或多个, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个(多) 肽, 即如上面所解释的通过肽键连接的氨基酸单体的一条或多条链。优选地, 根据本发明的蛋白质包括1、2、3或4个多肽。

[0021] 如本文所使用, 术语“重组体”(例如重组抗体、重组蛋白、重组核酸等)指的是任何分子(抗体、蛋白质、核酸等), 其通过重组手段制备、表达、创建或分离, 并且其不是天然存在的。

[0022] 如本文所使用, 术语“核酸”、“核酸分子”和“多核苷酸”可互换地使用并且意欲包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的, 但是优选地是双链DNA。

[0023] 如本文所使用, 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换地使用并且所有这样的名称包括后代。因此, 词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代对象细胞和衍生自 其的培养物, 不考虑传代的数目。还理解, 由于有意或无意突变, 所有后代在DNA含量 方面可能不是精确地相同的。包括与在原始转化细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性 的变体后代。在意欲表达不同名称时, 其根据上下文将是清楚的。

[0024] 如本文所使用, 术语“抗原结合片段”、“片段”和“抗体片段”可互换地使用, 指的是本发明的保留抗体的抗原结合活性的抗体的任何片段。抗体片段的实例包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。进一步, 如本文所使用的术语“抗体”包括抗体 和其抗原结合片段二者。

[0025] 如本文所使用, “中和抗体”是如此抗体: 其可以中和, 即阻止、抑制、降低、阻碍 或干扰病原体引起和/或保持(perpetuate) 宿主中的感染的能力。术语“中和抗体”和“中和……的抗体(一种或多种)”在本文中可互换地使用。这些抗体可以单独或组合使用, 在适当配制之后作为预防或治疗剂, 与主动免疫接种联合, 作为诊断工具, 或者作为本文中描述的生产工具。

[0026] 剂量通常涉及体重进行表达。因而, 表达为[g、mg或其它单位]/kg (或g、mg等) 的剂量通常指的是[g、mg或其它单位]“/kg (或g、mg等) 体重”, 即使术语“体重”没有明确提及。

[0027] 术语“结合”和“特异性结合”以及类似的引用对象不涵盖非特异性粘附。

[0028] 如本文所使用的术语“疫苗”通常被理解为预防或治疗性物质, 其提供至少一种抗原, 优选地免疫原。抗原或免疫原可以衍生自适合于接种疫苗的任何物质。例如, 抗原或免疫原可以衍生自病原体, 比如来自细菌或病毒颗粒等, 或者来自肿瘤或癌组织。抗原或免疫原刺激身体的适应性免疫系统以提供适应性免疫应答。具体而言, “抗原”或“免疫原”通常指的是如此物质: 其可以被免疫系统, 优选地被适应性免疫系统识别, 并且其能够触

发抗原特异性免疫应答,例如通过形成抗体和/或抗原特异性T细胞作为适应性免疫应答的一部分。通常,抗原可以是或者可以包括可以通过MHC呈递至T细胞的肽或蛋白质。

[0029] 如本文所使用,术语“序列变体”指的是与参比序列相比具有一种或多种变更的任何序列,其中参比序列是在“序列和SEQ ID编号的表格”(序列表)中列举的序列,即SEQ ID NO:1到SEQ ID NO:88中的任一种。因而,术语“序列变体”包括核苷酸序列变体和氨基酸序列变体。对于在核苷酸序列背景下的序列变体,参比序列也是核苷酸序列,而对于在氨基酸序列背景下的序列变体,参比序列也是氨基酸序列。如本文所使用的“序列变体”与参比序列具有至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%同一性。序列同一性通常关于参比序列(即在本申请中叙述的序列)的全长计算。如本文中提及的同一性百分比可以例如使用BLAST利用由NCBI规定的缺省参数来确定(the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62矩阵;空位开放罚分(gap open penalty)=11和空位扩展罚分(gap extension penalty)=1]。

[0030] 在核酸(核苷酸)序列背景下的“序列变体”具有变更的序列,其中参比序列中的核苷酸的一个或多个缺失,或被置换,或者一个或多个核苷酸插入参比核苷酸序列的序列中。在本文中通过标准的一字母名称(A、C、G或T)来提及核苷酸。由于遗传密码的简并性,核苷酸序列的“序列变体”可以导致各自的参比氨基酸序列的改变,即导致氨基酸“序列变体”,或者不这样。不导致氨基酸序列变体的核苷酸序列变体是优选的(沉默突变)。但是,导致“非沉默”突变的核苷酸序列变体也在本发明的范围内,尤其是这样的核苷酸序列变体,其导致与参比氨基酸序列具有至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0031] 在氨基酸序列背景下的“序列变体”具有变更的序列,其中与参比氨基酸序列相比一个或多个氨基酸缺失、被置换或被插入。作为变更的结果,这样的序列变体具有与参比氨基酸序列具有至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%同一性的氨基酸序列。例如,参比序列的每100个氨基酸,变体序列具有不超过10个变更——即缺失、插入或置换的任何组合——与参比序列具有“至少90%同一性”。

[0032] 虽然具有非保守氨基酸置换是可能的,但是优选的置换是保守氨基酸置换,其中置换的氨基酸与参比序列中的对应氨基酸具有类似的结构或化学性质。举例而言,保守氨基酸置换涉及将一种脂肪族或疏水性氨基酸例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸置换为另一种;将一种包含羟基的氨基酸例如丝氨酸和苏氨酸置换为另一种;将一种酸性残基例如谷氨酸或天冬氨酸置换为另一种;将一种包含酰胺的残基例如天冬酰胺和谷氨酰胺替换为另一种;将一种芳香族残基例如苯丙氨酸和酪氨酸替换为另一种;将一种碱性残基例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸替换为另一种;和将一种小氨基酸例如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和甘氨酸替换为另一种。

[0033] 氨基酸序列插入包括在从一个残基到包含一百个或更多个残基的多肽的长度范围内的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括氨基酸序列的N或C末端与报告分子或酶的融合。

[0034] 重要地,序列变体的变更不废除各自参比序列的功能,在当前情况下,例如,抗体

的序列或者其抗原结合片段结合至相同的表位和/或充分地中和HBV和HDV感染的功能。确定哪些核苷酸和氨基酸残基分别可以被置换、插入或缺失而不废除这样的功能的指导可以通过使用本领域中熟知的计算机程序被发现。

[0035] 如本文所使用,“衍生自”指定核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列指的是核酸、肽、多肽或蛋白质的起源。优选地,衍生自特定序列的核酸序列或氨基酸序列具有与其衍生自的那个序列或其部分基本上同一的核酸序列,其中“基本上同一”包括如上面所限定的序列变体。优选地,衍生自特定肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列衍生自该特定肽或蛋白质中的对应结构域。因此,“对应”具体指的是相同功能性。例如,“细胞外结构域”对应于(另一种蛋白质的)另一种“细胞外结构域”,或者“跨膜结构域”对应于(另一种蛋白质的)另一种“跨膜结构域”。肽、蛋白质和核酸的“对应”部分因而对于本领域普通技术人员是容易可确定的。同样地,“衍生自”其它序列的序列对于本领域普通技术人员通常是容易可确定的,因为在序列中具有其起源。

[0036] 优选地,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可以同一于(其衍生自的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质。但是,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列也可以具有相对于(其衍生自的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质的一种或多种突变,具体而言,衍生自另一种核酸、肽、多肽或蛋白质的核酸序列或氨基酸序列可以是(其衍生自的)起始核酸、肽、多肽或蛋白质的如上面所描述的功能序列变体。例如,在肽/蛋白质中,一个或多个氨基酸残基可以被其它氨基酸残基置换或者一个或多个氨基酸残基插入或缺失可能发生。

[0037] 如本文所使用,术语“突变”涉及与参比序列例如对应基因组序列相比核酸序列和/或氨基酸序列的改变。例如与基因组序列相比,突变可以是例如(天然存在的)体细胞突变,自发突变,诱发突变——例如由酶、化学物质或辐射诱发的,或者通过位点定向诱变(用于在核酸序列中和/或在氨基酸序列中制造特异性的和有意的改变的分子生物学方法)获得的突变。因而,术语“突变”或“产生突变”应当被理解为也包括例如在核酸序列中或在氨基酸序列中物理地制造突变。突变包括一个或多个核苷酸或氨基酸的置换、缺失和插入,以及数个连续的核苷酸或氨基酸的倒位。为了实现在氨基酸序列中的突变,优选地,突变可以被引入编码所述氨基酸序列的核苷酸序列从而表达(重组)突变的多肽。例如,通过变更——例如通过位点定向诱变——编码一种氨基酸的核酸分子的密码子以产生编码不同氨基酸的密码子,或通过合成序列变体,例如通过知晓编码多肽的核酸分子的核苷酸序列和通过设计包括编码多肽变体的核苷酸序列的核酸分子的合成而不需要使核酸分子的一个或多个核苷酸突变,实现突变。

[0038] 除其它发现之外,本发明基于在中和乙型肝炎和丁型肝炎病毒中高度强力的抗体,以及与本发明的抗体结合的表位的发现和分离。这样的抗体是期望的,因为为了中和乙型肝炎病毒仅需要少量的抗体。而且,当前不存在可用于丁型肝炎的治疗。根据本发明的抗体在预防以及治疗或减轻HBV和HDV中是高度有效的。而且,根据本发明的抗体结合至乙型肝炎病毒表面抗原的不同的——优选地所有已知的——基因型并结合至乙型肝炎病毒表面抗原的不同的——优选地所有已知的——传染性突变体。

[0039] 抗体或其抗原结合片段

[0040] 在第一方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其结合至HBsAg的抗原

环区并且中和乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒的感染。

[0041] 如本文所使用,术语“抗体”涵盖各种形式的抗体,其包括但不限于全抗体、抗体片段特别是抗原结合片段、人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体和基因工程化抗体(变体或突变抗体),只要保留了根据本发明的固有特性。人抗体和单克隆抗体是优选的并且尤其优选的是人单克隆抗体,具体地为重组人单克隆抗体。

[0042] 人抗体在现有技术中是熟知的(van Dijk,M.A.,and van de Winkel,J.G., Curr.Opin. Chem.Biol.5 (2001) 368-374)。人抗体也在转基因动物(例如,小鼠)中产生,这些转基因动物在免疫之后能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部所有组成成分或选择。在这样的种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击之后产生人抗体(参见,例如,Jakobovits,A.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits,A.,et al.,Nature 362 (1993) 255-258;Bruggemann,M.,et al.,Year Immunol.7 (1993) 3340)。人抗体也在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom,H.R.,and Winter,G.,J.Mol. Biol.227 (1992) 381-388;Marks,J.D.,et al.,J.Mol.Biol.222 (1991) 581-597)。Cole等和 Boerner等的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77 (1985);和Boerner,P.,et al.,J.Immunol.147 (1991) 86-95)。优选地,人单克隆抗体通过使用如在Traggiai E,Becker S,Subbarao K,Kolesnikova L,Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR,Rappuoli R,Lanzavecchia A. (2004):An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells:potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med.10 (8) :871-5中描述的改善的EBV-B细胞无限增殖化来制备。如本文所使用的术语“人抗体”也包括这样的抗体:其例如在可变区中被修饰以生成如本文描述的根据本发明的性质。如本文所使用,“可变区”(轻链(V_L)的可变区,重链(V_H)的可变区)表示直接地参与结合抗体至抗原的轻和重链对的每个。

[0043] 本发明的抗体可以具有任何同种型(例如,IgA、IgG、IgM,即 α 、 γ 或 μ 重链),但是将优选地是IgG。在IgG同种型内,抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类,其中IgG1是优选的。本发明的抗体可以具有 κ 或 λ 轻链。IgG型的HBsAg特异性抗体也可以有利地也阻断HBV和HBsAg从受感染细胞的释放——基于抗原非依赖性摄取IgG通过FcRN-IgG受体进入肝细胞。因此,IgG型的HBsAg特异性抗体可以细胞内结合并且从而阻断HBV病毒粒子和HBsAg的释放。

[0044] 优选地,根据本发明的抗体或者其抗原结合片段是纯化的抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

[0045] 本发明的抗体因而可以优选地是人抗体、单克隆抗体、人单克隆抗体、重组抗体或纯化抗体。本发明也提供了本发明的抗体的片段,具体地保留抗体的抗原结合活性的片段。这样的片段包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。虽然说明书,包括权利要求书,在一些地方可能明确地涉及抗原结合片段(一种或多种)、抗体片段(一种或多种)、变体(一种或多种)和/或抗体的衍生物(一种或多种),但是应当理解,术语“抗体”或“本发明的抗体”包括所有范畴的抗体,即抗原结合片段(一种或多种)、抗体片段(一种或多种)、变体(一种或多种)和抗体的衍生物(一种或多种)。

[0046] 本发明的抗体的片段可以从抗体通过包括利用酶比如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶进

行消化的方法,和/或通过化学还原裂解二硫键获得。可选地,抗体的片段可以通过重或轻链的序列的一部分的克隆和表达来获得。抗体“片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明还包括衍生自本发明的抗体的重和轻链的单链Fv片段(scFv)。例如,本发明包括scFv,其包含来自本发明的抗体的CDR。还包括的是重或轻链单体和二聚体、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体,例如单链Fv,在该单链Fv中重和轻链可变结构域通过肽连接体接合。

[0047] 本发明的抗体片段可以赋予单价或多价相互作用并且包含在上面描述的多种结构中。例如,scFv分子可以被合成以创建三价“三链抗体”或四价“四链抗体(tetrabody)”。scFv分子可以包括导致二价微抗体(minibody)的Fc区的结构域。另外,本发明的序列可以是多特异性分子的成分,其中本发明的序列靶向本发明的表位并且分子的其它区结合至其它靶标。示例性的分子包括但不限于双特异性Fab2、三特异性Fab3、双特异性scFv和双抗体(Holliger and Hudson,2005,Nature Biotechnology 9:1126-1136)。

[0048] 根据本发明的抗体可以以纯化形式提供。典型地,抗体将存在于基本上不含其它多肽的组合物中,例如其中少于90%(按重量计)、通常地少于60%并且更通常地少于50%的组合物由其它多肽组成。

[0049] 根据本发明的抗体在人中和/或在非人(或异源)宿主中,例如在小鼠中可以是免疫原性的。例如,抗体可以具有如此个体决定簇:其在非人宿主中是免疫原性的,但是在人宿主中不是免疫原性的。用于人用途的本发明的抗体包括不能容易地从宿主比如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等分离并且通常不能通过人源化或从异种小鼠获得的那些抗体。

[0050] 根据本发明的抗体和其抗原结合片段结合至HBsAg的抗原环区。乙型肝炎病毒的包膜包含三种“HBV包膜蛋白”(还被称为“HBsAg”、“乙型肝炎表面抗原”):S蛋白(对于“小的”,还被称为S-HBsAg)、M蛋白(对于“中的”,还被称为M-HBsAg)和L蛋白(对于“大的”,还被称为L-HBsAg)。S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg共享相同的C极端(还被称为“S结构域”,226个氨基酸),其对应于S蛋白(S-HBsAg)并且其对于病毒组装和感染力是关键的。S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg在内质网(ER)中合成、组装并且通过高尔基体分泌为颗粒。S结构域包括四种预测的跨膜(TM)结构域,其中S结构域的N端以及C端二者暴露于腔。跨膜结构域TM1和TM2对于将共翻译蛋白整合入ER膜都是必需的并且跨膜结构域TM3和TM4位于S结构域的C端1/3中。HBsAg的“抗原环区”位于HBsAg的S结构域的预测的TM3和TM4跨膜结构域之间,其中抗原环区包括S结构域的氨基酸101-172,该S结构域总计包含226个氨基酸(Salisse J.and Sureau C.,2009,Journal of Virology 83:9321-9328)。重要的是要注意感染力的决定簇存在于HBV包膜蛋白的抗原环区中。具体而言,在HBsAg的119和125之间的残基包含CXXC基序,其已经被证明是对于HBV和HDV的感染力需要的最重要序列(Jaoude GA,Sureau C.,Journal of Virology, 2005;79:10460-6)。

[0051] 当在本文中提及HBsAg的S结构域的氨基酸序列中的位置时,其指的是在SEQ ID NO: 3中陈述的氨基酸序列(在下面示出)或者指的是其天然或人工序列变体。

[0052] MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTS NHS PTSCPP
TCPGYRWMCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCM TTAQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWF VGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPI

FFCLWVYI

[0053] (SEQ ID NO:3;氨基酸101-172通过加下划线示出)

[0054] 例如,表达“S结构域的氨基酸101-172”指的是来自根据SEQ ID NO:3的多肽的位置101-172的氨基酸残基。但是,本领域技术人员理解,突变或变体(包括但不限于置换、缺失和/或添加,例如,如本文所描述的不同基因型的HBsAg或不同HBsAg突变体)可以在HBsAg的S结构域的氨基酸序列中天然地发生或者被人工地引入HBsAg的S结构域的氨基酸序列而不影响其生物学性质。因此,在本发明中,术语“HBsAg的S结构域”意欲包括所有这样的多肽,例如,包括根据SEQ ID NO:3的多肽和其天然或人工突变体。此外,当HBsAg的S结构域的序列片段在本文中被描述时(例如HBsAg的S结构域的氨基酸101-172或氨基酸120-130),它们不仅包括SEQ ID NO:3的对应序列片段,而且包括其天然或人工突变体的对应序列片段。例如,表达“来自HBsAg的S结构域的位置101-172的氨基酸残基”包括来自SEQ ID NO:3的位置101-172的氨基酸残基和其突变体(天然或人工突变体)的对应片段。根据本发明,表达“对应序列片段”或“对应片段”指的是当序列经历最佳比对时,即序列被比对以获得最高同一性百分比时位于序列的同等位置中的片段。

[0055] M蛋白(M-HBsAg)对应于通过被称为“前-S2”的55个氨基酸的N端结构域延伸的S蛋白。L蛋白(L-HBsAg)对应于通过被称为“前-S1”的108个氨基酸的N端结构域延伸的M蛋白(基因型D)。L蛋白的前-S1和前-S2结构域可以存在于病毒颗粒的内面处(ER的细胞质侧上)——其在病毒组装中起关键作用,或在外面上(ER的腔侧上)——可用于与靶细胞相互作用并且对于病毒感染力是必要的。而且,HBV表面蛋白(HBsAg)不仅被整合入病毒粒子包膜而且从ER-高尔基体中间区室膜自发地出芽以形成通过分泌从细胞释放的空的“亚病毒颗粒(SVP)”。

[0056] 由于所有三种HBV包膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg包括S结构域,因此所有三种HBV包膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg也包括“抗原环区”。因此,根据本发明的抗体或其抗原结合片段——其中和HBV并且结合至HBsAg的抗原环区——结合至所有三种HBV包膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg。

[0057] 而且,根据本发明的抗体或其抗原结合片段中和被乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒的感染。换句话说,根据本发明的抗体或其抗原结合片段降低乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒的病毒感染力。

[0058] 为了在实验室中研究和定量病毒感染力(或“中和”),本领域技术人员知晓各种标准的“中和试验”。对于中和试验,动物病毒通常在细胞和/或细胞系中增殖。在本发明的背景下,进行中和试验,其中培养的细胞在存在(或不存在)待测试抗体的情况下利用固定量的HBV或HDV温育。分泌入细胞培养上清液的乙型肝炎表面病毒(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)的水平可以被用作示值读数和/或HBcAg染色可以被评估。对于HDV,例如可以评估丁型抗原(delta antigen)免疫荧光染色。

[0059] 在HBV中和试验的优选实施方式中,培养的细胞,例如HepaRG细胞,特别是分化的HepaRG细胞,在存在或不存在待测试抗体的情况下利用固定量的HBV温育,例如在37℃下持续16小时。该温育优选地在培养基(例如,补充有4%PEG 8000)中进行。在温育之后,可以洗涤并进一步培养细胞。为了测量病毒感染力,分泌入培养上清液——例如从感染后第7天至第11天——的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)的水平可以通过

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测定。另外,HBcAg染色可以在免疫荧光分析中 评估。在HDV中和试验的优选实施方式中,可以使用与用于HBV的基本上相同的试验,区别是来自HDV携带者的血清可以被用作对分化的HepaRg细胞的HDV感染接种物(代替HBV)。对于检测,可以使用丁型抗原免疫荧光染色作为示值读数。

[0060] 本发明的抗体和抗原结合片段具有高中和效力。对于50%中和乙型肝炎病毒(HBV)和 丁型肝炎病毒(HDV)需要的本发明的抗体的浓度为例如大约10 μ g/ml或更低。优选地,对于50%中和HBV和HDV需要的本发明的抗体的浓度为大约5 μ g/ml,更优选地,对于50% 中和HBV和HDV需要的本发明的抗体的浓度为大约1 μ g/ml,甚至更优选地,对于50%中和HBV和HDV需要的本发明的抗体的浓度为大约750ng/ml。最优选地,对于50%中 和HBV和HDV需要的本发明的抗体的浓度为500ng/ml或更低,例如450、400、350、300、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60或大约50ng/ml或更低。这意味着50%中和HBV和HDV仅需要低浓度的抗体。特异性和效力可以使用本领域技术人员已 知的标准分析来测量。

[0061] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段——其强力地中和HBV和HDV二者——在预防 和治疗乙型肝炎和丁型肝炎中是有用的。在该背景下,值得注意的是HDV的感染通常与HBV的感染同时发生或在其之后发生(在不存在HBV的情况下HDV的接种不引起丁型肝炎,这是因为HDV需要HBV对其自身复制的支持)并且丁型肝炎通常在慢性HBV携带者 中被观察到。

[0062] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段促进HBsAg和HBV的清除。具体而言,根据本发明的抗体或其抗原结合片段促进HBV和乙型肝炎病毒的亚病毒颗粒(SVP's)二者的清除。HBsAg或亚病毒颗粒的清除可以通过测量例如血液样品——例如来自乙型肝炎患者——中的HBsAg的水平来评估。同样地,HBV的清除可以通过测量例如血液样品—— 例如来自乙型肝炎患者——中的HBV的水平来评估。

[0063] 在被HBV感染的患者的血清中,除了感染性颗粒(HBV)之外,通常存在过量的(通常1,000至100,000倍)空的亚病毒颗粒(SVP),其仅由以相对较小球体和可变长度的丝形式的HBV包膜蛋白(HBsAg)组成。亚病毒颗粒被显示为强烈地增强HBV的细胞内病毒复制和 基因表达(Bruns M.et al.1998J Virol 72(2):1462-1468)。这在包含HBV的血清的感染力的背景下也是重要的,因为感染力不仅取决于病毒的数目而且取决于SVP的数目(Bruns M.et al.1998J Virol 72(2):1462-1468)。而且,过量的亚病毒颗粒可以通过吸附中和抗体充当诱 饵并且因此延迟感染的清除。通常地,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)失去的实现因而被视为 治疗的理想端点和治愈慢性乙型肝炎(CHB)的最接近结果。

[0064] 因此,根据本发明的抗体或其抗原结合片段——其优选地促进HBsAg的清除具体 地 乙型肝炎病毒的亚病毒颗粒和HBV的清除——能够实现改善的治疗乙型肝炎,具体地在慢性乙型肝炎的背景下。因此,根据本发明的抗体或其抗原结合片段可以更加强力的发挥其中和性能,因为较少的抗体通过SVP吸附充当诱饵。另外地,根据本发明的抗体或其抗 原结合片段——其优选地促进乙型肝炎病毒的亚病毒颗粒的清除——减低了包含HBV的 血清的感染力。

[0065] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括Fc部分。更优选地,Fc部分衍生 自人源,例如来自人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4,其中人IgG1是特别优选的。

[0066] 如本文所使用,术语“Fc部分”指的是衍生自免疫球蛋白重链的一部分的序列,该

部分开始于就在木瓜蛋白酶裂解位点上游的铰链区(例如,天然IgG中的残基216,使得重链恒定区的第一残基为114)并终止于免疫球蛋白重链的C端处。因此,Fc部分可以是完整的Fc部分或其一部分(例如,结构域)。完整的Fc部分包括至少铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域(例如,EU氨基酸位置216-446)。额外的赖氨酸残基(K)有时存在于Fc部分的极C端处,但是常常从成熟抗体裂解。Fc部分内的氨基酸位置中的每个已经根据Kabat的本领域公知的EU编号系统编号,参见例如由Kabat等,在“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Dept.Health and Human Services,1983and 1987中。

[0067] 优选地,在本发明的背景下,Fc部分包括下列的至少一种:铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域,CH2结构域,CH3结构域,或其变体、部分或片段。在优选的实施方式中,Fc部分包括至少铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域。更优选地,Fc部分是完整的Fc部分。Fc部分也可以包括相对于天然存在的Fc部分的一个或多个氨基酸插入、缺失或置换。例如,铰链结构域、CH2结构域或CH3结构域(或其部分)的至少一个可以缺失。例如,Fc部分可以包括下列或由下列组成:(i)融合至CH2结构域(或其部分)的铰链结构域(或其部分),(ii)融合至CH3结构域(或其部分)的铰链结构域(或其部分),(iii)融合至CH3结构域(或其部分)的CH2结构域(或其部分),(iv)铰链结构域(或其部分),(v)CH2结构域(或其部分),或(vi)CH3结构域或其部分。

[0068] 本领域普通技术人员将理解,Fc部分可以被修饰使得其氨基酸序列与来自天然存在的免疫球蛋白分子的完整Fc部分改变,同时保留了天然存在的Fc部分授予的至少一种期望的功能。这些功能包括Fc受体(FcR)结合、抗体半衰期调节、ADCC功能、蛋白A结合、蛋白G结合和补体结合。本领域技术人员熟知天然存在的Fc部分的负责这些功能并且对于这些功能是必需的部分。

[0069] 例如,为了活化补体级联,C1q结合至IgG1的至少两个分子或IgM的一个分子,其附接至抗原靶标(Ward,E.S.,and Ghetie,V.,Ther.Immunol.2(1995)77-94)。Burton,D.R.描述了(Mol.Immunol.22(1985)161-206)包括氨基酸残基318至337的重链区参与补体固定。Duncan,A.R.和Winter,G.(Nature 332(1988)738-740),使用位点定向诱变,报道了Glu318、Lys320和Lys322形成与C1q的结合位点。在C1q的结合中Glu318、Lys320和Lys322残基的作用通过包含这些残基的短合成肽抑制补体介导的溶解的能力来确认。

[0070] 例如,FcR结合可以通过(抗体的)Fc部分与Fc受体(FcR)的相互作用介导,Fc受体是造血细胞上的专门的细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族,并且显示为介导如下二者:通过免疫复合物的吞噬作用去除抗体包被的病原体,和经由抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC;Van de Winkel,J.G.,and Anderson,C.L.,J.Leukoc.Biol.49(1991)511-524)溶解利用对应抗体包被的红细胞和各种其它细胞靶标(例如肿瘤细胞)。FcR通过它们对免疫球蛋白种类的特异性来限定;IgG抗体的Fc受体被称为Fc γ R,IgE的Fc受体被称为Fc ϵ R,IgA的Fc受体被称为Fc α R,等,并且新生的Fc受体被称为FcRn。Fc受体结合例如在Ravetch,J.V.,and Kinet,J.P.,Annu.Rev.Immunol.9(1991)457-492;Capel,P.J.,et al.,Immunomethods 4(1994)25-34;de Haas,M.,et al.,J Lab.Clin.Med.126(1995)330-341; and Gessner,J.E.,et al.,Ann.Hematol.76(1998)231-248中描述。

[0071] 通过天然IgG抗体(Fc γ R)的Fc结构域交联受体引发多种效应子功能,包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒作用、和炎性介质的释放、以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。

因此,提供受体(Fc γ R)的交联的Fc部分是优选的。在人中,Fc γ R的三个种类已经被表征,其为(i)Fc γ RI(CD64),其以高亲和力结合单体IgG并且在巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达;(ii)Fc γ RII(CD32),其以中至低亲和力结合复合的IgG,广泛地表达特别是在白细胞上,已知是抗体介导的免疫力中的核心因素(central player),并且其可以被分为Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIC,它们在免疫系统中执行不同的功能,但是以类似的低亲和力结合至IgG-Fc,并且这些受体的胞外域是高度同源的;和(iii)Fc γ RIII(CD16),其以中至低亲和力结合IgG并且作为两种类型存在:在NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及一些单核细胞和T细胞上发现并介导ADCC的Fc γ RIIIA,和在中性粒细胞上高度表达的Fc γ RIIIB。Fc γ RIIA在参与杀伤的许多细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞)上发现并且似乎能够活化杀伤过程。Fc γ RIIB似乎在抑制过程中起作用并且在B细胞、巨噬细胞上以及在肥大细胞和嗜酸性粒细胞上发现。重要地,所有Fc γ RIIB的75%在肝脏中发现(Ganesan,L.P.et al.,2012:Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes.Journal of Immunology 189:4981-4988)。Fc γ RIIB在被称为LESC的肝窦内皮细胞(Liver Sinusoidal Endothelium)上,并且在肝脏中的库普弗细胞中丰富地表达,并且LSEC是小免疫复合物清除的主要位点(Ganesan,L.P.et al.,2012:Fc γ RIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes.Journal of Immunology 189:4981-4988)。

[0072] 因此,在本发明中,这些抗体和其抗原结合片段是优选的,其能够结合至Fc γ RIIb,例如包括用于结合至Fc γ RIIb的Fc部分特别是Fc区的抗体,比如,例如IgG型抗体。而且,通过如由Chu,S.Y.et al.,2008:Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45,3926-3933描述的引入突变S267E和L328F来工程化Fc部分以增强Fc γ RIIB结合是可能的。

[0073] 因此,免疫复合物的清除可以增强(Chu,S.,et al.,2014:Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xcab7195,An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor Fc γ RIIb.Am J Respir Crit,American Thoracic Society International Conference Abstracts)。因此,在本发明的背景下,这些抗体或其抗原结合片段是优选的,其包括具有突变S267E和L328F的工程化Fc部分,具体地如由Chu,S.Y.et al.,2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies.Molecular Immunology 45,3926-3933描述的。

[0074] 在B细胞上,其似乎起进一步抑制免疫球蛋白产生和同种型转换至表述例如IgE种类的功能。在巨噬细胞上,Fc γ RIIB用于抑制如通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞上,b形式可以有助于通过IgE结合至其单独的受体来抑制这些细胞的活化。

[0075] 关于Fc γ RI结合,E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329中至少一种的天然IgG的修饰降低结合至Fc γ RI。置换入IgG1和IgG4的位置233-236处的IgG2残基降低结合至Fc γ RI达10³倍并且消除了对抗体敏化的红细胞的人单核细胞应答(Armour,K.L.,et al. Eur.J.Immunol.29(1999) 2613-2624)。关于Fc γ RII结合,例如对于E233-G236、P238、

D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414中至少一种的IgG突变,发现对Fc γ RIIA降低的结合。关于Fc γ RIII结合,例如对于E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376中至少一种的突变,发现对Fc γ RIIIA降低的结合。在Fc受体的人IgG1上绘制(map)结合位点,在Shields,R.L.,et al.,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604中描述了用于测量结合至Fc γ RI和Fc γ RIIA的上面提及的突变位点和方法。

[0076] 关于结合至关键的Fc γ R II,天然IgG Fc的两个区似乎对于Fc γ R II和IgG的相互作用是关键的,即(i) IgG Fc的下部铰链位点,具体地氨基酸残基L、L、G、G(234-237,EU编号),和(ii) IgG Fc的CH2结构域的相邻区,具体地邻近下部铰链区的上部CH2结构域中——例如在P331的区中——的环和链(Wines,B.D.,et al.,J.Immunol.2000;164:5313-5318)。而且,Fc γ RI似乎结合至IgG Fc上的相同位点,而FcRn和蛋白A结合至IgG Fc上的不同位点,其似乎在CH2-CH3界面处(Wines,B.D.,et al.,J.Immunol.2000;164:5313-5318)。

[0077] 例如,Fc部分可以包括至少在本领域中已知为对于FcRn结合或延长的半衰期需要的Fc部分的部分或由其组成。可选地或另外地,本发明的抗体的Fc部分包括至少在本领域中已知为对于蛋白A结合需要的部分和/或本发明的抗体的Fc部分包括在本领域中至少已知为对于蛋白G结合需要的Fc分子的部分。优选地,保留的功能是清除HBsAg和HBV,其假定通过Fc γ R结合介导。因此,优选的Fc部分包括至少在本领域中已知为对于Fc γ R结合需要的部分。如上面所概述的,优选的Fc部分可以因而至少包括(i)天然IgG Fc的下部铰链位点,具体地氨基酸残基L、L、G、G(234-237,EU编号),和(ii)天然IgG Fc的CH2结构域的相邻区,具体地邻近下部铰链区的上部CH2结构域中——例如在P331的区中,例如在P331周围,例如天然IgG Fc的氨基酸320和340(EU编号)之间,的天然IgG Fc的上部CH2结构域中至少3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的区中——的环和链。

[0078] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括Fc区。如本文所使用,术语“Fc区”指的是通过抗体重链的两个或更多个Fc部分形成的免疫球蛋白的部分。例如,Fc区可以是单体的或“单链”Fc区(即,scFc区)。单链Fc区由在单一多肽链内连接的(例如,以单一连续的核酸序列编码的)Fc部分组成。示例性的scFc区在WO 2008/143954A2中公开。优选地,Fc区是二聚的Fc区。“二聚的Fc区”或“dcFc”指的是由两个单独的免疫球蛋白重链的Fc部分形成的二聚体。二聚的Fc区可以是两个相同的Fc部分的同源二聚体(例如,天然存在的免疫球蛋白的Fc区)或两个不同的Fc部分的异源二聚体。

[0079] Fc区的Fc部分可以具有相同的或不同的种类和/或亚类。例如,Fc部分可以衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的免疫球蛋白(例如,人免疫球蛋白)。优选地,Fc区的Fc部分具有相同的种类和亚类。但是,Fc区(或Fc区的一个或多个Fc部分)也可以是嵌合的,其中嵌合Fc区可以包括衍生自不同免疫球蛋白种类和/或亚类的Fc部分。例如,二聚或单链Fc区的Fc部分的至少两个可以来自不同的免疫球蛋白种类和/或亚类。另外地或可选地,嵌合Fc区可以包括一个或多个嵌合Fc部分。例如,嵌合Fc区或部分可以包括衍生自第一亚类(例如IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的一个或多个部分,同时Fc区或部分的剩余部分具有不同亚类。例如,Fc多肽的Fc区或部分可以包括衍生自第一亚类(例如IgG1、IgG2或IgG4亚类)的免疫球蛋白的CH2和/或CH3结构域和来自第二亚类(例如IgG3亚类)的免疫球蛋白的铰链区。例如,Fc区或部分可以包括衍生自第一亚类(例如IgG4亚类)的免疫球蛋白

的铰链和/或CH2结构域和来自第二亚类(例如IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的CH3结构域。例如,嵌合Fc区可以包括来自第一亚类(例如IgG4亚类)的免疫球蛋白的Fc部分(例如,完整的Fc部分)和来自第二亚类(例如IgG1、IgG2或IgG3亚类)的免疫球蛋白的Fc部分。例如,Fc区或部分可以包括来自IgG4免疫球蛋白的CH2结构域和来自IgG1免疫球蛋白的CH3结构域。例如,Fc区或部分可以包括来自IgG4分子的CH1结构域和CH2结构域,和来自IgG1分子的CH3结构域。例如,Fc区或部分可以包括来自抗体的具体亚类的CH2结构域的一部分,例如CH2结构域的EU位置292-340。例如,Fc区或部分可以包括衍生自IgG4部分的CH2的位置292-340处的氨基酸和衍生自IgG1部分的CH2的剩余部分(可选地,CH2的292-340可以衍生自IgG1部分并且CH2的剩余部分衍生自IgG4部分)。

[0080] 而且,Fc区或部分可以(另外地或可选地)例如包括嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以例如部分地衍生自IgG1、IgG2或IgG4分子(例如,中上和中下铰链序列)并且部分地衍生自IgG3分子(例如,中部铰链序列)。在另一实例中,Fc区或部分可以包括部分地衍生自IgG1分子和部分地衍生自IgG4分子的嵌合铰链。在另一实例中,嵌合铰链可以包括来自IgG4分子的上部和下部铰链结构域和来自IgG1分子的中部铰链结构域。这样的嵌合铰链例如通过在IgG4铰链区的中部铰链结构域中的EU位置228处引入脯氨酸置换(Ser228Pro)来制造。在另一实施方式中,嵌合铰链可以包括来自IgG2抗体的EU位置233-236处的氨基酸和/或Ser228Pro突变,其中铰链的剩余氨基酸来自IgG4抗体(例如序列ESKYGPPCPPCPAPPVAGP的嵌合铰链)。可以在根据本发明的抗体的Fc部分中使用的进一步嵌合铰链在US 2005/0163783A1中描述。

[0081] 在本发明中,优选的是Fc部分或Fc区包括衍生自人免疫球蛋白序列(例如,衍生自来自人IgG分子的Fc区或Fc部分)的氨基酸序列或由其组成。但是,多肽可以包括来自另一种哺乳动物物种的一种或多种氨基酸。例如,灵长类Fc部分或灵长类结合位点可以包含在对象多肽中。可选地,一种或多种鼠科氨基酸可以存在于Fc部分中或Fc区中。

[0082] 优选地,具体地除了如上面描述的Fc部分之外,根据本发明的抗体还包括衍生自恒定区——具体地衍生自IgG的恒定区,优选地衍生自IgG1的恒定区,更优选地衍生自人IgG1的恒定区——的其它部分。更优选地,具体地除了如上面描述的Fc部分之外,根据本发明的抗体还包括恒定区的所有其它部分,具体地IgG的恒定区的所有其它部分,优选地IgG1的恒定区的所有其它部分,更优选地人IgG1的恒定区的所有其它部分。

[0083] 如上面所概述的,根据本发明的特别优选的抗体包括衍生自人IgG1的(完整的)Fc区。更优选地,具体地除了衍生自人IgG1的(完整的)Fc区之外,根据本发明的抗体还包括IgG的恒定区的所有其它部分,优选地IgG1的恒定区的所有其它部分,更优选地人IgG1的恒定区的所有其它部分。

[0084] 还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至HBsAg基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种。HBsAg的不同基因型的实例包括下列: GenBank登录号J02203 (HBV-D, ayw3)、GenBank登录号FJ899792.1 (HBV-D, adw2)、GenBank登录号AM282986 (HBV-A)、GenBank登录号D23678 (HBV-B1日本)、GenBank登录号AB117758 (HBV-C1柬埔寨)、GenBank登录号AB205192 (HBV-E加纳)、GenBank登录号X69798 (HBV-F4巴西)、GenBank登录号AF160501 (HBV-G美国)、GenBank登录号AY090454 (HBV-H尼加拉瓜)、GenBank登录号AF241409 (HBV-I越南) 和GenBank登录号AB486012 (HBV-J婆罗洲)。表1中示

出了不同基因型的HBsAg的S结构域的抗原环区的氨基酸序列(SEQ ID NO:5-15)。

[0085] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至HBsAg基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的至少6种,甚至更优选地至少8种,并且特别优选地所有10种。根据基因组序列,HBV分化为许多基因型。迄今为止,HBV基因组的八种熟知的基因型(A-H)已经被限定。而且,两种新基因型I和J也已经被确认(Sunbul M.,2014,World J Gastroenterol 20(18):5427-5434)。基因型已知影响疾病的进展并且在响应于抗病毒治疗的基因型之间的区别已经被确定。例如,基因型A具有慢性的倾向,而病毒突变在基因型C中被频繁地遇到。慢性和突变频繁二者在基因型D中是普通的。而且,HBV的基因型在全世界区别地分布(Sunbul M.,2014,World J Gastroenterol 20(18):5427-5434)。通过提供根据本发明的抗体或其抗原结合片段——其优选地结合至HBsAg基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的至少6种,优选地至少8种,更优选地所有10种,提供了非常宽泛地结合至不同基因型的抗体。

[0086] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至在抗原环区中具有突变的HBsAg突变体的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18种:HBsAg Y100C/P120T、HBsAg P120T、HBsAg P120T/S143L、HBsAg C121S、HBsAg R122D、HBsAg R122I、HBsAg T123N、HBsAg Q129H、HBsAg Q129L、HBsAg M133H、HBsAg M133L、HBsAg M133T、HBsAg K141E、HBsAg P142S、HBsAg S143K、HBsAg D144A、HBsAg G145R和HBsAg N146A。这些突变体是基于HBsAg基因型D——Genbank登录号FJ899792(SEQ ID NO:4)——的S结构域的天然存在的突变体,其中突变的氨基酸残基(一种或多种)在名称中指示。

[0087] SEQ ID NO:4:

[0088] MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHS PTSCPP
TCPGYRWMLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTC TTPAQGTSMPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFV GLSPTVWLSVIWMMWYGPSLYSTLSPFLPLLP
IFFCLWVYI

