



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I448552 B

(45) 公告日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 11 日

(21) 申請案號：100125171

(22) 申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 15 日

(51) Int. Cl. : C12N15/12 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(71) 申請人：中央研究院 (中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72) 發明人：吳漢忠 WU, HAN CHUNG (TW)；李璧君 LI, PI CHUN (TW)；廖美英 LIAO, MEI YING (TW)；邱倩玉 CHIU, CHIEN YU (TW)

(74) 代理人：洪堯順

(56) 參考文獻：

Wu, HC, et al., Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. 2003, J Gen Virol 84, 2771-2779.

Lai CY, et al., Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. 2008, J Virol 82: 6631-6643.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：2 共 0 頁

(54) 名稱

抗登革病毒抗體

ANTI-DENGUE VIRUS ANTIBODIES

(57) 摘要

在此提供專一於登革病毒之單株抗體，以及其抗原結合片段與功能性變體。同時揭露其用於治療或診斷登革病毒感染之用途。

Provided herein are monoclonal antibodies specific to dengue virus as well as their antigen-binding fragments, and functional variants. Also disclosed are uses thereof for treating or diagnosing dengue virus infection.

(A)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DB2-3	EVQLQQSGAELVRFPGVSVKISCKGSG	YTFDYAIT	WVKESNAKSLLEWI	GLISTYYGDSFYNQKFKG
DB13-19	EVKLVESGGGLVRFPGGSLKLSCATSG	FTFSTYGM	WVRQTPEERLEWV	ATISGGGSITYYFDTVKGRF
DB23-3	EVQLQQSGSELVRFPGVSVKISCKGSG	YTFDYAH	WVRQSHDESLEWI	GLISTYYGVSYNQKFKGKA
DB25-2	QVQLKESGPGLVRFPGSLSITCTVSG	FSLTDYGVH	WIRQSPGKSLWLG	VIWRGGITDYHAAFMS
DB32-6	QVQLQOSGAEELVRFPGASVKLSCTASG	FNIKDTYIH	WVKQHPGQGLEWI	GRIDPENGNKRYDPNFOAKA
DB42-3	EVKLVESGGDLVRFPGGSLKLSCAASG	FTFSNFAMS	WVRQTPEERLEWV	ATIGGGGDSYFPDSYKGRF

	FR3	CDR3	FR4
DB2-3	KATMTVDKRSRTAYNHLARLTSEDSAIYYC	TIRDGKGMNDY	WGQGTSTVTS
DB13-19	TISRDNAENNLVLMSSLRSEDFTALYYC	ASYNYGGFAY	WQGGTLVSVSAAKTTPPSDYPLA
DB23-3	TTVDKSSSTAYLELARLTSEDSAIYYC	ARLGDFADY	WQGGTSTVSVSAKTTPPSDYPLA
DB25-2	RLSITKDNSESQVFFKMSLQPDSDAIYYC	AKNFGHYGSGNYGNFDY	WGQGTSTLTVTS
DB32-6	TIADTSSNTAYLHLSSLYSEDTAVYYC	VRTGSPWFYFDV	WGA GTTVTVTS
DB42-3	TISRDNARNILVLMSSLRSDDTAMYFC	TREGGDDQYYSNDY	WQGGTSTVSVSAKTTPPSDYPLA

(B)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DB2-3	DVYMTQTFLSLPVSIGDLASIS	RSSQSLVHNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS
DB13-19	DIVMTQSHFEMSTSYGDRVSI	KASQDVGIAVA	WYQKPRQSPKLLIY	WASTRHT
DB23-3	DVLTQTFLSLPVSIGDQASIS	RSSQSVVHNGNTYLE	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS
DB25-2	VVMTQTFFKFLVLSAGDEVITC	KASQSVSNDVA	WYQKPGQSPKLLIY	YVSNRYS
DB32-6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	RASESVDKYGITFLH	WFQKPGQSPKLLIH	SASNRGS
DB42-3	QAVVVTQESALTTSEGETVITC	RGETCAVPTGNYAH	WVQEKFDRLFNGLIG	GTNERRAP

	FR3	CDR3	FR4
DB2-3	GVPDRFSGSGSTFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPYT	GGG T K L E I K
DB13-19	GVPDRITGSGSDTLTINNVQSEDLADYFC	QQFNSIFLT	FGGKLEIKRADAAPT
DB23-3	GVPDRFSGSGSDTFTLKISRVEAEDLGVYFC	FQGENFPRT	FGGKLEIKRADAAPT
DB25-2	GVPDRITGSGYSTDFTTINTVQAEDLAVYFC	QQDYSSPYT	FGG T K L E I K
DB32-6	GVPARTSGSGSDTDFSLNIHPMEEDDIAMYFC	QQSKEVPWT	FGG T K L E I K
DB42-3	GVPARTSGSLIGDKAALITGAQPEDEAIYFC	ALWYSNFWV	FGGKLTVLGQPKSTPTL

第 1 圖



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

100125171

※ 申請日：

2002.03.25

※IPC 分類：

C12N<sup>15</sup>/<sub>12</sub> (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K<sup>39</sup>/<sub>395</sub> (2006.01)

抗登革病毒抗體/Anti-Dengue Virus Antibodies

二、中文發明摘要：

在此提供專一於登革病毒之單株抗體，以及其抗原結合片段與功能性變體。同時揭露其用於治療或診斷登革病毒感染之用途。

三、英文發明摘要：

Provided herein are monoclonal antibodies specific to dengue virus as well as their antigen-binding fragments, and functional variants. Also disclosed are uses thereof for treating or diagnosing dengue virus infection.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種單株抗體，特別是關於一種抗登革病毒之單株抗體。

### 【先前技術】

登革熱(Dengue fever)，由登革病毒感染所造成，是一種經由節肢動物感染人類的重要疾病，在熱帶及亞熱帶地區已造成傳播性的公共衛生問題。全球每年大約有 5000 萬~1 億個登革熱(dengue fever, DF)病例，以及 50 萬個出血性登革熱(dengue hemorrhagic fever, DHF)，約有 2 千 5 百萬的人口具有感染登革熱的風險(Farrar et al., 2007; Halstead, 2007; Normile, 2007)。登革病毒感染後其症狀可能由輕微的發熱、頭痛及關節痛等至嚴重的出血性登革熱(DHF)及具致命威脅性(Kalayanarooj et al., 1997)的登革休克症候群(dengue shock syndrome, DSS)。

登革病毒(Dengue virus, DENV)具有四種基因及抗原相關之病毒血清型，分別是 DENV-1、-2、-3 及-4。登革病毒係為黃病毒科(family Flaviviridae)，黃病毒屬(genus Flavivirus)，具有大約 11 kb 的正股(positive-sense) RNA。黃病毒合成一聚合蛋白(polyprotein)，係被宿主及病毒蛋白酶加工進而產生三種結構蛋白，即殼體蛋白(C)、前驅膜/膜(prM/M)及套膜蛋白(E)，以及七種非結構蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B 及 NS5) (Rice et al., 1985)。殼體蛋白(C)是一個 11 kDa 的小蛋白，帶有高度正電性，其為組裝核殼(nucleocapsid)及病毒粒子(viral particle)成熟時所需(Kuhn et al., 2002)。NS1 是一種 45 kDa 的醣蛋白，其可轉移到內質網(ER)內腔並由細胞釋出(Schlesinger et al., 1990)，其具有幫助病毒 RNA 複製的功能(Lindenbach and Rice, 1997, 1999)。NS1 蛋白在溶液中形成穩定的寡聚物(二聚體及六聚體)(Flamand et al., 1999; Winkler et al., 1989)。套膜蛋白(E) 是一種 53 kDa

的糖蛋白，對於病毒入侵、與細胞受體之結合及中和性抗體的誘發都相當重要(Kuhn et al., 2002; Pierson et al., 2008; Pokidysheva et al., 2006; Roehrig, 2003)。套膜蛋白(E)係為登革病毒的外部表面，且由 90 個套膜蛋白二聚體所組成(Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2003)。

套膜蛋白(E)單體包含三個結構性及功能性的區域(Crill and Roehrig, 2001; Modis et al., 2003, 2005; Rey et al., 1995; Roehrig, 2003)。套膜蛋白區域 I (E protein domain I, E-DI)是一種中央  $\beta$ -摺疊結構( $\beta$ -barrel)。套膜蛋白區域 II (E protein domain II, E-DII)形成兩個類長指狀結構且包含黃病毒保留融合環(flavivirus conserved fusion loop)。套膜蛋白區域 III (E-DIII)具有一個類免疫球蛋白摺疊(immunoglobulin-like fold)且被認為可在病毒與宿主細胞受體間交互作用(Mukhopadhyay et al., 2005)。其生物特徵及對老鼠 MAbs 的抗原決定位專一性顯示出黃病毒套膜蛋白的抗原結構。可辨認包括在 E-DI 中之抗原決定位的抗體，係同時具備病毒專一性及交叉反應，主要是非中和性抗原決定位。與 E-DII 有反應的抗體係具有廣泛交互作用，但對於中和性則較弱。E-DIII 能誘導出具有血清型專一性、高度保護性的中和抗體及交互作用的抗體(Crill and Chang, 2004; Crill and Roehrig, 2001; Gromowski et al., 2008; Roehrig et al., 1998; Sukupolvi-Petty et al., 2007)。