[0089] (抗原环区,即氨基酸101-172以下划线示出)。

[0090] 不同突变体的HBsAg的S结构域的抗原环区的氨基酸序列在表1中示出(SEQ ID NO: 16-33)。

[0091] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至在抗原环区中具有突变的感染性HBsAg突变体的至少12种、甚至更优选地至少15种、和特别优选地所有18种:HBsAg Y100C/P120T、HBsAg P120T、HBsAg P120T/S143L、HBsAg C121S、HBsAg R122D、HBsAg R122I、HBsAg T123N、HBsAg Q129H、HBsAg Q129L、HBsAg M133H、HBsAg M133L、HBsAg M133T、HBsAg K141E、HBsAg P142S、HBsAg S143K、HBsAg D144A、HBsAg G145R和HBsAg N146A。

[0092] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至表位,其包括HBsAg的抗原环区的至少一个、优选地至少两个、更优选地至少三个氨基酸、甚至更优选地至少四个氨基酸,其中至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸选自HBsAg的S结构域的氨基酸115-133,优选地选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-133,更优选地选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-130。值得注意的是,氨基酸的位置(例如115-133、120-133、120-130)指的是如上面所描述的HBsAg的S结构域,其存在于所有三种HBV包膜蛋白S-HBsAg、M-HBsAg和L-HBsAg中,其中S-HBsAg典型地对应于HBsAg的S结构域。

[0093] 具体而言,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至HBsAg的抗原环区中的表位,其中表位典型地由位于以下位置处的一个或多个氨基酸形成:所述位置选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,更优选地选自氨基酸位置120-130。

[0094] 在表位的背景下的如本文所使用的术语“由……形成”的意思是与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的表位可以是线性的(连续的)或构象的(不连续的)。线性或顺序的表位是如此表位——其由抗体识别其氨基酸的线性序列,或一级结构。相比之下,构象表位具有特定的三维形状和蛋白质结构。因此,如果表位是线性表位并且包括位于下列位置处的多于一个氨基酸:所述位置选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,则由该表位包括的氨基酸典型地位于一级结构的相邻位置中(即氨基酸序列中的连续氨基酸)。在构象表位(3D结构)的情况下,相比之下,氨基酸序列典型地形成3D结构作为表位,并且因此,形成表位的氨基酸(或者“由表位包括的”氨基酸)可以位于或可以不位于一级结构的相邻位置中(即可以是或可以不是氨基酸序列中的连续氨基酸)。

[0095] 优选地,与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的表位仅由选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,更优选地选自氨基酸位置120-130的氨基酸(一种或多种)形成。换句话说,优选的是不需要(进一步)氨基酸——其位于位置115-133,优选地位置120-133,更优选地位置120-130之外——来形成与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的表位。

[0096] 优选地,与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的HBsAg的抗原环区中的表位由位于下列位置处的两个或更多个氨基酸形成:所述位置选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,更优选地选自氨基酸位置120-130。更优选地,与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的HBsAg的抗原环区中的表位由位于下列位置处的三个或更多个氨基酸形成:所述位置选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,更优选地选自氨基酸位置120-130。甚至更优选地,与本发明的抗体或其抗原结合片段结合的HBsAg的抗原环区中的表位由位于下列位置处的四个或更多个氨基酸形成:所述位置选自HBsAg的S结构域的氨基酸位置115-133,优选地选自氨基酸位置120-133,更优选地选自氨基酸位置120-130。换句话说,优选的是,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至选自HBsAg的S结构域的氨基酸115-氨基酸133,优选地选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-氨基酸133,更优选地选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-130的HBsAg的抗原环区的至少一个、优选地至少两个、更优选地至少三个、甚至更优选地至少四个氨基酸。

[0097] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至表位,其包括HBsAg的抗原环区的至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸,其中至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-氨基酸133,优选地选自氨基酸120-130,并且其中至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸位于相邻位置中(即为氨基酸序列/一级结构中的连续氨基酸)。

[0098] 与根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合的表位优选地是构象表位。因此,优选地是根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至表位,其包括HBsAg的抗原环区的至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸,其中至少两个、优选地至少三个、更优

选地至少四个氨基酸选自HBsAg的S结构域的氨基酸120-133,优选地选自氨基酸120-130,并且其中至少两个、优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸中的至少两个、优选至少三个不位于(一级结构的)相邻位置中。

[0099] 换句话说,(i)与抗体结合的氨基酸(即形成表位的氨基酸)中的每一个都不位于一级结构的相邻位置中,或(ii)与抗体结合的氨基酸(即形成表位的氨基酸)中的一些,例如两个或三个位于(一级结构的)相邻位置中,而与抗体结合的其他氨基酸(即形成表位的氨基酸)不位于(一级结构的)相邻位置中。

[0100] 与抗体结合的氨基酸(即形成表位的氨基酸)——其不位于一级结构的相邻位置中——典型地被不与抗体结合的一个或多个氨基酸间隔开。优选地至少一个、更优选地至少两个、甚至更优选地至少三个、最优选地至少四个、特别优选地至少五个氨基酸可以位于表位包括并且不位于相邻位置中的至少两个、优选地至少三个氨基酸之间。

[0101] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至表位,其包括HBsAg的S结构域的至少氨基酸P120、C121、R122和C124。更优选地,抗体或抗原结合片段结合至包括根据SEQ ID NO:88的氨基酸序列:PCRXC的表位,其中X是任意氨基酸或不是氨基酸;优选地X是任意氨基酸;更优选地X是T、Y、R、S或F;甚至更优选地X是T、Y或R;最优选地X是T或R。

[0102] 甚至更优选地,抗体或抗原结合片段结合至包括根据SEQ ID NO:80的氨基酸序列: TGPCR TC 或者与SEQ ID NO:80共享至少80%、优选地至少90%、更优选地至少95%序列同一性的氨基酸序列的表位。

[0103] 最优选地,抗体或抗原结合片段结合至包括根据SEQ ID NO:85的氨基酸序列: STTSTGPCRTC 或者与SEQ ID NO:85共享至少80%、优选地至少90%、更优选地至少95%序列同一性的氨基酸序列的表位。

[0104] 还优选的是抗体或抗原结合片段结合至包括含有HBsAg的S结构域的至少氨基酸145-151的氨基酸序列:GNCTCIP (SEQ ID NO:81)的表位。

[0105] 更优选地,抗体或抗原结合片段结合至包括根据SEQ ID NO:80的氨基酸序列和根据SEQ ID NO:81的氨基酸序列的表位。

[0106] 更优选地,抗体或抗原结合片段结合至包括根据SEQ ID NO:85的氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:87的氨基酸序列的表位。

[0107] 如上面所描述,与本发明的抗体结合的表位可以是线性的(连续的)或构象的(不连续的)。优选地,本发明的抗体和抗体片段结合至构象表位,更优选地构象表位仅在非还原条件下存在。

[0108] 但是,还优选的是根据本发明的抗体或其抗体片段结合至线性表位,更优选的是该线性表位非还原条件和还原条件二者下存在。

[0109] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至由根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列: $X_1X_2X_3TCX_4X_5X_6AX_7G$ 形成的HBsAg的抗原环中的表位 (SEQ ID NO:1),其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 和 X_7 可以是任意氨基酸。

[0110] 优选地, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 和 X_7 是氨基酸,其与SEQ ID NO:3的氨基酸120-130相比被保守地置换。还优选地是 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 和 X_7 是氨基酸,其与SEQ ID NO:5-33中任一种的氨基酸20-30相比被保守地置换(参见表1;涉及HBsAg的不同变体的S结构域的抗原环区序列,即氨基酸101-172)。

[0111] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_1 是小氨基酸。如本文所使用,“小”氨基酸指的是选自丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸的任意氨基酸。更优选地, X_1 是脯氨酸、丝氨酸或苏氨酸。

[0112] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_2 是小氨基酸。更优选地, X_2 是半胱氨酸或苏氨酸。

[0113] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_3 是带电氨基酸或脂肪族氨基酸。如本文所使用,“带电”氨基酸指的是选自精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸的任意氨基酸。如本文所使用,“脂肪族”氨基酸指的是选自丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的任意氨基酸。更优选地, X_3 是精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或异亮氨酸。

[0114] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_4 是小氨基酸和/或疏水性氨基酸。如本文所使用,“疏水性”氨基酸指的是选自丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和甘氨酸的任意氨基酸。更优选地, X_4 是甲硫氨酸或苏氨酸。

[0115] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_5 是小氨基酸和/或疏水性氨基酸。更优选地, X_5 是苏氨酸、丙氨酸或异亮氨酸。

[0116] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_6 是小氨基酸和/或疏水性氨基酸。更优选地, X_6 是苏氨酸、脯氨酸或亮氨酸。

[0117] 优选地,在SEQ ID NO:1中, X_7 是极性氨基酸或脂肪族氨基酸。如本文所使用,“极性”氨基酸指的是选自天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸的任意氨基酸。更优选地, X_7 是谷氨酰胺、组氨酸或亮氨酸。

[0118] 因此,更优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列: $X_1X_2X_3TCX_4X_5X_6AX_7G$ 形成的HBsAg的抗原环中的表位(SEQ ID NO:2),

[0119] 其中, X_1 是P、T或S,

[0120] X_2 是C或S,

[0121] X_3 是R、K、D或I,

[0122] X_4 是M或T,

[0123] X_5 是T、A或I,

[0124] X_6 是T、P或L,和

[0125] X_7 是Q、H或L。

[0126] 关于由根据SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列形成的优选表位,要注意的是如本文所使用的术语“由……形成”不具体地意欲暗示抗体必然地结合至SEQ ID NO:1或2的每个和每种氨基酸。具体而言,在优选的构象表位的情况下,抗体可以仅结合至SEQ ID NO:1或2的氨基酸中的一些,而其它氨基酸残基可以仅充当“间隔区”,从而提供表位的3D结构。

[0127] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至由选自在下面的表1中示出的SEQ ID NO:5-33的氨基酸序列中的一个或多个,优选地两个或更多个,更优选地三个或更多个和甚至更优选地四个或更多个氨基酸形成的HBsAg的抗原环中的表位。

[0128] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至具有根据在下面的表1中示出的SEQ ID NO:5-33中任一种的氨基酸序列的HBsAg的抗原环区或者其序列变体。甚至更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段结合至具有根据在下面的表1中示出的SEQ ID NO:5-33的氨基酸序列的HBsAg的所有抗原环变体。换句话说,如果根据本发明的抗体或其抗原结合片段能够结合至具有根据SEQ ID NO:5-33中任一种的氨基酸序列的

HBsAg的所有不同抗原环区,则其是特别优选的。

[0129] 表1:如本文所使用的不同基因型和突变体的HBsAg的S结构域的抗原环区的示例性氨基酸序列 (HBsAg的S结构域的残基101-172——除了SEQ ID NO:16,其指的是HBsAg的S结构域的残基100-172以便包括相关突变)。

[0130]

名称	SEQ ID NO.	氨基酸序列
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSC CCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPTD GNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPS DGNCTCIPISSWALGKYLWEWASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASVRFSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKYLWEWASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFAKYLWEWASARFSW
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTSMFPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFAKFLWEWASVRFSW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPL DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW

[0131]

HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPPSCCCTKPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTEPSD GNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTKSS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPK DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPS AGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPS DRNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPPSCCCTKPS DGACTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW

[0132] 一般而言,根据本发明的抗体或其抗原结合片段优选地包括在重链上的(至少)三种互补决定区(CDR)和在轻链上的(至少)三种CDR。一般而言,互补决定区(CDR)是在重链可变结构域和轻链可变结构域中存在的高变区。典型地,抗体的重链和连接的轻链的CDR一起形成抗原受体。通常,三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)在可变结构域中非连续地排列。由于抗原受体通常由(两种不同的多肽链即重链和轻链上的)两种可变结构域组成,因此对于每种抗原受体存在六种CDR(重链:CDRH1、CDRH2和CDRH3;轻链:CDRL1、CDRL2和CDRL3)。单个抗体分子通常具有两种抗原受体并且因此包含十二种CDR。重和/或轻链上的CDR可以通过构架区分离,其中构架区(FR)是可变结构域中的区,其与CDR相比是较不“可变的”。例如,链(或者分别地每个链)可以由被三个CDR分离的四个框架区组成。

[0133] 确定了本发明的示例性抗体的重链和轻链的序列,包括在重链上的三种不同CDR和在轻链上的三种不同CDR。CDR氨基酸的位置根据IMGT编号系统限定(IMGT: <http://www.imgt.org/>;cf.Lefranc,M.-P.等(2009)Nucleic Acids Res.37,D1006-D1012)。

[0134] 表2示出了根据本发明的示例性抗体(“HBC34”)的CDR以及重链可变区(VH)和轻链

可变区 (VL) 的氨基酸序列:

[0135]	HBC34	SEQ ID NO.	氨基酸序列
	CDRH1	34	GRIFRSFY
	CDRH2	35	NQDGSEK
	CDRH2 长	66	INQDGSEK
	CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
	CDRL1	37	KLGNKN
	CDRL2	38	EVK
	CDRL2 长	39	VIYEVKYRP
	CDRL3	40	QTDSTTVV
	VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTSVSS
	VL	42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYR PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTDSTTVVFGGGTRLTVL

[0136] 因而,优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表2中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的氨基酸序列。

[0137] 表3示出了根据本发明的进一步示例性抗体(“HBC34v7”)的CDR以及重链可变区(VH) 和轻链可变区(VL)的氨基酸序列:

[0138]	HBC34v7	SEQ ID NO.	氨基酸序列
	CDRH1	34	GRIFRSFY
	CDRH2	35	NQDGSEK
	CDRH2 长	66	INQDGSEK
	CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
	CDRL1	37	KLGNKN
	CDRL2	38	EVK
	CDRL2 长	39	VIYEVKYRP
[0139]	CDRL3	58	QTFDSTTVV
	VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTSVSS
	VL	59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYR PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL

[0140] 因而,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表3中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的

氨基酸序列。

[0141] 表4示出了根据本发明的进一步示例性抗体(“HBC34v23”)的CDR以及重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的氨基酸序列:

[0142]	HBC34v23	SEQ ID NO.	氨基酸序列
	CDRH1	34	GRIFRSFY
	CDRH2	35	NQDGSEK
	CDRH2 长	66	INQDGSEK
	CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
	CDRL1	37	KLGNKN
	CDRL2	38	EVK
	CDRL2 长	39	VIYEVKYRP
	CDRL3	58	QTFDSTTVV
	VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSG NSGGMDVWGQGTTSVSS
	VL	65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNACWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL

[0143] 因而,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表4中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的氨基酸序列。

[0144] 表5示出了根据本发明的进一步示例性抗体(“HBC34v31”)的CDR以及重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的氨基酸序列:

[0145]	HBC34v31	SEQ ID	氨基酸序列
		NO.	
	CDRH1	34	GRIFRSFY
	CDRH2	35	NQDGSEK
	CDRH2 长	66	INQDGSEK
	CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
	CDRL1	37	KLGNKN
	CDRL2	38	EVK
	CDRL2 长	39	VIYEVKYRP
	CDRL3	40	QTDWSTTVV
	VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSG NSGGMDVWGQGTTSVSS
	VL	42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTDWSTTVVFGGGTRLT VL

[0146]

[0147] 因而,优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表5中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的氨基酸序列。

[0148] 表6示出了根据本发明的进一步示例性抗体(“HBC34v32”)的CDR以及重链可变区(VH) 和轻链可变区(VL)的氨基酸序列:

[0149]

HBC34v32	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 长	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 长	39	VIYEVKYP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSG NSGGMDVWGQGTTTVSS
VL	59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKNCWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV L

[0150] 因而,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表6中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的氨基酸序列。

[0151] 表7示出了根据本发明的进一步示例性抗体(“HBC34v33”)的CDR以及重链可变区(VH) 和轻链可变区(VL)的氨基酸序列:

[0152]

HBC34v33	SEQ ID NO.	氨基酸序列
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 长	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 长	39	VIYEVKYP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSG NSGGMDVWGQGTITVTVSS
VL	65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNACWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL

[0153] 因而,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括与在表7中示出的CDR序列、VH序列和/或VL序列中至少一种具有至少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% 同一性的氨基酸序列。

[0154] 表8提供了对野生型 (WT) 抗体“HBC34”的示例性抗体变体“HBC34v7”、“HBC34v23”、“HBC34v31”、“HBC34v32”和“HBC34v33”的VH和VL修饰 和对相应的CDR和VH/VL氨基酸序列的各自SEQ ID NO的概述:

[0155]

变体名称	VH 修饰	VL 修饰	CDR						VL	VH
			H1	H2	H3	L1	L2	L3		
HBC34	WT	WT	34	35/ 66	36	37	38/ 39	40	41	42
HBC34-	WT	W107F	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	41	59

[0156]

V7				66			39			
HBC34-V23	WT	W07F/FR1234GL/C DR2Y66	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	41	65
HBC34-V31	FR124GL	WT	34	35/ 66	36	37	38/ 39	40	67	42
HBC34-V32	FR124GL	W107F	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	67	59
HBC34-V33	FR124GL	W07F/FR1234GL/C DR2Y66	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	67	65

[0157] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,重链包括至少一个 CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少一个 CDRL2和

至少一个CDRL3,其中至少一个CDR,优选地至少一个重链CDRH3包括根据 SEQ ID NO:36的氨基酸序列或如本文描述的其功能序列变体,或由其组成。因此,优选的是至少一个重链CDRH3包括与SEQ ID NO:36共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列。更优选地,至少一个重链CDRH3包括根据SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0158] 还优选的是抗体或抗原结合片段包括重链和轻链,重链包括至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个轻链CDRL3包括根据SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:58的氨基酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是至少一个轻链CDRL3包括与SEQ ID NO:40 或SEQ ID NO:58共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列。更优选地,至少一个轻链 CDRL3包括根据SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0159] 更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,重链包括至少一个 CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少一个 CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个重链CDRH1包括根据SEQ ID NO:34的氨基酸序列或其功能序列变体,至少一个重链CDRH2包括根据SEQ ID NO:35的氨基酸序列 或其功能序列变体和/或至少一个重链CDRH3包括根据SEQ ID NO:36的氨基酸序列或其 功能序列变体。更优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,重链包 括至少一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个重链CDRH1包括根据SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或其功能序列变体,至少一个重链CDRH2包括根据SEQ ID NO:35或66的 氨基酸序列或其功能序列变体和/或至少一个重链CDRH3包括根据SEQ ID NO:36的氨基 酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是至少一个重链CDRH1包括与SEQ ID NO:34 共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选 地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列;至少一个重链CDRH2包括与SEQ ID NO:35 或66共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特 别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和/或至少一个重链CDRH3包括与 SEQ ID NO:36共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少 95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列。更优选地,至少一个重链 CDRH1包括根据SEQ ID NO:34的氨基酸序列;至少一个重链CDRH2包括根据SEQ ID NO:35或66的氨基酸序列;和/或至少一个重链CDRH3包括根据SEQ ID NO:36的氨基 酸序列。

[0160] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,重链包括至少一个 CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少一个 CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个CDRL1包括根据SEQ ID NO:37的氨基酸序列 或其功能序列变体,至少一个CDRL2包括根据SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列或其功 能序列变体和/或至少一个CDRL3氨基包括根据SEQ ID NO:40的氨基酸序列或其功能序 列变体。还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链,重链包括至少 一个CDRH1、至少一个CDRH2和至少一个CDRH3和轻链包括至少一个CDRL1、至少 一个CDRL2和至少一个CDRL3,其中至少一个轻链CDRL1包括根据SEQ ID NO:37的 氨基酸序列或其功能序列变体,至少一

个轻链CDRL2包括根据SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列或其功能序列变体和/或至少一个轻链CDRL3氨基酸包括根据SEQ ID NO:58的氨基酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是至少一个轻链CDRL1包括与SEQ ID NO:37 共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列;至少一个轻链CDRL2包括与SEQ ID NO:38 或39共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和/或至少一个轻链CDRL3包括与 SEQ ID NO:40或58共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的氨基酸序列。更优选地,至少一个轻链CDRL1包括根据SEQ ID NO:37的氨基酸序列;至少一个轻链CDRL2包括根据SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列;和/或至少一个重链CDRL3包括根据SEQ ID NO:40或58的氨基酸序列。

[0161] 因此,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别根据SEQ ID NO:34 -38和40或其功能序列变体或根据SEQ ID NO:34-37和39-40或其功能序列变体。还优选的是抗体或抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别根据SEQ ID NO:34、36-38、40和66或其功能序列变体或根据SEQ ID NO:34、36-37、39-40和66或其功能序列变体。还优选的是抗体或抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别根据SEQ ID NO:34-38和58或其功能序列变体或根据SEQ ID NO:34-37、39和58或其功能序列变体。而且,优选的是抗体或抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别根据SEQ ID NO:34、36-38、58和66或其功能序列变体或根据SEQ ID NO:34、36-37、39、58和66或其功能序列变体。

[0162] 因此,优选的是抗体或抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) 其分别地与SEQ ID NO:34-38和40中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(ii) 其分别地与SEQ ID NO:34-37、39和40中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(iii) 其分别地与SEQ ID NO:34-38和58中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(iv) 其分别地与SEQ ID NO:34-37、39和58中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(v) 其分别地与SEQ ID NO:34、36-38、40和66中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(vi) 其分别地与SEQ ID NO:34、36-37、39、40和66中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(vii) 其分别地与SEQ ID NO:34、36-38、58和66中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性;或(viii) 其分别地与SEQ ID NO:34、36-37、39、58和66中每种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同

一性。

[0163] 更优选地,抗体或抗原结合片段包括CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列和 CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:(i) 其分别地根据SEQ ID NO:34-38和40;或(ii) 其分别地根据SEQ ID NO:34-37、39和40;或(iii) 其分别地根据SEQ ID NO:34-38和 58;或(iv) 其分别地根据SEQ ID NO:34-37、39和58;或(v) 其分别地根据SEQ ID NO:34、36-38、40和66;或(vi) 其分别地根据SEQ ID NO:34、36-37、39、40和66;或(vii) 其 分别地根据SEQ ID NO:34、36-38、58和66;或(viii) 其分别地根据SEQ ID NO:34、36- 37、39、58和66。

[0164] 而且,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括根据SEQ ID NO:41的重链可变区(VH)氨基酸序列或其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:42的轻链可变区(VL)氨基酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是抗体或抗原结合片段包括与SEQ ID NO:41 共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的重链可变区(VH)氨基酸序列和与SEQ ID NO:42共享至少 80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98% 或99%序列同一性的轻链可变区(VL)氨基酸序列。更优选地,抗体或抗原结合片段包括根 据SEQ ID NO:41的重链可变区(VH)氨基酸序列和根据SEQ ID NO:42的轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0165] 而且,还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括根据SEQ ID NO:41或 67 的重链可变区(VH)氨基酸序列或其功能序列变体和/或根据SEQ ID NO:42的轻链可变区(VL)氨基酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是抗体或抗原结合片段包括与SEQ ID NO:41或67共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95% 和特别优选地至少98%或99%序列同一性的重链可变区(VH)氨基酸序列和与SEQ ID NO: 42 共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别 优选地至少98%或99%序列同一性的轻链可变区(VL)氨基酸序列。更优选地,抗体或抗原 结合片段包括根据SEQ ID NO:41或67的重链可变区(VH)氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 42的轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0166] 优选地,抗体或抗原结合片段包括根据SEQ ID NO:41或67的重链可变区(VH)氨基酸序列或其功能序列变体和根据SEQ ID NO:59或65的轻链可变区(VL)氨基酸序列或其功能序列变体。因此,优选的是抗体或抗原结合片段包括(i) 与SEQ ID NO:41或67共享至少 80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98% 或99%序列同一性的重链可变区(VH)氨基酸序列;和(ii) 与SEQ ID NO:59或65共享至少 80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98% 或99%序列同一性的轻链可变区(VL)氨基酸序列。更优选地,抗体或抗原结合片段包括根据SEQ ID NO:41或67的重链可变区(VH)氨基酸序列和根据SEQ ID NO:59或65的轻链 可变区(VL)氨基酸序列。

[0167] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链CDRH1、CDRH2和CDRH3和轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别地与SEQ ID NO:34-38 和40的氨基酸序列或SEQ ID NO:34-37和39-40的氨基酸序列具有至少80%,例如, 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。优选地,根据本发明的抗体或其抗 原结合片段包括至少一个重

链CDRH1、CDRH2和CDRH3和轻链CDRL1、CDRL2和 CDRL3氨基酸序列,其分别地与SEQ ID NO: 34-38和58的氨基酸序列或分别地与SEQ ID NO: 34-37和39和58的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链CDRH1、CDRH2和CDRH3和轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别地与SEQ ID NO: 34、36-38、40和66的氨基酸序列或分别地与SEQ ID NO: 34、36-37、39-40和66的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链CDRH1、CDRH2和CDRH3和轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其分别地与SEQ ID NO: 34、36-38、58和66的氨基酸序列或分别地与SEQ ID NO: 34、36-37、39、58和66的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0168] 还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链可变区 (VH) 和至少一个轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 41-42的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0169] 还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链可变区 (VH) 和至少一个轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 41和59的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0170] 还优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段包括至少一个重链可变区 (VH) 和至少一个轻链可变区 (VL) 氨基酸序列,其与SEQ ID NO: 41和65的氨基酸序列具有至少80%,例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0171] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34。

[0172] 本发明人已经分离了根据本发明的单克隆抗体 (mAb),其在本文中被称为HBC34 (参见实施例1)。基于该抗体HBC34,具体地基于HBC34的VH和VL基因,如本文所使用,术语“gHBC34”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO: 34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 35的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 40的CDRL3氨基酸序列。具体而言,“gHBC34”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO: 34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 40的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34”的重链可变区 (V_H) 具有根据SEQ ID NO: 41的氨基酸序列和“gHBC34”的轻链可变区 (V_L) 具有根据SEQ ID NO: 42的氨基酸序列。

[0173] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34v7,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34v7。

[0174] 本发明人已经鉴定了根据本发明的进一步单克隆抗体(mAb),其在本文中被称为HBC34v7(参见实施例11)。基于该抗体HBC34v7,具体地基于HBC34v7的VH和VL基因,如本文所使用,术语“gHBC34v7”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34v7”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO:34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:58的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34v7”的重链可变区(V_H)具有根据SEQ ID NO:41的氨基酸序列和“gHBC34v7”的轻链可变区(V_L)具有根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0175] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34v23,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34v23。

[0176] 本发明人已经鉴定了根据本发明的进一步单克隆抗体(mAb),其在本文中被称为HBC34v23(参见实施例12)。基于该抗体HBC34v23,具体地基于HBC34v23的VH和VL基因,如本文所使用,术语“gHBC34v23”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34v23”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO:34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:58的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34v23”的重链可变区(V_H)具有根据SEQ ID NO:41的氨基酸序列和“gHBC34v23”的轻链可变区(V_L)具有根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0177] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34v31,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34v31。

[0178] 本发明人已经鉴定了根据本发明的进一步单克隆抗体(mAb),其在本文中被称为HBC34v31(参见实施例12)。基于该抗体HBC34v31,具体地基于HBC34v31的VH和VL基因,如本文所使用,术语“gHBC34v31”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34v31”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO:34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:40的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34v31”的重链可变区(V_H)具有根据SEQ ID NO:67的氨基酸序列和“gHBC34v31”的轻链可变区(V_L)具有根据SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0179] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34v32,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34v32。

[0180] 本发明人已经鉴定了根据本发明的进一步单克隆抗体(mAb),其在本文中被称为HBC34v32(参见实施例12)。基于该抗体HBC34v32,具体地基于HBC34v32的VH和VL基因,如本文所使用,术语“gHBC34v32”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34v32”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO:34的CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO:36的CDRH3氨基酸序

列、根据SEQ ID NO:37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:40的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34v32”的重链可变区(V_H)具有根据SEQ ID NO:67的氨基酸序列和“gHBC34v32”的轻链可变区(V_L)具有根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0181] 特别优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是gHBC34v33,具体地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是HBC34v33。

[0182] 本发明人已经鉴定了根据本发明的进一步单克隆抗体(mAb),其在本文中被称为HBC34v33(参见实施例12)。基于该抗体HBC34v33,具体地基于HBC34v33的VH和VL 基因,如本文所使用,术语“gHBC34v33”指的是各自的“通用”抗体或其抗原结合片段。即,“gHBC34v33”指的是如此抗体或其抗原结合片段,其具有根据SEQ ID NO:34的 CDRH1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:35或66的CDRH2氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 36的CDRH3氨基酸序列、根据SEQ ID NO:37的CDRL1氨基酸序列、根据SEQ ID NO: 38或39的CDRL2氨基酸序列和根据SEQ ID NO:40的CDRL3氨基酸序列。“gHBC34v33”的重链可变区(V_H)具有根据SEQ ID NO:67的氨基酸序列和“gHBC34v33”的轻链可变区(V_L)具有根据SEQ ID NO:65的氨基酸序列。

[0183] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段是人抗体、单克隆抗体、人单克隆抗体、纯化抗体、单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

[0184] 本发明的抗体因而可以是人抗体、单克隆抗体、人单克隆抗体、重组抗体或纯化抗体。本发明还提供了本发明的抗体的片段,具体地保留抗体的抗原结合活性的片段。这样的片段包括但不限于单链抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv。

[0185] 本发明的抗体的片段可以从抗体通过包括利用酶比如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶进行消化的方法,和/或通过化学还原裂解二硫键获得。可选地,抗体的片段可以通过重或轻链的序列的一部分的克隆和表达来获得。抗体“片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明还包括衍生自本发明的抗体的重和轻链的单链Fv片段(scFv)。例如,本发明包括scFv,其包含来自本发明的抗体的CDR。还包括的是重或轻链单体和二聚体、单结构域 重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体,例如单链Fv,在该单链Fv中重和轻链可变 结构域通过肽连接体接合。

[0186] 本发明的抗体片段可以赋予单价或多价相互作用并且包含在上面描述的多种结构中。例如,scFv分子可以被合成以创建三价“三链抗体”或四价“四链抗体”。scFv分子可以包括导致二价微抗体的Fc区的结构域。另外,本发明的序列可以是多特异性分子的成分,其中本发明的序列靶向本发明的表位并且分子的其它区结合至其它靶标。示例性的分子包括但不限于双特异性Fab2、三特异性Fab3、双特异性scFv和双抗体(Holliger and Hudson, 2005,Nature Biotechnology9:1126-1136)。

[0187] 在另一方面,本发明提供了如本文所描述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段用作 药物。优选地,如本文所描述的根据本发明的抗体或其抗原结合片段用于预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎。该方面的详细描述在“医学治疗和用途”下和在本发明的药物 组合物的背景下在下面提供。

[0188] 核酸分子

[0189] 在另一方面,本发明还提供了包括多核苷酸的核酸分子,该多核苷酸编码根据本

发明的如上面所描述的抗体或其抗原结合片段。核酸分子和/或多核苷酸的实例包括,例如,重组多核苷酸,载体,寡核苷酸, RNA分子比如rRNA、mRNA、miRNA、siRNA或tRNA, 或DNA分子比如cDNA。编码本发明的抗体的轻和重链以及CDR的一部分或全部的核酸序列是优选的。表2-8提供了根据本发明的示例性抗体的CDR以及VH和VL的氨基酸序列的SEQ ID编号,其优选地由如本文所描述的多核苷酸/核酸序列编码。优选地,本文提供了编码本发明的示例性抗体的轻和重链,具体地VH和VL序列以及CDR的一部分或全部的核酸序列。下面的表9提供了编码根据本发明的示例性抗体的CDR以及VH和VL的核酸序列的SEQ ID编号。由于遗传密码的冗余性,本发明还包括这些核酸序列的序列变体,并且具体而言这样的序列变体——其编码相同氨基酸序列。

[0190] 核酸分子是包括核酸成分,优选地由核酸成分组成的分子。术语核酸分子优选地指DNA或RNA分子。具体而言,其与术语“多核苷酸”同义使用。优选地,核酸分子是包括核苷酸单体或由核苷酸单体组成的聚合物,这些核苷酸单体通过糖/磷酸骨架的磷酸二酯键彼此共价地连接。术语“核酸分子”也包括修饰的核酸分子,比如碱基修饰的、糖修饰的或骨架修饰的等DNA或RNA分子。

[0191] 表9示出了根据本发明的示例性抗体(“HBC34”、“HBC34v7”、“HBC34v23”、“HBC34v31”、“HBC34v32”和“HBC34v33”)的CDR以及重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的核酸序列:

[0192]

名称	SEQ ID NO.	核酸序列
HBC34		
CDRH1	43	GGACGCATCTTTAGAAAGTTTTTAC
CDRH2	44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA
CDRH3	45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTC
CDRL1	46	AAATTGGGGAATAAAAAT
CDRL2	47	GAGGTAAAA
CDRL2 长	48	gtcatctatGAGGTAAAtaccgcccc
CDRL3	49	CAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTG
VH	50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCA GCCGGGGGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTG GACGCATCTTTAGAAAGTTTTTAC ATGAGCTGGGTCCGC CAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACTAT AAACCAAGATGGAAGTGAGAA ATTATATGTGGACTCTG TGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAG AACTCACTATTTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGAG GACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAA TAGTGGGGGTATGGACG TCTGGGGCCAGGGGACCACG GTCTCCGTCTCCTCA

[0193]

VL	51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCC CCAGGACAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTGGAGATAAA TTGGGGAATAAAAATGTTTGCTGGTTTCAGCATAAGCCA GGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTAT GAGGTTAAATAC CGCCCCTCGGGGATTCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCA GGCTATGGATGAGGCTGCCTATTTCTGT CAGACGTGGGA CAGCACCCTGTGGTGTT CGGCGGAGGGACCAGGCTG ACCGTCCTA
VH 密码子优化的	70	GAACTGCAGCTGGTCTGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCA GCCCCGAGGGAGCCAGAGACTGTCTTGTGCCGCATCAG GGAGGATCTTCAGGAGCTTCTACAT GTCTGGGTGCGC CAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCCACCAT CAACCAGGACGGATCTGAAAAGCTGTATGTGGATAGTG TCAAAGGCCGGTTCACAATTAGCAGAGACAACGCTAAA AATTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGAG GATACCGCCGTCTACTATTG CGCCGCTTGGTCTGGCAA CAGCGGCGGGATGGATGTCT GGGGGCAGGGCACAACA GTGAGCGTCTCTTCC
VL 密码子优化的	71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGTCTCAC CTGGACAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCGGCGAT AAACTGGGCAACAAGAAC GTGTGCTGGTTCAGCACA AACCCGGACAGAGTCCTGTGCTGGTCATCTAC GAGGTC AAGTATCGGCCAAGCGGCATTCCCGAAAGATT CAGCGGC TCCAACTCTGGGAATACCGCAACACTGACTATCTCTGGA ACCCAGGCAATGGACGAGGCAGCTTACTTTTGCC CAGAC TTGGGATTCAACTACTGTCGTGT TCGGCGGCGGAACTA GACTGACTGTCCTG
CRDH1 密码子优化的	72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC
CDRH2 密码子优化的	73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG
CDRH3 密码子优化的	74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTC
CDRL1 密码子优化的	75	AAACTGGGCAACAAGAAC
CDRL2 密码子优化的	76	GAGGTCAAG
CDRL2 长, 密码子优化的	77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA
CDRL3 密码子优化的	78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG
HBC34v7、HBC34v23、HBC34 v31、HBC34 v32 和 HBC34 v33		

[0194]

CDRL1 v7 和 CDRL1 v23	60	AAGCTGGGGAACAAAAAT
CDRL2 v7 和 CDRL2 v23	61	GAGGTGAAA
CDRL2 长 v7 和 CDRL2 v23 长	62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT
CDRL3 v7 和 CDRL3 v23	63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC
VL v7	64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCGTCTCT CCAGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCTCTGGCGACAAG CTGGGGAACAAAAATGTCTGTTGGTTCCAGCACAAAGCC AGGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATA TCGGCCTTCAGGAATTCCAGAACGGTTCAGCGGATCAAA CAGCGGCAATACTGCAACCCTGACAATTAGCGGGACCCA GGCCATGGACGAAGCCGCTTATTTCTGCCAGACATTCGAT TCCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGGAAGTGGCTGACC GTGCTG
HBC34 v31、 HBC34 v32 和 HBC34 v33 VH	68	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGGGGACTGGTGCA GCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCAGCTTCTGG AAGAATCTTCAGATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACA GGCTCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAAAACATCA ATCAGGACGGATCAGAAAAGCTGTATGTGGATAGCGTCA AAGGCAGGTTCACTATTTCCCGCGACAACGCCAAAAATT CTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAGGATA CCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAGTG GAGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGACA GTCAGCTCC
VL v23	69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGTCTCT CCAGGCCAGACAGCATCCATCACTTGCTCTGGCGACAAG CTGGGGAACAAAAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCA GGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATAT CGGCCTTCAGGAATTCCAGAAAGATTAGTGATCAAAAC AGCGGCAATACTGCTACCCTGACAATTAGCGGGACCCAG GCCATGGACGAAGCTGATTACTATTGCCAGACATTCGATT CCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGGAAGTGGCTGACC GTGCTG

[0195] 优选地,根据本发明的核酸分子的序列包括根据SEQ ID NO:43-51中任一种的核酸序列或其功能序列变体,或由其组成。还优选的是根据本发明的核酸分子的序列包括根据SEQ ID NO:43-51、60-64和68-78中任一种的核酸序列,或由其组成。

[0196] 还优选的是根据本发明的核酸序列包括如此核酸序列:其与编码在根据本发明的(示例性)抗体中使用的CDR、VH序列和/或VL序列的核酸,例如与在表9中示出的序列具有至少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%同一性。因而,如此核酸分子是优选的,其中多核苷酸序列包括根据SEQ ID NO:43-51中任一种的核酸序列或其功能序列变体,或由其组成。还优选的是如此核酸分子,其中多核苷酸序列包括与SEQ ID NO:43-51、60-64和68-78

中任一种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的核酸序列,或由其组成。更优选地,多核苷酸序列包括根据SEQ ID NO:43-51、60-64和68-78中任一种的核酸序列或由其组成。

[0197] 更优选地,多核苷酸序列包括与SEQ ID NO:70-78中任一种共享至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%和特别优选地至少98%或99%序列同一性的核酸序列或由其组成。SEQ ID NO:70-78是密码子优化的核酸序列(参见表9)。特别优选地,多核苷酸序列包括根据SEQ ID NO:70-78中任一种的核酸序列或由其组成。

[0198] 一般而言,核酸分子可以被操作以插入、缺失或变更某些核酸序列。来自这样的操作 的改变包括但不限于引入限制位点、修改密码子使用、添加或优化转录和/或翻译调控序列 等的改变。也可能的是改变核酸以变更编码的氨基酸。例如,可以有用的是将一个或多个 (例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)氨基酸置换、缺失和/或插入引入抗体的氨基酸序列。这样的点突变可以修饰效应子功能、抗原结合亲和力、翻译后修饰、免疫原性等,可以引入氨基酸用于附接共价基团(例如标记)或者可以引入标签(例如,用于纯化目的)。突变可以被引入特定位点或者可以被随机引入,然后选择(例如,分子进化)。例如,编码本 发明的(示例性)抗体的CDR区、VH序列和/或VL序列中的任一种的一种或多种核酸可以 随机地或定向地突变以在编码的氨基酸中引入不同的性质。这样的改变可以是迭代过程的结果,其中最初改变被保留并且在其它核苷酸位置处的新改变被引入。进一步,在独立步骤中实现的改变可以被组合。引入编码的氨基酸的不同性质可以包括但不限于增强的亲和力。

[0199] 载体

[0200] 进一步包含在本发明的范围内的是载体,例如表达载体,其包括根据本发明的核酸分子。优选地,载体包括如上面描述的核酸分子。

[0201] 术语“载体”指的是核酸分子,优选地指的是重组核酸分子,即天然不存在的核酸分子。在本发明的背景下的载体适合于并入或具有期望的核酸序列。这样的载体可以是贮藏载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。贮藏载体是允许方便贮藏核酸分子的载体。因而,载体可以包括例如与根据本发明的期望的抗体或其抗体片段对应的序列。表达载体可以被用于产生表达产物比如RNA,例如mRNA,或肽,多肽或蛋白质。例如,表达载体 可以包括对于载体的序列段(stretch)的转录需要的序列,比如启动子序列。克隆载体通常是 包含克隆位点的载体,该克隆位点可以被用于将核酸序列并入载体。克隆载体可以是例如 质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适合于将核酸分子转移入细胞或生物体的载体, 例如病毒载体。在本发明的背景下的载体可以是例如RNA载体或DNA载体。优选地,载体是DNA分子。例如,在本申请的意义下的载体包括克隆位点、选择标志比如抗生素抗性因子、和适合于载体的操作的序列比如复制起点。优选地,在本申请的背景下的载体是 质粒载体。

[0202] 细胞

[0203] 在进一步方面,本发明还提供了细胞,其表达根据本发明的抗体或其抗原结合片段; 和/或包括根据本发明的载体。

[0204] 这样的细胞的实例包括但不限于真核细胞,例如酵母细胞、动物细胞或植物细胞。优选地,细胞是哺乳动物细胞,更优选地哺乳动物细胞系。优选的实例包括人细胞、CHO细胞、HEK293T细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、人肝细胞例如Hepa RG细胞、骨髓瘤细胞 或杂交瘤