在對抗登革病毒方面，抗體扮演了一種重要角色。然而，抗體也跟登革病毒感染的嚴重臨床表現的發展有關。抗體依賴性增強(Antibody-dependent enhancement, ADE)描述在交叉反應性抗 E 免疫球蛋白(anti-E immunoglobulins)表現非中和性或次中和性濃度時，有助於病毒感染的效能增加(Halstead and O'Rourke, 1977)。抗體-病毒複合體貼附於循環單核細胞(circulating monocyte)的 Fc 受體，藉此顯示出登革病毒在具 Fc 受體的細胞中可複製出至較高效價(Halstead, 1988; Littau et al., 1990)。其整體結果導致可能形成更嚴重的疾病。更進一步，抗 NS1 抗體(anti-NS1 antibody)被報載可對抗登革病毒感染(Falgout et al., 1990; Qu et al., 1993)。同時，其顯示出抗 NS1 抗體可結合於表皮細胞且可與部份自體抗原產生交叉反應，誘導出細胞激素(cytokine)、趨化

素(chemokine)的表現，且造成細胞凋亡(apoptosis) (Lin et al., 2005; Lin et al., 2002)。此些文獻顯示該些抗套膜(E)及 NS1 蛋白的抗體，同時也與登革病毒疾病的致病過程有關。因此，急需發展一種可安全且有效對抗登革病毒的疫苗或治療藥物。

### 【發明內容】

在一方面，本發明揭露一些抗登革病毒單株抗體，即 DB2-3, DB3-4, DB5-2, DB6-1, DB7-3, DB8-1, DB9-1, DB11-3, DB12-3, DB13-19, DB16-1, DB19-4, DB20-6, DB21-6, DB22-4, DB23-3, DB24-2, DB25-2, DB27-3, DB28-4, DB29-1, DB31-4, DB32-6, DB33-3, DB34-1, DB36-2, DB37-1, DB38-1, DB39-2, DB40-2, DB41-2 及 DB42-3，以及抗原結合片段(例如 F(ab')<sub>2</sub>, Fab 或 Fv)，及其功能性變體(例如，人源化抗體、嵌合抗體或單鏈抗體)。在一實施例中，上述單株抗體其中之一之功能性變體包含(i)一重鏈變異區(V<sub>H</sub>)，其包含該單株抗體之所有互補決定區(complementarity determining regions, CDRs)，及(ii)一輕鏈變異區(V<sub>L</sub>)，其包括該單株抗體之所有互補決定區(CDRs)。在另一實施例中，一種功能性變體包括與一單株抗體相同的重鏈變異區(V<sub>H</sub>)及輕鏈變異區(V<sub>L</sub>)。

在另一方面，本發明揭露一種治療登革病毒感染的方法，藉由對一需要治療登革病毒感染之個體施予一有效劑量之任何前述抗體。在此使用的用語「治療」係指一組成物的應用或施用，該組成物包括一或多個活性成分，其針對罹患登革病毒感染、具有登革病毒感染症狀或具有登革病毒感染風險的個體，具有治癒、醫治、減緩、紓解、改變、改善、改良，或影響其感染、感染症狀或易感染體質的目的。在此使用的用語「一有效劑量」係指對該個體提供醫療效果所需之各活性成分，可單獨或與其他一個或多個活性成分組合施用。有效劑量可隨該領域熟習此技藝者之認知而改變，其取決於給藥途徑、賦形劑選擇及其他活性成分的共同使用。

在又一方面，本發明揭露一種在一樣本中檢測登革病毒抗原存在

的方法。該樣本可以是一來自可能受登革病毒感染患者之血清樣本，亦可以是一組織培養樣本。此方法包括至少下列步驟：提供一可能包含一登革病毒抗原之樣本，使該樣本與任何前述抗體接觸，及確認該抗體是否結合於該樣本中之一抗原，該抗體與該抗原的結合表示該樣本中存在有一登革病毒抗原。

在本發明的保護範圍中亦包括(i)一種用於治療登革病毒感染的醫藥組成物，該醫藥組成物包括一或多個前述抗登革病毒抗體，以及(ii)將任何前述抗登革病毒抗體用於製造或治療登革病毒感染的藥物之用途。

本發明之一或多種實施例的細節將詳述如下之實施說明中。本發明之其它特徵或優點，將透過以下圖式及實施例之詳細說明及專利範圍而更為清楚。

#### 【實施方式】

本申請案主張美國臨時申請案 No. 61/364,845(申請日：2010 年 7 月 16 日)之優先權，其內容之全體皆引用作為本說明書的揭示內容。

在此所述的單離抗登革病毒抗體，包括如表 1 所列之抗體，即 DB2-3, DB3-4, DB5-2, DB6-1, DB7-3, DB8-1, DB9-1, DB11-3, DB12-3, DB13-19, DB16-1, DB19-4, DB20-6, DB21-6, DB22-4, DB23-3, DB24-2, DB25-2, DB27-3, DB28-4, DB29-1, DB31-4, DB32-6, DB33-3, DB34-1, DB36-2, DB37-1, DB38-1, DB39-2, DB40-2, DB41-2 及 DB42-3，及其抗原結合片段及經過基因工程之功能性變體。

在此所使用的用語「單離抗體」係指一種實質上與自然存在分子不同之抗體，即自然存在分子係由包含該抗體配製物之頂多 20% 乾重之所組成。抗體純度可由任何適當方法測量得到，例如：色層管柱層析法(column chromatography)、聚丙烯醯胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis)及高效液相層析法(HPLC)。

表 1 所列之任何單株抗體可經由習知方法所製得，例如：融合瘤技術、重組技術或化學合成。可參閱例如 Harlow and Lane, (1988)

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 以及以下實施例。

單株抗體的抗原結合片段(例如  $F(ab')_2$ , Fab 或 Fv), 可以經由習知技術所製得。例如,  $F(ab')_2$  片段可藉由胃蛋白酶(pepsin)切除一抗體分子所製得, 且 Fab 片段可經由還原  $F(ab')_2$  之雙硫鍵所製得。

一單株抗體之功能性變體係指一抗體, 其包含該單株抗體之相同的抗原結合殘基(例如 CDRs 的專一決定殘基(specific-determining residues); 參閱 Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143; 2004), 且因此具有相同的抗原專一性。一功能性變體可包括一重鏈變異區( $V_H$ ), 其至少 70% (例如 75%, 80%, 85%, 90% 或 95%) 相似於其親代單株抗體, 以及一輕鏈變異區( $V_L$ ), 其至少 70% (例如 75%, 80%, 85%, 90% 或 95%) 相似於其親代單株抗體。另外, 功能性變體可包括一含有 CDRs 之重鏈變異區( $V_H$ ), 各 CDRs 至少 80% (例如 85%, 90% 或 95%) 之序列相同於該單株抗體中對應的 CDRs, 以及一含有輕鏈變異區( $V_L$ ) 之 CDRs, 其至少 80% (例如 85%, 90% 或 95%) 之序列相同於該單株抗體中對應的 CDRs。在一實施例中, 功能性變體包括與其親代單株抗體相同的重鏈變異區( $V_H$ ) 及輕鏈變異區( $V_L$ )。互補決定區(CDRs) 及其專一決定殘基可由其重鏈變異區( $V_H$ ) 及輕鏈變異區( $V_L$ ) 之胺基酸序列而決定。參閱網路資料 [bioinf.org.uk/abs](http://bioinf.org.uk/abs) 及 Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143; 2004。在此所述的功能性變體之結合專一性, 可由該領域之習知方法所測定, 例如 ELISA 或西方墨點法。

例如, 一單離抗體可包括 DB32-6 (SEQ ID NO:1) 之重鏈變異區( $V_H$ ) 的胺基酸序列, 以及 DB32-6 (SEQ ID NO:5) 之輕鏈變異區( $V_L$ ) 的胺基酸序列。在另一實施例中, 一單離抗體可包括 DB32-6 之重鏈 CDR1, CDR2 及 CDR3 序列(分別為 SEQ ID NOs: 2, 3, 及 4), 及 DB32-6 之輕鏈 CDR1, CDR2 及 CDR3 序列(分別為 SEQ ID NOs: 6, 7, 及 8)。

在此所使用的用語, 兩胺基酸序列之「同源百分比(percent homology)」, 是利用 Karlin 及 Altschul 之演算法(參閱 *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1990) 如 Karlin 及 Altschul 所述修正(參閱 *Proc,*

*Natl. Acad. Sci. USA* 5873-5877, 1993)。此演算法同時配合 NBLAST 及 XBLAST 程式，參閱 Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990。BLAST 蛋白質檢索是以 XBLAST 程式進行，score = 50，wordlength = 3，以得到與參考胜肽同源的胺基酸序列。為得到間隙排比以用於比對目的，故利用 Altschul et al 所述的 Gapped BLAST(參閱 *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997)。當使用 BLAST 及 Gapped BLAST 程式，則利用各程式的預設參數(例如 XBLAST 及 NBLAST)。參閱 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) 之網路資料。

前述功能性變體可以是一種人源化抗體、嵌合抗體、單鏈抗體或是衍生自表 1 所列單株抗體之任何區域抗體(domain antibody, dAb; 參閱 Ward, et. Al., 1989, *Nature*, 341:544-546)。

人源化抗體包括一種人類免疫球蛋白(例如受者抗體)，其負責抗原結合之區域/殘基(即 CDRs，特別是其中的專一決定殘基)被取代為該些來自非人類免疫球蛋白(即供者抗體)之殘基。在某些情況下，在受者抗體中的架構區域中的一或多個殘基亦被取代為該些來自供者抗體的殘基。人源化抗體亦可包含非來自受者抗體及供者抗體的殘基。該些殘基可包括進一步重新定義或改善抗體之表現。該些抗體可經由該領域習知技藝予以人源化，例如重組技術。

嵌合抗體是一種利用衍生自不同物種之片段所組成的分子，諸如該些具有衍生自鼠科動物之可變區域及人類免疫球蛋白之恆定區(constant region)。此種抗體可經由習知技藝，例如參閱 Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604;及 Takeda et al. (1984) *Nature* 314:452.所製得。

單鏈抗體可經由重組技術而製得，例如連結編碼有 V<sub>H</sub> 鏈的核苷酸序列以及及編碼有 V<sub>L</sub> 鏈的核苷酸序列。較佳地，在兩個可變區域間利用一靈活的連結子予以連結。

在此所述的任何抗登革病毒抗體，可被用於治療登革病毒感染。在進行此種治療時，可將一抗登革病毒抗體與一藥學上可接受載體混合，可單一地或是與一抗病毒成分混合，以形成一醫藥組成物。「可接

受(acceptable)」意指該載體必需可與該組成物中的活性成分共存(較佳地，可穩定該活性成分)且不會對受治療的該個體產生毒性。適當的載體包括維晶纖維素(microcrystalline cellulose)、甘露醇(mannitol)、葡萄糖(glucose)、去脂奶粉(defatted milk powder)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)及澱粉(starch)，或其組合。

上述醫藥組成物可經由習知給藥途徑施用至一需治療的個體(即罹患或具有登革病毒感染之人類患者)，習知給藥途徑包括例如：口服、非口服、吸入、局部、直腸、鼻部、頰部、陰道或透過植入型藥盒進行給藥。在此所述的「非口服」包括：皮下、皮內、靜脈內、肌肉內、關節內、動脈內、滑液內、胸骨內、鞘內、病灶內、頭蓋骨內之注射或注入技術。

一種無菌的可注射組成物，例如一種無菌的可注射水性或油性懸浮液，可依據該領域之習知技藝製得，包括使用分散劑或潤濕劑(例如 Tween 80)及懸浮劑。該無菌可注射物可以是一種在無毒性非口服可接受稀釋劑或溶劑中的無菌可注射溶液或懸浮液，例如 1,3-丁二醇(1,3-butanediol)。可接受的載劑及溶劑可為甘露醇、水、林格氏液(Ringer's solution)、等張生理食鹽水。此外，無菌、非揮發性油一般可用於作為一溶劑或懸浮媒介物(例如合成的單-或二酸甘油酯)。脂肪酸，例如油酸及其甘油酯衍生物，可用於製備可注射物，如天然藥學上可接受油類，諸如橄欖油或蓖麻油，特別是以聚氧乙烯的形式。該些油性溶液或懸浮液可包括一長鏈醇類稀釋劑或分散劑，或羧甲基纖維素(Carboxymethyl cellulose)或相似的分散劑。其它一般使用的介面活性劑諸如 Tweens 或 Spans 或其他相似的乳化劑或生物可接受促進劑，其一般使用於製造藥學上可接受固態、液態或其他的劑型。

此外，上述醫藥組成物可透過可注射型長效路徑施用於一個體，諸如使用 1、3 或 6 個月長效型注射或生物可分解物質及方法。

在此所述的抗登革病毒抗體可被使用作為一診斷藥劑，透過習知方法例如 ELISA 或西方墨點法，以確認一個體是否受到登革病毒感染。

在未進一步揭露細節，據信該領域熟習此技藝人士可根據上述說

明，使用本發明至其完整內容。以下特定實施例，據此，僅為例示說明，而非用以限制本發明以其他形式實施。所有公開引用文獻在此併入作為參考。

## 對抗登革病毒第 2 型之單株抗體的生產及特徵化

### (1) 材料及方法

BHK-21 細胞在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 之環境下培養於 MEM 培養基 (Minimal Essential Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY)，其中添加有 10% 熱去活化胎牛血清(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS, Gibco) 及 100 U/ml 盤尼西林(penicillin)、100 µg/ml 鏈黴素(streptomycin)、0.25 µg/ml 兩性黴素 B (amphotericin B) (Antibiotic-Antimycotic, Gibco)。 *Aedes albopictus* C6/36 細胞在 28 °C 之環境下培養於 MM (Mitsuhashi and Maramorosch) 昆蟲培養基(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/ DMEM 培養基(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)，其中添加有 10% 熱去活化胎牛血清及 100 U/ml 盤尼西林(penicillin)、100 µg/ml 鏈黴素、0.25 µg/ml 兩性黴素 B。四種登革病毒(DENVs)，DENV-1 Hawaii, DENV-2 New Guinea C 及 16681, DENV-3 H87 及 DENV-4 H241，係由 Dr. Duane J. Gubler (Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, U.S.A.) 所提供。

感染 DENV-2 的病患係來自在南台灣的高雄之疫情爆發(2002)之病患，如先前文獻所述(Wang et al., 2006)。登革主動監控系統(active physician-based dengue surveillance system) 已建立於北台灣的國立台灣大學附設醫院(NTUH)。DHF 及 DF 的診斷係根據 WHO 的案例定義 (WHO, 1997)。經告知同意，取得急性(在發病後第 1-7 天)及康復期(在發病後第 8 天至 4 個月)之血液樣本。所有樣本以 800×g、4°C 離心 10 分鐘，並保存於-80 °C 以供使用。確認的登革血清及血漿樣本係以下列四種方法的至少兩種進行檢測：(i) 對於急性期樣本以血清型專一反轉錄 PCR (serotype-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 進行檢測，(ii) 將病毒自樣本分離後培養於 mosquito

C6/36 細胞，(iii) 登革專一 IgM (dengue-specific IgM) 測試 (iv) 在康復期血清樣本中進行血球凝集-抑制檢測 (Lanciotti et al., 1992) 觀察其具有增加四倍效價的抗登革病毒抗體。取經過檢測(以購得之 ELISA 套組(PanBio, Queensland, Australia))抗登革病毒抗體為陰性之一健康正常人的血清樣本(Vaughn et al., 1998; Vaughn et al., 1999)，將其作為參考以建立截取值(cutoff values)。

依據先前文獻所述步驟(Wu et al., 2003)製得抗登革病毒第二型單株抗體(Anti-DENV-2 MAbs)。雌性，第 4-6 週齡之 BALB/c 小鼠係以純化 DENV-2 作為抗原進行免疫接種。經過四次免疫接種後取其血清並測試其對於抗 DENV-2 之免疫反應。選出最適合的小鼠進行最後增強。取已免疫小鼠的脾臟細胞，將其與小鼠骨髓瘤細胞 NS-1 在 50% (v/v) PEG-1500 (polyethylene glycol-1500, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 進行融合。將混合物以 10 ml 無血清 DMEM (serum-free DMEM) 稀釋，以 400g 離心 5 分鐘。將融合細胞培養於 DMEM 培養基 (添加有 15% FBS, HAT 培養基及融合瘤選殖因子(Roche))之 96 孔盤中。在進行 2 個星期的融合後，將培養基上清液以 ELISA 篩出可結合於受 DENV-2 感染之 C6/36 細胞，但不會結合於未受感染之細胞，以當作陽性選植株(positive clone)。挑選後的細胞株經限數稀釋法 (limiting dilution) 進行次選殖。將融合瘤細胞利用購買的分型套組 (isotyping kit) (Southern Biotech, Birmingham, AL)，利用 ELISA 進行分型。腹水產生於注射過 pristine (pristane-primed) 的 BALB/C 小鼠中。利用標準蛋白質 G-Sepharose 4B gel (Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)，依據其使用說明，對該些單株抗體進行親和性純化。