细胞。

[0205] 具体而言,细胞可以转染有根据本发明的载体,优选地转染有表达载体。术语“转染”指的是将核酸分子比如DNA或RNA(例如,mRNA)分子引入细胞,优选地引入真核细胞。在本发明的背景下,术语“转染”包括用于将核酸分子引入细胞,优选地引入真核细胞,比如引入哺乳动物细胞的对于本领域技术人员而言已知的任何方法。这样的方法包括,例如,电穿孔、例如基于阳离子脂质和/或脂质体的脂质转染法、磷酸钙沉淀、基于纳米颗粒的转染、基于病毒的转染或基于阳离子聚合物的转染——比如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺等。优选地,引入是非病毒的。

[0206] 而且,本发明的细胞可以稳定地或瞬时地转染有根据本发明的载体,例如用于表达根据本发明的抗体或其抗原结合片段。优选地,细胞稳定地转染有编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的根据本发明的载体。可选地,还优选的是细胞瞬时地转染有编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的根据本发明的载体。

[0207] 抗体的任选的另外的特征

[0208] 本发明的抗体可以例如偶联至递送至治疗位点的药物或者偶联至可检测标记以促进位点的成像,该位点包括感兴趣的细胞。用于偶联抗体至药物和可检测标记的方法在本领域中是熟知的,如使用可检测标记的成像方法。标记的抗体可以在采用多种标记的多种试验中采用。本发明的抗体和HBsAg上——具体而言HBsAg的抗原环区上——感兴趣的表位之间的抗体-抗原络合物的形成的检测可以通过将可检测的物质附接至抗体来促进。适合的检测方式包括使用标记比如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、色原、酶底物或辅因子、酶抑制剂、辅基络合物、自由基、颗粒、染料等。适合的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基络合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;适合的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例是鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;和适合的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。这样标记的试剂可以在多种熟知的试验中使用,比如放射免疫测定、酶免疫测定例如ELISA、荧光免疫测定等。根据本发明的标记的抗体因而可以在这些试验中使用,例如,如US 3,766,162;US 3,791,932;US 3,817,837和US 4,233,402中描述的。

[0209] 根据本发明的抗体可以缀合至治疗部分比如细胞毒素、治疗剂、或放射性金属离子或放射性同位素。放射性同位素的实例包括但不限于 I-^{131} 、 I-^{123} 、 I-^{125} 、 Y-^{90} 、 Re-^{188} 、 Re-^{186} 、 At-^{211} 、 Cu-^{67} 、 Bi-^{212} 、 Bi-^{213} 、 Pd-^{109} 、 Tc-^{99} 、 In-^{111} 等。这样的抗体缀合物可以被用于修饰给定的生物反应;药物部分将不被解释为限于传统的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有期望的生物学活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可以包括,例如毒素,比如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素。

[0210] 用于缀合这样的治疗部分至抗体的技术是熟知的。参见,例如,Arnon et al. (1985) “Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy,” in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) “Antibodies for Drug Delivery,” in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel

Dekker, Inc.), pp.623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp.475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp.303-316; 和 Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158。

[0211] 可选地, 抗体或其抗体片段可以缀合至第二抗体或其抗体片段以形成抗体复共轭对配合物 (heteroconjugate), 如在 US 4,676,980 中描述的。此外, 连接体可以在标记和本发明的抗体之间使用, 例如, 如在 US 4,831,175 中描述的。抗体或其抗原结合片段可以直接地用本领域中已知的放射性碘、铟、钇或其它放射性颗粒标记, 例如, 如在 US 5,595,721 中描述的。治疗可以由利用同时或随后施用的缀合的或非缀合的抗体的治疗的组合组成, 例如, 如在 W000/52031; W000/52473 中描述的。

[0212] 本发明的抗体也可以附接至固相支持体。另外, 本发明的抗体或其功能性抗体片段可以通过共价缀合至聚合物而被化学修饰以例如增加它们的循环半衰期。聚合物的实例和将它们附接至肽的方法在 US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 和 US 4,609,546 中示出。在一些实施方式中, 聚合物可以选自聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇 (PEG)。PEG 在室温下在水中是可溶的并且具有通式: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$, 其中 R 可以是氢, 或保护基团比如烷基或烷醇基。优选地, 保护基团可以具有 1-8 个碳原子。例如, 保护基团是甲基。符号 n 是正整数。在一个实施方式中, n 在 1 与 1,000 之间。在另一实施方式中, n 在 2 与 500 之间。优选地, PEG 的平均分子量在 1,000 和 40,000 之间, 更优选地, PEG 的分子量在 2,000 和 20,000 之间, 甚至更优选地, PEG 的分子量在 3,000 和 12,000 之间。而且, PEG 可以具有至少一个羟基, 例如 PEG 可以具有末端羟基。例如, 其是被活化以与抑制剂上的游离氨基反应的末端羟基。但是, 将理解, 反应基团的类型和量可以改变以实现本发明的共价缀合的 PEG/抗体。

[0213] 水溶性聚氧乙烯化多元醇在本发明中也是有用的。它们包括聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化丙三醇 (POG) 等。在一个实施方式中, 使用 POG。不受任何理论的束缚, 由于聚氧乙烯化丙三醇的丙三醇骨架是在例如动物和人中在单、二、三酸甘油酯中天然存在的相同的骨架, 因此该分支将不一定被视为体内的外来物。POG 可以具有与 PEG 相同范围的分子量。可以用于增加循环半衰期的另一种药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法对于本领域技术人员而言是已知的。其它药物递送系统在本领域中是已知的并且在例如引用的 Poznansky 等 (1980) 和 Poznansky (1984) 中描述。

[0214] 本发明的抗体可以以纯化形式提供。通常地, 抗体将存在于基本上不含其它多肽的组合物中, 例如, 其中少于 90% (按重量计)、通常地少于 60% 和更通常地少于 50% 的组合物由其它多肽组成。

[0215] 本发明的抗体在非人 (或者异源的) 宿主, 例如在小鼠中可以是免疫原性的。具体而言, 抗体可以具有如此个体决定簇, 其非人宿主是免疫原性的, 但是在人宿主中不是免疫原性的。具体而言, 用于人用途的本发明的抗体包括不能容易地分离自宿主比如小鼠、山羊、兔、大鼠、非灵长类哺乳动物等并且通常不能通过人源化或从异种小鼠获得的那些抗体。

[0216] 抗体的产生

[0217] 根据本发明的抗体可以通过本领域中已知的任何方法制造。例如,使用杂交瘤技术制造单克隆抗体的一般方法是熟知的(Kohler,G.and Milstein,C,.1975;Kozbar et al.1983)。在一个实施方式中,使用在W02004/076677中描述的可选的EBV无限增殖化方法。

[0218] 优选的方法在W0 2004/076677中描述。在该方法中,产生本发明的抗体的B细胞转化有EBV和多克隆B细胞活化剂。细胞生长和分化的另外的刺激剂可以任选地在转化步骤期间添加以进一步增强效率。这些刺激剂可以是细胞因子比如IL-2和IL-15。在一方面,IL-2在无限增殖化步骤期间添加以进一步提高无限增殖化效率,但是其使用不是必需的。使用这些方法产生的无限增殖化B细胞然后可以使用本领域中已知的方法培养并且自其分离抗体。

[0219] 另一种优选的方法在W0 2010/046775中描述。在该方法中,浆细胞以有限数目培养,或者在微孔培养板中作为单一浆细胞培养。抗体可以分离自浆细胞培养物。进一步,从浆细胞培养物,可以使用本领域中已知的方法提取RNA和进行PCR。抗体的VH 和VL区可以通过RT-PCR(反转录酶PCR)扩增,测序并克隆入表达载体,该表达载体然后被转染入HEK293T细胞或其它宿主细胞。表达载体中核酸的克隆、宿主细胞的转染、转染的宿主细胞的培养和产生的抗体的分离可以使用本领域技术人员已知的任何方法进行。

[0220] 如果需要,可以使用过滤、离心和各种色谱法比如HPLC或亲和色谱法进一步纯化抗体。用于纯化抗体比如单克隆抗体的技术,包括用于产生药用级别抗体的技术,在本领域中是熟知的。

[0221] 本发明的抗体的片段可以通过如下方法从抗体获得:所述方法包括利用酶比如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶进行消化,和/或通过化学还原裂解二硫键。可选地,抗体的片段可以通过重或轻链的序列的一部分的克隆和表达获得。抗体“片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。本发明还包括衍生自本发明的抗体的重和轻链的单链Fv片段(scFv)。例如,本发明包括含有来自本发明的抗体的CDR的scFv。还包括的是重或轻链单体和二聚体、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体以及单链抗体,例如,如此单链Fv:在该单链Fv中重和轻链可变结构域通过肽连接体接合。

[0222] 本发明的抗体片段可以赋予单价或多价相互作用并且可以包含在如上面所描述的多 种结构中。例如,scFv分子可以被合成以创建三价“三链抗体”或四价“四链抗体”。scFv 分子可以包括导致二价微抗体的Fc区的结构域。另外地,本发明的序列可以是多特异性分子的成分,其中本发明的序列靶向本发明的表位和分子的其它区结合至其它靶标。示例性分子包括但不限于双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、双特异性scFv和双抗体(Holligerand Hudson,2005,Nature Biotechnology 9:1126-1136)。

[0223] 分子生物学的标准技术可以被用于制备编码本发明的抗体或抗体片段的DNA序列。期望的DNA序列可以使用寡核苷酸合成技术完全地或部分地合成。位点定向诱变和聚合酶链反应(PCR)技术可以酌情使用。

[0224] 任何适合的宿主细胞/载体系统可以被用于表达编码本发明的抗体分子或其片段的DNA序列。细菌,例如大肠杆菌和其它微生物系统可以部分地用于表达抗体片段比如Fab和F(ab')₂片段,并且尤其是Fv片段和单链抗体片段,例如单链Fv。真核,例如哺乳动物,宿

主细胞表达系统,可以被用于产生更大的抗体分子,包括完整抗体分子。适合的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0225] 本发明还提供了用于产生根据本发明的抗体分子的方法,其包括在适合于由编码本发明的抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养包括编码本发明的核酸的载体的宿主细胞,和分离抗体分子。

[0226] 抗体分子可以包括仅重或轻链多肽,在该情况下仅重链或轻链多肽编码序列需要被用于转染宿主细胞。对于包括重和轻链二者的产物的产生,细胞系可以被转染有两种载体,编码轻链多肽的第一载体和编码重链多肽的第二载体。可选地,可以使用单一载体,所述载体包括编码轻链和重链多肽的序列。可选地,根据本发明的抗体可以通过如下过程产生:(i)在宿主细胞中表达根据本发明的核酸序列,例如通过使用根据本发明的载体,和(ii)分离表达的抗体产物。另外地,该方法可以包括(iii)纯化分离的抗体。可以对转化的B细胞和培养的浆细胞进行产生期望特异性或功能的抗体的那些细胞的筛选。

[0227] 筛选步骤可以通过任何免疫测定,例如ELISA,通过组织或细胞(包括转染的细胞)的染色,通过中和试验或通过本领域中已知的用于鉴定期望特异性或功能的许多其它方法中的一种进行。试验可以基于一种或多种抗原的简单识别进行选择,或者可以另外基于期望的功能进行选择,例如以选择中和抗体而不仅仅是抗原结合抗体,以选择可以改变靶向的细胞的特性的抗体,比如它们的信号传导级联、它们的形状、它们的生长速率、它们影响其它细胞的能力、它们对其它细胞或其它试剂或在一些条件下的改变的影响的应答、它们的分化状态等。

[0228] 个别转化的B细胞克隆然后可以从阳性转化的B细胞培养物产生。用于从阳性细胞的混合物分离个别克隆的克隆步骤可以使用有限稀释、显微操作、单细胞沉积,通过细胞分选或本领域中已知的其它方法进行。

[0229] 来自培养的浆细胞的核酸可以使用本领域中已知的方法在HEK293T细胞或其它已知的宿主细胞中分离、克隆和表达。

[0230] 本发明的无限增殖化B细胞克隆或转染的宿主细胞可以以多种途径使用,例如,作为单克隆抗体的来源、作为编码感兴趣的单克隆抗体的核酸(DNA或mRNA)的来源、用于研究等。

[0231] 本发明还提供了包括产生根据本发明的抗体的无限增殖化B记忆细胞或转染的宿主细胞的组合物。

[0232] 本发明的无限增殖化B细胞克隆或培养的浆细胞也可以被用作克隆随后重组表达的抗体基因的核酸的来源。来自重组来源的表达比来自B细胞或杂交瘤的表达在制药目的方面是更普遍的,例如由于稳定性、再现性、易培养性(culture ease)等原因。

[0233] 因而,本发明还提供了用于制备重组细胞的方法,其包括如下步骤:(i)从编码感兴趣的抗体的B细胞克隆或者培养的浆细胞获得一种或多种核酸(例如,重和/或轻链mRNA);(ii)将核酸插入表达载体和(iii)将载体转染入宿主细胞以便允许感兴趣的抗体在所述宿主细胞中表达。

[0234] 类似地,本发明提供了用于制备重组细胞的方法,其包括如下步骤:(i)对来自B细胞克隆或者培养的浆细胞的编码感兴趣的抗体的核酸(一种或多种)进行测序;和(ii)使用来自步骤(i)的序列信息制备插入宿主细胞的核酸(一种或多种)以便于允许感兴趣的

抗体在所述 宿主细胞中的表达。核酸可以但不必在步骤(i)和(ii)之间操作以引入限制位点、以改变密码子使用、和/或以优化转录和/或翻译调控序列。

[0235] 而且,本发明还提供了制备转染的宿主细胞的方法,其包括将宿主细胞转染有编码感兴趣的抗体的一种或多种核酸的步骤,其中核酸是衍生自本发明的无限增殖化B细胞克隆或培养的浆细胞的核酸。因而,首先制备核酸(一种或多种),然后使用其转染宿主细胞的过程可以在不同的时间通过不同的人在不同的地方(例如,在不同的国家)进行。

[0236] 本发明的这些重组细胞然后可以被用于表达和培养目的。它们具体地可用于表达抗体用于大规模药物生产。它们也可以被用作药物组合物的活性成分。可以使用任何适合的培养技术,包括但不限于静置培养、滚瓶培养、腹水液、中空纤维型生物反应器筒、模块化微型发酵罐、搅拌釜、微载体培养、陶瓷芯灌注等。

[0237] 用于从B细胞或浆细胞获得并测序免疫球蛋白基因的方法在本领域中是熟知的(例如,参见Kuby Immunology的第4章,第4版,2000)。

[0238] 转染的宿主细胞可以是真核细胞,包括酵母和动物细胞,特别是哺乳动物细胞(例如CHO细胞、NS0细胞、人细胞比如PER.C6或HKB-11细胞、骨髓瘤细胞、或人肝细胞比如Hepa RG),以及植物细胞,其中哺乳动物细胞是优选的。优选的表达宿主可以使本发明的抗体糖基化,具体地利用其自身在人中没有免疫原性的糖类结构。在一个实施方式中,转染的宿主细胞可以能够在无血清培养基中生长。在进一步实施方式中,转染的宿主细胞可以能够在不存在动物来源的产品的情况下在培养中生长。转染的宿主细胞也可以被培养以产生细胞系。

[0239] 本发明还提供了用于制备编码感兴趣的抗体的一种或多种核酸分子(例如,重和轻链基因)的方法,其包括如下步骤:(i)根据本发明制备无限增殖化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)从B细胞克隆或培养的浆细胞获得编码感兴趣的抗体的核酸。进一步,本发明提供了用于获得编码感兴趣的抗体的核酸序列的方法,其包括如下步骤:(i)根据本发明制备无限增殖化B细胞克隆或培养浆细胞;(ii)对来自B细胞克隆或培养的浆细胞的编码感兴趣的抗体的核酸进行测序。

[0240] 本发明进一步提供了制备编码感兴趣的抗体的核酸分子(一种或多种)的方法,其包括获得核酸的步骤,该核酸获得自本发明的转化的B细胞克隆或者培养的浆细胞。因而,首先获得B细胞克隆或者培养的浆细胞,然后从B细胞克隆或者培养的浆细胞获得核酸(一种或多种)的过程可以在不同的时间通过不同的人在不同的地方(例如,在不同的国家)进行。

[0241] 本发明还包括用于制备根据本发明的抗体(例如,用于制药用途)的方法,其包括如下步骤:(i)获得和/或测序来自表达感兴趣的抗体的选择的B细胞克隆或者培养的浆细胞的一种或多种核酸(例如,重和轻链基因);(ii)将核酸(一种或多种)插入表达载体或使用核酸(一种或多种)序列(一种或多种)制备表达载体;(iii)转染能够表达感兴趣的抗体的宿主细胞;(iv)在表达感兴趣的抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞;和任选地(v)纯化感兴趣的抗体。

[0242] 本发明还提供了制备抗体的方法,其包括如下步骤:在表达感兴趣的抗体的条件下培养或传代培养转染的宿主细胞群,例如稳定转染的宿主细胞群,和任选地纯化感兴趣的抗体,其中所述转染的宿主细胞群已经通过如下过程制备:(i)提供编码感兴趣的选择

抗体的核酸(一种或多种),该感兴趣的选择抗体由上面描述的B细胞克隆或培养的浆细胞产生,(ii)将核酸(一种或多种)插入表达载体,(iii)在可以表达感兴趣的抗体的宿主细胞中转染载体,和(iv)培养或传代培养包括插入的核酸的转染的宿主细胞以产生感兴趣的抗体。因而,首先制备重组宿主细胞,然后培养其以表达抗体的过程可以在不同的时间通过不同的人在不同的地方(例如,在不同的国家)进行。

[0243] 药物组合物

[0244] 本发明还提供了包括下列的一种或多种的药物组合物:

[0245] (i) 根据本发明的抗体或其抗体片段;

[0246] (ii) 编码根据本发明的抗体或抗体片段的核酸;

[0247] (iii) 包括根据本发明的核酸的载体;或

[0248] (iv) 表达根据本发明的抗体或包括根据本发明的载体的细胞。

[0249] 换句话说,本发明还提供了药物组合物,其包括根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体和/或根据本发明的细胞。

[0250] 药物组合物还可以优选地包含药学上可接受的运载体、稀释剂和/或赋形剂。虽然运载体或赋形剂可以促进施用,但是其自身不应当诱导对接受组合物的个体有害的抗体的产生。其也不应当有毒。适合的运载体可以是大的、缓慢代谢的大分子,比如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物和灭活的病毒颗粒。一般而言,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的运载体可以是活性成分或非活性成分。优选地,根据本发明的药物组合物中的药学上可接受的运载体相对于乙型或丁型肝炎不是活性成分。

[0251] 可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,比如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或有机酸的盐,比如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0252] 药物组合物中的药学上可接受的运载体可以另外地包含液体比如水、盐水、丙三醇和乙醇。另外地,辅助物质,比如湿润剂或乳化剂或pH缓冲物质可以存在于这样的组合物中。这样的运载体使得药物组合物能够配制为片剂、丸剂、糖衣片、胶囊、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂和悬浮液,用于对象摄入。

[0253] 本发明的药物组合物可以以多种形式制备。例如,组合物可以被制备为可注射剂,为液体溶液或悬浮液。也可以制备在注射之前适合于溶解在液体媒介或者悬浮在液体媒介中的固体形式(例如,冻干的组合物,类似于Synagis™和Herceptin™,用于利用包含防腐剂的无菌水重构)。组合物可以被制备用于外用施用,例如作为药膏、霜剂或粉末。组合物可以被制备用于口服施用,例如作为片剂或胶囊,作为喷雾剂,或作为糖浆剂(任选地调味的)。组合物可以被制备用于肺部施用,例如作为吸入剂,使用细粉末或喷雾剂。组合物可以被制备为栓剂或子宫托。组合物可以被制备用于鼻部、耳部或眼部施用,例如作为滴剂。组合物可以是试剂盒形式,其被设计使得组合的组合物刚好在施用至对象之前被重构。例如,冻干的抗体可以以含有无菌水或无菌缓冲剂的试剂盒形式提供。

[0254] 优选的是组合物中的活性成分是抗体分子、抗体片段或其变体和衍生物,具体而言,组合物中的活性成分是根据本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物。这样,其对于在胃肠道中的降解可以是敏感的。因此,如果组合物通过使用胃肠道的途径施用,则组合物可以包含保护抗体免受降解的药剂,但是一旦该药剂从胃肠道吸收,它立即释放抗体。

[0255] 药学上可接受的运载体的全面讨论在Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472中可获得。

[0256] 本发明的药物组合物通常具有在5.8到8.5之间的pH, 在一些实施方式中, 其可以在6到8之间, 并且在其它实施方式中, 大约7。pH可以通过使用缓冲剂来维持。组合物可以是无菌的和/或无致热源的。相对于人, 组合物可以是等渗的。在一个实施方式中, 本发明的药物组合物在密闭容器中供应。

[0257] 在本发明的范围内的是以几种施用形式存在的组合物; 这些形式包括但不限于适合于肠胃外施用的那些形式, 例如, 通过注射或输注, 例如通过快速浓注或连续输注。在产品用于注射或输注的情况下, 其可以采取在油性或水性媒介中的悬浮液、溶液或乳液的形式, 并且其可以包含配方剂 (formulatory agent), 比如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。可选地, 抗体分子可以是干燥形式, 在使用之前利用适合的无菌液体重构。媒介通常被理解为如此材料: 其适合于储存、运输和/或施用化合物, 比如药学活性化合物, 具体而言根据本发明的抗体。例如, 媒介可以是生理学上可接受的液体, 其适合于储存、运输和/或施用药学上活性化合物, 具体而言根据本发明的抗体。一旦被配制, 本发明的组合物可以直接地被施用至对象。在一个实施方式中, 组合物适合于施用至哺乳动物, 例如人对象。

[0258] 本发明的药物组合物可以通过许多途径施用, 其包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮 (transdermal)、经皮 (transcutaneous)、外用、皮下、鼻内、肠内、舌下、阴道内或直肠途径。无针注射器 (hypospray) 也可以被用于施用本发明的药物组合物。优选地, 药物组合物可以被制备为用于口服施用, 例如作为片剂、胶囊等, 用于外用施用, 或者作为可注射剂, 例如作为液体溶液或悬浮液, 其中特别优选的是药物组合物是可注射剂。在注射之前适合于溶解在液体媒介或者悬浮在液体媒介中的固体形式也是优选的, 例如药物组合物处于冻干形式。

[0259] 对于注射, 例如静脉内、皮肤或皮下注射, 或者在痛苦部位处的注射, 活性成分将优选地是肠胃外可接受的水溶液的形式, 其是无热原的并且具有适合的pH、等渗性和稳定性。本领域技术人员能够熟练地使用, 例如, 等渗媒介比如氯化钠注射液、林格液、乳酸盐林格注射液制备适合的溶液。可以根据需要包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。无论其是多肽、肽或者核酸分子、将给予个体的根据本发明的其它药学上有用的化合物, 施用优选地是以“预防上有效量”或“治疗上有效量” (根据具体情况), 这足以显示对个体有益。施用的实际量、和施用的速度和时间进程将取决于正在治疗的性质和严重程度。对于注射, 根据本发明的药物组合物可以例如在预装注射器中提供。

[0260] 如上面所限定的发明性药物组合物也可以以任何口服可接受的剂型被口服施用, 包括但不限于胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。在用于口服使用的片剂的情况下, 通常使用的运载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂比如硬脂酸镁也通常被添加。对于以胶囊形式的口服施用, 有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水性悬浮液对于口服使用需要时, 活性成分, 即如上面所限定的发明性转运蛋白货物缀合物分子 (transporter cargo conjugate molecule), 与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要, 也可以添加某些甜味剂、增味剂或着色剂。

[0261] 发明性药物组合物也可以被外用施用, 尤其是当治疗的靶标包括通过外用施加易接近的区域或器官, 例如包括皮肤的疾病或任何其它易接近的上皮组织的疾病。适合的外

用制剂容易地被制备用于这些区域或器官中的每个。对于外用应用,发明性药物组合物可以以适合的药膏配制,该药膏包含发明性药物组合物,特别是如上面所限定的其成分,悬浮或溶解在一种或多种运载体中。用于外用施用的运载体包括但不限于矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可选地,发明性药物组合物可以以适合的洗液或霜剂配制。在本发明的背景下,适合的运载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二醇、苯醇和水。

[0262] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案,其中在本发明的背景下,多剂量方案是优选的。已知的基于抗体的药物,具体地基于抗HBV的药物,例如Hepatect[®] CP,关于施用频率具体地对于不同适应症提供了指导,例如,药物是否应当每日、每周、每月等递送。频率和剂量也可以取决于症状的严重程度。

[0263] 例如,根据本发明的药物组合物可以每日施用,例如每天一次或几次,例如每天一次、两次、三次或四次,优选地每天一次或两次,更优选地每天一次,持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21或更多天,例如每日持续1、2、3、4、5、6个月。优选地,根据本发明的药物组合物可以每周施用,例如每周一次或两次,持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21或更多周,例如每周持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或者每周持续2、3、4或5年。而且,根据本发明的药物组合物可以优选地每月施用,例如每月一次,或者更优选地,每两个月一次持续1、2、3、4或5或更多年。施用的优选端点是达到血清转变时,优选地治疗的端点是伴随血清转化为抗HBV抗体的来自血清的HBsAg的持久消失。还优选的是施用持续终身。此外,还设想仅单次施用,具体地相对于某些适应症,例如用于在非免疫对象中遭受意外暴露的情况下预防乙型肝炎。

[0264] 具体而言,优选的是对于单一剂量,例如每日、每周或每月剂量,优选地对于每周剂量,根据本发明的药物组合物中抗体或其抗原结合片段的量不超过1g,优选地不超过500mg,更优选地不超过250mg,甚至更优选地不超过100mg,和特别优选地不超过50mg。

[0265] 药物组合物通常包括“有效”量的本发明的一种或多种抗体,即足以治疗、改善、减轻或预防期望疾病或病症,或足以展现可检测的治疗效果的量。治疗效果也包括致病效力和身体症状的降低或减轻。任何具体对象的精确有效量将取决于它们的尺寸、重量和健康、病症的性质和程度、以及选择用于施用的治疗剂或治疗剂的组合。对于给定情形,有效量由常规实验确定并且在临床医师的判断内。出于本发明的目的,相对于其被施用至的个体的体重(例如,以Kg计),有效剂量通常是从大约0.005到大约100mg/kg、优选地从大约0.0075到大约50mg/kg、更优选地从大约0.01到大约10mg/kg、和甚至更优选地从大约0.02到大约5mg/kg的本发明的抗体(例如药物组合物中抗体的量)。

[0266] 例如,在肝脏移植的背景下,例如由于乙型肝炎引发的肝功能衰竭,在根据本发明的药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的量可以优选地不超过50mg,更优选地不多于10mg——对于移植那天的单次剂量,然后手术前后不多于10-50mg,优选地不多于2-10mg/天持续七天,并且不多于10-50mg,优选地不多于2-10mg/单次剂量,每1-3月被施用以维持抗HB血清水平为大约100IU/L。

[0267] 对于慢性乙型肝炎的治疗,例如,根据本发明的抗体或其抗原结合片段或药物组合物优选地皮下施用,以根据本发明的抗体的上至500mg,优选地上至250mg,更优选地上

至100mg的单次剂量。这样的单次剂量可以如上面所描述的每日、每周或每月施用。

[0268] 而且,根据本发明的药物组合物也可以包括额外的活性成分,其可以是进一步抗体或不是抗体的成分。额外的活性成分优选地选自聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂 (checkpoint inhibitor)。优选的聚合酶抑制剂包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。聚合酶抑制剂抑制DNA正链的反转录和合成。聚合酶抑制剂不阻止病毒传播、cccDNA的形成并且不影响HBsAg释放。干扰素包括IFN α 和IFN β ,其中IFN β 是优选的。优选的检查点抑制剂涉及PD-1/PD-L1和/或CTLA4的阻断,并且因而包括抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体和抗-CTLA4抗体。根据本发明的药物组合物可以包括一种或多种额外的活性成分。

[0269] 根据本发明的抗体或抗原结合片段可以与额外的活性成分存在于同一药物组合物中,或者优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段由第一药物组合物包括并且额外的活性成分由与第一药物组合物不同的第二药物组合物包括。因此,如果设想多于一种额外的活性成分,则每种额外的活性成分和根据本发明的抗体或抗原结合片段优选地由不同的药物组合物包括。这些不同的药物组合物可以组合/同时施用或者在不同时间或在不同位置(例如身体的不同部分)施用。

[0270] 优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段以及额外的活性成分提供叠加的治疗效果,或优选地,协同治疗效果。术语“协同”被用于描述两种或更多种活性药剂的组合效果,其比每种各自活性药剂的单独效果的总和更强。因而,在两种或更多种药剂的组合效果导致活性或过程的“协同抑制”的情况下,意图是活性或过程的抑制比每种各自活性药剂的抑制效果的总和更强。术语“协同治疗效果”指的是利用两种或更多种疗法的组合观察到的治疗效果,其中该治疗效果(如通过许多参数中的任一种测量的)比利用各自单独疗法观察到的单独治疗效果的总和更强。

[0271] 包括根据gHCB34的抗体和其抗原结合片段,和药学上可接受的运载体的药物组合物是优选的。

[0272] 在一个实施方式中,本发明的组合物可以包括本发明的抗体,其中抗体可以占按组合物中的总蛋白质的重量计至少50% (例如,60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)。在这样的组合物中,抗体优选地是纯化形式。

[0273] 本发明还提供了制备药物组合物的方法,其包括如下步骤:(i)制备本发明的抗体;和(ii)将纯化的抗体与一种或多种药学上可接受的运载体进行掺合。

[0274] 在另一实施方式中,制备药物组合物的方法包括如下步骤:将抗体与一种或多种药学上可接受的运载体进行掺合,其中抗体是从本发明的转化的B细胞或培养的浆细胞获得的单克隆抗体。

[0275] 作为出于治疗目的递送抗体或B细胞的替代方案,可能的是递送编码衍生自B细胞或培养的浆细胞的感兴趣的单克隆抗体(或其活性片段)的核酸(通常地DNA)至对象,使得核酸可以在对象中原位表达以提供期望的治疗效果。适合的基因疗法和核酸递送载体是本领域中已知的。

[0276] 组合物可以包括抗菌剂,特别是如果以多剂量形式包装时。它们可以包括清洁剂,例如吐温(聚山梨醇酯),比如吐温80。清洁剂通常以低水平存在,例如,低于0.01%。组合物也可以包括钠盐(氯化钠)以给予张度。例如,10 \pm 2mg/ml NaCl的浓度是典型的。

[0277] 进一步, 药物组合物可以包括例如大约15-30mg/ml (例如, 25mg/ml) 的糖醇 (例如, 甘露醇) 或二糖 (例如, 蔗糖或海藻糖), 特别是如果它们将被冻干或者如果它们包括已经由冻干材料重构的材料。用于冻干的组合物的pH在冻干之前可以调节至5和8之间, 或5.5 和7之间, 或者大约6.1。

[0278] 本发明的组合物也可以包括一种或多种免疫调节剂。在一个实施方式中, 一种或多种 免疫调节剂包括佐剂。

[0279] 医学治疗和用途

[0280] 在进一步方面, 本发明提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在 (i) 预防、治疗或 减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎; 或在 (ii) 诊断乙型肝炎和/或丁型肝炎中的用途。

[0281] 在本发明的范围内的是抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞或药物组合物的几 种施用形式和途径, 如上面关于药物组合物描述的。这在本文描述的抗体或其抗原结合片 段、核酸、载体和细胞的用途的背景下具体而言关于优选的施用形式和途径也适用。

[0282] 诊断方法可以包括将抗体或抗体片段与样品接触。这样的样品可以分离自对象, 例如 分离的组织样品, 其取自例如鼻道、鼻窦 (sinus cavity)、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾脏、耳 朵、眼睛、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液, 优选 地血清。诊断方法也可以包括抗原/抗体络合物的检测, 具体地在将抗体或抗体片段与样品 接触之后。这样的检测步骤通常在试验台进行, 即不与人或动物体进行任何接触。检测方 法的实例对于本领域技术人员是熟知的并且包括例如ELISA (酶联免疫吸附测定)。

[0283] 本发明还提供了 (i) 根据本发明的抗体、抗体片段或其变体和衍生物, (ii) 根据本 发明的 无限增殖化B细胞克隆, (iii) 根据本发明的核酸或载体, 或 (iv) 本发明的药物组合物在 (a) 制造用于预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎的药物中的或用于 (b) 诊断乙 型肝炎和/ 或丁型肝炎的用途。

[0284] 本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发 明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用作药物, 具体地用于预防 或治 疗乙型肝炎和/或丁型肝炎。其还提供了本发明的抗体在制造用于治疗对象和/或在 对象中 诊断的药物中的用途。其还提供了用于治疗对象的方法, 包括给对象施用本发明的 组合物 的步骤。在一些实施方式中, 对象可以是人。检查治疗处理的效率的一种方式包括 在施用 本发明的组合物之后监测疾病症状。治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

[0285] 在一个实施方式中, 根据本发明的抗体、抗体片段、无限增殖化B细胞克隆或药物组 合物被施用至需要这样的治疗的对象。这样的对象包括但不限于特别是处于乙型肝炎 和/ 或丁型肝炎风险下或易感乙型肝炎和/或丁型肝炎的对象。

[0286] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段也可以被用在诊断乙型肝炎和/或丁型肝炎 的试 剂盒中。进一步, HBsAg的抗原环区中的表位——其能够结合如本文所描述的本发明 的抗 体, 可以被用在用于通过检测保护性抗HBV抗体的存在或测定保护性抗HBV抗体的效 价 来监测应用程序的效率的试剂盒中。

[0287] 优选地, 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的 载 体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用在治疗或减轻慢性乙型肝炎中。

[0288] 有趣地, 根据本发明的抗体 (i) 强力地中和HBV感染, (ii) 结合至L-HBsAg (大HBV包

膜蛋白,其存在于感染性HBV颗粒中),从而阻止HBV的传播,(iii)结合至S-HBsAg,从而促进亚病毒颗粒(SVP)的清除,和(iv)可以诱导血清转化,即对病毒的主动免疫应答。

[0289] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于在肝脏移植之后预防乙型肝炎(再)感染,具体地用于乙型肝炎引发的肝功能衰竭。

[0290] 为了这个目的,优选地,可以在移植的那天给接受肝脏移植的患者施用高剂量并且在手术前后给予每日剂量持续大约1周。其后,优选地,每1-3月可以给予进一步剂量以维持抗HBV抗体血清水平高于100IU/ml。

[0291] 在另一优选的实施方式中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于在非免疫对象中阻止/预防乙型肝炎。这例如在(假设的)意外暴露于HBV的情况下(暴露后预防)。术语“非免疫对象”包括如此对象:其从未接受疫苗接种并且因而未被免疫,和如此对象:其在疫苗接种之后未显示免疫应答(没有可测量的抗乙型肝炎抗体)。具体而言,在后者组中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于(连续的)预防乙型肝炎,即与“暴露后预防”相比,(连续的)预防对于这样的对象是优选的,其在疫苗接种之后没有显示免疫应答(没有可测量的抗乙型肝炎抗体)并且对于其连续预防是必需的。

[0292] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于在血液透析患者中预防乙型肝炎。

[0293] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于在新生儿中预防乙型肝炎。因此,具体而言,乙型肝炎病毒携带者-母亲/非免疫母亲的新生儿是优选的。而且,优选的是根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在出生时被施用或者在出生后尽快被施用。优选地,可以重复施用直到疫苗接种后的血清转化。

[0294] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物被用于治疗或减轻丁型肝炎,优选地乙型肝炎和丁型肝炎,其具体地是乙型肝炎和丁型肝炎共患症(comorbidity)。有趣地,根据本发明的抗体不仅强力地中和乙型肝炎病毒,而且强力地中和丁型肝炎病毒。因此,根据本发明的抗体可以提供丁型肝炎的第一治疗。

[0295] 组合疗法

[0296] 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在根据本发明的方法和用途中的施用可以单独实施或与可用于治疗和/或稳定待治疗或抑制的疾病或紊乱的助剂(co-agent)(其在本文中还被称作“额外的活性成分”)组合实施。

[0297] 本发明包括根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的施用,其中在可用于治疗和/或预防乙型肝炎的其它治疗方案或助剂之前、同时或随后,其被施用至对象。与所述助剂

同时施用的所述抗体、核酸、载体、细胞或药物组合物可以在相同或不同组合物(一种或多种)中并且通过相同或不同的施用途径(一种或多种)施用。

[0298] 所述其它治疗方案或助剂可以选自聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂。

[0299] 因而,在本发明的另一方面中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物与用于上面描述的(医疗)用途的聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂组合施用。

[0300] 优选的聚合酶抑制剂包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。拉米夫定是最优选的聚合酶抑制剂。聚合酶抑制剂抑制DNA正链的反转录和合成。聚合酶抑制剂不阻止病毒传播、cccDNA的形成并且不影响HBsAg释放。

[0301] 干扰素包括IFN α 和IFN β ,其中IFN β 是优选的。

[0302] 优选的检查点抑制剂涉及PD-1/PD-L1和/或CTLA4的阻断,并且因而包括抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体和抗-CTLA4抗体。因而,根据本发明的药物组合物可以包括一种或多种额外的活性成分。

[0303] 与根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物组合施用的进一步优选的助剂(额外的活性成分)包括LT β R激动剂。

[0304] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物与聚合酶抑制剂组合施用。对于这样的组合在预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎中的用途,这特别适用。在该背景下,优选的聚合酶抑制剂包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。最优选的聚合酶抑制剂是拉米夫定。

[0305] 优选地,抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞或药物组合物经由与聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂相同或不同的施用途径施用。

[0306] 在进一步方面,本发明因而还提供了下列的组合:

[0307] (i) 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物;和

[0308] (ii) 聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂。

[0309] 这样的组合优选地被用于预防、治疗或减轻乙型肝炎和/或丁型肝炎,具体地被用于治疗或减轻慢性乙型肝炎和/或慢性丁型肝炎。更优选地,该组合被用于HBV单独感染的患者或HBV/HDV共同感染的患者。

[0310] 这样的组合优选地加速HBsAg清除。

[0311] 鉴于其,本发明还提供了包括下列的试剂盒:

[0312] (i) 根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物;和

[0313] (ii) 聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂。

[0314] 另外地,试剂盒可以包括用于施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物的工具,比如注射器或容器和/或小叶,例如具有使用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物和/或

聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂的使用说明。

[0315] 根据本发明的抗体或抗原结合片段可以与额外的活性成分(助剂)存在于同一药物组合物中,或者优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段由第一药物组合物包括并且额外的活性成分(助剂)由与第一药物组合物不同的第二药物组合物包括。因此,如果设想多于一种额外的活性成分(助剂),则每种额外的活性成分(助剂)和根据本发明的抗体或抗原结合片段优选地由不同的药物组合物包括。这样的不同的药物组合物可以组合/同时施用或者在不同时间或在不 同位置(例如身体的不同部分)施用。

[0316] 优选地,根据本发明的抗体或抗原结合片段以及额外的活性成分(助剂)提供叠加的治疗效果,或优选地协同治疗效果。如上面所描述的,术语“协同”被用于描述两种或更多种活性药剂的组合效果,其比每种各自活性药剂的单独效果的总和更强。因而,在两种或更多种药剂的组合效果导致活性或过程的“协同抑制”的情况下,意图是活性或过程的抑制比每种各自活性药剂的抑制效果的总和更强。术语“协同治疗效果”指的是利用两种或更多种疗法的组合观察到的治疗效果,其中该治疗效果(如通过许多参数中的任一种测量的)比利用各自单独疗法观察到的单独治疗效果的总和更强。

[0317] 用途和方法

[0318] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物用于通过检查抗乙型肝炎或抗丁型肝炎疫苗的抗原包含正确构象的特定表位来监测所述疫苗的质量的用途。

[0319] 而且,本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在诊断乙型肝炎和/或丁型肝炎中的用途。

[0320] 另外地,还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物在确定分离的血液样品是否感染有乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒中的用途。

[0321] 如上面所描述,诊断方法可以包括将抗体或抗体片段与样品接触。这样的样品可以分离自对象,例如分离的组织样品,其取自例如鼻道、鼻窦、唾液腺、肺、肝、胰腺、肾脏、耳朵、眼睛、胎盘、消化道、心脏、卵巢、垂体、肾上腺、甲状腺、脑、皮肤或血液,优选地血清。诊断方法也可以包括抗原/抗体络合物的检测,具体地在将抗体或抗体片段与样品接触之后。这样的检测步骤通常在试验台进行,即不与人或动物体进行任何接触。检测方法的实例对于本领域技术人员是熟知的并且包括例如ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0322] 本发明还提供了预防和/或治疗对象中的乙型肝炎和/或丁型肝炎的方法,其中该方法包括给有需要的对象施用根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物。