將 96 孔盤中的 C6/36 單層細胞，以 0.5 的病毒感染劑量 (multiplicity of infection, MOI)，感染 DENV-1 至 -4 (DENV-1 Hawaii, DENV-2 16681, DENV-3 H87, 及 DENV-4 H241)。將 1 µg/ml 的單株抗體溶於含 1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 之 PBS 中，三重複加入盤內使抗體於室溫下與病毒反應 1 小時。以含有 0.1% (v/v) Tween-20 (PBST<sub>0.1</sub>) 的 PBS 清洗三次。二級抗體 (Horseradish peroxidase

(HRP)-conjugated anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 溶於 1% (w/v) BSA 之 PBS 以 1:2,000 之比例稀釋後加入盤中於室溫下作用 1 小時。將培養盤加入過氧化酶的受質 *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD; Sigma), 並以 3N HCl 終止反應。以光度計測量其 490 nm 吸光值。

將 BHK-21 細胞以 1:1 甲醇/丙酮(methanol/acetone)於-20°C 下固定 10 分鐘。再將細胞置於含有 1% BSA 之 PBS 中室溫作用 1 小時。以含有 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗兩次後, 加入抗登革病毒的一級抗體 (DB MAbs) 或控制組抗體 (正常老鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 以 1:250 的比例稀釋於室溫下作用 1 小時。經過三次清洗後, 加入二級抗體 FITC-接合山羊抗鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) 以 1:250 及 DAPI 以 1:2,000 稀釋, 並在室溫下作用 1 小時。經過三次清洗後以螢光顯微鏡拍照紀錄 DB 單株抗體或控制組抗體對於感染 DENV-2 或未感染(mock) 的 BHK-21 細胞之結合情形。

DENV-2 (PL046) E 的表現質體係取自 Dr. Y.-L. Lin (Yu et al., 2006), 並製備以表現 E-DI-II 及 E-DIII。將對應 E-DI-II 之 DNA 片段, 以下列引子對進行 PCR 擴增: 正向: 5'-GATGCTAGCATGCGTTGCATAG GAATA-3' (NheI 的位置以粗體標記; SEQ ID NO:9) 及反向: 5'-GATCTCGAGTCCTTTGAGCTGTAGTTT-3' (Xho 的位置以粗體標記; SEQ ID NO:10)。設計適當的引子對以構築 E-DIII, 正向:5'-GATGCTAGCATGAAAGGAATGTCATAC-3'(NheI 的位置以粗體標記; SEQ ID NO:11) 以及反向:5'-GATCTCGAGTTGGCCGATAGAACT-3' (Xho 的位置以粗體標記; SEQ ID NO:12)。該些引子對被設計用於選殖入 pET21a 載體(Merck, Darmstadt, Germany)。重組 E-DI-II, 包含套膜蛋白第 1-295 個胺基酸, 在其 C 端標記以六個組胺酸(hexahistidine)用於親和性純化(affinity purification)。重組 E-DIII, 包含套膜蛋白第 295-400 個胺基酸, 亦標記以六個組胺酸。將表現質體轉殖入大腸桿菌 *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)。將 20 ml 的菌液培養於含有 50 µg/ml 青黴素(ampicillin)

之 LB 培養液中，直至 OD600 吸光值=0.6，並以 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 在 37°C 下誘導 4 小時。取得菌沉澱物以超音波震盪。重組蛋白質 E-DI-II 及 E-DIII 以 12% SDS-PAGE 進行分析，並以考馬斯藍 (coomassie blue) 染色或進行西方墨點分析。

在病毒感染後取細胞並以 RIPA 緩衝液 (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% 十二烷基磺酸鈉 [SDS], 1% Triton X-100, 1% 去氧膽酸鈉及 proteinase inhibitor cocktail tablet, Roche) 打破細胞。將細胞溶解物或表現蛋白以 12,000g 的轉速在 4°C 下離心 20 分鐘，並取其上清液。取等量的全細胞萃取物與樣本緩衝液 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 混合。蛋白質樣本以 SDS-PAGE 分離，並轉至硝化纖維膜 (Hybond-C Super; Amersham, Little Chalfont, UK)。配製 5% 脫脂牛奶 (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NY) 於 PBS 中，以阻斷非專一性抗體結合位，並加入一級抗體 DB MAbs (腹水於 1:250 至 1:5,000 稀釋液)，於室溫下反應 1 小時。清洗後加入 1:10,000 稀釋比例之二級抗體 HRP-接合抗鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)，於室溫下反應 1 小時。經清洗後利用 ECL 試劑 (enhanced chemiluminescence reagents, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 檢測其訊號。

將 ELISA 盤塗佈 50  $\mu$ l/well 的 capture MAb (可辨識套膜蛋白的 DB42-3)，以 0.5  $\mu$ g/ml 的濃度於 0.1 M 碳酸氫鈉緩衝液 (pH 8.6) 中，於 4°C 下反應 6 小時。經 PBS 清洗兩次後，將孔盤與含有 1% BSA 的 PBS 阻斷非專一性抗體結合位，於 4°C 下隔夜反應，並以含有 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗三次。於孔盤上加入  $5 \times 10^6$  plaque forming unit (PFU)/ml 的病毒培養液於室溫下反應 1 小時。受 DENV-2 感染之患者或健康人類的血清樣本在不同稀釋比例 1:100, 1:400, 1:1,600 及 1:3,200 下加入盤內並於室溫反應 1 小時。在清洗三次後，加入 1:10,000 之比例稀釋的山葵過氧化酶接合抗人類 IgG (horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human IgG) 或 IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)，於室溫下反應 1 小時，接著清洗五次。

將孔盤以 OPD (Sigma) 呈色並以 3 N HCl 終止反應。以光度計測量其 490 nm 的吸光值。

將八個 3 倍依序稀釋的 MAbs (200  $\mu\text{g/ml}$  至 0.09  $\mu\text{g/ml}$ ) 與等量的 200 PFU 之 DENV-2 混合，在 4°C 下反應 1 小時。MAbs 在 PRNT 的最終濃度介於 100 至 0.05  $\mu\text{g/ml}$  之間。將 100  $\mu\text{l}$  的抗體-病毒混合液以二重複的方式，加入 12 孔盤的 BHK-21 細胞單層中。在吸收病毒 2 小時後，除去上清液，並將 2 ml 的 1% (w/v) 羧甲基纖維素(Sigma) 於含有 2% (v/v) FBS 之 MEM 加入於感染細胞上。在 37°C 下反應 5-7 天，將形成於細胞單層上的病毒斑以 1 ml 3.7% 福馬林(Sigma) 於室溫下進行固定 1 小時。將細胞以 1% 結晶紫染色以觀察該些病毒斑。病毒斑百分比的減少係以下式計算：抑制百分比(%Inhibition)=100 - [(加入 MAb 之病毒斑數目/未加入 MAb 之病毒斑數目) $\times$ 100]。

飼養的 ICR 種小鼠係購自於國立台灣大學的動物中心。將純化的 MAbs 以 10  $\mu\text{g/ml}$  之劑量與  $1\times 10^4$  PFU (25-fold  $\text{LD}_{50}$ ) 之 DENV-2 於 4°C 下反應 30 分鐘。20  $\mu\text{l}$  的反應混合物，以顱內注射的方式(intracranial (i.c.) injection) 接種至 2 天大的乳鼠鼠腦中。每天觀察其存活率及包括癱瘓等發病症狀，連續進行 21 天。動物照護係依照中央研究院(Taipei, Taiwan) 的規定進行。在感染後治療實驗中，小鼠係在感染病毒 1 天後以顱內注射方式注入 5  $\mu\text{g}$  的 MAb。

在先前文獻中已描述出血小鼠模式(Chen HC et al., 2007; 及 Yen et al., 2008)。C57BL/6 小鼠係購自於 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) 以及飼養於國立台灣大學醫學院實驗動物中心。所有小鼠都飼養於無致病的柵欄設備中，並在 4-5 週齡時予以病毒感染。在接種之前，100  $\mu\text{g/ml}$  的 MAbs 或 PBS 以  $2\times 10^8$  pfu 之 DENV-2 (16681) 於 4°C 下反應 30 分鐘。將 100  $\mu\text{l}$  的混合液以皮下注射接種於小鼠上背部四個位置。在接種後第 3 天，將小鼠犧牲以觀察其出血情形的發展。

利用 TRIzol 試劑(Invitrogen) 萃取約  $1\times 10^7$  個融合瘤細胞之 RNA，並以 NucleoTrap mRNA Mini Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) 分離出 mRNA。純化後的 mRNA 以寡核甘酸(oligo dT) 作為引子進行

ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen), 可變重鏈及輕鏈區域( $V_H$  及  $V_L$ )係以不同的引子組進行 PCR 擴增所得到之 cDNA 產物 (Dubel et al., 1994; Orlandi et al., 1989; Orum et al., 1993)。以 pfu turbo DNA 聚合酶 (Merck) 進行 30 循環的 PCR, 條件為:  $95^\circ\text{C}$  進行 30 秒,  $55^\circ\text{C}$  進行 30 秒, 及  $68^\circ\text{C}$  進行 60 秒。將 PCR 產物純化並利用 TA kit (Promega, Madison, WI) 將其插入 pGEM-T Easy 質體。再將完成後的質體進行定序以確認中和性 MAbs 的  $V_H$  及  $V_L$  序列已插入質體。利用 Vector NTI (InforMax) 之軟體進行序列分析。由該些序列中, 藉由 Kabat 資料庫比對分析其架構區(FR)及互補決定區(CDR), 並利用 ImMunoGeneTics 資料庫進行序列比對(alignment) (Lefranc et al., 2009)。

依據先前文獻內容進行噬菌體表現生物汰選技術。簡單而言, 將 ELISA 盤塗佈以  $100\ \mu\text{g/ml}$  之 MAbs。加入  $100\ \mu\text{l}$  稀釋的 MAb 至孔洞, 於  $4^\circ\text{C}$  下反應 6 小時。在清洗後, 將噬菌體表現勝肽庫(New England BioLabs, Inc.)稀釋為  $4 \times 10^{10}$  pfu 後加入孔洞中並置於室溫下反應 50 分鐘。在清洗後, 以  $100\ \mu\text{l}$   $0.2\ \text{M}$  glycine/HCl (pH2.2) 將結合的噬菌體洗出, 並以  $15\ \mu\text{l}$   $1\ \text{M}$  Tris/HCl (pH9.1) 進行中和。並在後續回合挑選時, 將洗出的噬菌體在 ER2738 中放大。將噬菌體滴定於含有 IPTG 及 X-Gal 的 LB 培養基盤上。用於第二及第三回合生物汰選步驟與第一回合相同, 加入  $2 \times 10^{11}$  pfu 的噬菌體進行生物挑選。ELISA 盤塗佈以  $50\ \mu\text{l}$  的  $50\ \mu\text{g/ml}$  MAbs。在清洗後, 放大的噬菌體稀釋 5 倍並加入盤中, 於室溫下反應 1 小時。在清洗後, 加入 1:5000 稀釋比例的 HRP-接合抗-M13 抗體(GE Healthcare), 於室溫下反應 1 小時。以 OPD 反應並以 HCl 中止反應。測量其  $490\ \text{nm}$  的吸光值。

使用重組表現載體 pCBD2-2J-2-9-1 以產生類病毒顆粒(virus-like particle, VLP)突變株。利用 pCBD2-2J-2-9-1 為模板進行定點突變(site-directed mutagenesis), 產生不同的 VLP 突變株。利用 pfu ultra DNA 聚合酶 (MERCK) 進行 PCR 反應, 且將所有突變株定序確認。BHK-21 細胞以不同的 VLPs 質體轉染。在轉染兩天後, 將細胞以含有 1% FBS 之 PBS 清洗, 並以 3.7% 福馬林進行固定,  $4^\circ\text{C}$  下反應 10 分鐘。以含有

1% FBS, 0.1% saponin (Sigma-Aldrich)之 PBS 進行打洞，4°C 下反應 10 分鐘。為進行染色，將細胞與 MAbs 於 4°C 反應 30 分鐘，DB32-6, DB25-2, 3H5 及混合 MAbs(4G2, DB2-3, DB13-19, DB21-6 及 DB42-3)，濃度分別為 0.1, 1, 1 及 1  $\mu\text{g/ml}$ 。在清洗兩次後，加入 R-藻紅素(PE)-接合 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> 片段山羊抗鼠 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)稀釋至 1:250，4°C 下反應 30 分鐘，以流式細胞儀(flow cytometry)進行分析。依據先前描述的步驟確認是否有辨識反應。

實施人源化 DB32-6 的構築及表現。兩個人類基因，GenBank accession DI084180 及 DI075739，與 DB32-6 V<sub>H</sub> 及 V<sub>L</sub> 分別相似 94.7% 及 92.2%。人源化 DB32-6 V<sub>H</sub> 係由分別來自 accession DI084180 基因經修飾的 FR1 至 FR4，以及 DB32-6 V<sub>H</sub> 之 CDR1 至 CDR3 所組成。人源化 DB32-6 V<sub>L</sub> 係由來自 DI075739 基因經修飾的 FRs，以及 DB32-6 V<sub>L</sub> 之 CDRs 所組成。合成人源化 DB32-6 V<sub>H</sub> 及 V<sub>L</sub>(GENEART, Germany)，並以 pfu Turbo (EMD Bioscience)進行 PCR 放大。並將所得到 V<sub>H</sub> 選殖入修飾過具有信號肽及人類 IgG1 恆定區的表現載體 pcDNA3.1 (Invitrogen)。V<sub>L</sub> 選殖入修飾過的表現載體 pSecTag (Invitrogen)。V<sub>H</sub> 及 V<sub>L</sub> 質體共轉染進入 CHO-K1 細胞並以 G 418 及嘌呤霉素(puromycin)進行篩選 2-3 週。轉染細胞在 96 孔盤中進行極限稀釋。在 2 週後，得到可在 McCoy's 5A 培養基(Sigma-Aldrich)中產生人源化抗體之穩定株，並進行 ELISA 確認。利用 CELLline AD 1000 (INTEGRA Biosciences, Switzerland)套組，依據產品使用說明生產人源化抗體。

DENV-2 的 E-DIII 之鼠類及人源化 DB32-6 MAbs 親和性分析，係以表面離子共振(surface plasmon resonance) (BIAcore X, Biacore, Inc)進行。純化的 E-DIII (50  $\mu\text{g/ml}$ )固定於 CM5 感測晶片(Biacore, Inc)上，注射流速 10  $\mu\text{l/min}$ 。將 MAbs 在 HBS-EP buffer (Biacore, Inc)中稀釋至 4, 2, 1, 0.5, 0.25 及 0 nM。MAbs 注射流速 30  $\mu\text{l/min}$  下進行 3 分鐘，並使其分離 1.5 分鐘。MAb 注射之前以 10 mM glycine HCl, 0.2 M NaCl (pH3.0)清洗後再進行下一次的樣本注射。資料係以 BIAevaluation 軟體

內的 global fit 1:1 程式進行結合分析。

## (2) 抗 DENV-2 的 MAbs 之生產及確認

所有抗 DENV-2 的 32 種 MAbs 列於如下之表 1，係在小鼠以 DENV-2 strain 16681 進行免疫反應後產生。

**表 1. DENV-2 MAbs 經由 IFA, ELISA, WB and PRNT<sub>50</sub> (µg/ml) 之特徵**

MAbs	同型輕鏈 (Isotype, Light chain)	專一性 (Specificity)	IFA		ELISA			WB				PRNT <sub>50</sub> (µg/ml)
			D2	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D2
DB2-3	IgG1, κ	E-DI-II	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤1.2
DB3-4	IgG1, κ	E	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤3.7
DB5-2	IgG1, κ	C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.
DB6-1	IgG2a, κ	NS1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
DB7-3	IgG1, κ	C	+	-	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
DB8-1	IgM, κ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DB9-1	IgG1, κ	E-DI-II	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤3.7
DB11-3	IgG1, κ	C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.
DB12-3	IgG1, κ	NS1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
DB13-19	IgG1, κ	E-DI-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	≤33
DB16-1	IgG2a, κ	NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
DB19-4	IgG2b, κ	E	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤3.7
DB20-6	IgG1, κ	NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
DB21-6	IgG1, κ	E-DI-II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	>33
DB22-4	IgG2a, κ	E-DI-II	+	-	+	-	-	-	-	-	-	>33
DB23-3	IgG2a, κ	E-DI-II	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤0.41
DB24-2	IgG2a, κ	E	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤3.7
DB25-2	IgG1, κ	E-DIII	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤1.2
DB27-3	IgG1, κ	E-DI-II	+	-	+	-	-	-	+	-	-	>33
DB28-4	IgG1, κ	C	+	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
DB29-1	IgG1, κ	NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
DB31-4	IgG1, κ	C	+	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
DB32-6	IgG2b, κ	E-DIII	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤0.14
DB33-3	IgG1, κ	E-DI-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>33
DB34-1	IgM, κ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DB36-2	IgG1, κ	E	+	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.
DB37-1	IgG1, κ	E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	>33
DB38-1	IgG1, κ	NS1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
DB39-2	IgG1, κ	E-DI-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>33
DB40-2	IgM, κ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DB41-2	IgG1, κ	NS1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	n.d.
DB42-3	IgG1, λ	E-DI-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	≤3.7
3H5	IgG1	E-DIII	+	-	+	-	-	-	+	-	-	≤0.41
4G2	IgG2a	E-DI-II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	≤11