[0323] 本发明还提供了治疗已经接受肝脏移植的对象的方法,其包括给已经接受肝脏移植的对象施用治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物。

[0324] 在上述方法中,遭受慢性乙型肝炎的对象是优选的。

[0325] 而且,对于在此描述的方法,前面描述的细节,具体地在药物组合物和医疗用途的

背景下,也适用。例如,在上面描述的方法中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段、根据本发明的核酸、根据本发明的载体、根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物优选地与如本文描述的聚合酶抑制剂、干扰素和/或检查点抑制剂组合施用。

附图说明

[0326] 在下文,将给出附图的简单描述。这些附图意欲更详细地图解说明本发明。但是它们不意欲以任何方式限制本发明的主题。

[0327] 图1示出了实施例1:如通过ELISA测量的HBC34单克隆抗体与三种不同HBsAg血清型(adw、ady和ayw)的结合。

[0328] 图2示出了实施例2:不同抗HB抗体,即HBV免疫球蛋白(HBIG)——HBC34,和针对前S1(18/7)或HBsAg的进一步单克隆抗体在体外中和HepaRG细胞的HBV感染的能力。除了HBIG之外,每种抗体在三种不同浓度下测试,即5 μ g/ml、0.5 μ g/ml和0.05 μ g/ml,HBIG在5000 μ g/ml、500 μ g/ml和50 μ g/ml下测试。

[0329] 图3示出了实施例2:在存在三种不同浓度(5 μ g/ml、0.5 μ g/ml或0.05 μ g/ml)的HBC34单克隆抗体的情况下在感染的HepaRG细胞中HBcAg的染色,以及作为参比的核染色。

[0330] 图4示出了实施例2:不同浓度的HBC34对感染性HDV的中和活性。在0.12 μ g/ml HBC34的浓度下,不可检测到HDV阳性细胞,这表明HDV的强力中和。相比之下HBIG不中和HDV(以1:1000稀释测试,即50 μ g/ml)。

[0331] 图5示出了实施例3:10种HBV基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的HBsAg的抗原环的氨基酸序列。这些序列包括由HBC34抗体识别的表位(以灰色强调)。顶部的序列(HBV-DJ02203)被用于设计实施例5、图7中的肽文库。

[0332] 图6示出了实施例3:如通过细胞荧光分析测定的,人单克隆抗体HBC34和对照抗体(都在5 μ g/ml下)与瞬时地转染有表达如在图中指出的不同HBsAg基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的质粒的通透性Hep2细胞的结合。

[0333] 图7示出了实施例4:测试的19种HBsAg突变体的抗原环的氨基酸序列。带圆圈的为HBsAg突变体的残基,其较弱地(虚线圆)或不被HBC34抗体结合。

[0334] 图8示出了实施例4:人单克隆抗体HBC34和两种其它HBsAg特异性抗体(Ab5和Ab6)——都在5 μ g/ml下测试——在转染有表达如在图中指出的不同HBsAg基因型D突变体的质粒的Hep2细胞上的结合(“WT”:HBsAg基因型D,Genbank登录号FJ899792)。

[0335] 图9示出了实施例5:HBC34与如使用肽扫描技术测定的650个线性和环状肽的文库的结合以及由HBC34结合的四种肽的序列。标明为1的残基是半胱氨酸,其被引入以允许化学连接至支架从而重建构象表位。如果除了新引入的半胱氨酸之外的其它半胱氨酸残基存在,则它们被丙氨酸替代(加下划线的丙氨酸残基)。

[0336] 图10示出了实施例5:在还原条件下HBV病毒颗粒上Ab4和HBC34的蛋白质印迹染色。Ab4是比较抗体,其针对抗原环也是反应性的。

[0337] 图11示出了实施例6:接种有 5×10^7 份拷贝的HBV基因组等价物(基因型D)的人源化uPA/SCID小鼠中HBV病毒血症的水平,该小鼠从感染后三周接受利用HBC34(以1 mg/kg,每周两次i.p.施用)、对照抗体(对照AB)或恩替卡韦(ETV;以1 μ g/ml口服施用)的处理持续6周。在HBV感染的传播阶段(第3周至第6周p.i.(感染后)),病毒血症在接受对照抗体的组

中增加>2log,而HBV效价在利用HBC34或恩替卡韦治疗的小鼠中降低。

[0338] 图12示出了实施例6:在实验的终点(第9周)实施例6的小鼠中HBsAg的存在(肝内(intrahepatic)分析)的肝细胞染色。在接受对照抗体的小鼠中几乎所有肝细胞染色HBsAg 阳性,而传播通过利用恩替卡韦的治疗和利用HBC34的治疗二者有效地阻断(大约1-5% HBsAg阳性细胞)。

[0339] 图13示出了实施例6:cccDNA测量,其在HBV感染后3周处死的小鼠(“3周hcv”;即不治疗)与从感染后第3周至第9周利用HBC34或恩替卡韦治疗的小鼠之间没有显著地差异。相比之下,当在感染后9周被处死时,cccDNA/细胞的估计量在接受对照抗体的组中增加了上至2log。

[0340] 图14示出了实施例6:在基线(BL)、治疗第3周(感染后第6周)和治疗第6周(感染后第9周)处的循环HBsAg的水平。循环HBsAg的水平在接受HBC34的小鼠中降低>1log(并且低于检测限),但是在利用恩替卡韦治疗的小鼠中没有降低,而在对照组中HBsAg水平增加>2log(达到5000-10000IU/ml的水平)。

[0341] 图15示出了实施例7:在基线(BL)、治疗第3周(感染后第15周,“第3周”)和治疗第6周(感染后第18周,“第6周”)处在慢性乙型肝炎环境(setting)中的HBV效价(左图)和循环HBsAg的水平(右图)。HBV效价和循环HBsAg的水平在接受HBC34的小鼠中在治疗的第3周和第6周处降低。单独曲线代表单独动物。对照抗体:虚线,HBC34:实线。

[0342] 图16示出了实施例8:在种群恢复有原代人肝细胞并且共感染有包含HDV-RNA和HBV-DNA的患者源血清的uPA/SCID小鼠中的HBV效价(左图)和HDV效价(右图)。在感染后5周,开始利用HBC34或对照抗体(“对照”)的治疗。在基线(第3周,第5周BL)处、在治疗第3周(感染后第8周-“第8周”)处和在治疗第6周(感染后第11周-“第11周”)处示出HBV效价(左图)和HDV效价(右图)。单独曲线代表单独动物。对照抗体:虚线,HBC34:实线。

[0343] 图17(第1部分)示出了实施例9:HBV-s-抗原的抗原环的示意图,HBC34的表位以灰色强调。为了绘制HBC34的表位,如使用肽扫描技术测定的测试1520种不同表位的文库。图17(第2-5部分)示出了实施例9:HBC34与16组不同的肽结合的量级(ELISA强度)。HBC34正结合至构象表位,如通过结合至组13-16的肽和结合至组9-12的肽所证明的,组13-16的肽由组合的CLIPS构建体组成,其代表不连续表位的两个部分(第2部分),和组9-12的肽由环状肽组成(第3部分)。利用线性肽1-4(第4部分)和5-8(第5部分)的组没有观察到HBC34的结合,这进一步支持了如下观点:HBC34结合至不连续构象表位。

[0344] 图18示出了实施例9:HBC34与由812个不连续的或环状的T3CLIPS肽组成的肽文库的结合。为了微调图17中描述的表位作图,基于前面的组(图17)通过全置换分析的方式生成3组肽(被称为RN1、RN2和RN3)。图18示出了HBC34与组1-3的结合,在组1-3中加框位置处的残基被置换为选自系列AEFGHKLPQRSVY_的13种氨基酸中的一种,其中“_”代表残基缺失。在变换位置处的原始残基在每幅图的左侧上以及(i)在水平加框序列中(当原始氨基酸是变换系列的一部分时)或(ii)在序列下面(当原始氨基酸不是变换系列的一部分时)指示。

[0345] 图19示出了实施例10:在接种有 2×10^9 份拷贝的HBV基因组等价物(基因型D)的人源化uPA/SCID小鼠中,HBC34(1mg/kg i.p每周两次)和拉米夫定(在饮用水中以0.4mg/ml补充)的组合疗法在降低HBV病毒血症(图A)和循环HBV-s-抗原(图B)的水平中的作用,该

小鼠从感染后8周开始接受持续4周的利用对照抗体(对照)、单独的HBC34 (HBC34)、单独的拉米夫定(拉米夫定)或组合治疗(HBC34和拉米夫定)的治疗。组合疗法与单独的任一药物相比引起更高的病毒血症的降低。

[0346] 图20示出了实施例11和12:生成的两组VH(图A)和VL(图B)序列的比对,以获得抗体变体1-32.CDR(根据IMGT限定)以灰色强调。

[0347] 图21示出了实施例11:18种工程化HBC34变体(通过结合如在第2和第3列中指出的突变的VH和VL序列获得的)与HBsAg(adw亚型)的结合,如通过ELISA测定的。在第4列中,结合的失去利用“-”指示,强烈降低的结合利用“+/-”指示,降低的结合利用“+/~”指示,类似于或等于原始抗体的结合利用“+”指示。

[0348] 图22示出了实施例11:HBC34的8种不同的工程化变体与HBsAg(adw)的结合,如在直接的基于抗原的ELISA测定中测定的。在图21中描述的18种HBC34突变体中选择这8种变体;为了更好的表征对HBsAg的亲合力,滴定8种抗体并与亲本抗体序列比较。

[0349] 图23示出了实施例11:在图22中描述的8种抗体的特征的总结。通过使用Graphpad prism拟合图22中的曲线测定EC50。通过在含有8种变体中的每种以及亲本抗体的293 Expi细胞的300ml转染的上清液中(ELISA)定量分泌的IgG测定生产力。

[0350] 图24示出了实施例11和12:总结15种变体的特征的表,在其中为12种额外的HBC34的工程化变体,基于前述组的结果通过在框架中引入额外突变设计(图A)。通过在基于抗原的ELISA测定中滴定抗体获得结合曲线并且通过利用Graphpad prism拟合曲线计算EC50。基于在含有15种变体中每种和亲本抗体的293Expi细胞的30ml转染的上清液中分泌的IgG的定量计算生产力。标绘倍数改变并且在图B中示出。

[0351] 图25示出了实施例11和12:如通过细胞荧光分析测定的,HBC34和变体6、7、19、23和24的结合。所有抗体从5 μ g/ml开始滴定并且结合至瞬时地转染有表达不同HBsAg基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的质粒的通透性Hep2细胞。

实施例

[0352] 在下文中,呈现了阐明本发明的不同实施方式和方面的具体实施例。但是,本发明的范围不应当由在本文中描述的特定实施方式限制。给出了下面的制备和实施例以使得本领域技术人员能够更清楚地理解和实践本发明。但是,本发明的范围不被示例性实施方式限制,其仅意欲阐明本发明的单一方面,并且功能上等价的方法在本发明的范围内。事实上,除了本文描述的那些之外,本发明的各种修改根据上文描述、附图和下面的实施例对于本领域技术人员而言将变得显而易见。所有这些修改落入所附权利要求书的范围内。

[0353] 实施例1:鉴定和表征人单克隆抗体HBC34

[0354] 以与在Traggiai E.et al.,2004,Nat Med 10(8):871-5中描述的类似方式从人患者分离人单克隆抗体。通过测定抗体的可变区(表2和3)和其中的互补决定区(CDR)的核苷酸和氨基酸序列表征抗体并且将其称为“HBC34”。因此,HBC34是具有如在上面的表2和3中示出的CDR、VH和VL序列的IgG1型全人单克隆抗体。

[0355] 接着,测定三种HBsAg血清型adw、ady和ayw的哪一种与人单克隆抗体HBC34结合。有趣地,HBC34以高亲合力结合至三种HBsAg血清型(adw、ady和ayw),并且具有相似的和低的EC50值,如通过ELISA测量的(图1)。

[0356] HBV抗体的保护效价以使得对于不同试验标准化的国际单位(IU)表达。在1977年,建立了抗HB免疫球蛋白(W1042)的国际参比制品。在该标准品的制备中使用的血浆源自已经自然地感染乙型肝炎病毒的个体(Barker, L.F., D.Lorenz, S.C.Rastogi, J.S.Finlayson, and E.B.Seligmann.1977.Study of a proposed international reference preparation for antihepatitis B immunoglobulin.WHO Expert Committee on Biological Standardization technical report series.WHO Expert Committee on Biological Standardisation 29th Report BS 77.1 164.Geneva,Switzerland,World Health Organization,1977;World Health Organization: Anti-hepatitis B immunoglobulin.WHO Tech Rep Ser 1978;626:18)。如利用免疫测定诊断地测量(Abbott Architect诊断免疫测定)的,HBC34的活性为5000IU/mg。作为比较,HBIG 的活性为~1IU/mg。

[0357] 实施例2:抗体HBC34强力地中和感染性HBV和HDV

[0358] 实施例2的第一目标是测定HBC34是否中和感染性HBV并且将HBC34的中和活性与其它抗HB抗体的中和活性比较。为此,在存在或不存在抗体(HBC34、18/7、Ab2、Ab3 和HBIG)的情况下在补充有4%PEG 8000 (Sigma-Aldrich)的培养基中在37℃下持续16小时利用固定量的HBV温育分化的HepaRG细胞。在温育的终点,洗涤并进一步培养细胞。每3天更换培养基。通过在酶联免疫吸附测定(ELISA)中测量在感染后的第7天至第11天分泌入培养上清液的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)的水平和通过在免疫荧光测定中检测HBcAg染色来检测感染。

[0359] 如在图2和3中所示出的,当在5和0.5μg/ml下测试时,HBC34完全地中和HBV感染,而也结合至HBsAg的比较人单克隆抗HB抗体Ab2和Ab3不导致完全中和。这表示不是所有的结合至HBsAg的抗体都能够中和HBV感染(例如,Ab2和Ab3)。值得注意的是,仅当在5000和500μg/ml下测试时,HBIG中和HBV感染,即以与HBC34相比低1000倍的效力。18/7是针对HBsAg的前-S1区的鼠科单克隆抗体。

[0360] 实施例2的第二目标是测定分化的HepaRg上HBC34针对HDV的中和活性。来自HDV携带者的血清被用作HDV感染接种物。丁型抗原免疫荧光染色被用作示值读数。如在图4中示出的,当在0.12μg/ml下测试时,HBC34完全地阻断HDV感染。作为比较,HBIG 也被测试并且是无效的(在1/1000,即50μg/ml下测试)。

[0361] 实施例3:抗体HBC34识别所有的10种HBV基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J

[0362] 通过流式细胞术分析测试HBC34识别10种HBV基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J(如在图5中示出的)的能力。具体而言,人上皮细胞(Hep2细胞)转染有表达10种HBV基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J(如在图5中示出的)的HBsAg中每种质粒。人单克隆抗体HBC34(5μg/ml)和对照抗体(5μg/ml)被用于染色瞬时地转染的通透性细胞。转染后两天,Hep2细胞被收集、固定并且利用皂苷通透以便利用HBC34或对照Ab进行免疫染色。使用具有FlowJo软件(TreeStar)的Becton Dickinson FACSCanto2(BD Biosciences)分析抗体与转染的细胞的结合。如在图6中所示出的,HBC34识别所有10种HBV HBsAg基因型,具有类似的染色图案。

[0363] 实施例4:抗体HBC34识别所有功能性HBsAg突变体

[0364] 通过流式细胞术分析测试HBC34结合至19种不同的HBsAg基因型D突变体(基于

HBsAg基因型D, Genbank登录号FJ899792, 如图7中所示出的) 的能力: HBsAg Y100C/P120T、HBsAg P120T、HBsAg P120T/S143L、HBsAg C121S、HBsAg R122D、HBsAg R122I、HBsAg T123N、HBsAg T123N/C124R、HBsAg Q129H、HBsAg Q129L、HBsAg M133H、HBsAg M133L、HBsAg M133T、HBsAg K141E、HBsAg P142S、HBsAg S143K、HBsAg D144A、HBsAg G145R和HBsAg N146A (对于这些突变体的抗原环区的氨基酸序列参见SEQ ID NO: 16-33)。具体而言, 人上皮细胞 (Hep2细胞) 转染有表达不同HBsAg 突变体的质粒并且如在实施例3中进行分析。5 μ g/ml的人单克隆抗体HBC34和两种其它 HBsAg特异性抗体 (Ab5和Ab6) 被用于测试HBC34与转染的Hep2细胞的结合。

[0365] 如在图8中所示出的, 发现HBC34结合至19种HBsAg突变体中的18种。HBC34 结合, 但是Ab5和Ab6不结合, 仅在突变体HBsAg T123N/C124R中完全地废除, 即在残基123和124二者都突变时。值得注意的是, 这两个残基 (即T123和C124) 突变为丙氨酸 显示为与HBV感染力的失去相关联, 其最可能是由于由C124形成的可以导致抗原环中的 构象改变的二硫桥的失去 (Salisse J. and Sureau C., 2009, Journal of Virology 83:9321-9328)。因而, 人单克隆抗体HBC34结合至18种HBsAg突变体。

[0366] 实施例5: 抗体HBC34结合至抗原环中的保守的构象表位

[0367] 通过使用被设计以覆盖HBsAg的整个抗原环区的650个线性和环状肽的文库 (来自Pepscan, Lelystad, The Netherlands的“CLIPS Discontinuous Epitope Mapping”技术) 鉴定由 HBC34识别的表位。基于标准的Fmoc化学过程合成线性和CLIPS肽。为了重构构象表位, 使用Chemically Linked Peptides on Scaffolds, CLIPS——如在Timmerman et al., 2007, Journal of Molecular Recognition 20:283-99中描述的技术, 在化学支架上合成环状肽。例如, 合成包含两个半胱氨酸的单一环状肽并且环的大小通过以可变间隔引入半胱氨酸残基来 改变。如果除了新引入的半胱氨酸之外存在其它半胱氨酸, 则它们被丙氨酸替代。肽中的 多个半胱氨酸的侧链通过在信用卡格式聚丙烯PEPSCAN卡 (455种肽格式/卡) 上与CLIPS 模板比如1,3-双 (溴甲基) 苯在碳酸氢铵中的0.5mM溶液反应偶联至CLIPS模板。抗体与每 种肽的结合在基于PEPSCAN的ELISA中测试。将包含共价连接的肽的455孔信用卡格式 聚丙烯卡在封闭溶液中利用测试抗体 (以1 μ g/ml) 温育。在洗涤之后, 添加过氧化物酶底物 2,2'-连氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸 (ABTS) 和2 μ l的3% H₂O₂。在一小时后, 利用电荷 耦合器件 (CCD) -摄像机和图像处理系统测量显色。原始数据是光学值并且范围为0至3000 (与标准96孔板ELISA阅读器的1至3类似的log尺度)。

[0368] 如在图9中示出的, 发现HBC34识别具有根据SEQ ID NO 52的氨基酸序列: XGSSTTSTGPCRTCMTXPSDGNATAIPISSWX的双重环状肽, 其中编码为X的残基被置 换为半胱氨酸并且加下划线的残基从C置换为A (SEQ ID NO 52)。

[0369] 识别具有低信号的三种额外的肽:

[0370] (a) 具有根据SEQ ID NO 53的氨基酸序列: TSTGPCRTCMTTAQG (SEQ ID NO 53) 的线性15-mer肽,

[0371] (b) 具有根据SEQ ID NO 54的氨基酸序列: GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT (SEQ ID NO 54) 的另一种线性肽,

[0372] 和(c) 具有根据SEQ ID NO 55的氨基酸序列: XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTCMTTAQGTSX的双重环状肽, 其中编码为X的残基被 置换为半胱氨酸并且加下划线的残基从C置换

为A (SEQ ID NO 55)。

[0373] 该分析表明HBC34的核心表位由构象表位形成,该构象表位由根据SEQ ID NO:56的氨基酸序列:PCRTCMTTAQG (SEQ ID NO 56;HBsAg的S结构域的氨基酸120-130) (HBV-D J02203))形成。

[0374] 而且,如在图10中示出的,人单克隆抗体HBC34在还原条件下在HBV病毒颗粒上在蛋白质印迹中根本不反应。

[0375] 这些结果确认了与HBC34结合的HBsAg的表位是构象表位。

[0376] 这些结果与在实施例4中观察到的结果一致,在实施例4中HBC34结合在存在T123N/C124R突变的情况下失去。

[0377] HBsAg的区——其包括与HBC34结合的构象表位,在不同HBV基因型中是多态的。在HBsAg的表位区的下列一般序列中,在不同基因型中突变的残基以X指示:PCX₁TCX₂X₃X₄AQG (SEQ ID NO:57),

[0378] 其中,X₁优选地是R或K,

[0379] X₂优选地是M或T,

[0380] X₃优选地是T或I,和

[0381] X₄优选地是T、P或L。

[0382] 而且,上述序列与结合人单克隆抗体HBC34的18种HBsAg突变体的额外比较表明了HBC34结合至由根据SEQ ID NO:2的氨基酸序列:X₁X₂X₃TCX₄X₅X₆A X₇G形成的表位,

[0383] 其中,X₁是P、T或S,

[0384] X₂是C或S,

[0385] X₃是R、K、D或I,

[0386] X₄是M或T,

[0387] X₅是T、A或I,

[0388] X₆是T、P或L,和

[0389] X₇是Q、H或L。

[0390] 实施例6:在HBV感染后3周开始施用HBC34阻止在人源化uPA小鼠中的病毒传播

[0391] 实施例6的目标是调查人单克隆抗体HBC34是否能够阻止HBV的传播。换句话说,目标是通过在初次感染建立后治疗小鼠调查进入抑制剂HBC34抗体在体内抑制人肝细胞的感染的能力。为此,使用利用原代人肝细胞种群恢复的幼稚uPA/SCID小鼠(参见Petersen et al.Nature Biotechnology,2008,26:335-341)。通过脾内注射给这些小鼠移植冷冻保藏的人肝细胞。八周后,测定在宿主肝脏中人肝细胞的成功种群恢复,其测量仅地由移植的人肝细胞表达的人血清白蛋白。具有适合的人白蛋白水平的小鼠被i.p.接种 5×10^7 份拷贝的HBV基因组等价物(基因型D,HBeAg阳性)以允许病毒进入。在感染后三周,开始治疗方案,其中小鼠接受HBC34治疗(以1mg/kg,每周两次i.p.施用)、对照抗体或恩替卡韦(ETV;在水中以1 μ g/ml口服施用,Baraclude Solution,Bristol-Myers Squibb)持续6周。在处死时移出的肝脏样本在液氮中迅速冷冻用于免疫荧光分析。

[0392] 使用QiAmp MinElute病毒旋转试剂盒(Qiagen,Hilden,Germany)从血清样品提取HBV DNA.HBV特异性引物和杂交探针被用于测定HBV DNA病毒血症和如前面描述的定量地装载cccDNA(Volz T et al.,Gastroenterology 2007;133:843-852)。使用Master Pure

DNA 纯化试剂盒 (Epicentre, Biozym, Germany) 和 RNeasy RNA 纯化试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 从肝脏样本提取 DNA 和 RNA。使用 β - 球蛋白基因试剂盒 (Roche DNA 对照试剂盒; Roche Diagnostics) 标准化细胞 DNA 含量的肝内 HBV DNA 值。通过从总 HBV DNA 减去 cccDNA 量估算 rcDNA 的水平。使用寡-dT 引物和 Transcriptor 试剂盒 (Roche Applied Science) 反转录并通过使用对总病毒 RNA 特异性的引物定量病毒 RNA 和基因组 RNA。HBV RNA 水平标准化为人特异性 GAPDH RNA。使用由制造商推荐的 Abbott Architect 平台 (定量的 HBsAg 试剂盒, Abbott, Ireland, Diagnostic Division) 执行来自血液样品的 HBsAg 定量。嵌合的小鼠肝脏的冷冻切片使用人特异性细胞角蛋白-18 单克隆抗体 (monoclonal) (Dako, Glostrup, Denmark) 免疫染色以染色人肝细胞。对于 HBV 核心抗原 (HBcAg) 的检测, 使用多克隆兔抗 HBcAg。通过采用 Alexa 标记的二次抗体 (Invitrogen, Darmstadt, Germany) 或 TSA- 荧光素 (HBcAg) 系统 (Perkin Elmer, Jügesheim, Germany) 可视化特异性信号, 同时利用 Hoechst 33342 (Invitrogen) 获得核染色。通过荧光显微镜分析染色的切片。

[0393] 在治疗的开始时 HBV DNA 的中值基线水平为 2×10^6 份 DNA 拷贝/ml。在 HBV 感染的传播阶段 (第 3 周至第 6 周 p.i. (感染后)), 在接受对照抗体的组中病毒血症增加 $>2\log$, 而在利用 HBC34 或恩替卡韦治疗的小鼠中 HBV 效价降低 (图 11)。

[0394] 也在实验的终点 (即第 9 周) 通过染色肝细胞肝内分析小鼠的 HBcAg 的存在。在接受对照抗体的小鼠中几乎所有肝细胞染色 HBcAg 阳性, 而传播通过利用恩替卡韦的治疗和利用 HBC34 的治疗二者有效地阻断 (大约 1-5% HBcAg- 阳性细胞)。这些结果表明 HBC34 可以在 HBV 感染的上升阶段期间有效地阻断病毒传播 (图 12)。

[0395] 与组织学和血清学数据一致, cccDNA 测量显示了肝内 cccDNA 载量在 HBV 感染后 3 周处死的小鼠与从感染后第 3 周至第 9 周治疗的小鼠之间没有显著地差异。相比之下, cccDNA/ 细胞的估算量在感染后 9 周处死的对照组中增加了上至 $2\log$, 这暗示了新形成的 rcDNA 在治疗的小鼠中不能有效地被转化为 cccDNA (图 13)。相同趋势也通过测量其它肝内病毒参数比如松环 DNA (rcDNA) 和 HBV RNA 转录物的水平发现。

[0396] 而且, 在基线 (BL)、治疗第 3 周 (感染后第 6 周) 和治疗第 6 周 (感染后第 9 周) 处测量血液循环 HBsAg 的水平。值得注意的是, 在接受 HBC34 的小鼠中循环 HBsAg 的水平降低 $>1\log$ (并且低于检测限), 但是在利用恩替卡韦治疗的小鼠中没有降低, 而在对照组中 HBsAg 水平增加了 $>2\log$ (达到 5000-10000 IU/ml 的水平) (图 14)。HBsAg 的测量不受如在加标实验 (spike-in experiment) 中测定的 HBC34 抗体存在的影响, 在该实验中添加 HBC34 抗体至 HBsAg 阳性小鼠血清不改变使用 Abbott Architect 诊断免疫测定的预期测量值。

[0397] 这些结果表明 HBC34 可以阻断 HBV 病毒传播并且促进 HBsAg 的清除。

[0398] 实施例 7: 在慢性 HBV 感染的人源化 uPA 小鼠中施用 HBC34 促进 HBV 和 HBsAg 清除

[0399] 为了模拟慢性乙型肝炎环境, 利用 HBV 感染幼稚的人源化 uPA/SCID 小鼠, 并且在感染后 12 周, 达到 2×10^9 份拷贝/ml 的 HBV DNA 的中值水平和 10000 IU/ml 的 HBsAg 的水平。这些水平与在患有慢性 HBV 感染的人患者中通常观察到的水平一样高。

[0400] 其后, 从感染后第 12 周开始利用 HBC34 或利用对照抗体治疗小鼠持续 6 周 (1mg/kg i.p. 每周两次)。如在图 15 中所示出的, HBV 效价和血液循环 HBsAg 的水平在接受 HBC34 持续 3 周 (感染后第 15 周) 和 6 周 (感染后第 18 周) 的小鼠中降低。因而, HBC34 在治疗 6 周后促进 HBV 病毒血症和 HBsAg 水平二者的明显降低。HBeAg 和人白蛋白水平在 HBC34 治疗的小鼠中

没有改变,这表明不存在肝脏毒性。

[0401] 实施例8:施用HBC34在体内阻断HDV感染

[0402] 利用包含HDV-RNA和HBV-DNA的患者源血清共感染幼稚的人源化uPA/SCID小鼠。在感染后五周(当HBV效价达到 10^7 至 10^9 之间的水平,并且HDV RNA达到 10^3 至 10^6 份 拷贝/ml之间的水平时),利用HBC34或对照抗体持续6周治疗小鼠(1mg/kg i.p.每周两次)。

[0403] 如在实施例6和7中描述的,测量HBV DNA病毒血症。经由病毒RNA(使用QiAmp MinElute Virus Spin Kit,Qiagen,Venlo,Netherlands从血清样品提取)的反转录和ABI Viia7 (Applied Biosystems,Carlsbad,USA)上的定量RT-PCR测定HDV病毒血症,定量RT-PCR 使用ABI Fast 1-Step Virus Master(Applied Biosystems,Carlsbad,USA)、HDV特异性引物和 探针。

[0404] 如在图16中示出的,HBC34在治疗后3周和6周(分别地第8和11周)二者有效地阻断HDV病毒传播。与在HBV慢性感染的小鼠中观察到的类似,HBC34促进2log的HBV 病毒DNA效价降低(图13)。

[0405] 实施例9:HBC34不连续表位的精细表位作图

[0406] 为了进一步精制由在实施例5中描述的HBC34抗体识别的表位,生成由16个不同组组成的1520个肽的新文库:

[0407] 一组1(被称为LIN15):衍生自靶序列(SEQ ID NO:5: QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRT CMTTAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSW AFGKFLWEWASARFSW;J02203(D,ayw3))的线性15-mer肽,其具有一个残基 的偏置(offset)。天然的Cys残基被乙酰胺基甲基(还被称为“Acm”;在各自的氨基酸序列中表示为“2”)保护。

[0408] 一组2(被称为LIN22):衍生自靶序列(SEQ ID NO:5: QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRT CMTTAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSW AFGKFLWEWASARFSW;J02203(D,ayw3))的线性22-mer肽,其具有一个残基的 偏置。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0409] 一组3(被称为LIN30):衍生自靶序列(SEQ ID NO:5: QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRT CMTTAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSW AFGKFLWEWASARFSW;J02203(D,ayw3))的线性30-mer肽,其具有一个残基的 偏置。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0410] 一组4(被称为LIN15.AA):组1的肽,但是在位置9和10中的残基被Ala替代。当天然的Ala在任一位置中发生时,其被Gly替代。

[0411] 一组5(被称为LIN22.AA):组2的肽,但是在位置12和13中的残基被Ala替代。当 天然的Ala在任一位置中发生时,其被Gly替代。

[0412] 一组6(被称为LIN30.AA):组3的肽,但是在位置16和17中的残基被Ala替代。当 天然的Ala在任一位置中发生时,其被Gly替代。

[0413] 一组7(被称为CYS.A):长度27的组合肽。在位置1-11和17-27中的线性序列,其 包含成对的Cys残基。这些11-mer序列经由“GGSGG”(SEQ ID NO:79)连接体接 合。不参与二硫桥形成的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0414] 一组8(被称为CYS.B):线性22-mer序列,其包含形成二硫桥的两个Cys。不参与二硫桥形成的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0415] 一组9(被称为L00P12):长度12的约束肽。在位置2-11中的 衍生自HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的10-mer序列。在位置1和12中为Cys残基,其通过mP2CLIPS接合。天然的Cys

残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0416] 一组10(被称为L00P15):长度15的约束肽。在位置2-14中的 衍生自HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的13-mer序列。在位置1和15中为Cys残基,其通过mP2CLIPS接合。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0417] 一组11(被称为L00P21):长度21的约束肽。在位置2-20中的 衍生自HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的19-mer序列。在位置1和21中为Cys残基,其通过mP2CLIPS接合。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0418] 一组12(被称为L00P31):长度31的约束肽。在位置2-30中的 衍生自HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的29-mer序列。在位置1和31中为Cys残基,其通过mP2CLIPS接合。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0419] 一组13(被称为MAT.A):长度25的组合肽。在位置2-12和14-24中的衍生自 HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的11-mer肽。在位置1、13和25中为Cys残基,其 通过T3CLIPS接合。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0420] 一组14(被称为MAT.B):长度28的组合肽。在位置2-12和14-27中的分别为 11-mer和14-mer肽。在位置1、13和28中为Cys残基,其通过T3CLIPS接合。天 然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0421] 一组15(被称为MAT.C):长度28的组合肽。在位置2-15和17-27中的分别为 14-mer和11-mer肽。在位置1、16和28中为Cys残基,其通过T3CLIPS接合。天 然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0422] 一组16(被称为MAT.D):长度31的组合肽。在位置2-15和17-30中的衍生自 HBV-S-Ag的抗原环的靶序列的14-mer肽。在位置1、16和31中为Cys残基,其 通过T3CLIPS接合。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0423] 当在高严格条件下测试时,抗体HBC34不结合在阵列上存在的任何肽。当在低严格条件下测试时(在0.1%肽扫描缓冲剂中5μg/ml和包含马血清和卵清蛋白的组合的预先调节),结合约束和组合肽——结合至来自组14和组16的肽——的抗体与组13和组15相比 有些少。在线性表位模拟上没有记录到结合。数据在图17中示出。这些数据示出了抗体 HBC34识别由肽段(peptide stretch)₁₈TGPCRTC₂₄(SEQ ID NO:80)和₄₅GNCTCIP₅₁(SEQ ID NO:81)组成的构象不连续表位,其中肽段₁₈TGPCRTC₂₄(SEQ ID NO:80)是表位的优势部分(图17)。

[0424] 为了基于上面描述的结果通过全置换分析的方式精细绘制抗体HBC34的表位,合成 由三个不同组组成的812个不连续或环状T3CLIPS肽:

[0425] 一组1(被称为RN1;不连续的T3CLIPS):衍生自不连续模拟 C2IPIPSSWAFGCSTTSTGP2RT2C(SEQ ID NO:82)的表位突变体系列。对于该序列 的每个位置,进行置换分析。换句话说,对于肽序列的每个位置,制造变体,在这 些变体中在这个位置处的原始氨基酸被选自丙氨酸(A)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L)、脯氨酸(P)、谷氨酰胺(Q)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、缬氨酸(V)、酪氨酸(Y)和“_”的 13种氨基酸中的一种替代,其中“_”代表残基缺失。天然的Cys残基被Acm(表 示为“2”)保护。

[0426] 一组2(被称为RN2;不连续的T3CLIPS):衍生自不连续模拟 CGN2T2IPIPSSWAFCSTTSTGP2RT2C(SEQ ID NO:83)的表位突变体系列。对于该 序列的每个

位置,以与组1相同的方式进行置换分析(即,GN2T残基不突变)。天然 的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0427] 一组3(被称为RN3;环T3CLIPS):衍生自环状模拟CGGGCSTTSTGP2RT2C(SEQ ID NO:84)的表位突变体系列。对于该序列的位置6-16,以与组1相同的方式进行 置换分析。天然的Cys残基被Acm(表示为“2”)保护。

[0428] 在基于PEPSCAN的ELISA中在20 μ g/ml下在利用0.1%SQ(包含0.1%的马血清和卵清蛋白的組合的肽扫描缓冲剂)预先调节的肽阵列上测试HBC34抗体。利用HBC34抗体溶液温育肽阵列(在4 $^{\circ}$ C下过夜)。在洗涤之后,利用适合的抗体过氧化物酶缀合物(SBA)的 1/1000稀释液在25 $^{\circ}$ C下温育肽阵列1小时。在洗涤之后,添加过氧化物酶底物2,2'-连氨基 -二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸(ABTS)和20 μ l/ml的3% H_2O_2 。在一小时后,测量显色。显色 利用电荷耦合器件(CCD)-摄像机和图像处理系统定量。

[0429] 如预期的,当在低严格条件下测试时,抗体HBC34结合来自所有组的肽。实验的结果示出了残基₁₂₀PCR₁₂₂和C₁₂₄对于结合是关键的,而仅残基I150、I152、W156和F158 的某些替代显著地降低结合(图18)。而且,在所有三个阵列上记录的数据已经前后一致地 示出了用E替代区₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄(SEQ ID NO:85)内的任何残基将降低结合,而用R 或Y反替代增加结合。但是,对于区₁₄₅GNCTCIPIPSSWAF₁₅₉(SEQ ID NO:86)没有观察到相同情况。

[0430] 综合起来,这些结果暗示了抗体HBC34识别具有对结合关键的残基₁₂₀PCR₁₂₂和C₁₂₄的不连续表位。残基₁₄₅GNCTCIPIPSSWAF₁₅₈(SEQ ID NO:87)的存在显示为提供用于建立 和稳定表位-互补位相互作用的结构环境。该结论起因于如下观察:不连续表位模拟(当₁₄₅GNCTCIPIPSSWAF₁₅₈(SEQ ID NO:87)和₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄(SEQ ID NO:85)存在于一个模拟中时)与单独的序列₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄(SEQ ID NO:85)(组3,RN3)相比更加耐受 替代。另外地,固定扭转角从而提供构象刚度的P151显示为影响结合,尤其是当被已知 相反性质的G替代时。替代G145P类似地影响HBC34的结合。重复地观察到R/Y替代改 善了与基序₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄(SEQ ID NO:85)内,但不与基序₁₄₅GNCTCIPIPSSWAF₁₅₈(SEQ ID NO:87)内的任何位置的结合,同时E替代降低结合。该观察可以暗示残基₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄(SEQ ID NO:85)结合至抗体HBC34内的带负电荷的互补位(或接近负 电荷的簇)和结合的改善以及降低结果来自静电力,并且表征互补位特征而不是表位的那些。

[0431] 实施例10:在利用HBC34和拉米夫定的组合治疗的慢性HBV感染的人源化uPA小鼠中增加的HBsAg减少

[0432] 在进一步研究中,调查包括抗体HBC34的组合疗法的效力。选择HBC34与聚合酶抑制剂即拉米夫定的组合。

[0433] 为了模拟慢性乙型肝炎环境,利用HBV感染幼稚的人源化uPA/SCID小鼠,并且在感染后8周之后,达到 2×10^9 份拷贝/ml的HBV DNA的中值水平和9000IU/ml的HBsAg的水平。这些水平与在具有慢性HBV感染的人患者中通常观察到的水平一样高。

[0434] 其后,从感染后第8周开始利用单独的抗体HBC34、利用单独的聚合酶抑制剂拉米夫定、利用HBC34和拉米夫定的组合或利用对照抗体治疗小鼠4周(HBC34在1mg/kg下, i.p.每周两次;在饮用水中补充0.4mg/ml的拉米夫定)。

[0435] 血清中HBV病毒血症和HBsAg水平在治疗第0周(治疗前)、治疗第2周、治疗第4 周和治疗第6周中,或在治疗第0周(治疗前)、治疗第3周和治疗第6周中评估。在图19A (HBV病

毒血症)和B(HBsAg)中示出结果。

[0436] 如在图19中所示出的,利用HBC34、拉米夫定或两种药物组合治疗分别引起病毒血症(A)的平均0.7log、1.3log和2.4log减少。显著地,在接受单独的HBC34的小鼠中HBsAg(B)下降了1.3log(平均BL=15,600IU/ml)并且在组合组中下降了2.6log(平均BL=2,600IU/ml),而在利用单独的拉米夫定治疗的小鼠中没有检测到显著的HBsAg减少(0.2log;平均BL=9,000IU/ml)。

[0437] 总之,HBC34和拉米夫定的组合明显地实现了最强效果。有趣地是,即使单独的拉米夫定是无效的,但是观察到HBC34和拉米夫定的组合的这样的强效果。鉴于其,HBC34和拉米夫定的组合的观察到的强效果明显地是出乎意料的协同效果。

[0438] 总之,在组合疗法中实现的出人意料强的HBsAg减少证明了可以例如在慢性环境中使用HBC34抗体与聚合酶抑制剂组合以加速在HBV单独感染的和HBV/HDV共同感染的患者二者中的HBsAg清除。

[0439] 实施例11:HBC34抗体的序列工程化:VH和VL的CDR3

[0440] 利用通过突变(i)VH CDR3的残基W107为A或F,(ii)VH CDR3的残基M115为I或L,和/或(iii)VL CDR3的残基W107为A或F在VH和VL的CDR3中的突变生成第一系列的HBC34突变体。通过将HBC34的未突变的VH或VL(在下文中被称为WT、野生型或亲本抗体)与如在图20和图21中图解的VH和VL突变体的不同组合进行组合产生总计18种HBC34变体。

[0441] 通过ELISA测试产生的HBC34抗体变体与HBsAg adw抗原的结合,与在实施例1中类似。结果在图21中示出。

[0442] 值得注意的是,VH CDR3的W107突变为A(在HBC34-V5、HBC34-V8、HBC34-V9、HBC34-V10、HBC34-V12和HBC34-V17变体中,图21)完全地废除了HBC34结合至HBsAg。这表明W107在HBC34互补位中对于抗原识别是关键残基。VH CDR3的W107突变为F(与W具有类似芳香族特性的氨基酸)部分地影响HBC34结合(HBC34-V1),这表明W不能在不损害HBC34与HBsAg的结合亲和力的情况下突变。