MAbs(monoclonal antibodies), 單株抗體; IFA(immunofluorescence assay) 免疫螢光檢測; ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 酵素連結免

疫吸附法；WB(Western blotting)西方墨點法；PRNT(plaque reduction neutralization test) 溶菌斑中和試驗。Ig(immunoglobulin)免疫球蛋白；E(envelope protein),套膜蛋白；E-DI-II(envelope protein domain I-II)套膜蛋白區域 I-II；E-DIII(envelope protein domain III) 套膜蛋白區域 III；NS1(nonstructural protein 1)非結構蛋白 1；C(capsid protein)殼體蛋白。(+)對 DENV 具有陽性反應， $A_{490} > 0.2$ ；(-)對 DENV 具有陰性反應， $A_{490} < 0.2$ 。n.d. (not determined)未確定。

免疫球蛋白(Ig)同型確認顯示出 32 種 MAbs 係由 22 IgG1, 5 IgG2a, 2 IgG2b 及 3 IgM 所組成(表 1)。利用免疫螢光檢測及 ELISA 確認(表 1)，29 個 IgG MAbs 會與 DENV-2-感染細胞發生反應，而不會與無感染細胞(mock)發生反應。利用 ELISA 及西方墨點法，檢測 MAbs 對於 4 種 DENVs (DENV-1 Hawaii, DENV-2 16681, DENV-3 H87 及 DENV-4 H241)的專一性(表 1)。基於使用非還原條件的西方墨點分析，17 種 MAbs 會辨識套膜蛋白(53 kDa)，7 種會辨識雙聚 NS1 蛋白(75 kDa)，2 種會辨識殼體蛋白(11 kDa)。6 種 MAbs 無法在西方墨點法中被確認。為確認該些 MAbs 之標的蛋白質，製備轉染以可表現 DENV-2 C, prM, prM-E, E, NS1, NS2A, NS2B, NS2B-3, NS3, NS4A, NS4B 及 NS5 之質體的 BHK-21 細胞。篩檢結果顯示出 3 種 MAbs (DB21-6, DB22-4 及 DB36-2)可辨識套膜蛋白，及另外 3 種 MAbs (DB5-2, DB11-3 及 DB31-4)可辨識殼體蛋白。32 種 MAbs 的確認及其特徵摘錄如表 1 所示。

### (3) 分析抗套膜蛋白之區域 I-II 或區域 III 的 DENV-2 MAbs

DENV 的套膜蛋白(E protein)長度大約為 500 個胺基酸，N 端 400 個胺基酸形成胞外區(ectodomain) (Modis et al., 2003)。套膜蛋白胞外區係由三個區域：E-DI、E-DII 及 E-DIII 所組成。E-DI-II 係為非連續且包括套膜蛋白之第 1-295 個胺基酸，E-DIII 係為連續且包括套膜蛋白之第 296-394 個胺基酸(Modis et al., 2003)。EDI-II-flag (36 kDa)及 EDIII-flag (17 kDa)融合蛋白係透過重組技術以 *E. coli* 生產。可被中和性抗體辨識的抗原決定位已在套膜蛋白之所有三個區域中確認 (Goncalvez et al., 2004; Gromowski and Barrett, 2007; Roehrig, 2003;

Sukupolvi-Petty et al., 2007)。

為得知 DENV 套膜蛋白的抗原結構之特徵，在此構築及表現 DENV-2 之重組 E-DI-II 及 E-DIII 於 *E. coli* 表現系統中。所得之載體表現 E-DI-II 及 E-DIII 係為融合蛋白，在其 C 端具有 Flag 標記序列及 hexahistidine 標記。SDS-PAGE 分析顯示 E-DI-II 為 36 kDa，E-DIII 為 17 kDa。可藉由辨識 Flag 標記之抗體以及辨識 DENV-2 套膜蛋白之抗體而辨識。西方墨點分析及 IFA 結果顯示，17 種 MAbs 辨識套膜蛋白 (表 1)，10 種 MAbs 結合於重組套膜蛋白，其中 8 種 MAbs 結合於 E-DI-II，2 種 MAbs (DB25-2 及 DB32-6) 結合於 DIII。4G2 辨識廣泛黃病毒的 E-DI-II，以及 3H5 辨識專一血清型 DENV-2 的 E-DIII。兩者係用於作為正控制組。MAbs DB21-6 及 DB22-4 無法經由西方墨點法確認，但 IFA 結果顯示 E-DI-II 可被辨識。然而，5 種 MAbs 無法經由上述兩種檢測方法確認。全部 10 種 MAbs (DB2-3, DB9-1, DB13-19, DB21-6, DB22-4, DB23-3, DB27-3, DB33-3, DB39-2 及 DB42-3) 係以 E-DI-II 為標的，且 2 種 MAbs (DB25-2 及 DB32-6) 可辨識 E-DIII (參表 1)。

#### (4) 藉由 capture ELISA 檢測登革患者血清樣本

MAb DB42-3 會與 DENV-1, -2, -3 及 -4 產生交叉反應。該 MAb 可檢測取自受 DENV-2 感染之 DHF 及 DF 患者之血清樣本。利用正常人血清樣本於 490 nm 的平均吸光值 ( $A_{490}$ ) 加上三倍標準差以用於確認截斷值 (cutoff value)。抗套膜蛋白 IgG capture ELISA 的敏感度，在急性及康復期的血清樣本中分別為 90% (9/10) 及 100% (10/10)。在不同稀釋比例 (1:100, 1:400, 1:1,600 及 1:3,200) 之截斷值分別為 0.35, 0.14, 0.08 及 0.06。抗套膜蛋白 IgM capture ELISA 的敏感度，在急性及康復期的血清樣本中分別為 50% (5/10) 及 80% (8/10)。在不同稀釋比例 (1:100, 1:400, 1:1,600 及 1:3,200) 之截斷值分別為 0.34, 0.15, 0.07 及 0.08。相對地，由健康的正常人取得之血清樣本經檢測為陰性。該些結果顯示 MAb DB42-3 可用於作為 DENV 感染的血清診斷。

#### (5) 體外 (*in vitro*) 的中和能力

利用 PRNT，評估純化的 MAbs 對於阻斷 BHK-21 細胞受 DENV-2 感染的的能力。10 種 MAbs 在介於 0.14  $\mu\text{g/ml}$  至 33  $\mu\text{g/ml}$  之 50% PRNT (PRNT<sub>50</sub>)濃度間，其具有中和能力，反之，正常小鼠 IgG (NMIgG)在對 DENV 達到濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$  時，不具有中和能力(表 1)。3H5，一種已知可強力中和 DENV-2 血清專一型 MAb，在此作為正控制組。3H5 的 DENV-2 PRNT<sub>50</sub> 濃度係為 0.41  $\mu\text{g/ml}$ ，且可完全抑制病毒感染的濃度為 11  $\mu\text{g/ml}$ 。

DB32-6 被發現是一種可抗 E-DIII 的 DENV-2 血清專一型 MAb，PRNT<sub>50</sub> 的濃度為 0.14  $\mu\text{g/ml}$ ，此為最有效中和 DENV-2 感染之抗體。其在濃度為 1.2  $\mu\text{g/ml}$  時，可完全地抑制感染。DB32-6 比 3H5 具有更強的中和活性。DB25-2 被發現是一種可抗 E-DIII 的 DENV-2 血清專一型 MAb，PRNT<sub>50</sub> 濃度為 1.2  $\mu\text{g/ml}$ 。DB2-3 及 DB23-3 被發現是一種可抗 E-DI-II 的 DENV-2 血清專一型 MAb，且 PRNT<sub>50</sub> 的濃度為分別為 1.2  $\mu\text{g/ml}$  及 0.41  $\mu\text{g/ml}$  (表 1)。具有複合活性的 MAb DB42-3 可辨識 E-DI-II，且被發現 PRNT<sub>50</sub> 的濃度為 3.7  $\mu\text{g/ml}$ 。4 種血清專一型 MAbs:DB3-4, DB9-1, DB19-4 及 DB24-2 PRNT<sub>50</sub> 的濃度為 3.7  $\mu\text{g/ml}$  可中和 DENV-2 感染(表 1)。更進一步，4G2 及 DB13-19 被發現為具有複合活性的 MAbs，PRNT<sub>50</sub> 分別為 11  $\mu\text{g/ml}$  及 33  $\mu\text{g/ml}$  (表 1)。然而，DB21-6, DB22-4, DB27-3, DB33-3, DB37-1 及 DB39-2 等 MAbs，不具有或具有較低的對抗 DENV-2 之中和活性(PRNT<sub>50</sub> >33  $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 1)。