[0443] VH CDR3的M115突变为L不影响HBC34结合(HBC34-V13),而突变为I(HBC34-V11)部分地降低了HBC34结合,这表明在不损害HBC34结合的情况下M115可以被L但是不能被I置换。与利用单一突变W107A获得的结果一致,双突变W107A和M115A(HBC34-V10)完全废除HBC34结合。

[0444] VL CDR3的W107突变为F不影响HBC34结合(HBC34-V7),而突变为A(HBC34-V15)部分地降低HBC34结合,这表明在不损害HBC34结合的情况下VL CDR3的W107可以被F但是不能被A置换。正如预期的,在VH的CDR3中的突变W107F和在VL的CDR3中的突变W107A的组合完全废除了结合(HBC34-v2)。在VH CDR3中的突变M115L和在VL CDR3中的突变W107F的组合(HBC34-V6)、在VH CDR3中的突变M115I与在VL CDR3中的突变W107F的组合(HBC34-v4)和在VH CDR3中的突变W107F和在VL CDR3中的突变W107F的组合部分地影响了HBC34结合至HBsAg,这表明这些两种突变的组合,而不是单独突变,对于保留亲本HBC34抗体的结合亲和力是不相容的。

[0445] 在下一步中,上面描述的18种HBC34变体中的六种被选择用于进一步表征(HBC34-V1、V3、V4、V6、V7、V11和V13)以便于(i)确认初始结果;(ii)通过ELISA测量结合亲和力(即以测定结合的EC50);和(iii)评估来自瞬时转染的293-Expi细胞的这些HBC34变

体的生产力(图22和图23)。

[0446] 如在第一实验中观察到的,HBC34-V3变体(携带双突变VH CDR3的W107F和VL CDR3的W107F)以与亲本HBC34抗体相比高9倍的EC50结合至HBsAg(adw血清型)。另外地,HBC34-V3在与HBC34相比几乎低5倍的浓度下产生。分别携带单一突变M115I 和M115L的HBC34-V11和HBC34-V13变体以与HBC34相比相同或稍微优越的EC50结合至HBsAg。但是,两种变体与HBC34相比较低效地产生(与HBC34相比时低 $0.6\times$ 和 $0.3\times$ 的生产力)。这些结果表明HBC34-V11,并且甚至更多的HBC34-V13变体,以高亲和力结合至HBsAg,但是在哺乳动物细胞中较低效地产生。类似地,携带VH CDR3中的单一突变W107F的HBC34-V1变体与HBC34相当(1.6倍更高的EC50)结合至HBsAg,但是与HBC34相比4倍更低效地(即 $0.25\times$)产生。VL CDR3的W107与VH CDR3的W107、M115I 或M115L的组合(HBC34-V3,HBC34-V4和HBC34-V6)降低结合亲和力(1.6-9.0倍更高的EC50)和生产力(在培养上清液中 $0.20-0.35\times$ 更低的抗体浓度)二者。出人意料地,VL CDR3 的单一突变W107F(HBC34-V7)与HBC34类似地结合至HBsAg并且与HBC34相比甚至更高效地(上至 $1.7\times$)产生,在培养上清液中达到 $533\mu\text{g/ml}$ 的显著高的浓度(图23)。

[0447] 实施例12:HBC34抗体的序列工程化:框架区

[0448] 产生12种额外的HBC34变体(HBC34-V19至HBC34-V30;图24A),其中几种突变被引入VH和VL二者的框架区(FR)——其对应于在HBC34未突变共同祖先中发现的残基(HBC34-UCA)(图20),并且与VH CDR3突变M115L并与VL CDR3突变W107F组合。

[0449] 结果在图24中示出。在VL CDR3中存在W107突变的情况下在VL的FR中引入9种突变(HBC34-V27、HBC34-V28、HBC34-V29和HBC34-V30)——与WT、M115L组合——显著地降低了HBC34结合至HBsAg,因而表明了VL中突变残基的重要作用(图24A-B)。HBC34变体,其中上面描述的相同VL变体(即W107F/FR1234-GL)与FR中携带M115L突变和额外的9种突变的VH组合,不结合至HBsAg,这表明在VH和VL二者中的突变本质上促进HBsAg结合。

[0450] 重要地,与携带Y66K突变的对应变体(HBC34-V27和HBC34-V28)相比,在HBC34-V23和HBC34-V24中的VL的FR中引入的9种突变中仅一种(即K66Y)的去除显著增加了与HBsAg的结合($100\times$ 倍更低的EC50)。类似地,与携带Y66K突变的对应非结合变体(HBC34-V27和HBC34-V28)相比,HBC34-V25和HBC34-V26中K66Y突变的去除恢复了HBsAg结合。

[0451] 在这些中,HBC34-V23变体保留了高亲和力结合(与HBC34相比 $1.5\times$ 更高的EC50)并且与亲本HBC34抗体类似地产生。值得注意的是,与HBC34-V23变体仅具有一个氨基酸差异(即VH中的M115L)的HBC34-V24变体以与HBC34-V23类似的EC50结合至HBsAg,但是不有效地产生(与HBC34相比仅 $0.14\times$ 生产力)。这些结果表明虽然不显著地影响HBC34变体与HBsAg的结合,但是在位置115处存在L对携带该突变的HBC34变体的生产力具有负面影响。实际上,平均来说,携带M115L突变的所有HBC34变体(HBC34-V6、HBC34-V13、HBC34-V19、HBC34-V20、HBC34-V21、HBC34-V22、HBC34-V24、HBC34-V25、HBC34-V26、HBC34-V28、HBC34-V29和HBC34-V30)与亲本HBC34抗体相比具有 $0.3\times$ 的平均生产力。

[0452] 显著地,在VH CDR3中M115L突变的存在下,在VH的FR中引入5种或9种突变(分别地HBC34-V19和HBC34-V20变体)不明显地降低与HBsAg的结合,这暗示了突变的残基在通过HBC34抗体的高亲和力抗原识别中不具有重要作用。在HBC34-V21和HBC34-V22中,在HBC34V19和HBC34-V20变体的骨架上引入W107F突变降低了 $20-30\times$ 的与HBsAg的结合。有

趣地,相同突变(即在VL CDR3中的W107)不影响在VH的FR中 不携带相同的5种或9种突变的其它变体的结合,结果可以表明VH FR中的残基与VH的 残基107在结合至HBsAg中具有合作用(例如通过稳定可变区支架的某一构象)。

[0453] 最终地,并与图23中示出的实施例11的结果一致,在VL CDR3中携带单一突变W107的HMB34-V7抗体显示了与HBC34相比与HBsAg的相当的结合(即 $1.4\times$)并且与HBC34 相比更有效地($1.2\times$)产生(平均来说,在进行两个实验中,与HBC34抗体相比, $1.5\times$ 即50% 更有效地产生HBC34-V7)。该结果暗示了在VL CDR3中的W107F突变对HBC34抗体生产具有积极影响,同时不明显地影响与HBsAg的结合亲和力。

[0454] 最终,通过流式细胞术分析测试HBC34以及变体HBC34-V6、HBC34-V7、HBC34-V19、HBC34-V23和HBC34-V24识别10种基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I和J(如在图 25中所示出的)的能力。具体地,将人上皮细胞(Hep2细胞)转染有表达10种HBV基因型 A、B、C、D、E、F、G、H、I和J的HBsAg中每种的质粒。对于瞬时地转染的通透性细胞的染色,在多种浓度(从5000ng/ml至7ng/ml的8个连续稀释)下测试所有抗体。转染后 两天,Hep2细胞被收集、固定并且利用皂苷通透以便利用HBC34或五种选择的变体免疫 染色。使用具有FlowJo软件(TreeStar)的Becton Dickinson FACSCanto2(BD Biosciences)分析抗体与转染细胞的结合。如在图25中所示出的,HBC34和所有测试的五种变体以类似 水平识别所有10种HBV HBsAg基因型。

[0455] 序列的表格和SEQ ID编号(序列表):

[0456]

SEQ ID NO	序列	备注
1	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G 其中X ₁ 、X ₂ 、X ₃ 、X ₄ 、X ₅ 、X ₆ 和X ₇ 可以是任意氨基酸	表位
2	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G 其中 X ₁ 是 P、T 或 S, X ₂ 是 C 或 S, X ₃ 是 R、K、D 或 I, X ₄ 是 M 或 T, X ₅ 是 T、A 或 I, X ₆ 是 T、P 或 L, 和 X ₇ 是Q、H或L。	
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLG GTTVCLGQNSQSPTSNSHPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFI LLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQ GTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFS WLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP FLPLLPIFFCLWVYI	HBsAg 的 S 结构域 (GenBank 登录号 J02203)
4	MENVTSGLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLG GTTVCLGQNSQSPTSNSHPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFI LLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQ GTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFS WLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLSP FLPLLPIFFCLWVYI	HBsAg 的 S 结构域 (GenBank 登录号 FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	FJ899792 (D, adw2)
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPT DGNCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPS DGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFPSCCCKPS DGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCKSKP SDGNCTCIPISSWALGKYLWEWASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFKYLWEWASVRFSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPSTTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFGKYLWEWASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKP SDGNCTCIPISSWAFKYLWEWASARFSW	AF241409 (I)

[0457]

15	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTQAQGTSMFPSCCCTKPS DGNCTCIPIPSSWAFKFLWEWASARFSW	AB486012 (J)
16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTK PSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS LDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYPSCCCTKPS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYPSCCCTKPS DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYPSCCCTKPS DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYPSCCCTKPS DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTEP SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKS SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg P142S
30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS KDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS SDGACTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	CDRH1 aa
35	NQDGSEK	CDRH2 aa
36	AAWSGNSGGMDV	CDRH3 aa
37	KLGNKN	CDRL1 aa

[0458]

38	EVK	CDRL2 aa
39	VIYEVKYRP	CDRL2长aa
40	QTWDSTTVV	CDRL3 aa
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQA PGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFL QMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTSVSS	VH aa
42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQ SPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAA YFCQTWDSTTVVFGGGTRLTVL	VL aa
43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTTAC	CDRH1 nuc
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	CDRH2 nuc
45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTC	CDRH3 nuc
46	AAATTGGGGAATAAAAAT	CDRL1 nuc
47	GAGGTAAA	CDRL2 nuc
48	gtcatctatGAGGTAAAtaccgcccc	CDRL2长nuc
49	CAGACGTGGGACAGCACCCTGTGGTG	CDRL3 nuc
50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAG CCGGGGGGGTCCCAGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGGA CGCATCTTTAGAAGTTTTTAC ATGAGCTGGGTCCGCCAG GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACT ATAAAC CAAGATGGAAGTGAGAAATT TATATGTGGACTCTGTGAAG GGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCA CTATTTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGAGGACACGG CCGTTTATTACTGCG CGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGG GGTATGGACGTCT GGGGCCAGGGGACCACGGTCTCCGTC TCCTCA	VH nuc
51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCC CAGGACAGACAGTCAGCATCCCCTGCTCTGGAGATA AAATT GGGGAATAAAAATGTTTGCTGGTTTC AGCATAAGCCAGG CCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTAT GAGGTAAATACCGC CCCTCGGGGATTCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTG GGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTA TGGATGAGGCTGCCTATTTCTGT CAGACGTGGGACAGCA CCACTGTGGTGTT CGGCGGAGGGACCAGGCTGACCGTC CTA	VL nuc

[0459]

52	<u>X</u> GSSTTSTGPCRTCMT <u>X</u> PSDGN <u>A</u> TAIPSSW <u>X</u> 其中编码为 <u>X</u> 的残基被半胱氨酸置换	肽
53	TSTGPCRTCMTTAQG	肽
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	肽
55	<u>X</u> SMYPS <u>A</u> S <u>A</u> TKPSDGN <u>X</u> TGPCRTCMTTAQGT <u>S</u> <u>X</u> 其中编码为 <u>X</u> 的残基被半胱氨酸置换	肽
56	PCRTCMTTAQG	HBsAg 的 S 结构域的 氨基酸 120 - 130 (HBV-D J02203
57	PCX ₁ TCX ₂ X ₃ X ₄ AQG 其中 X ₁ 优选地是 R 或 K, X ₂ 优选地是 M 或 T, X ₃ 优选地是 T 或 I, 和 X ₄ 优选地 T、P 或 L	表位
58	QTFDSTTVV	CDRL3 v7 和 CDRL3 v23 (aa)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGD KLG NKNVCWFQHKPGQS PVLVIYE V KYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAAY FC QTFDSTTVV FGGGTRLTVL	VL v7
60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	CDRL1 v7 和 CDRL1 v23 (nuc)
61	GAGGTGAAA	CDRL2 v7 和 CDRL2 v23 nuc
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	CDRL2 长v7和CDRL2 长v23 nuc
63	CAGACATTGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 v7 和 CDRL3 v23 nuc
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGTCCGTCTCTCC AGGACAGACCGTGTCCATCCCTTGCTCTGGCGACA AAGCTG GGGAACAAAAAT GTCTGTTGGTTCAGCACAAAGCCAGGG CAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTAC GAGGTGAAATATCGGC CTTCAGGAATTCCAGAACGGTTCAGCGGATCAAACAGCGG CAATACTGCAACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATG GACGAAGCCGCTTATTTCTGCC CAGACATTGATTCCACCA CAGTGGTCTTTGGCGGGGGA ACTAGGCTGACCGTGCTG	VL v7 nuc
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGD KLG NKNACWYQQKPGQ SPVLVIYE V KYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAD YY QTFDSTTVV FGGGTKLTVL	VL v23 aa
66	INQDGSEK	HBC34wt CDRH2 aa

[0460]

67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTVSS	HBC34 v31、HBC34 v32和HBC34 v33 VH
68	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGGGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGTGCAGCTTCTGGAA GAATCTTCAGATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGCTCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGCGAAACATCAATCAGG ACGGATCAGAAAAGCTGTATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTATTTCCGCGACAAACGCCAAAAATTCTCTGTTTC TGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAGGATACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAGTGGAGGCATGGAC GTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGACAGTCAGCTCC	HBC34 v31、HBC34 v32和HBC34 v33 VH (nuc)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGTCCGTCTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATCACTTGCTCTGGCGACA AGCTG GGGAACA AAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTAC GAGGTGAA ATATCGGC CTTCAGGAATTCCAGAAAGATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATACTGCTACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATGG ACGAAGCTGATTACTATTGCC CAGACATTGATTCCACCAC AGTGGTCTTT GGCGGGGAACTAAGCTGACCGTGCTG	VL v23 nuc
70	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCAGGAGGAGGGTGGGTCCAGCCCGGAGGGAGCCAGAGACTGTCTTGTCGCCGATCAG GG AGGATCTTCAGGAGCTTCT ACATGTCCTGGGTGCGCCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCGCCACCAT CAAC CAGGACGGATCTGAAA AGCTGTATGTGGATAGTGTCAAA GGCCGTTTCACAATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATTCTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGAGGATAACCGC CGTCTACTATTGCG CCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGG GATGGATGTCT GGGGGCAGGGCACAACAGTGAGCGTCTCTTCC	HBC34 wt VH密码子优化的
71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTCCGTCTCACC TGGACAGACCGTCTCAATCCCCTGCTCCGGCGAT AAACTGGGCAACAAGA ACGTGTGCTGGTTCCAGCACAAA CCCGGACAGAGTCCTGTGCTGGTCATCTAC GAGGTCAAGT ATCGGCCAAGCGGCATTCCCGAAAAGATTAGCGGCTCCAA CTCTGGGAATACCGCAACACTGACTATCTCTGGAACCCAG GCAATGGACGAGGCAGCTTACTTTTGCC CAGACTTGGGATT CAACTACTGTCGTG TTTCGGCGGCGGAACTAGACTGACTG TCCTG	HBC34 wt VL密码子优化的
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	HBC34 wt CDRH1 密码子优化的
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	HBC34 wt CDRH2 密码子优化的
74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTC	HBC34 wt CDRH3 密码子优化的
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	HBC34 wt CDRL1 密码子优化的

[0461]

76	GAGGTCAAG	HBC34 wt CDRL2 密码子优化的
77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	HBC34 wt CDRL2长 密码子优化的
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	HBC34 wt CDRL3 密码子优化的
79	GGSGG	连接体
80	TGPCRTC	表位
81	GNCTCIP	表位
82	CCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC 其中具体地在位置 2、21 和 24 处的半胱氨酸偶联至乙酰胺基甲基	不连续的表位模拟
83	CGNCTCIPISSWAF <u>C</u> STTSTGPCRTCC 其中具体地在位置 4、6、24 和 27 处的半胱氨酸偶联至乙酰胺基甲基。	不连续的表位模拟
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC 其中具体地在位置 13 和 16 处的半胱氨酸偶联至乙酰胺基甲基。	环状表位模拟
85	STTSTGPCRTC	表位
86	GNCTCIPISSWAF <u>C</u>	表位
87	GNCTCIPISSWAF	表位
88	PCRXC	表位

[0001] 序列表

[0002] <110> 胡默波斯生物医学公司

[0003] <120> 强力地中和乙型肝炎病毒的抗体和其用途

[0004] <130> HB01P024W01

[0005] <150> PCT/EP2015/001970

[0006] <151> 2015-10-07

[0007] <160> 88

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 11

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 表位

[0015] <220>

[0016] <221> misc_feature

[0017] <222> (1) .. (3)

[0018] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0019] <220>

[0020] <221> misc_feature

[0021] <222> (6) .. (8)

[0022] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0023] <220>

[0024] <221> misc_feature

[0025] <222> (10) .. (10)

[0026] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0027] <400> 1

[0028] Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly

[0029] 1 5 10

[0030] <210> 2

[0031] <211> 11

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工序列

[0034] <220>

[0035] <223> 表位

[0036] <220>

[0037] <221> misc_feature

[0038] <222> (1) .. (1)

[0039]	<223> Xaa是Pro、Thr或Ser
[0040]	<220>
[0041]	<221> misc_feature
[0042]	<222> (2) .. (2)
[0043]	<223> Xaa是Cys或Ser
[0044]	<220>
[0045]	<221> misc_feature
[0046]	<222> (3) .. (3)
[0047]	<223> Xaa是Arg、Lys、Asp或Ile
[0048]	<220>
[0049]	<221> misc_feature
[0050]	<222> (6) .. (6)
[0051]	<223> Xaa是Met或Thr
[0052]	<220>
[0053]	<221> misc_feature
[0054]	<222> (7) .. (7)
[0055]	<223> Xaa是Thr、Ala或Ile
[0056]	<220>
[0057]	<221> misc_feature
[0058]	<222> (8) .. (8)
[0059]	<223> Xaa是Thr、Pro或Leu
[0060]	<220>
[0061]	<221> misc_feature
[0062]	<222> (10) .. (10)
[0063]	<223> Xaa是Gln、His或Leu
[0064]	<400> 2
[0065]	Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
[0066]	1 5 10
[0067]	<210> 3
[0068]	<211> 226
[0069]	<212> PRT
[0070]	<213> 人工序列
[0071]	<220>
[0072]	<223> HBsAg的S结构域 (GenBank登录号J02203)
[0073]	<400> 3
[0074]	Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
[0075]	1 5 10 15
[0076]	Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
[0077]	20 25 30

[0078]	Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
[0079]	35 40 45
[0080]	Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
[0081]	50 55 60
[0082]	Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
[0083]	65 70 75 80
[0084]	Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
[0085]	85 90 95
[0086]	Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
[0087]	100 105 110
[0088]	Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
[0089]	115 120 125
[0090]	Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
[0091]	130 135 140
[0092]	Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
[0093]	145 150 155 160
[0094]	Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
[0095]	165 170 175
[0096]	Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
[0097]	180 185 190
[0098]	Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
[0099]	195 200 205
[0100]	Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
[0101]	210 215 220
[0102]	Tyr Ile
[0103]	225
[0104]	<210> 4
[0105]	<211> 226
[0106]	<212> PRT
[0107]	<213> 人工序列
[0108]	<220>
[0109]	<223> HBsAg的S结构域 (GenBank登录号FJ899792)
[0110]	<400> 4
[0111]	Met Glu Asn Val Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
[0112]	1 5 10 15
[0113]	Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
[0114]	20 25 30
[0115]	Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
[0116]	35 40 45

[0117]	Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
[0118]	50 55 60
[0119]	Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
[0120]	65 70 75 80
[0121]	Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
[0122]	85 90 95
[0123]	Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
[0124]	100 105 110
[0125]	Ser Ser Thr Thr Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala
[0126]	115 120 125
[0127]	Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
[0128]	130 135 140
[0129]	Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
[0130]	145 150 155 160
[0131]	Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
[0132]	165 170 175
[0133]	Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
[0134]	180 185 190
[0135]	Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Thr
[0136]	195 200 205
[0137]	Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
[0138]	210 215 220
[0139]	Tyr Ile
[0140]	225
[0141]	<210> 5
[0142]	<211> 72
[0143]	<212> PRT
[0144]	<213> 人工序列
[0145]	<220>
[0146]	<223> 抗原环区J02203 (D,ayw3)
[0147]	<400> 5
[0148]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0149]	1 5 10 15
[0150]	Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser
[0151]	20 25 30
[0152]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0153]	35 40 45
[0154]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0155]	50 55 60

[0156] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 [0157] 65 70
 [0158] <210> 6
 [0159] <211> 72
 [0160] <212> PRT
 [0161] <213> 人工序列
 [0162] <220>
 [0163] <223> 抗原环区FJ899792 (D,adw2)
 [0164] <400> 6
 [0165] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 [0166] 1 5 10 15
 [0167] Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 [0168] 20 25 30
 [0169] Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 [0170] 35 40 45
 [0171] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 [0172] 50 55 60
 [0173] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 [0174] 65 70
 [0175] <210> 7
 [0176] <211> 72
 [0177] <212> PRT
 [0178] <213> 人工序列
 [0179] <220>
 [0180] <223> 抗原环区AM282986 (A)
 [0181] <400> 7
 [0182] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Thr Thr Thr Thr
 [0183] 1 5 10 15
 [0184] Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
 [0185] 20 25 30
 [0186] Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 [0187] 35 40 45
 [0188] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
 [0189] 50 55 60
 [0190] Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 [0191] 65 70
 [0192] <210> 8
 [0193] <211> 72
 [0194] <212> PRT

[0195] <213> 人工序列
[0196] <220>
[0197] <223> 抗原环区D23678 (B1)
[0198] <400> 8
[0199] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0200] 1 5 10 15
[0201] Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0202] 20 25 30
[0203] Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
[0204] 35 40 45
[0205] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
[0206] 50 55 60
[0207] Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
[0208] 65 70
[0209] <210> 9
[0210] <211> 72
[0211] <212> PRT
[0212] <213> 人工序列
[0213] <220>
[0214] <223> 抗原环区AB117758 (C1)
[0215] <400> 9
[0216] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr
[0217] 1 5 10 15
[0218] Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0219] 20 25 30
[0220] Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0221] 35 40 45
[0222] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu
[0223] 50 55 60
[0224] Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
[0225] 65 70
[0226] <210> 10
[0227] <211> 72
[0228] <212> PRT
[0229] <213> 人工序列
[0230] <220>
[0231] <223> 抗原环区AB205192 (E)
[0232] <400> 10
[0233] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr

[0234]	1	5	10	15
[0235]	Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser			
[0236]	20	25	30	
[0237]	Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr			
[0238]	35	40	45	
[0239]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu			
[0240]	50	55	60	
[0241]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp			
[0242]	65	70		
[0243]	<210> 11			
[0244]	<211> 72			
[0245]	<212> PRT			
[0246]	<213> 人工序列			
[0247]	<220>			
[0248]	<223> 抗原环区X69798 (F4)			
[0249]	<400> 11			
[0250]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr			
[0251]	1	5	10	15
[0252]	Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser			
[0253]	20	25	30	
[0254]	Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr			
[0255]	35	40	45	
[0256]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Leu Gly Lys Tyr Leu Trp Glu			
[0257]	50	55	60	
[0258]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp			
[0259]	65	70		
[0260]	<210> 12			
[0261]	<211> 72			
[0262]	<212> PRT			
[0263]	<213> 人工序列			
[0264]	<220>			
[0265]	<223> 抗原环区AF160501 (G)			
[0266]	<400> 12			
[0267]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr			
[0268]	1	5	10	15
[0269]	Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser			
[0270]	20	25	30	
[0271]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr			
[0272]	35	40	45	

[0273]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
[0274]	50 55 60
[0275]	Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
[0276]	65 70
[0277]	<210> 13
[0278]	<211> 72
[0279]	<212> PRT
[0280]	<213> 人工序列
[0281]	<220>
[0282]	<223> 抗原环区AY090454 (H)
[0283]	<400> 13
[0284]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
[0285]	1 5 10 15
[0286]	Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
[0287]	20 25 30
[0288]	Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0289]	35 40 45
[0290]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
[0291]	50 55 60
[0292]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0293]	65 70
[0294]	<210> 14
[0295]	<211> 72
[0296]	<212> PRT
[0297]	<213> 人工序列
[0298]	<220>
[0299]	<223> 抗原环区AF241409 (I)
[0300]	<400> 14
[0301]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0302]	1 5 10 15
[0303]	Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
[0304]	20 25 30
[0305]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0306]	35 40 45
[0307]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
[0308]	50 55 60
[0309]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0310]	65 70
[0311]	<210> 15

[0312]	<211> 72
[0313]	<212> PRT
[0314]	<213> 人工序列
[0315]	<220>
[0316]	<223> 抗原环区AB486012 (J)
[0317]	<400> 15
[0318]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
[0319]	1 5 10 15
[0320]	Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Ile Thr Ala Gln Gly Thr Ser
[0321]	20 25 30
[0322]	Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0323]	35 40 45
[0324]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Phe Leu Trp Glu
[0325]	50 55 60
[0326]	Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
[0327]	65 70
[0328]	<210> 16
[0329]	<211> 73
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 人工序列
[0332]	<220>
[0333]	<223> 抗原环区HBsAg Y100C/P120T
[0334]	<400> 16
[0335]	Cys Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr
[0336]	1 5 10 15
[0337]	Thr Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
[0338]	20 25 30
[0339]	Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys
[0340]	35 40 45
[0341]	Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp
[0342]	50 55 60
[0343]	Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0344]	65 70
[0345]	<210> 17
[0346]	<211> 72
[0347]	<212> PRT
[0348]	<213> 人工序列
[0349]	<220>
[0350]	<223> 抗原环区HBsAg P120T

[0351]	<400> 17
[0352]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0353]	1 5 10 15
[0354]	Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0355]	20 25 30
[0356]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0357]	35 40 45
[0358]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0359]	50 55 60
[0360]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0361]	65 70
[0362]	<210> 18
[0363]	<211> 72
[0364]	<212> PRT
[0365]	<213> 人工序列
[0366]	<220>
[0367]	<223> 抗原环区HBsAg P120T/S143L
[0368]	<400> 18
[0369]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0370]	1 5 10 15
[0371]	Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0372]	20 25 30
[0373]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Leu Asp Gly Asn Cys Thr
[0374]	35 40 45
[0375]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0376]	50 55 60
[0377]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0378]	65 70
[0379]	<210> 19
[0380]	<211> 72
[0381]	<212> PRT
[0382]	<213> 人工序列
[0383]	<220>
[0384]	<223> 抗原环区HBsAg C121S
[0385]	<400> 19
[0386]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0387]	1 5 10 15
[0388]	Gly Thr Gly Pro Ser Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0389]	20 25 30

[0390]	Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr
[0391]			35					40					45			
[0392]	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Trp	Glu
[0393]			50					55					60			
[0394]	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp								
[0395]	65						70									
[0396]	<210>	20														
[0397]	<211>	72														
[0398]	<212>	PRT														
[0399]	<213>	人工序列														
[0400]	<220>															
[0401]	<223>	抗原环区HBsAg	R122D													
[0402]	<400>	20														
[0403]	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr
[0404]	1				5					10					15	
[0405]	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Asp	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
[0406]				20					25					30		
[0407]	Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr
[0408]				35					40					45		
[0409]	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Trp	Glu
[0410]				50					55					60		
[0411]	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp								
[0412]	65						70									
[0413]	<210>	21														
[0414]	<211>	72														
[0415]	<212>	PRT														
[0416]	<213>	人工序列														
[0417]	<220>															
[0418]	<223>	抗原环区HBsAg	R122I													
[0419]	<400>	21														
[0420]	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr
[0421]	1				5					10					15	
[0422]	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Ile	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
[0423]				20					25					30		
[0424]	Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr
[0425]				35					40					45		
[0426]	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Trp	Glu
[0427]				50					55					60		
[0428]	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp								

[0429]	65	70
[0430]	<210> 22	
[0431]	<211> 72	
[0432]	<212> PRT	
[0433]	<213> 人工序列	
[0434]	<220>	
[0435]	<223> 抗原环区HBsAg T123N	
[0436]	<400> 22	
[0437]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr	
[0438]	1 5 10 15	
[0439]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Asn Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser	
[0440]	20 25 30	
[0441]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr	
[0442]	35 40 45	
[0443]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu	
[0444]	50 55 60	
[0445]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp	
[0446]	65 70	
[0447]	<210> 23	
[0448]	<211> 72	
[0449]	<212> PRT	
[0450]	<213> 人工序列	
[0451]	<220>	
[0452]	<223> 抗原环区HBsAg Q129H	
[0453]	<400> 23	
[0454]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr	
[0455]	1 5 10 15	
[0456]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala His Gly Thr Ser	
[0457]	20 25 30	
[0458]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr	
[0459]	35 40 45	
[0460]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu	
[0461]	50 55 60	
[0462]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp	
[0463]	65 70	
[0464]	<210> 24	
[0465]	<211> 72	
[0466]	<212> PRT	
[0467]	<213> 人工序列	

[0468] <220>
 [0469] <223> 抗原环区HBsAg Q129L
 [0470] <400> 24
 [0471] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 [0472] 1 5 10 15
 [0473] Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Leu Gly Thr Ser
 [0474] 20 25 30
 [0475] Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 [0476] 35 40 45
 [0477] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 [0478] 50 55 60
 [0479] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 [0480] 65 70
 [0481] <210> 25
 [0482] <211> 72
 [0483] <212> PRT
 [0484] <213> 人工序列
 [0485] <220>
 [0486] <223> 抗原环区HBsAg M133H
 [0487] <400> 25
 [0488] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 [0489] 1 5 10 15
 [0490] Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 [0491] 20 25 30
 [0492] His Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 [0493] 35 40 45
 [0494] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 [0495] 50 55 60
 [0496] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 [0497] 65 70
 [0498] <210> 26
 [0499] <211> 72
 [0500] <212> PRT
 [0501] <213> 人工序列
 [0502] <220>
 [0503] <223> 抗原环区HBsAg M133L
 [0504] <400> 26
 [0505] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 [0506] 1 5 10 15

[0507]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0508]	20 25 30
[0509]	Leu Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0510]	35 40 45
[0511]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0512]	50 55 60
[0513]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0514]	65 70
[0515]	<210> 27
[0516]	<211> 72
[0517]	<212> PRT
[0518]	<213> 人工序列
[0519]	<220>
[0520]	<223> 抗原环区HBsAg M133T
[0521]	<400> 27
[0522]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0523]	1 5 10 15
[0524]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0525]	20 25 30
[0526]	Thr Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0527]	35 40 45
[0528]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0529]	50 55 60
[0530]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0531]	65 70
[0532]	<210> 28
[0533]	<211> 72
[0534]	<212> PRT
[0535]	<213> 人工序列
[0536]	<220>
[0537]	<223> 抗原环区HBsAg K141E
[0538]	<400> 28
[0539]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0540]	1 5 10 15
[0541]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0542]	20 25 30
[0543]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Glu Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
[0544]	35 40 45
[0545]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu

[0546]	50	55	60
[0547]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp		
[0548]	65	70	
[0549]	<210> 29		
[0550]	<211> 72		
[0551]	<212> PRT		
[0552]	<213> 人工序列		
[0553]	<220>		
[0554]	<223> 抗原环区HBsAg P142S		
[0555]	<400> 29		
[0556]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr		
[0557]	1	5	10
[0558]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser		
[0559]	20	25	30
[0560]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Ser Ser Asp Gly Asn Cys Thr		
[0561]	35	40	45
[0562]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu		
[0563]	50	55	60
[0564]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp		
[0565]	65	70	
[0566]	<210> 30		
[0567]	<211> 72		
[0568]	<212> PRT		
[0569]	<213> 人工序列		
[0570]	<220>		
[0571]	<223> 抗原环区HBsAg S143K		
[0572]	<400> 30		
[0573]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr		
[0574]	1	5	10
[0575]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser		
[0576]	20	25	30
[0577]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Lys Asp Gly Asn Cys Thr		
[0578]	35	40	45
[0579]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu		
[0580]	50	55	60
[0581]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp		
[0582]	65	70	
[0583]	<210> 31		
[0584]	<211> 72		

[0585] <212> PRT
[0586] <213> 人工序列
[0587] <220>
[0588] <223> 抗原环区HBsAg D144A
[0589] <400> 31
[0590] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0591] 1 5 10 15
[0592] Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0593] 20 25 30
[0594] Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Cys Thr
[0595] 35 40 45
[0596] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0597] 50 55 60
[0598] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0599] 65 70
[0600] <210> 32
[0601] <211> 72
[0602] <212> PRT
[0603] <213> 人工序列
[0604] <220>
[0605] <223> 抗原环区HBsAg G145R
[0606] <400> 32
[0607] Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0608] 1 5 10 15
[0609] Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0610] 20 25 30
[0611] Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Arg Asn Cys Thr
[0612] 35 40 45
[0613] Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0614] 50 55 60
[0615] Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0616] 65 70
[0617] <210> 33
[0618] <211> 72
[0619] <212> PRT
[0620] <213> 人工序列
[0621] <220>
[0622] <223> 抗原环区HBsAg N146A
[0623] <400> 33

[0624]	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
[0625]	1 5 10 15
[0626]	Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
[0627]	20 25 30
[0628]	Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Ala Cys Thr
[0629]	35 40 45
[0630]	Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
[0631]	50 55 60
[0632]	Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
[0633]	65 70
[0634]	<210> 34
[0635]	<211> 8
[0636]	<212> PRT
[0637]	<213> 人工序列
[0638]	<220>
[0639]	<223> 抗体HBC34 CDRH1 aa
[0640]	<400> 34
[0641]	Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe Tyr
[0642]	1 5
[0643]	<210> 35
[0644]	<211> 7
[0645]	<212> PRT
[0646]	<213> 人工序列
[0647]	<220>
[0648]	<223> 抗体HBC34 CDRH2 aa
[0649]	<400> 35
[0650]	Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
[0651]	1 5
[0652]	<210> 36
[0653]	<211> 12
[0654]	<212> PRT
[0655]	<213> 人工序列
[0656]	<220>
[0657]	<223> 抗体HBC34 CDRH3 aa
[0658]	<400> 36
[0659]	Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val
[0660]	1 5 10
[0661]	<210> 37
[0662]	<211> 6

[0663] <212> PRT
 [0664] <213> 人工序列
 [0665] <220>
 [0666] <223> 抗体HBC34 CDRL1 aa
 [0667] <400> 37
 [0668] Lys Leu Gly Asn Lys Asn
 [0669] 1 5
 [0670] <210> 38
 [0671] <400> 38
 [0672] 000
 [0673] <210> 39
 [0674] <211> 9
 [0675] <212> PRT
 [0676] <213> 人工序列
 [0677] <220>
 [0678] <223> 抗体HBC34 CDRL2 长 aa
 [0679] <400> 39
 [0680] Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro
 [0681] 1 5
 [0682] <210> 40
 [0683] <211> 9
 [0684] <212> PRT
 [0685] <213> 人工序列
 [0686] <220>
 [0687] <223> 抗体HBC34 CDRL3 aa
 [0688] <400> 40
 [0689] Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
 [0690] 1 5
 [0691] <210> 41
 [0692] <211> 119
 [0693] <212> PRT
 [0694] <213> 人工序列
 [0695] <220>
 [0696] <223> 抗体HBC34 VH aa
 [0697] <400> 41
 [0698] Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 [0699] 1 5 10 15
 [0700] Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
 [0701] 20 25 30

[0702] Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0703] 35 40 45
 [0704] Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
 [0705] 50 55 60
 [0706] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 [0707] 65 70 75 80
 [0708] Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0709] 85 90 95
 [0710] Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 [0711] 100 105 110
 [0712] Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
 [0713] 115
 [0714] <210> 42
 [0715] <211> 106
 [0716] <212> PRT
 [0717] <213> 人工序列
 [0718] <220>
 [0719] <223> 抗体HBC34 VL aa
 [0720] <400> 42
 [0721] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 [0722] 1 5 10 15
 [0723] Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
 [0724] 20 25 30
 [0725] Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 [0726] 35 40 45
 [0727] Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 [0728] 50 55 60
 [0729] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 [0730] 65 70 75 80
 [0731] Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
 [0732] 85 90 95
 [0733] Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 [0734] 100 105
 [0735] <210> 43
 [0736] <211> 24
 [0737] <212> DNA
 [0738] <213> 人工序列
 [0739] <220>
 [0740] <223> 抗体HBC34 CDRH1 nuc

[0741] <400> 43
[0742] ggacgcatct ttagaagttt ttac 24
[0743] <210> 44
[0744] <211> 24
[0745] <212> DNA
[0746] <213> 人工序列
[0747] <220>
[0748] <223> 抗体HBC34 CDRH2 nuc
[0749] <400> 44
[0750] ataaaccaag atggaagtga gaaa 24
[0751] <210> 45
[0752] <211> 36
[0753] <212> DNA
[0754] <213> 人工序列
[0755] <220>
[0756] <223> 抗体HBC34 CDRH3 nuc
[0757] <400> 45
[0758] gcggcttgga gcggcaatag tgggggtatg gacgtc 36
[0759] <210> 46
[0760] <211> 18
[0761] <212> DNA
[0762] <213> 人工序列
[0763] <220>
[0764] <223> 抗体HBC34 CDRL1 nuc
[0765] <400> 46
[0766] aaattgggga ataaaaat 18
[0767] <210> 47
[0768] <400> 47
[0769] 000
[0770] <210> 48
[0771] <211> 27
[0772] <212> DNA
[0773] <213> 人工序列
[0774] <220>
[0775] <223> 抗体HBC34 CDRL2 长 nuc
[0776] <400> 48
[0777] gtcactatg aggttaaata ccgcccc 27
[0778] <210> 49
[0779] <211> 27

[0780]	<212> DNA
[0781]	<213> 人工序列
[0782]	<220>
[0783]	<223> 抗体HBC34 CDRL3 nuc
[0784]	<400> 49
[0785]	cagacgtggg acagcaccac tgtggtg 27
[0786]	<210> 50
[0787]	<211> 357
[0788]	<212> DNA
[0789]	<213> 人工序列
[0790]	<220>
[0791]	<223> 抗体HBC34 VH nuc
[0792]	<400> 50
[0793]	gaactgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tgggtccagc cgggggggtc ccagagactg 60
[0794]	tcctgtgcag cctctggacg catctttaga agtttttaca tgagctgggt ccgccaggcc 120
[0795]	ccagggaagg ggctggagtg ggtggccact ataaaccaag atggaagtga gaaattatat 180
[0796]	gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactatatt 240
[0797]	ctgcaaatga acaacctgag agtcgaggac acggccgttt attactgcgc ggcttggagc 300
[0798]	ggcaatagtg ggggtatgga cgtctggggc caggggacca cggtctccgt ctctca 357
[0799]	<210> 51
[0800]	<211> 318
[0801]	<212> DNA
[0802]	<213> 人工序列
[0803]	<220>
[0804]	<223> 抗体HBC34 VL nuc
[0805]	<400> 51
[0806]	tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agtcagcatc 60
[0807]	ccctgctctg gagataaatt ggggaataaa aatgtttgct ggtttcagca taagccaggc 120
[0808]	cagtcccctg tgttggtcat ctatgaggtt aaataccgcc cctcggggat tcctgagcga 180
[0809]	ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
[0810]	gatgaggctg cctatttctg tcagacgtgg gacagcacca ctgtggtgtt cggcggaggg 300
[0811]	accaggctga ccgtccta 318
[0812]	<210> 52
[0813]	<211> 33
[0814]	<212> PRT
[0815]	<213> 人工序列
[0816]	<220>
[0817]	<223> 肽
[0818]	<220>

[0819] <221> misc_feature
 [0820] <222> (1) .. (1)
 [0821] <223> Xaa被Cys置换
 [0822] <220>
 [0823] <221> misc_feature
 [0824] <222> (17) .. (17)
 [0825] <223> Xaa被Cys置换
 [0826] <220>
 [0827] <221> misc_feature
 [0828] <222> (33) .. (33)
 [0829] <223> Xaa是被Cys置换
 [0830] <400> 52
 [0831] Xaa Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr
 [0832] 1 5 10 15
 [0833] Xaa Pro Ser Asp Gly Asn Ala Thr Ala Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
 [0834] 20 25 30
 [0835] Xaa
 [0836] <210> 53
 [0837] <211> 15
 [0838] <212> PRT
 [0839] <213> 人工序列
 [0840] <220>
 [0841] <223> 肽
 [0842] <400> 53
 [0843] Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly
 [0844] 1 5 10 15
 [0845] <210> 54
 [0846] <211> 26
 [0847] <212> PRT
 [0848] <213> 人工序列
 [0849] <220>
 [0850] <223> 肽
 [0851] <400> 54
 [0852] Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser
 [0853] 1 5 10 15
 [0854] Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr
 [0855] 20 25
 [0856] <210> 55
 [0857] <211> 33

[0858] <212> PRT
 [0859] <213> 人工序列
 [0860] <220>
 [0861] <223> 肽
 [0862] <220>
 [0863] <221> misc_feature
 [0864] <222> (1) .. (1)
 [0865] <223> Xaa被Cys置换
 [0866] <220>
 [0867] <221> misc_feature
 [0868] <222> (17) .. (17)
 [0869] <223> Xaa被Cys置换
 [0870] <220>
 [0871] <221> misc_feature
 [0872] <222> (33) .. (33)
 [0873] <223> Xaa被Cys置换
 [0874] <400> 55
 [0875] Xaa Ser Met Tyr Pro Ser Ala Ser Ala Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
 [0876] 1 5 10 15
 [0877] Xaa Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser
 [0878] 20 25 30
 [0879] Xaa
 [0880] <210> 56
 [0881] <211> 11
 [0882] <212> PRT
 [0883] <213> 人工序列
 [0884] <220>
 [0885] <223> 抗原环区片段 (HBsAg HBV-D J02203的S结构域的氨基酸120 - 130)
 [0886] <400> 56
 [0887] Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly
 [0888] 1 5 10
 [0889] <210> 57
 [0890] <211> 11
 [0891] <212> PRT
 [0892] <213> 人工序列
 [0893] <220>
 [0894] <223> 表位
 [0895] <220>
 [0896] <221> misc_feature

[0897]	<222> (3) .. (3)
[0898]	<223> Xaa可以是任意氨基酸,优选地Xaa是Arg或Lys
[0899]	<220>
[0900]	<221> misc_feature
[0901]	<222> (6) .. (6)
[0902]	<223> Xaa可以是任意氨基酸,优选地Xaa是Met或Thr
[0903]	<220>
[0904]	<221> misc_feature
[0905]	<222> (7) .. (7)
[0906]	<223> Xaa可以是任意氨基酸,优选地Xaa是Thr或Ile
[0907]	<220>
[0908]	<221> misc_feature
[0909]	<222> (8) .. (8)
[0910]	<223> Xaa可以是任意氨基酸,优选地Xaa是Thr、Pro或Leu
[0911]	<400> 57
[0912]	Pro Cys Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Gln Gly
[0913]	1 5 10
[0914]	<210> 58
[0915]	<211> 9
[0916]	<212> PRT
[0917]	<213> 人工序列
[0918]	<220>
[0919]	<223> CDRL3 v7和CDRL3 v23 (aa)
[0920]	<400> 58
[0921]	Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
[0922]	1 5
[0923]	<210> 59
[0924]	<211> 106
[0925]	<212> PRT
[0926]	<213> 人工序列
[0927]	<220>
[0928]	<223> VL v7
[0929]	<400> 59
[0930]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0931]	1 5 10 15
[0932]	Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
[0933]	20 25 30
[0934]	Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0935]	35 40 45

[0936]	Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0937]	50 55 60
[0938]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[0939]	65 70 75 80
[0940]	Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
[0941]	85 90 95
[0942]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
[0943]	100 105
[0944]	<210> 60
[0945]	<211> 18
[0946]	<212> DNA
[0947]	<213> 人工序列
[0948]	<220>
[0949]	<223> CDRL1 v7 和 CDRL1 v23 (nuc)
[0950]	<400> 60
[0951]	aagctgggga acaaaaat 18
[0952]	<210> 61
[0953]	<400> 61
[0954]	000
[0955]	<210> 62
[0956]	<211> 27
[0957]	<212> DNA
[0958]	<213> 人工序列
[0959]	<220>
[0960]	<223> CDRL2 长 v7 和 CDRL2 长 v23 nuc
[0961]	<400> 62
[0962]	gtcatctacg aggtgaaata tcggcct 27
[0963]	<210> 63
[0964]	<211> 27
[0965]	<212> DNA
[0966]	<213> 人工序列
[0967]	<220>
[0968]	<223> CDRL3 v7 和 CDRL3 v23 nuc
[0969]	<400> 63
[0970]	cagacattcg attccaccac agtggtc 27
[0971]	<210> 64
[0972]	<211> 318
[0973]	<212> DNA
[0974]	<213> 人工序列

[0975] <220>
 [0976] <223> VL v7 nuc
 [0977] <400> 64
 [0978] tcttacgagc tgacacagcc acctagcgtg tccgtctctc caggacagac cgtgtccatc 60
 [0979] ccttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgtctgtt ggttccagca caagccaggg 120
 [0980] cagagtcccg tgctggtcat ctacgaggtg aatatcggc cttcaggaat tccagaacgg 180
 [0981] ttcagcggat caaacagcgg caatactgca accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg 240
 [0982] gacgaagccg cttatttctg ccagacattc gattccacca cagtggctctt tggcggggga 300
 [0983] actaggctga ccgtgctg 318
 [0984] <210> 65
 [0985] <211> 106
 [0986] <212> PRT
 [0987] <213> 人工序列
 [0988] <220>
 [0989] <223> VL v23 aa
 [0990] <400> 65
 [0991] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 [0992] 1 5 10 15
 [0993] Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Ala
 [0994] 20 25 30
 [0995] Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 [0996] 35 40 45
 [0997] Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 [0998] 50 55 60
 [0999] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 [1000] 65 70 75 80
 [1001] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
 [1002] 85 90 95
 [1003] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [1004] 100 105
 [1005] <210> 66
 [1006] <211> 8
 [1007] <212> PRT
 [1008] <213> 人工序列
 [1009] <220>
 [1010] <223> HBC34wt CDRH2 aa
 [1011] <400> 66
 [1012] Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 [1013] 1 5

[1014]	<210> 67
[1015]	<211> 119
[1016]	<212> PRT
[1017]	<213> 人工序列
[1018]	<220>
[1019]	<223> HBC34 v31、HBC34 v32和HBC34 v33 VH
[1020]	<400> 67
[1021]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1022]	1 5 10 15
[1023]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
[1024]	20 25 30
[1025]	Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1026]	35 40 45
[1027]	Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
[1028]	50 55 60
[1029]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
[1030]	65 70 75 80
[1031]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1032]	85 90 95
[1033]	Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[1034]	100 105 110
[1035]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[1036]	115
[1037]	<210> 68
[1038]	<211> 357
[1039]	<212> DNA
[1040]	<213> 人工序列
[1041]	<220>
[1042]	<223> HBC34 v31、HBC34 v32和HBC34 v33 VH (nuc)
[1043]	<400> 68
[1044]	gaggtgcagc tgggtggaatc cggcggggga ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg 60
[1045]	agctgtgcag cttctggaag aatcttcaga tctttttaca tgagttgggt gagacaggct 120
[1046]	cctgggaagg gactggagtg ggtcgcaaac atcaatcagg acggatcaga aaagctgtat 180
[1047]	gtggatagcg tcaaaggcag gttcactatt tcccgcgaca acgcaaaaaa ttctctgttt 240
[1048]	ctgcagatga acaatctgcg ggtggaggat accgctgtct actattgtgc agcctggctc 300
[1049]	ggcaacagtg gaggcattgga cgtgtgggga cagggaacca cagtgcagc cagctcc 357
[1050]	<210> 69
[1051]	<211> 318
[1052]	<212> DNA

[1053]	<213> 人工序列
[1054]	<220>
[1055]	<223> VL v23 nuc
[1056]	<400> 69
[1057]	tcttacgagc tgacacagcc ccctagcgtg tccgtctctc caggccagac agcatccatc 60
[1058]	acttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgcctgtt ggtatcagca gaagccaggg 120
[1059]	cagagtcccg tgctggtcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaaaga 180
[1060]	ttcagtggat caaacagcgg caatactgct accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg 240
[1061]	gacgaagctg attactattg ccagacattc gattccacca cagtggctct tggcggggga 300
[1062]	actaagctga ccgtgctg 318
[1063]	<210> 70
[1064]	<211> 357
[1065]	<212> DNA
[1066]	<213> 人工序列
[1067]	<220>
[1068]	<223> HBC34 wt VH 密码子优化的
[1069]	<400> 70
[1070]	gaactgcagc tggtcgaatc aggaggaggg tgggtccagc ccggaggggag ccagagactg 60
[1071]	tcttgtgccg catcaggag gatcttcagg agcttctaca tgtcctgggt gcgccaggca 120
[1072]	ccaggcaagg gactggagtg ggtcgccacc atcaaccagg acggatctga aaagctgtat 180
[1073]	gtggatagtg tcaaaggccg gttcacaatt agcagagaca acgctaaaaa ttctctgttt 240
[1074]	ctgcagatga acaatctgcg agtggaggat accgccgtct actattgcgc cgcttgggtct 300
[1075]	ggcaacagcg gcgggatgga tgtctggggg cagggcacaa cagtgagcgt ctcttcc 357
[1076]	<210> 71
[1077]	<211> 318
[1078]	<212> DNA
[1079]	<213> 人工序列
[1080]	<220>
[1081]	<223> HBC34 wt VL 密码子优化的
[1082]	<400> 71
[1083]	tcatacgaac tgactcagcc tccctccgtc tccgtctcac ctggacagac cgtctcaatc 60
[1084]	ccctgctccg gcgataaact gggcaacaag aacgtgtgct ggttccagca caaacccgga 120
[1085]	cagagtccctg tgctggtcat ctacgaggtc aagtatcggc caagcggcat tcccgaaga 180
[1086]	ttcagcggct ccaactctgg gaataccgca aactgacta tctctggaac ccaggcaatg 240
[1087]	gacgagcgag cttacttttg ccagacttgg gattcaacta ctgtcgtgtt cggcggcgga 300
[1088]	actagactga ctgtcctg 318
[1089]	<210> 72
[1090]	<211> 24
[1091]	<212> DNA

- [1092] <213> 人工序列
[1093] <220>
[1094] <223> HBC34 wt CDRH1 密码子优化的
[1095] <400> 72
[1096] gggaggatct tcaggagctt ctac 24
[1097] <210> 73
[1098] <211> 24
[1099] <212> DNA
[1100] <213> 人工序列
[1101] <220>
[1102] <223> HBC34 wt CDRH2 密码子优化的
[1103] <400> 73
[1104] atcaaccagg acggatctga aaag 24
[1105] <210> 74
[1106] <211> 36
[1107] <212> DNA
[1108] <213> 人工序列
[1109] <220>
[1110] <223> HBC34 wt CDRH3 密码子优化的
[1111] <400> 74
[1112] gccgcttggt ctggcaacag cggcgggatg gatgtc 36
[1113] <210> 75
[1114] <211> 18
[1115] <212> DNA
[1116] <213> 人工序列
[1117] <220>
[1118] <223> HBC34 wt CDRL1 密码子优化的
[1119] <400> 75
[1120] aaactgggca acaagaac 18
[1121] <210> 76
[1122] <400> 76
[1123] 000
[1124] <210> 77
[1125] <211> 27
[1126] <212> DNA
[1127] <213> 人工序列
[1128] <220>
[1129] <223> HBC34 wt CDRL2 长密码子优化的
[1130] <400> 77

[1131] gtcactctacg aggtcaagta tcggcca 27
[1132] <210> 78
[1133] <211> 27
[1134] <212> DNA
[1135] <213> 人工序列
[1136] <220>
[1137] <223> HBC34 wt CDRL3 密码子优化的
[1138] <400> 78
[1139] cagacttgagg attcaactac tgtcgtg 27
[1140] <210> 79
[1141] <211> 5
[1142] <212> PRT
[1143] <213> 人工序列
[1144] <220>
[1145] <223> 连接体
[1146] <400> 79
[1147] Gly Gly Ser Gly Gly
[1148] 1 5
[1149] <210> 80
[1150] <211> 7
[1151] <212> PRT
[1152] <213> 人工序列
[1153] <220>
[1154] <223> 表位
[1155] <400> 80
[1156] Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
[1157] 1 5
[1158] <210> 81
[1159] <211> 7
[1160] <212> PRT
[1161] <213> 人工序列
[1162] <220>
[1163] <223> 表位
[1164] <400> 81
[1165] Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
[1166] 1 5
[1167] <210> 82
[1168] <211> 25
[1169] <212> PRT

[1170]	<213>	人工序列
[1171]	<220>	
[1172]	<223>	不连续表位模拟
[1173]	<220>	
[1174]	<221>	misc_feature
[1175]	<222>	(2) .. (2)
[1176]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1177]	<220>	
[1178]	<221>	misc_feature
[1179]	<222>	(21) .. (21)
[1180]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1181]	<220>	
[1182]	<221>	misc_feature
[1183]	<222>	(24) .. (24)
[1184]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1185]	<400>	82
[1186]	Cys Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Cys Ser Thr Thr	
[1187]	1	5 10 15
[1188]	Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys	
[1189]	20	25
[1190]	<210>	83
[1191]	<211>	28
[1192]	<212>	PRT
[1193]	<213>	人工序列
[1194]	<220>	
[1195]	<223>	不连续表位模拟
[1196]	<220>	
[1197]	<221>	misc_feature
[1198]	<222>	(4) .. (4)
[1199]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1200]	<220>	
[1201]	<221>	misc_feature
[1202]	<222>	(6) .. (6)
[1203]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1204]	<220>	
[1205]	<221>	misc_feature
[1206]	<222>	(24) .. (24)
[1207]	<223>	偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1208]	<220>	

[1209] <221> misc_feature
[1210] <222> (27) .. (27)
[1211] <223> 偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1212] <400> 83
[1213] Cys Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
[1214] 1 5 10 15
[1215] Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
[1216] 20 25
[1217] <210> 84
[1218] <211> 17
[1219] <212> PRT
[1220] <213> 人工序列
[1221] <220>
[1222] <223> 环状表位模拟
[1223] <220>
[1224] <221> misc_feature
[1225] <222> (13) .. (13)
[1226] <223> 偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1227] <220>
[1228] <221> misc_feature
[1229] <222> (16) .. (16)
[1230] <223> 偶联至乙酰胺基甲基的半胱氨酸
[1231] <400> 84
[1232] Cys Gly Gly Gly Cys Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
[1233] 1 5 10 15
[1234] Cys
[1235] <210> 85
[1236] <211> 11
[1237] <212> PRT
[1238] <213> 人工序列
[1239] <220>
[1240] <223> 表位
[1241] <400> 85
[1242] Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
[1243] 1 5 10
[1244] <210> 86
[1245] <211> 15
[1246] <212> PRT
[1247] <213> 人工序列

[1248] <220>
[1249] <223> 表位
[1250] <400> 86
[1251] Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
[1252] 1 5 10 15
[1253] <210> 87
[1254] <211> 14
[1255] <212> PRT
[1256] <213> 人工序列
[1257] <220>
[1258] <223> 表位
[1259] <400> 87
[1260] Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
[1261] 1 5 10
[1262] <210> 88
[1263] <211> 5
[1264] <212> PRT
[1265] <213> 人工序列
[1266] <220>
[1267] <223> 表位
[1268] <220>
[1269] <221> misc_feature
[1270] <222> (4) .. (4)
[1271] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[1272] <400> 88
[1273] Pro Cys Arg Xaa Cys
[1274] 1 5