該些發現指出抗 E-DIII 的血清專一型-MAb DB32-6 最具有中和 DENV 感染之潛力。某些血清專一型 MAb，即抗 E-DI-II 的 DB2-3 及 DB23-3，及抗 E-DIII 的 DB25-2，也顯示出其強烈的中和活性。參表 1。

#### (6) MAbs 預防乳鼠因 DENV-2 所引發的致死性

以 ICR 種之乳鼠(2 天齡)(Meiklejohn et al., 1952; Sabin and Schlesinger, 1945)，進行中和性 MAbs 之體內(*in vivo*)保護實驗。將小鼠以腦內接種的方式接種 20  $\mu\text{l}$  的 DENV-2-MAb 混合物，其包含 DENV-2  $1 \times 10^4$  plaque-forming units (25-fold LD<sub>50</sub>)及 10  $\mu\text{g/ml}$  的中和性

MAb。每天觀察小鼠是否出現不正常的症狀，連續觀察 21 天。顯著地，處理以非中和性抗體 NMIgG 之組別在第 6-9 天乳鼠出現癱瘓、豎毛及低活力的現象。接著在第 10-17 天出現嚴重病徵，包括食慾缺乏、無力及死亡等現象。相對地，DB32-6 保護了 93% 的小鼠免於因 DENV-2 而死亡。3H5, DB23-3, DB2-3 及 DB25-2 之保護效果為分別具有 75%, 76%, 72% 及 71% 的存活率。DB42-3 及 DB13-19 分別顯示了 46% 及 28% 的存活率。相較於 NMIgG 而言，中和性抗體展現出顯著延遲癱瘓及死亡的發生。

為了評估具高度保護性的 MAb DB32-6 之醫療潛力，施予 100  $\mu\text{g/ml}$  或 1  $\mu\text{g/ml}$  經 i.c. 注射感染登革病毒之乳鼠，21 天後其存活率分別為 100% 及 89%。相比之下，3H5 分別為 82% 及 40% 的存活率。DB32-6 比習知強力中和性 3H5 更具有強烈中和性及保護能力。

該些結果顯示該些中和性 MAbs 可被用於治療及抑制 DENV-2 感染。

### (7) $V_H$ 及 $V_L$ 序列分析

為了進一步將該些 MAbs 發展於臨床用途，在此選殖並分析該些 MAbs 之  $V_H$  及  $V_L$  DNA 序列。該些中和性 MAbs 之  $V_H$  及  $V_L$  之胺基酸序列係顯示如第 1 圖所示。序列分析顯示出 6 種 MAbs 係為獨特的。FR1 至 FR4 及 CDR1 至 CDR3 的胺基酸序列已確認。最接近的參考基因係顯示如下表 2。有趣的是 DB2-3 及 DB23-3 株共有  $V_H1S137*01$  及  $J_H4*01$  之基因片段，顯示出，藉由  $V_H$  及  $J_H$  基因片段編碼之 CDR1/2 重鏈環 (heavy-chain loops) 結合於 DENV-2，其具有特殊的配搭性。然而，DB13-19, DB25-2, DB32-6 及 DB42-3 基因片段皆不相同。該些資料顯示，結合親和性的較佳化可發生於藉由細胞的高突變性及體內篩選而達成。

表 2 中和性 MAbs 的遺傳學特徵

基因片段 <sup>a</sup>	MAbs					
	DB2-3	DB13-19	DB23-3	DB25-2	DB32-6	DB42-3
$V_H$	1S137*01	5S4*01	1S137*01	2.5*01	14.3*02	5.9*04

J <sub>H</sub>	4*01	3*01	4*01	2*01	1*01	4*01
V <sub>L</sub>	1.110*01	6.23*01	1.117*01	6.32*01	3.2*01	1*01
J <sub>L</sub>	2*01	1*01	1*01	2*01	1*01	1*01

<sup>a</sup>V<sub>H</sub>, 重鏈 V 基因; J<sub>H</sub>, 重鏈 J 基因; V<sub>L</sub>, 輕鏈 V 基因; J<sub>L</sub>, 輕鏈 J 基因。

### (8) 中和性抗原決定位之確認

利用噬菌體表現技術確認前述中和性抗體的中和性抗原決定位，經過三次噬菌體表現生物汰選後，噬菌體效價增加至 85 倍(DB32-6)及 331 倍(DB25-2)(和第 1 次結果相比)。隨機挑選出第 3 次生物汰選中個別的噬菌體株。利用 ELISA 確認該些 MAbs 是否可專一地辨識所挑選的噬菌體株。在個別挑選的 20 個噬菌體株中，分別有 17 及 18 個噬菌體株可顯著結合至 DB32-6 及 DB25-2。選出的噬菌體 PC32-6 及 PC25-14 係可單一地且劑量依賴地分別結合至 DB32-6 及 DB25-2，且不會與控制組 NMIgG 結合。

將 17 個對於 DB32-6 產生高度反應之噬菌體株進行擴增，且純化其噬菌體 DNA 進行定序。所有噬菌體株表現出 12 個胺基酸殘基(第 2 圖，左)。藉由 DB32-6 所挑出的噬菌體表現胜肽序列具有組胺酸(H)-離胺酸(K)-麩胺酸(E)-色胺酸(W)/酪胺酸 (Y)-組胺酸(H)之保留序列(第 2 圖，左)。相似地，利用顯示 7 個胺基酸序列的噬菌體庫，藉由 DB32-6 所挑選出的 17 個免疫陽性噬菌體株，亦包含 H-K-E-W/Y-H 之保留序列(第 2 圖，左)。有趣地，藉由 DB32-6 及 DB25-2 挑選出的所有噬菌體表現胜肽分別包含離胺酸(K)及麩胺酸(E)(第 2 圖)。

為了進一步確認中和性抗原決定位，發明人發展出不同專一剔除套膜蛋白抗原決定位之 VLPs (E protein epitope-specific knock-out VLPs)，並篩選出無結合之 VLP 突變株(loss-of-binding VLP mutants)以確認最關鍵的辨認殘基。利用此方法，發現當 DB32-6 在 E-DIII 的 A-股之 K310 變成丙胺酸(K310A) 或麩醯胺酸(K310Q)時，抗體即失去與其 VLP 結合能力。相似地，當 DB25-2 在 E-DIII 的 A-股之 E311 變成精胺酸(E311R)，抗體即失去與其 VLP 結合能力。兩個重要的辨識殘基 K310 及 E311 皆位於 E-DIII 的 A-股。在此發現，如先前報告所述

地，MAb 3H5 可辨識殘基 K305、E383 及 P384。

發明人結合噬菌體表現、電腦結構分析及 VLP 突變試驗以確認中和性抗原決定位。值得注意地，即使鄰近殘基(K310 及 E311)能引發抗體產生不同程度的中和活性。本發明數據進一步確認位於 E-DIII 的 A-股之抗原決定位對於誘發中和性抗體是相當重要的。

#### (9) 人源化 DB32-6MAb 的發展

將 DB32-6 的 CDRs 接在人類 IgG1 骨架，以產生人源化 DB32-6 (hDB32-6)。在 CHO-K1 細胞中表現 hDB32-6 抗體，並純化其培養液。hDB32-6 抗體保有鼠類 DB32-6 (mDB32-6) 抗 DENV-2 的專一性。發明人建立了 hDB32-6 的穩定株。在挑選後，MAbs hDB32-6-30、hDB32-6-48 及 hDB32-6-51 被發現具有高度結合活性。比較該些 MAbs，發現 hDB32-6-48 具有最高的產量。MAb hDB32-6-48 係為劑量依賴地抗 DENV-2 及 E-DIII。其親和性經由表面離子共振(surface plasmon resonance)進行分析。鼠類 DB32-6 及 hDB32-6-48，具相似的親和性(分別為 0.12 nM 及 0.18 nM)能結合於 DENV-2 之 E-DIII。其結果顯示出人源化 DB32-6 仍保持鼠類 DB32-6 對套膜蛋白的結合親和性。

#### (10) DB32-6 保護小鼠對抗 DENV-2-引發致死性及出血性

利用兩種小鼠模式評估 DB32-6 是否可有效地保護小鼠對抗 DENV-2 的威脅。發明人建立一種乳鼠模式以確認 mDB32-6 及 hDB32-6 的保護能力。在乳鼠保護實驗中，10  $\mu\text{g/ml}$  的 mDB32-6 及 hDB32-6-48 可保護小鼠對抗 DENV-2 的威脅並分別顯示 96% 及 92% 的存活率。給予小鼠 1  $\mu\text{g/ml}$  的 mDB32-6、hDB32-6-48 及 3H5，其分別具有 92%、77% 及 37% 的存活率。