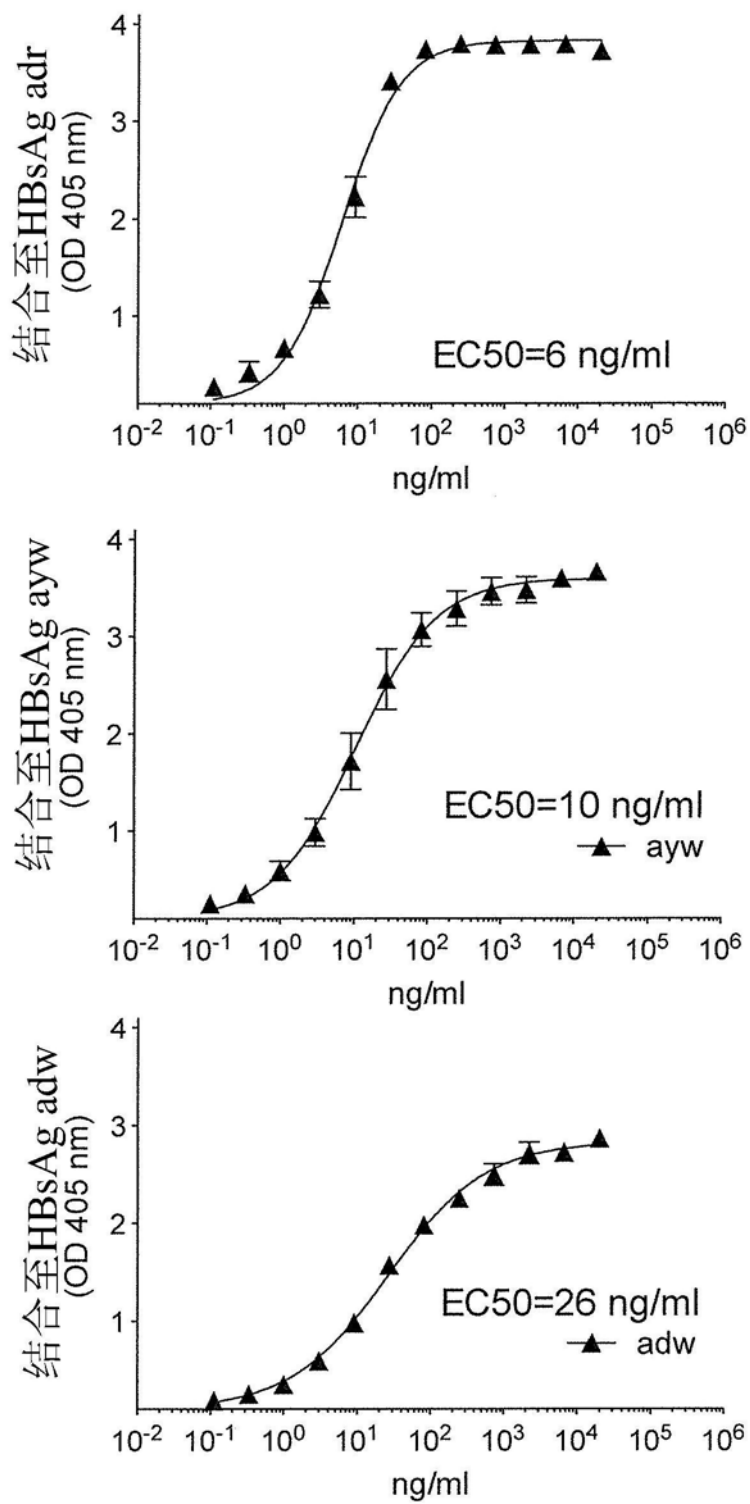


图1

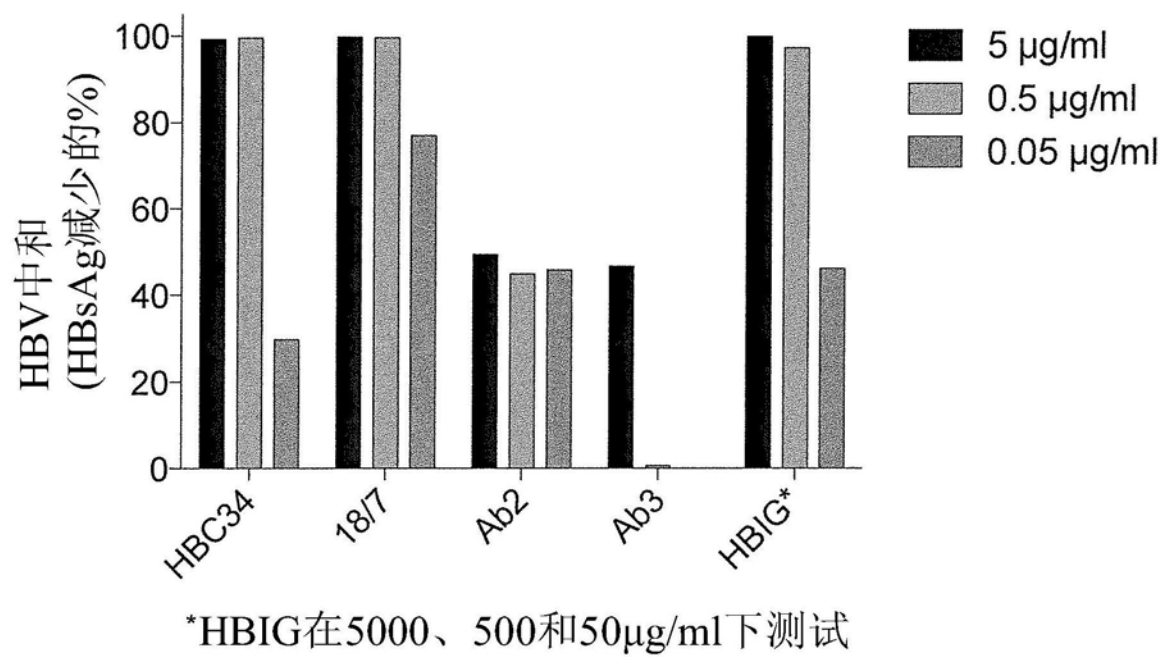


图2

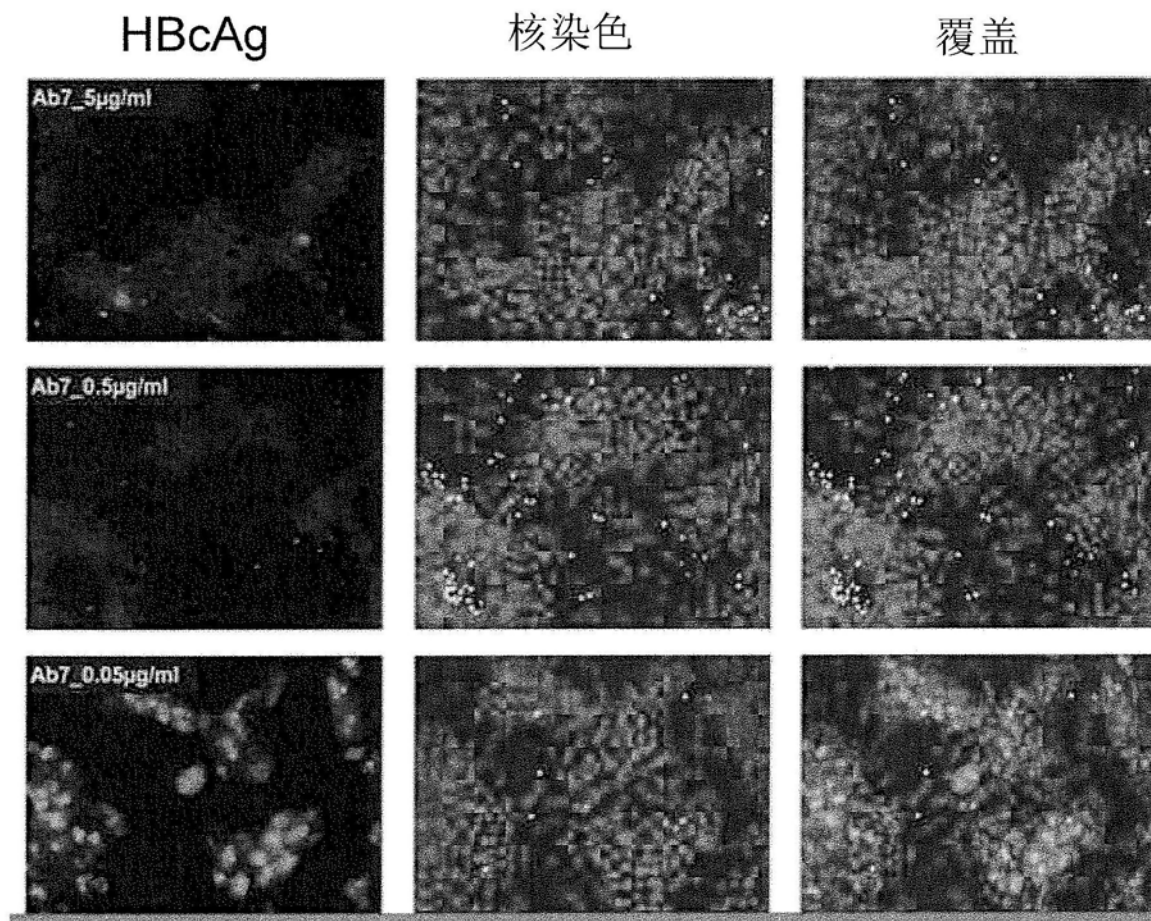


图3

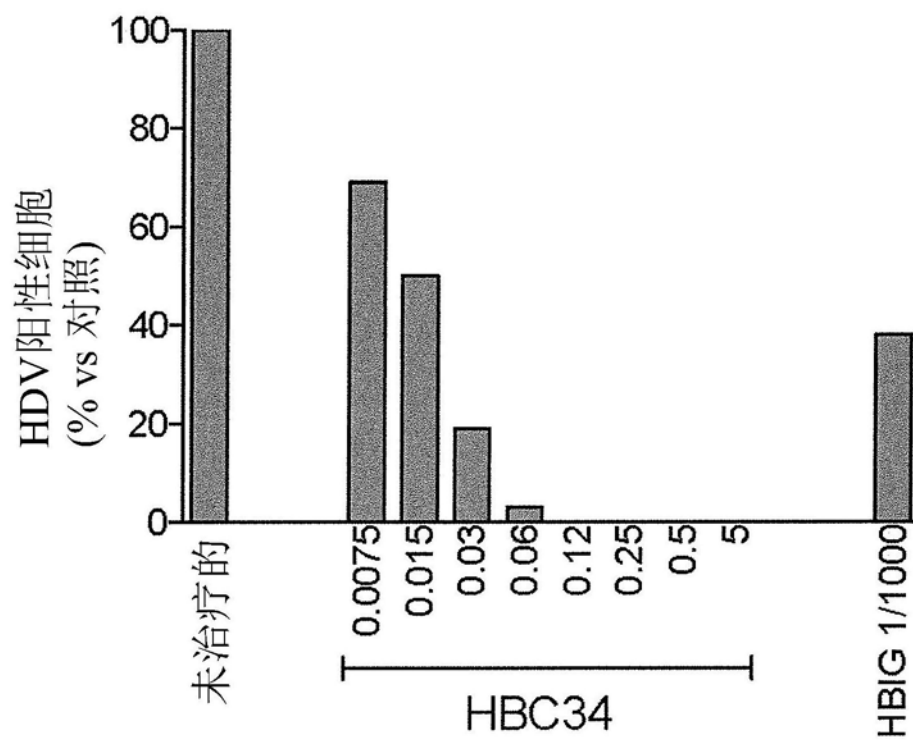


图4

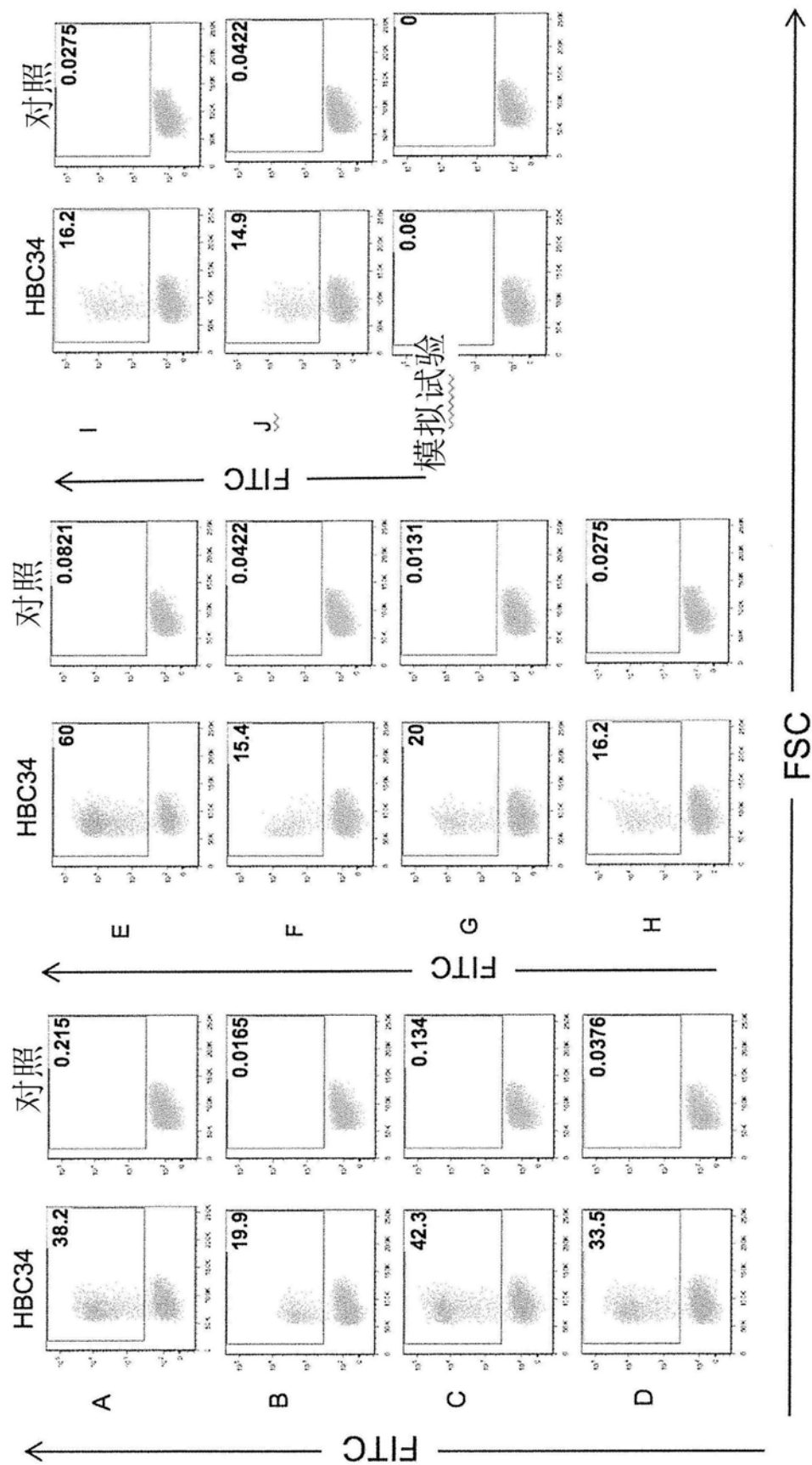


图6

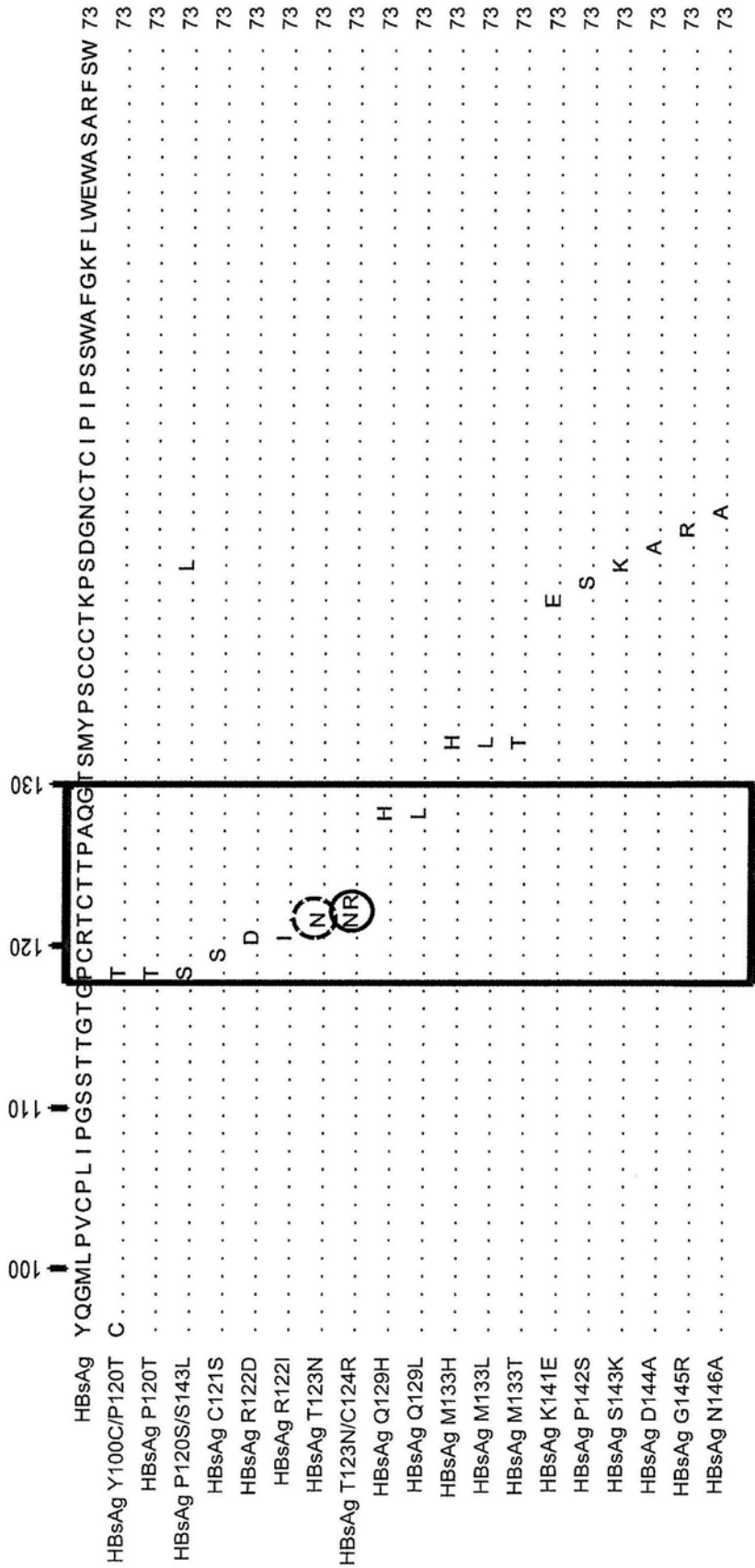


图7

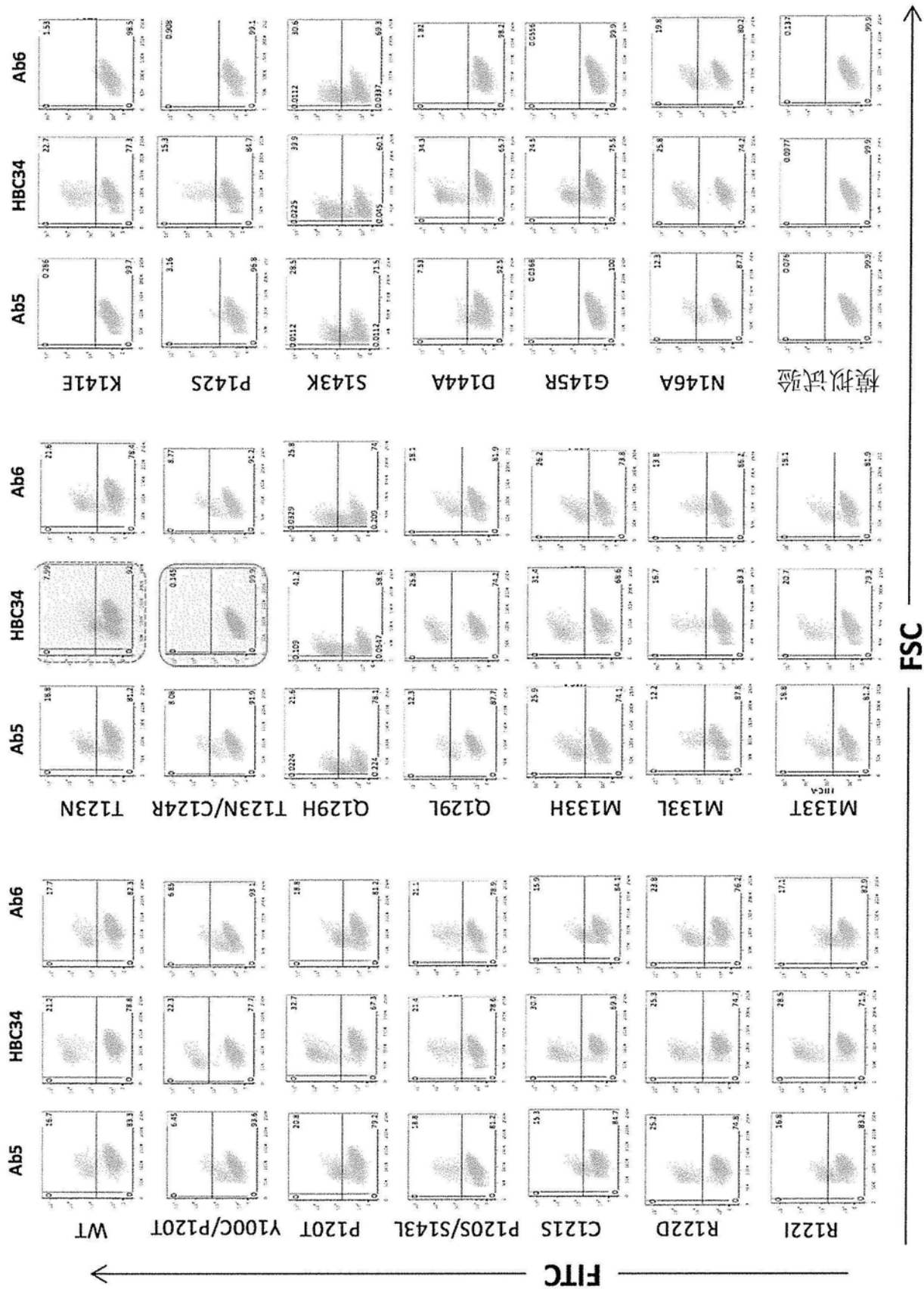


图8

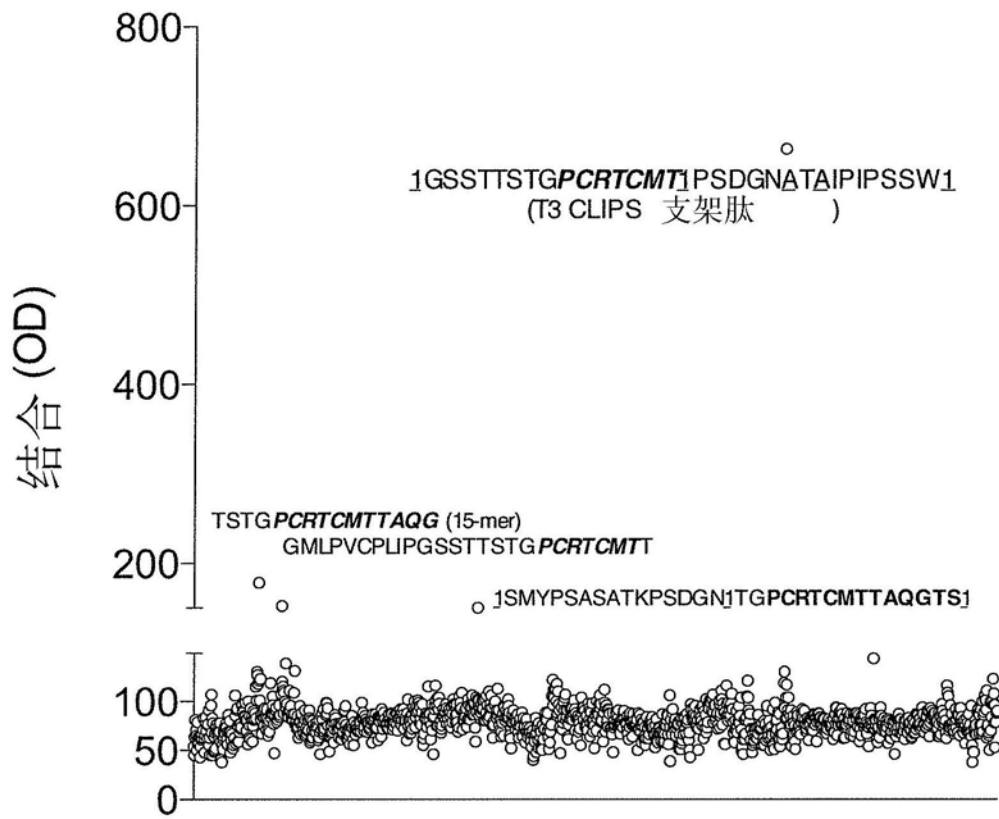


图9

mab 8 7

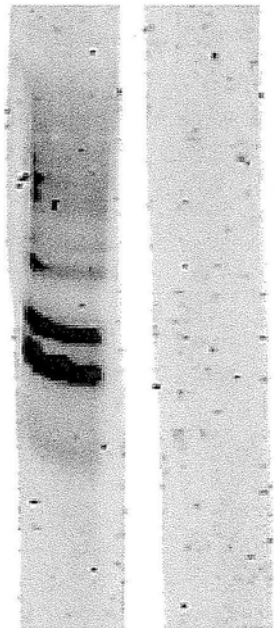


图10

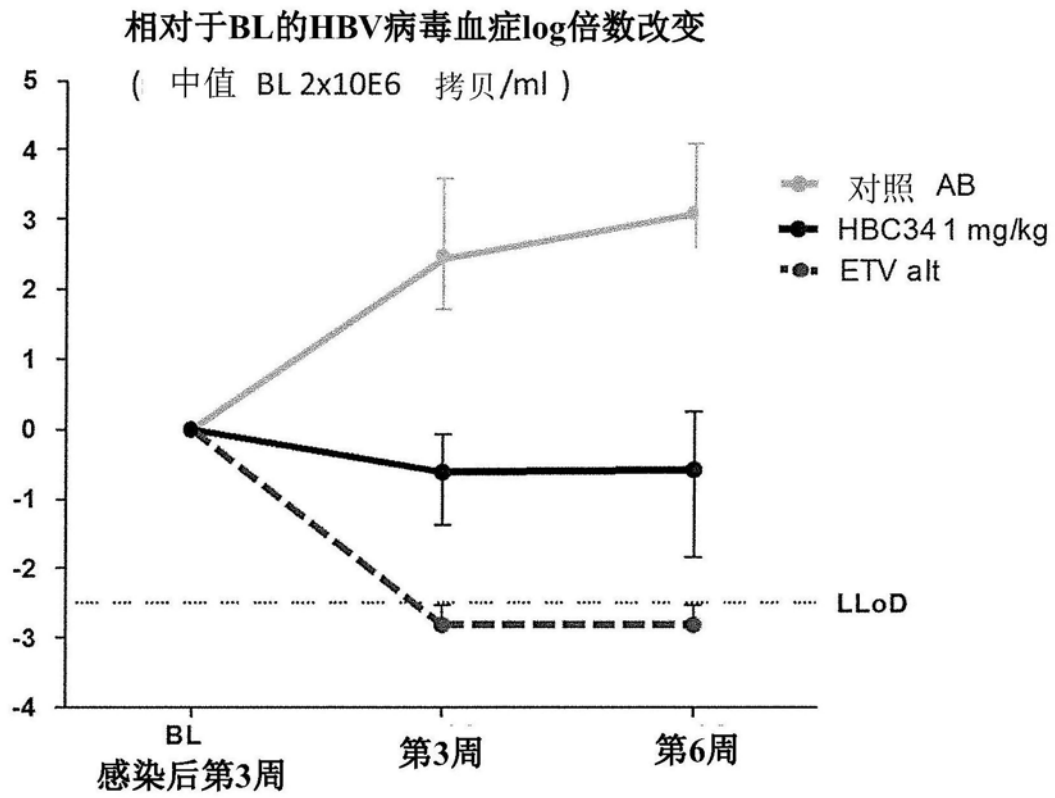


图11

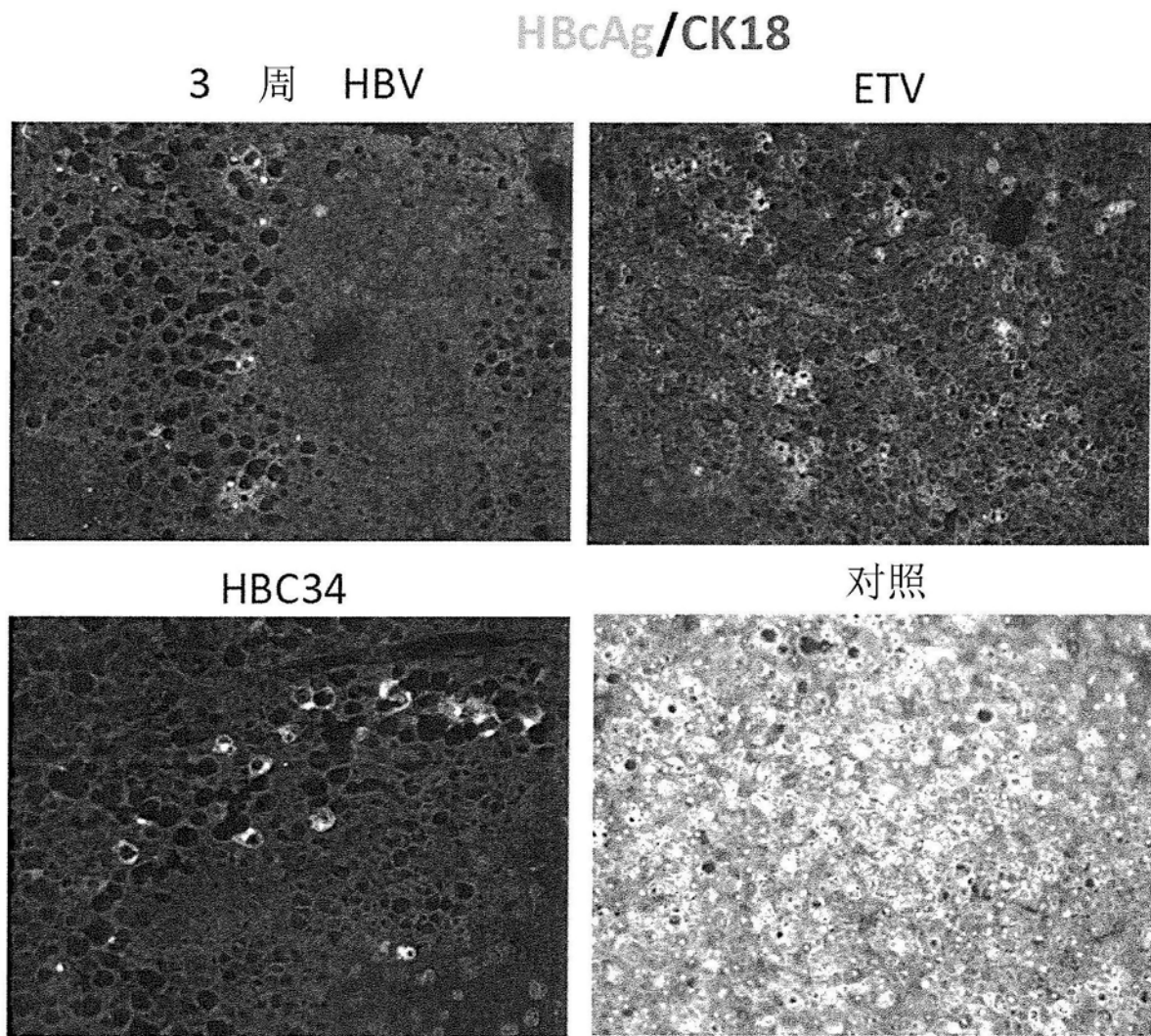


图12

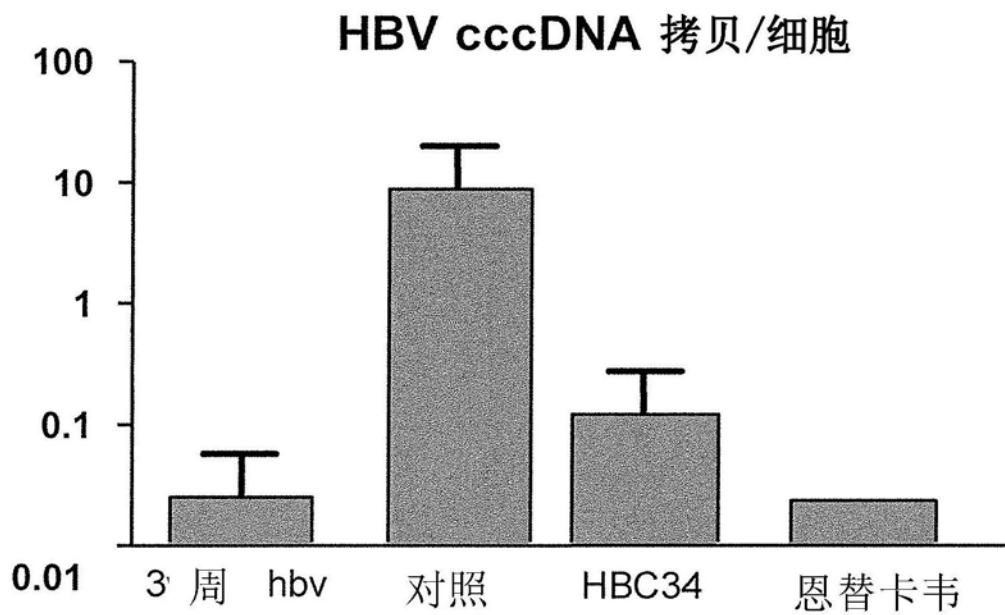


图13

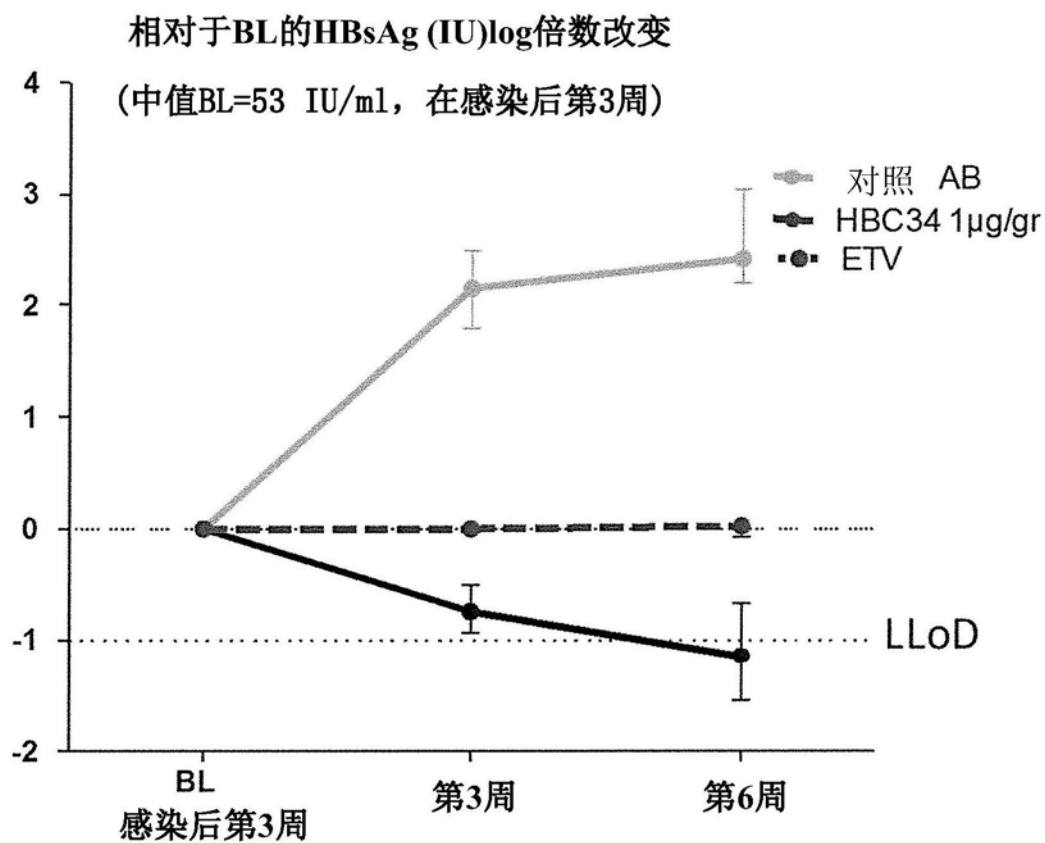


图14

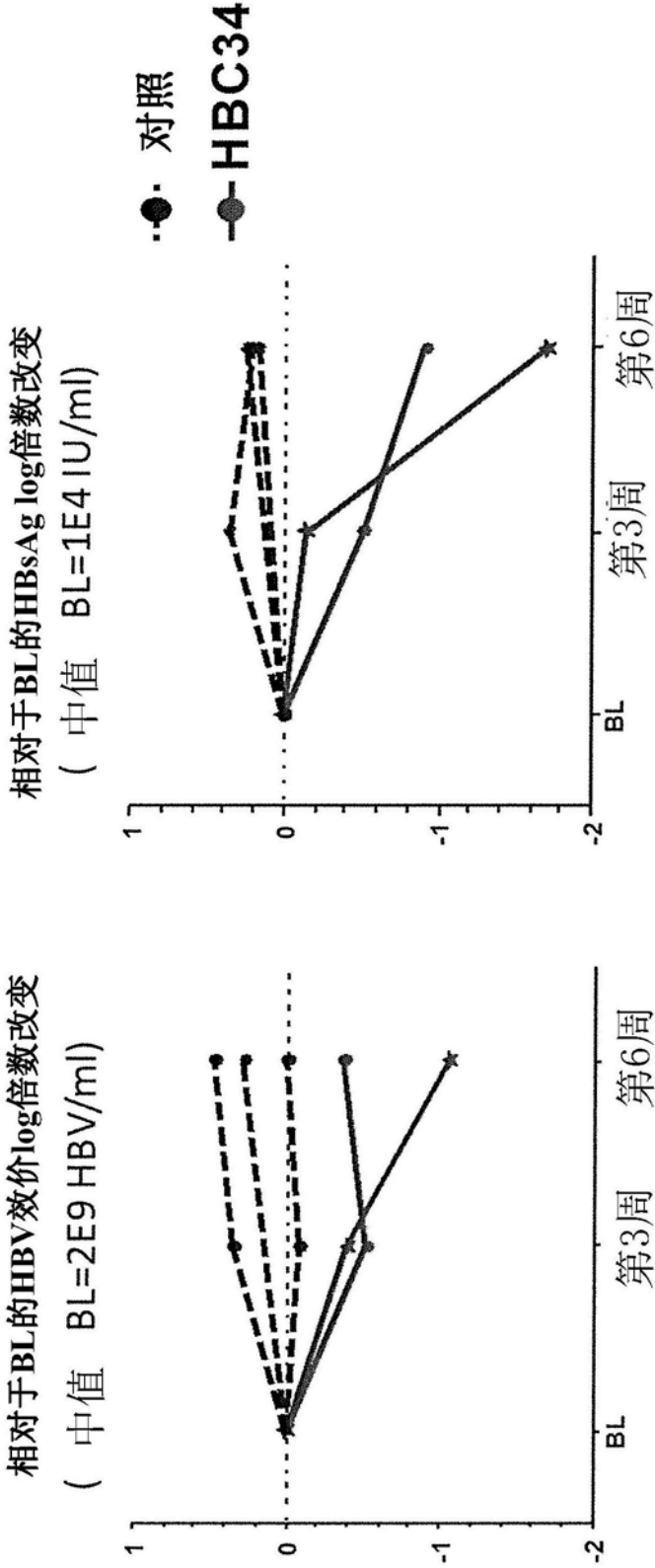


图15

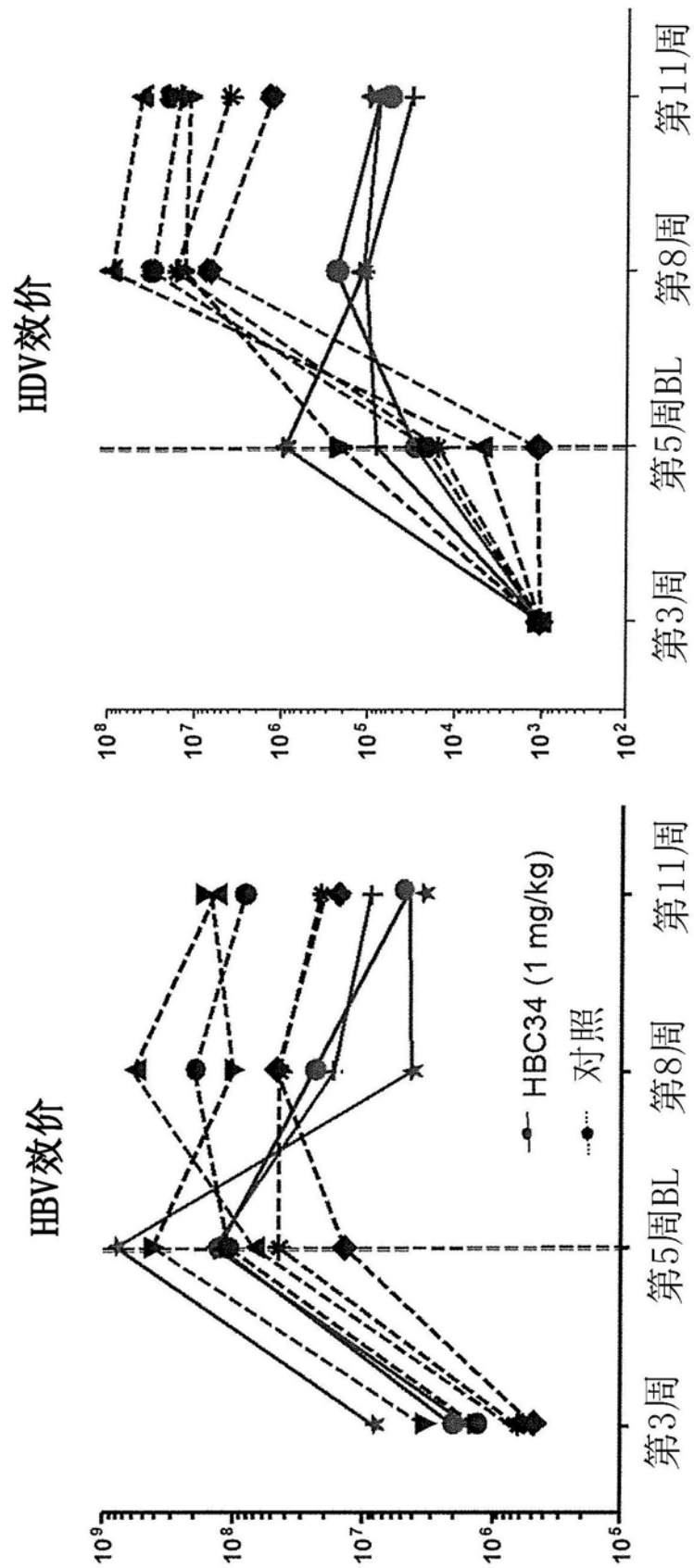


图16

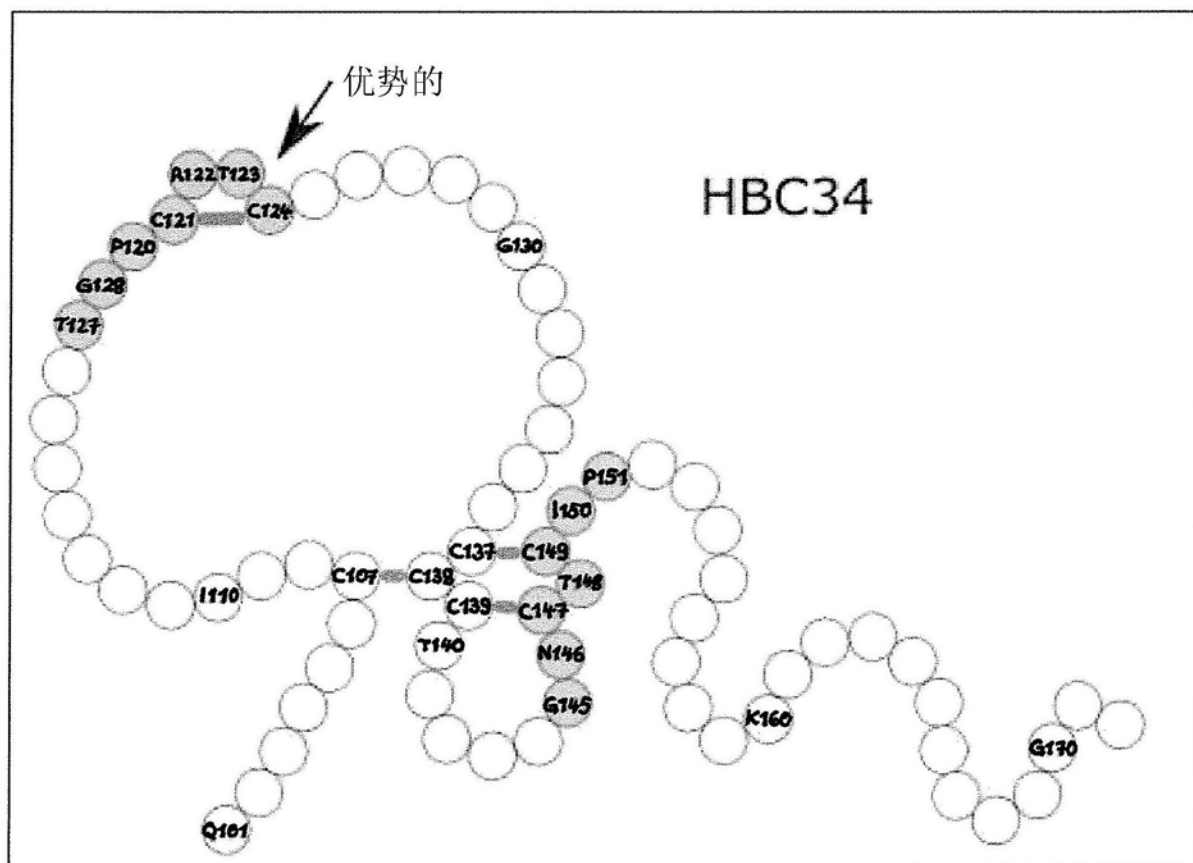
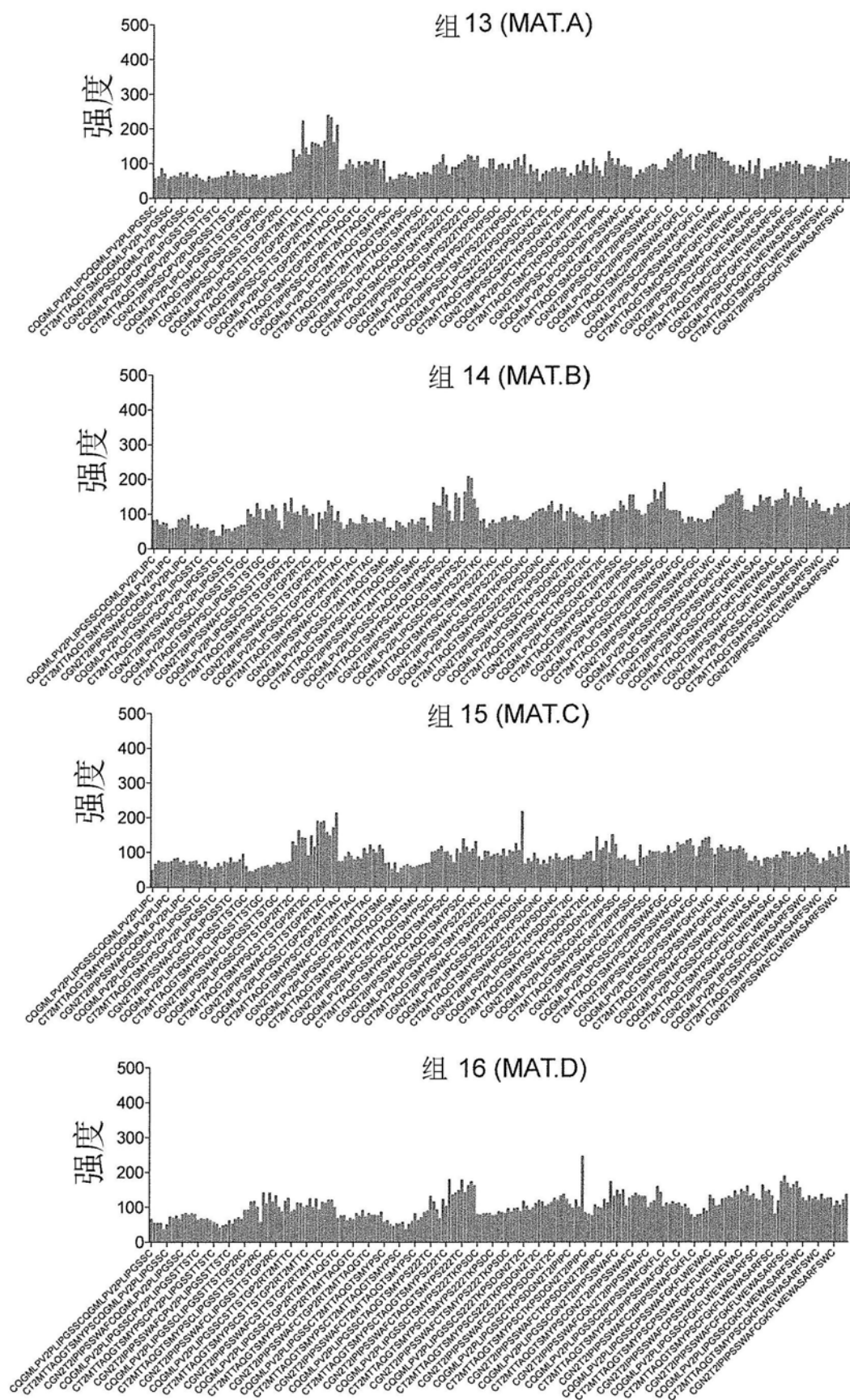
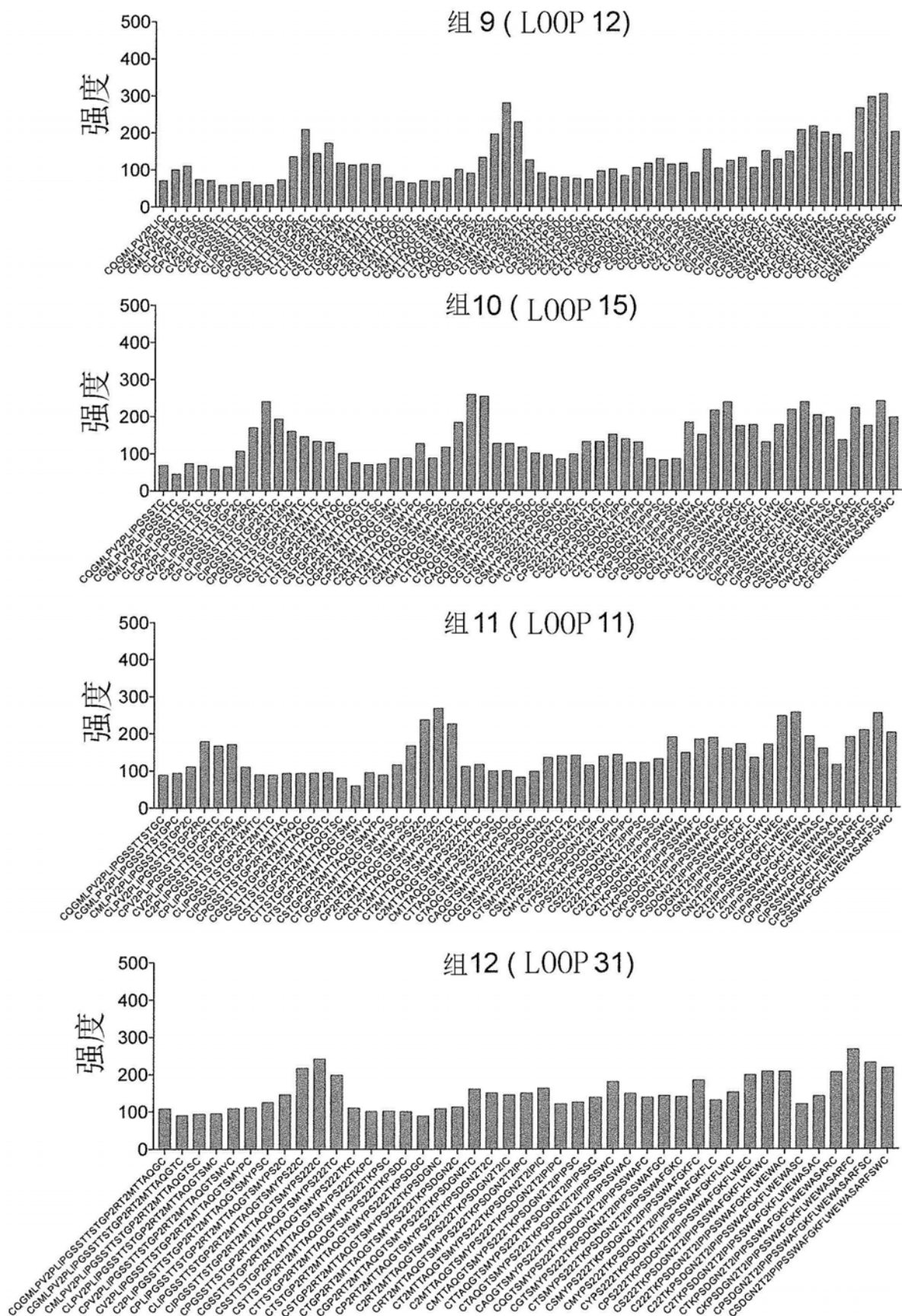


图17





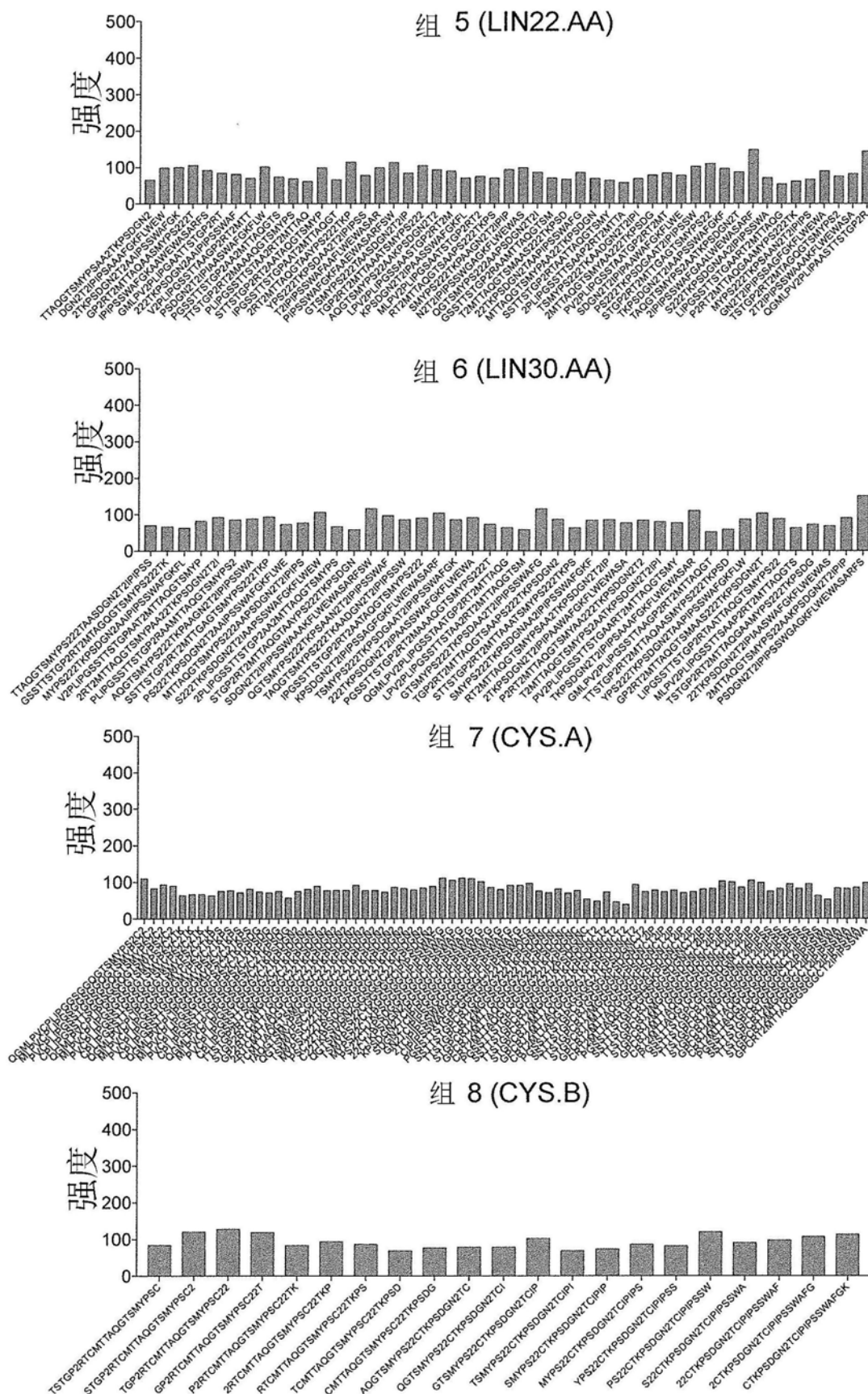


图17(续)

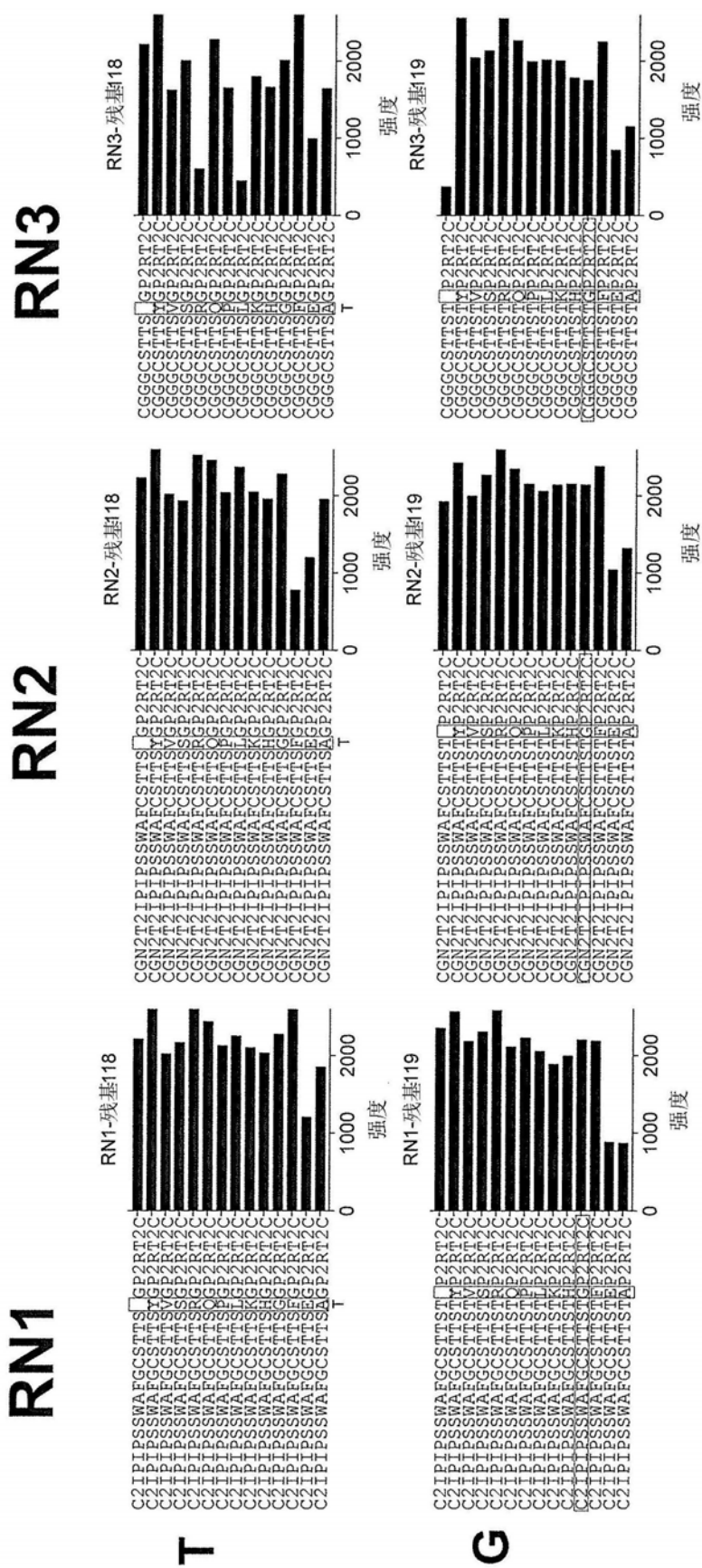


图18

图18 (续)

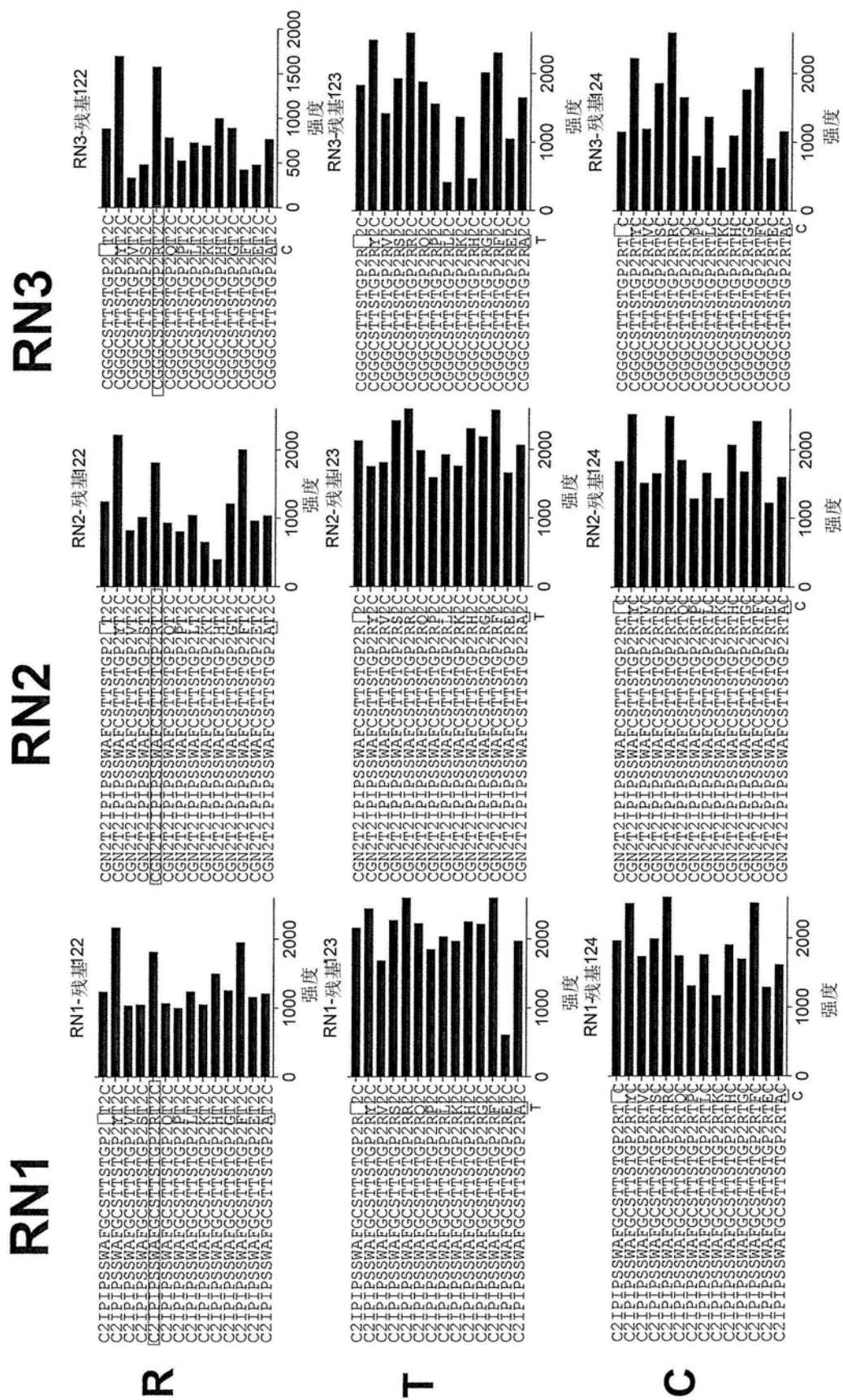


图18 (续)

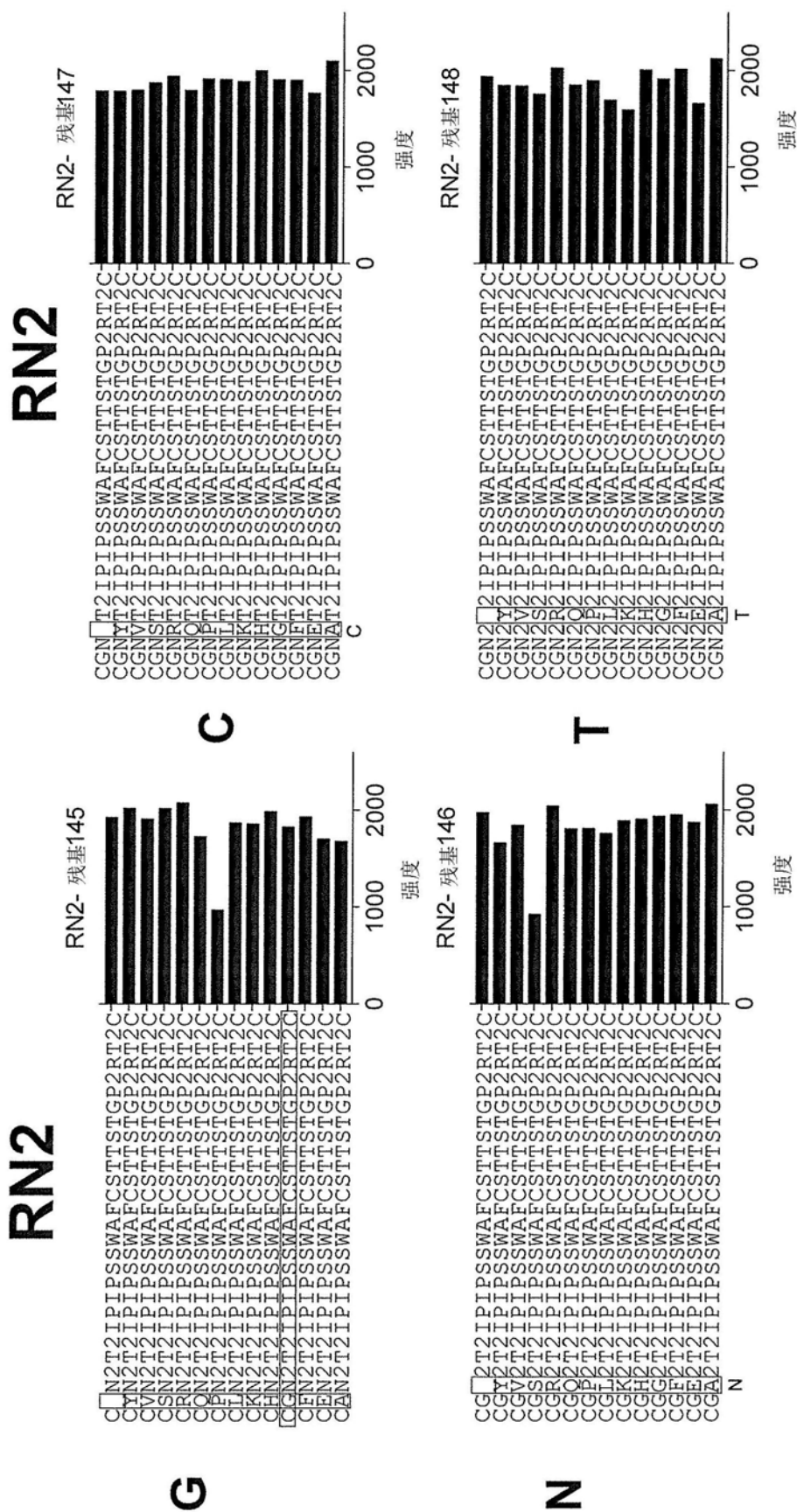


图18 (续)

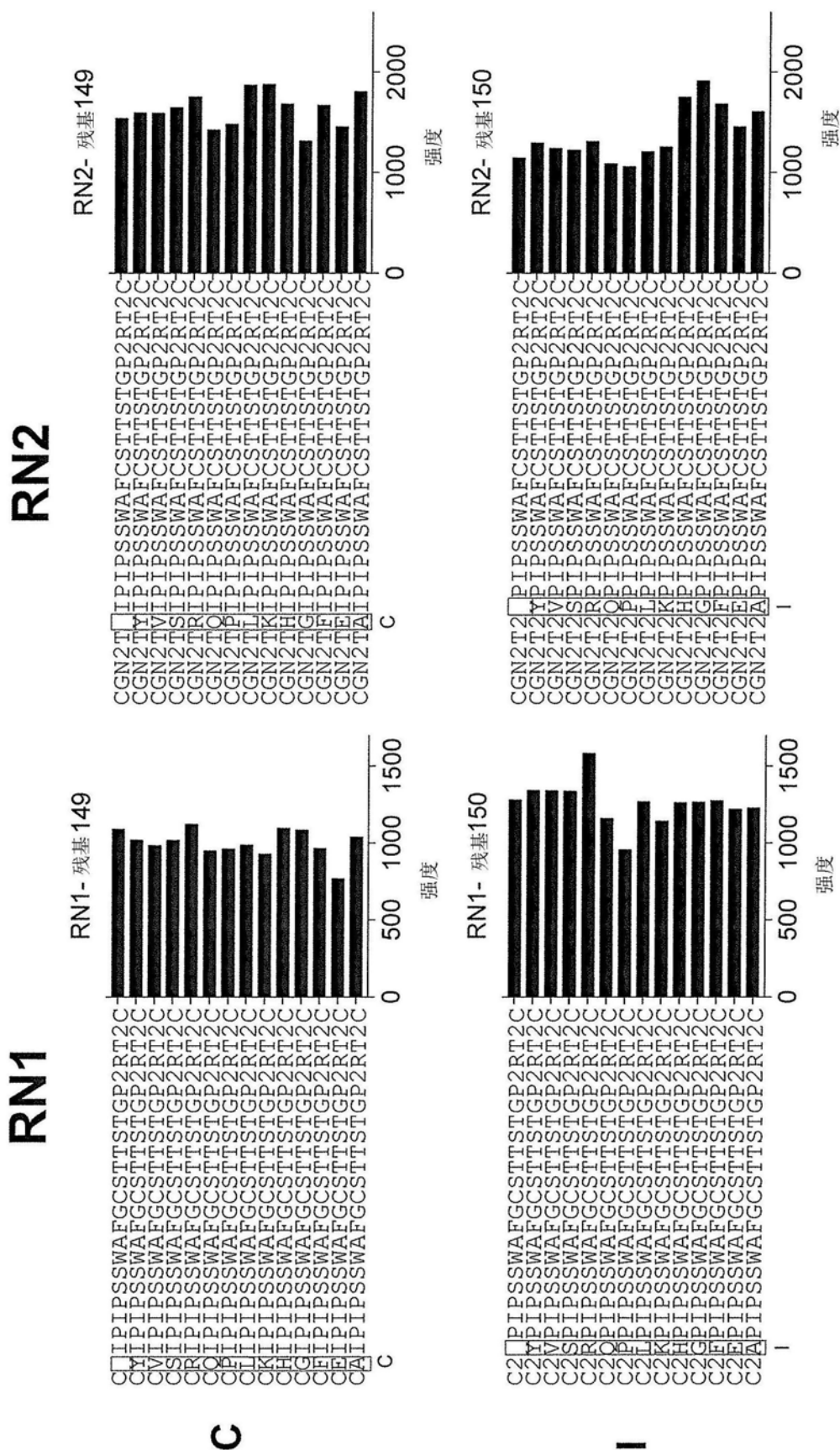


图18(续)

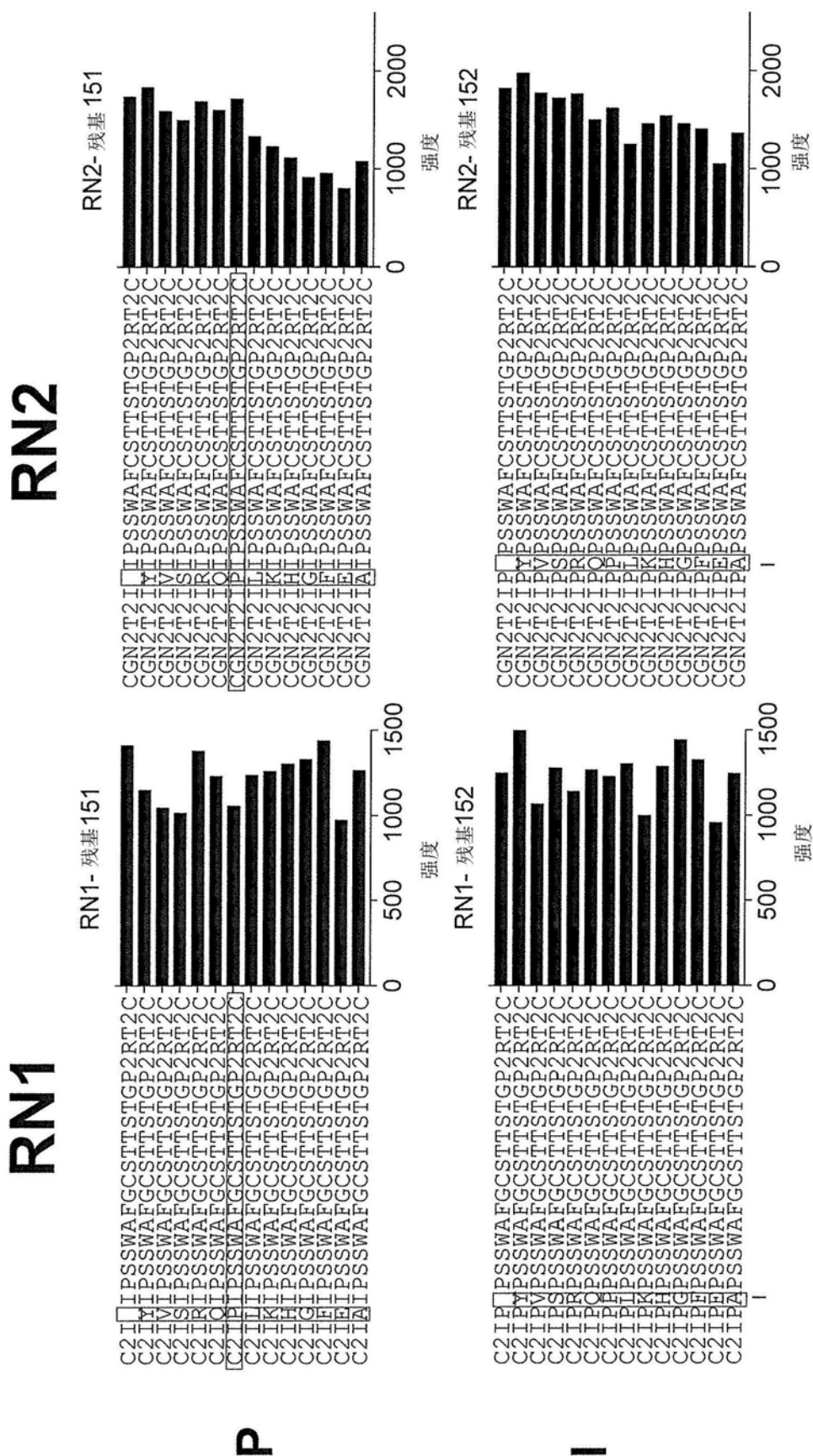


图18 (续)

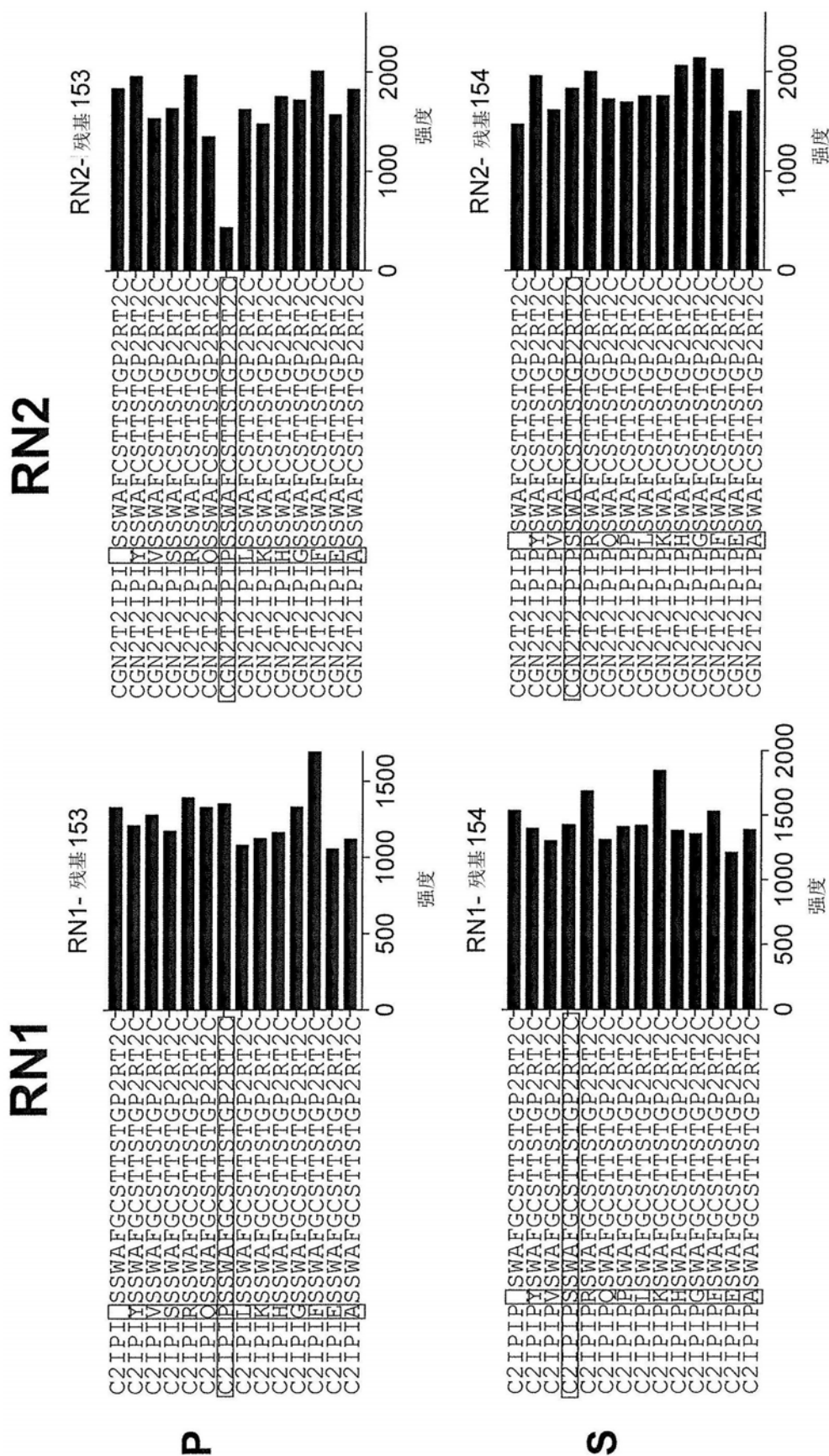


图18 (续)

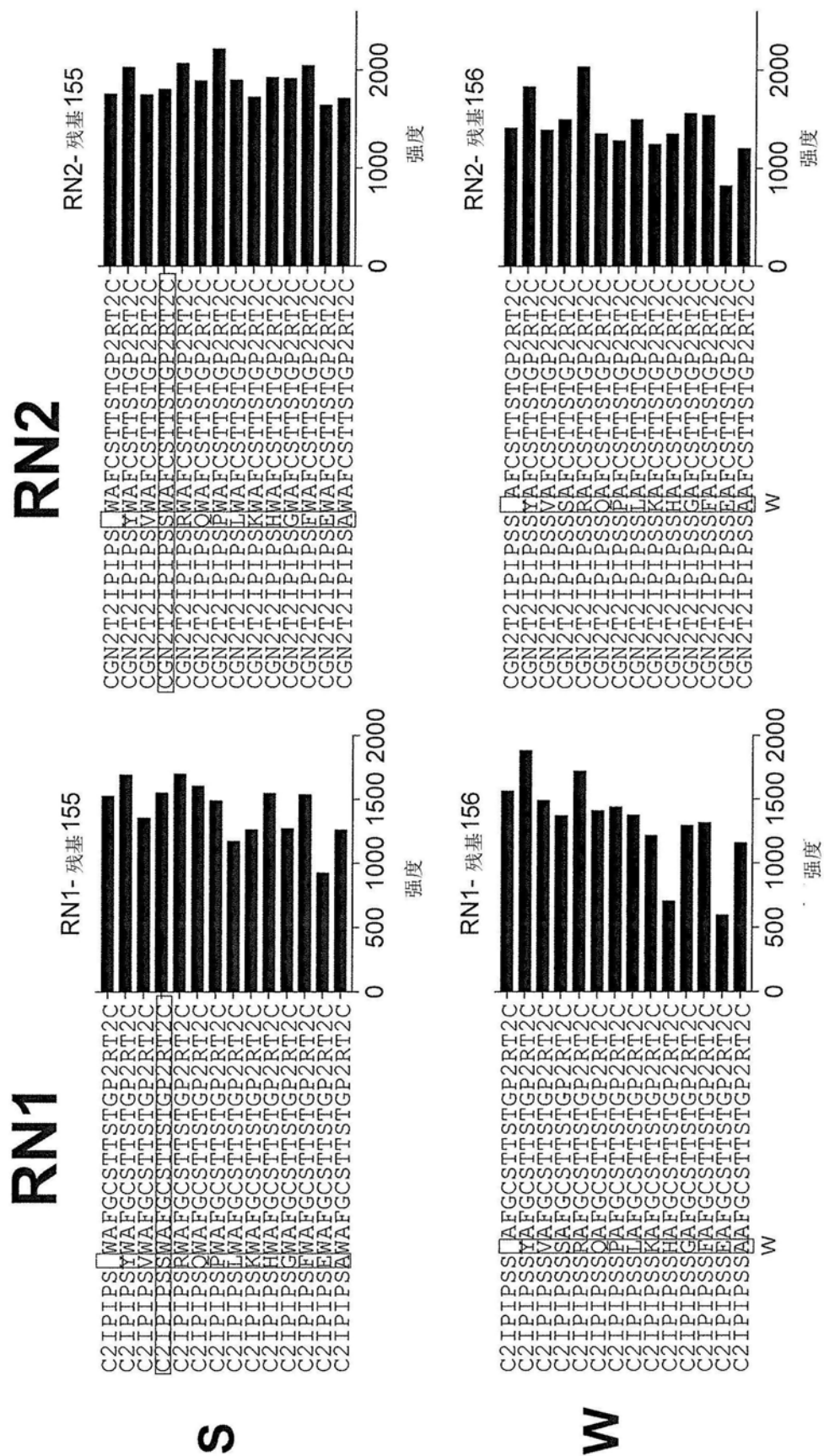


图18 (续)

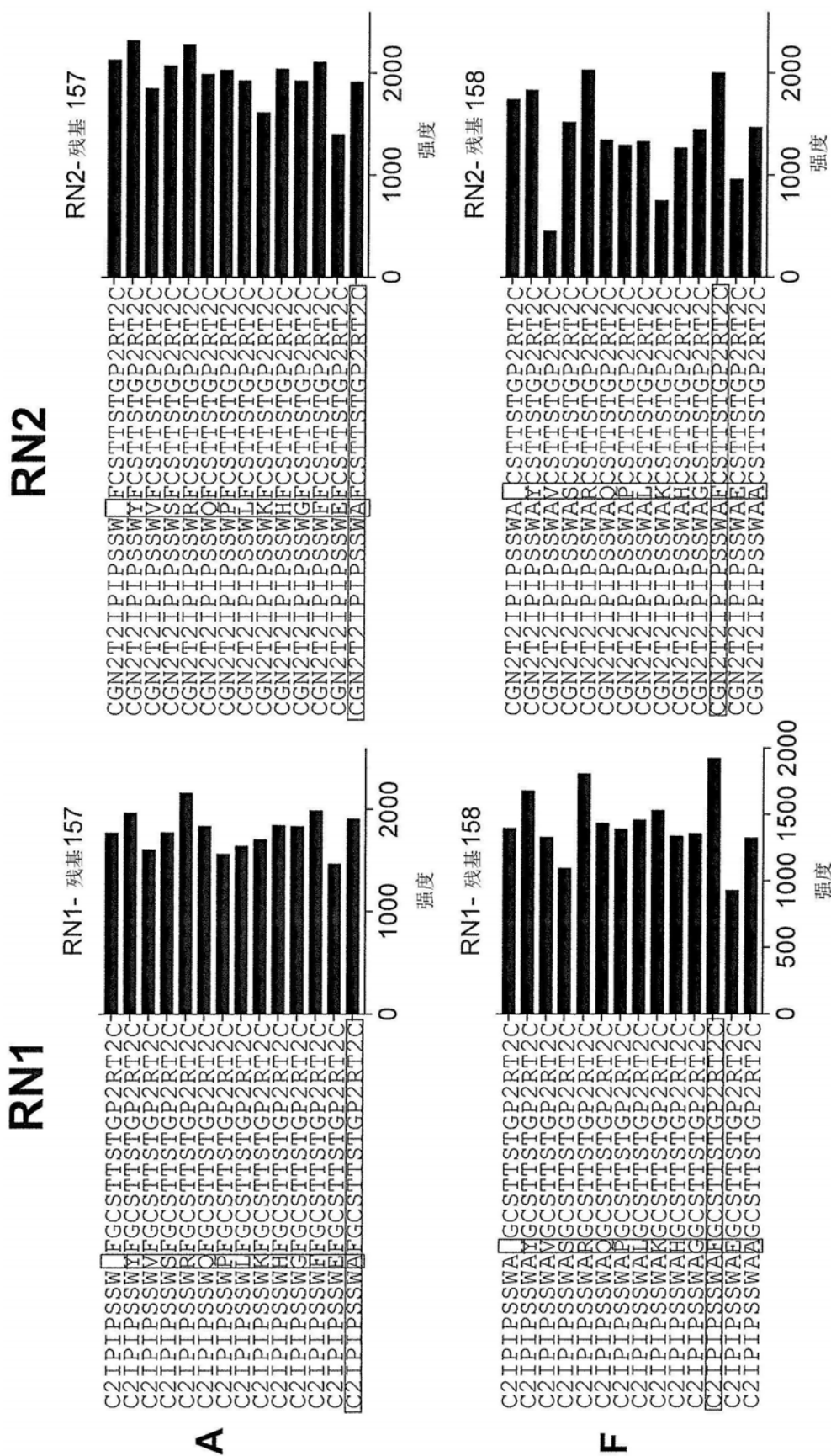


图18(续)

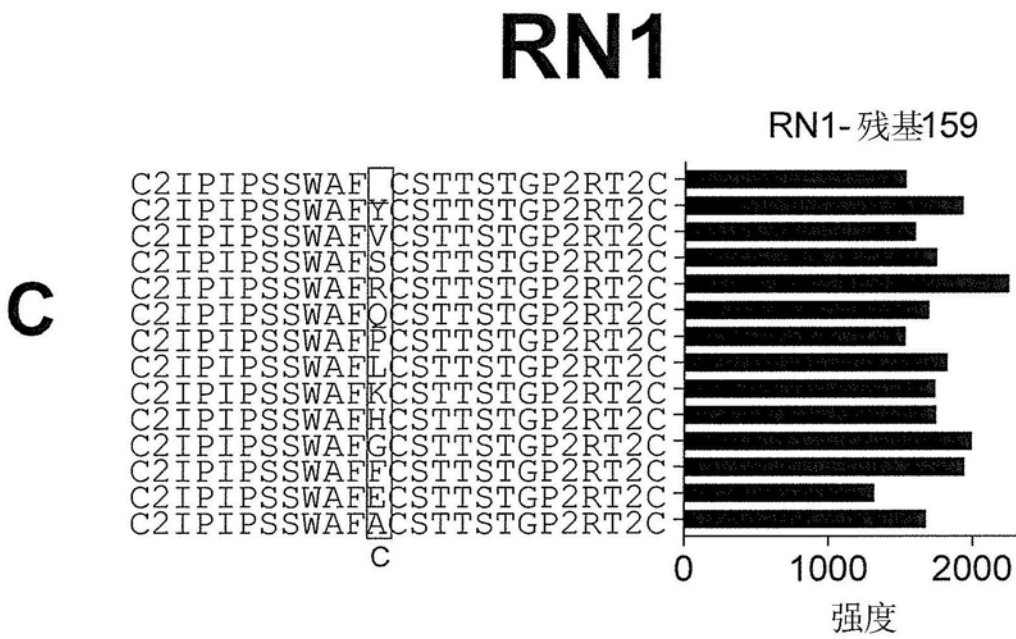


图18 (续)

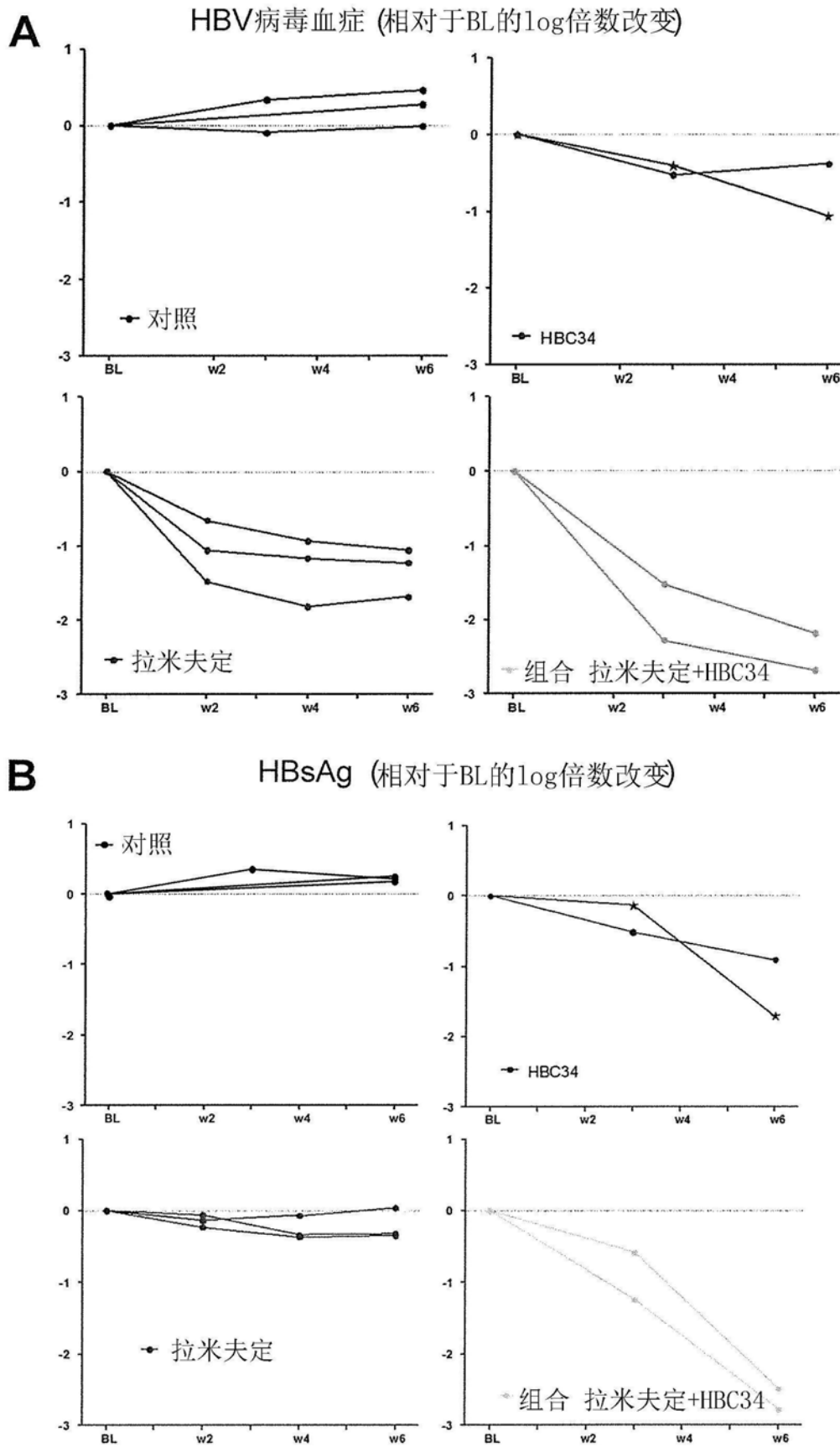


图19

A

VH-WT	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSLCAASGR	I	FRSFYMSWVRQAPGKGL	EWAT	I	NODGSEK	LYVDSV	KGRFT	I	SRDNAKNSLFLQMN	LRVEDTAVYYCAAWSNGSGMDV	WGSGTTVSVSS	119
VH-M115I													119
VH-M115L													119
VH-W107A													119
VH-W107A/M115A													119
VH-W107F													119
VH-M115J/FR124GL	.V												119
VH-M115J/FR1234GL	.V												119
VH-FR124GL	.V												119
VH-UCA	.V												119

B

VL-WT	SYELTQPPSVSVSPGQTYS	I	PCSGDKLGNKNVCWFQHKPGQSPVLV	I	YEVKYP	SGI	PERFSGNSGNTAT	LT	I	SGTQAMDEAAYFCQTWDSTTVV	FGGTRLTVL	106
VL-W107A												106
VL-W107F												106
VL-W107F/FR1234GL												106
VL-W107F/FR1234GL/Y66												106
VL-UCA												106

图20

变体名称	VH	VL	结合至 HBsAg (adw)
HBC34	WT	WT	+
HBC34-V1	W107F	WT	+/-
HBC34-V2	W107F	W107A	-
HBC34-V3	W107F	W107F	+/-
HBC34-V4	M115I	W107F	+/-
HBC34-V5	W107A	W107F	-
HBC34-V6	M115L	W107F	+/~
HBC34-V7	WT	W107F	+
HBC34-V8	W107A/M115A	W107F	-
HBC34-V9	W107A/M115A	W107A	-
HBC34-V10	W107A/M115A	WT	-
HBC34-V11	M115I	WT	+/~
HBC34-V12	W107A	WT	-
HBC34-V13	M115L	WT	+
HBC34-V15	WT	W107A	+/~
HBC34-V16	M115L	W107A	+/-
HBC34-V17	W107A	W107A	-
HBC34-V18	M115I	W107A	+/-

图21

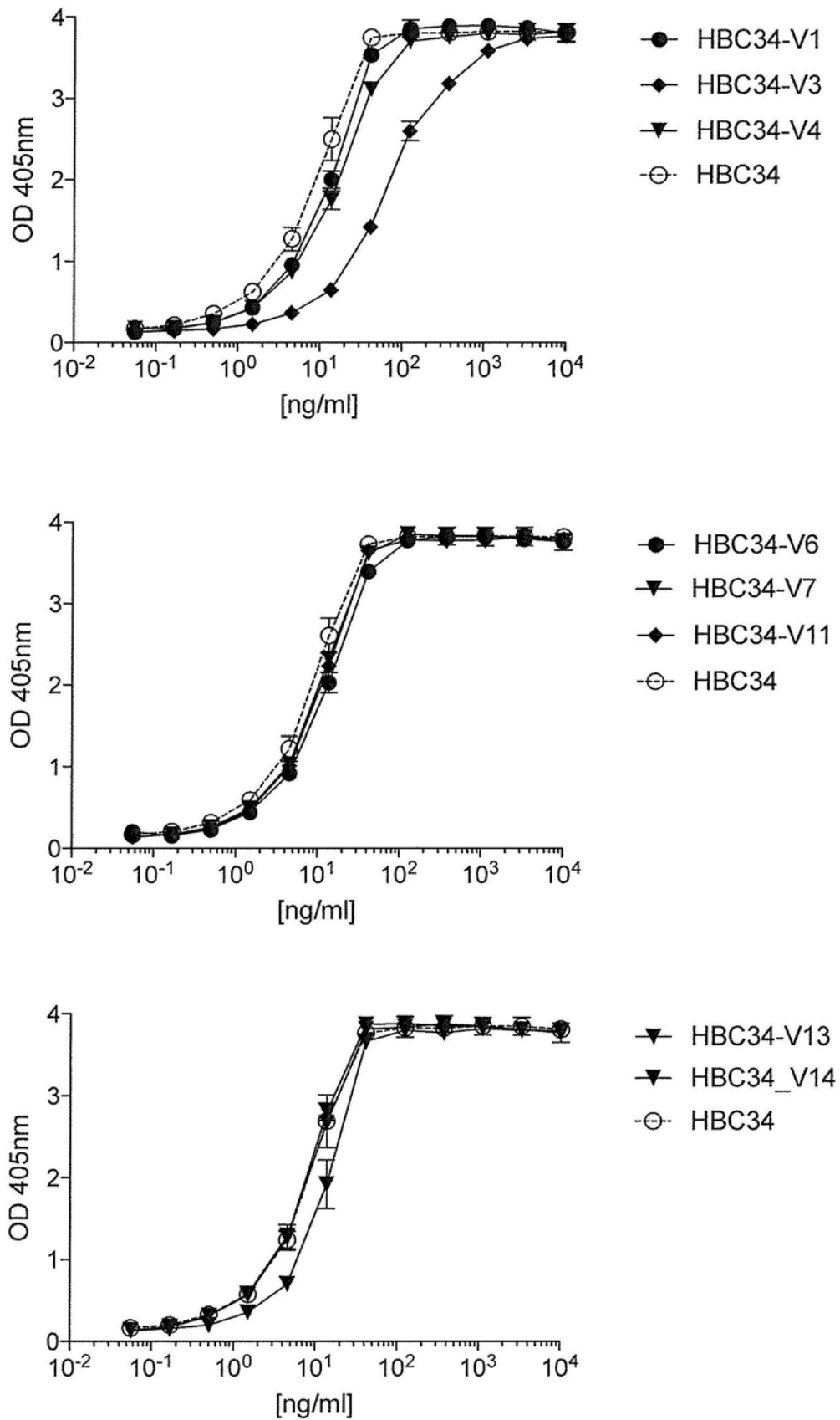


图22

变体名称	VH	VL	结合 EC50	倍数改变 (突变体/wt)	生产力 ($\mu\text{g/ml}$)	倍数改变 (突变体/wt)
HBC34	WT	WT	7,7	1,0	318	1,00
HBC34-V1	W107F	WT	12,8	1,6	79	0,25
HBC34-V3	W107F	W107F	69,4	9,0	64	0,20
HBC34-V4	M115I	W107F	15,7	2,0	112	0,35
HBC34-V6	M115L	W107F	12,7	1,6	103	0,32
HBC34-V7	WT	W107F	10,4	1,3	533	1,68
HBC34-V11	M115I	WT	10,8	1,4	195	0,61
HBC34-V13	M115L	WT	8,0	1,0	106	0,33

图23

A

变体名称	VH修饰	VL修饰	EC50	倍数改变 (突变体/wt)	生产力 ($\mu\text{g/ml}$)	倍数改变 (突变体/wt)
HBC34	WT	WT	13,3	1,0	197	1,00
HBC34-V6	M115L	W107F	16,5	1,2	35	0,18
HBC34-V7	WT	W107F	18,6	1,4	232	1,18
HBC34-V13	M115L	WT	12,0	0,9	46	0,23
HBC34-V19	M115L/FR124GL	WT	18,9	1,4	37	0,19
HBC34-V20	M115L/FR1234GL	WT	31,8	2,4	145	0,73
HBC34-V21	M115L/FR124GL	W107F	607	45,6	28	0,14
HBC34-V22	M115L/FR1234GL	W107F	419	31,4	110	0,56
HBC34-V23	WT	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	20,1	1,5	184	0,93
HBC34-V24	M115L	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	24,0	1,8	27	0,14
HBC34-V25	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	492	36,9	26	0,13
HBC34-V26	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	125	9,4	93	0,47
HBC34-V27	WT	W107F/FR1234GL	2022	151,8	270	1,37
HBC34-V28	M115L	W107F/FR1234GL	2037	152,9	29	0,15
HBC34-V29	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	36	0,18
HBC34-V30	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	101	0,51

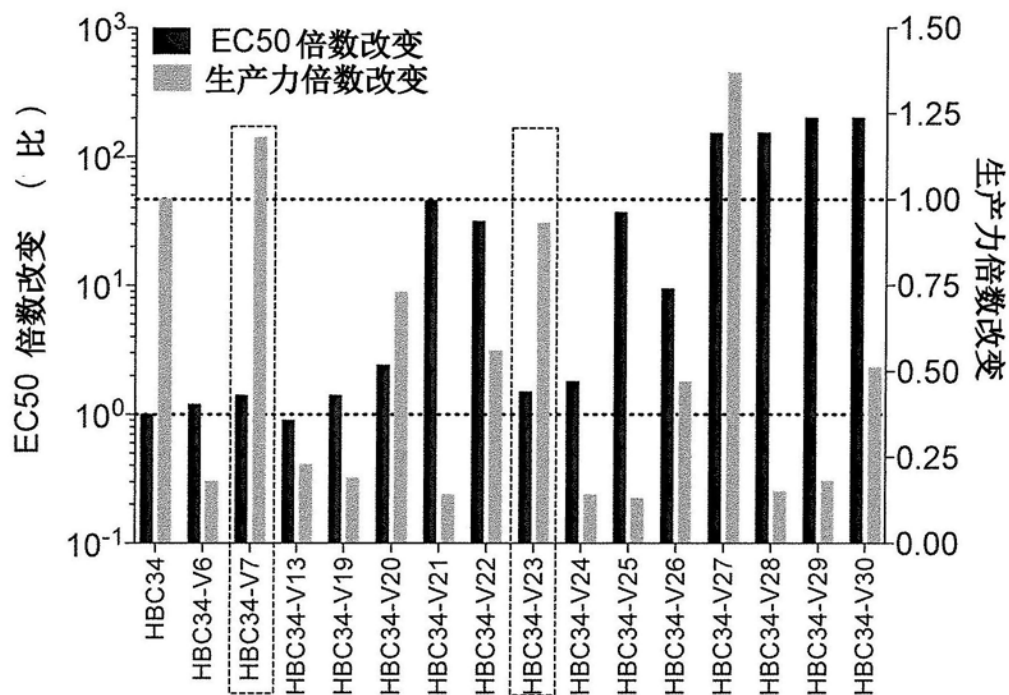
B

图24

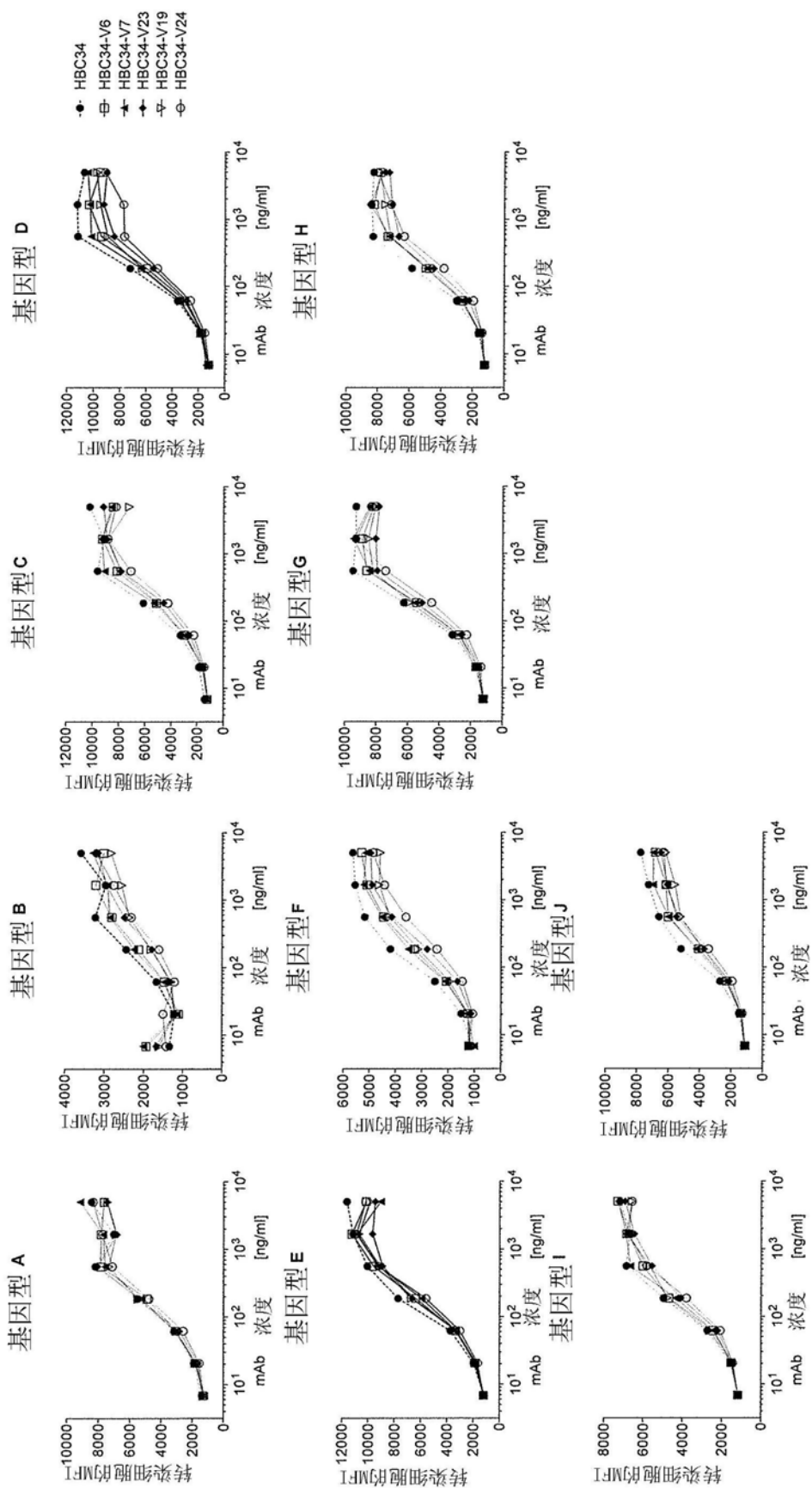


图25