為進一步評估 MAbs 的醫療效果，在感染病毒 1 天後給予 5  $\mu\text{g}$  的 MAb。其結果顯示給予 MAbs mDB32-6、hDB32-6-48 及 3H5 的組別中，其存活率分別為 96%、94% 及 56%。然而，在給予正常人類 IgG (NHlgG) 的控制組中，沒有任何小鼠存活。

利用 C57BL/6 小鼠以評估 DB32-6 是否可中和 DENV-2 及避免出

血現象的發生。在接種前將 DENV-2 16681 處理以 PBS 或各抗體。值得注意地，和預處理以 PBS 之病毒比較，其引發 100% 的小鼠發生嚴重出血現象，而預處理以 mDB32-6 及 hDB32-6-48 之病毒並無引發(0%) 小鼠發生嚴重出血現象。預處理以 NHIgG 和 3H5 病毒分別引發 80% 和 60% 的小鼠發生輕度出血。嚴重出血發生於小鼠被 PBS-和 NHIgG-處理的病毒，及預處理以 3H5 病毒引發小鼠輕度出血感染。重要地，mDB32-6 及 hDB32-6-48 完全地中和 DENV 所引發出血現象的能力。該些結果顯示人源化 DB32-6 具有出色的對抗 DENV-2 之中和能力，且可用於作為醫療抗體以預防及治療 DENV-2 感染。

#### 其它實施例

本說明書揭露之所有特徵可以任意組合方式結合。說明書中所揭露的每一特徵可取代為其他具有相同、等效或相似目的的特徵。據此，除非有其他明確闡述，在此所揭露之各個特徵僅為上位系列之等效或相似特徵之實施例。

根據上述內容，該領域熟習此技藝人士可輕易地確認本發明之必要特徵，且未脫離本發明保護範圍及精神，可對本發明作不同變化及修飾以用於不同用途及條件。據此，其它實施例亦在本發明請求保護範圍中。

## 參考文獻

Beasley, D.W., and Barrett, A.D. (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol* 76, 13097-13100.

Chau, T.N., Quyen, N.T., Thuy, T.T., Tuan, N.M., Hoang, D.M., Dung, N.T., Lien le, B., Quy, N.T., Hieu, N.T., Hieu, L.T., et al. (2008). Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis* 198, 516-524.

Chen, Y.C., Huang, H.N., Lin, C.T., Chen, Y.F., King, C.C., and Wu, H.C. (2007). Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. *Clin Vaccine Immunol* 14, 404-411.

Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA (2007) Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol* 81: 5518-5526.

Churdboonchart, V., Bhamarapavati, N., Peampramprecha, S., and Sirinavin, S. (1991). Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 44, 481-493.

Crill, W.D., and Chang, G.J. (2004). Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol* 78, 13975-13986.

Crill, W.D., Hughes, H.R., Delorey, M.J., and Chang, G.J. (2009). Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One* 4, e4991.

Crill, W.D., and Roehrig, J.T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.

Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Zewe, M., Gotter, S., Welschof, M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1994). Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *J Immunol Methods* 175, 89-95.

Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J.J., and Lai, C.J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 64, 4356-4363.

Farrar, J., Focks, D., Gubler, D., Barrera, R., Guzman, M.G., Simmons, C., Kalayanarooj, S., Lum, L., McCall, P.J., Lloyd, L., et al. (2007). Towards a global dengue research agenda. *Trop Med Int Health* 12, 695-699.

Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A., and Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73, 6104-6110.

Goncalvez, A.P., Chien, C.H., Tubthong, K., Gorshkova, I., Roll, C., Donau, O., Schuck, P., Yoksan, S., Wang, S.D., Purcell, R.H., et al. (2008). Humanized monoclonal antibodies derived from chimpanzee Fabs protect against Japanese encephalitis virus in vitro and in vivo. *J Virol* 82, 7009-7021.

Goncalvez, A.P., Purcell, R.H., and Lai, C.J. (2004). Epitope determinants of a chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virol* 78, 12919-12928.

Green, S., and Rothman, A. (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 19, 429-436.

Gromowski, G.D., and Barrett, A.D. (2007). Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* 366, 349-360.

Gromowski, G.D., Barrett, N.D., and Barrett, A.D. (2008). Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus. *J Virol* 82, 8828-8837.

Gubler, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11, 480-496.

Halstead, S.B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239, 476-481.

Halstead, S.B. (2007). Dengue. *Lancet* 370, 1644-1652.

Halstead, S.B., and O'Rourke, E.J. (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 265, 739-741.

Kalayanarooj, S., Vaughn, D.W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Viramitrachai, W., Ratanachu-ek, S., Kiatpolpoj, S., Innis, B.L., et al. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 176, 313-321.

Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717-725.

Lai, C.J., Goncalvez, A.P., Men, R., Wernly, C., Donau, O., Engle, R.E., and Purcell, R.H. (2007). Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. *J Virol* 81, 12766-12774.

Lai, C.Y., Tsai, W.Y., Lin, S.R., Kao, C.L., Hu, H.P., King, C.C., Wu, H.C., Chang, G.J., and Wang, W.K. (2008). Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 82, 6631-6643.

Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., and Vorndam, A.V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30, 545-551.

Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImmunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 37, D1006-1012.

Lin, B., Parrish, C.R., Murray, J.M., and Wright, P.J. (1994). Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2. *Virology* 202, 885-890.

Lin, C.F., Chiu, S.C., Hsiao, Y.L., Wan, S.W., Lei, H.Y., Shiau, A.L., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., Liu, C.C., et al. (2005). Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus

nonstructural protein 1. *J Immunol* 174, 395-403.

Lin, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., Liu, C.C., Chiu, S.C., and Lin, Y.S. (2002). Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* 169, 657-664.

Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* 71, 9608-9617.

Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73, 4611-4621.

Littaua, R., Kurane, I., and Ennis, F.A. (1990). Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 144, 3183-3186.

Mathew, A., and Rothman, A.L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 225, 300-313.

Meiklejohn, G., England, B., and Lennette (1952). Propagation of dengue virus strains in unweaned mice. *Am J Trop Med Hyg* 1, 51-58.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6986-6991.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 1223-1231.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.

Normile, D. (2007). Tropical diseases. Hunt for dengue vaccine heats up as the disease burden grows. *Science* 317, 1494-1495.

Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G.E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A., Chung, K.M., et al. (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med* 11, 522-530.

Oliphant, T., Nybakken, G.E., Engle, M., Xu, Q., Nelson, C.A., Sukupolvi-Petty, S., Marri, A., Lachmi, B.E., Olshevsky, U., Fremont, D.H., et al. (2006). Antibody recognition

and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virol* 80, 12149-12159.

Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T., and Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3833-3837.

Orum, H., Andersen, P.S., Oster, A., Johansen, L.K., Riise, E., Bjornvad, M., Svendsen, I., and Engberg, J. (1993). Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Res* 21, 4491-4498.

Pierson, T.C., Fremont, D.H., Kuhn, R.J., and Diamond, M.S. (2008). Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe* 4, 229-238.

Pokidysheva, E., Zhang, Y., Battisti, A.J., Bator-Kelly, C.M., Chipman, P.R., Xiao, C., Gregorio, G.G., Hendrickson, W.A., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124, 485-493.

Qu, X., Chen, W., Maguire, T., and Austin, F. (1993). Immunoreactivity and protective effects in mice of a recombinant dengue 2 Tonga virus NS1 protein produced in a baculovirus expression system. *J Gen Virol* 74 ( Pt 1), 89-97.

Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298.

Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., and Strauss, J.H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726-733.

Roehrig, J.T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 59, 141-175.

Roehrig, J.T., Bolin, R.A., and Kelly, R.G. (1998). Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328.

Sabin, A.B., and Schlesinger, R.W. (1945). Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science* 101, 640-642.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Putnak, J.R., and Walsh, E.E. (1990). Cell surface

expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* 71 ( Pt 3), 593-599.

Sukupolvi-Petty, S., Austin, S.K., Purtha, W.E., Oliphant, T., Nybakken, G.E., Schlesinger, J.J., Roehrig, J.T., Gromowski, G.D., Barrett, A.D., Fremont, D.H., et al. (2007). Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* 81, 12816-12826.

Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A.Q., Korimbocus, J., Kramer, R.A., Clijsters-van der Horst, M., de Jong, M., Jongeneelen, M., Thijsse, S., et al. (2006). Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *J Virol* 80, 6982-6992.

Valdes, K., Alvarez, M., Pupo, M., Vazquez, S., Rodriguez, R., and Guzman, M.G. (2000). Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 856-857.

Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., et al. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181, 2-9.

Vaughn, D.W., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Solomon, T., Dung, N.M., Cuzzubbo, A., and Devine, P.L. (1998). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 36, 234-238.

Vaughn, D.W., Nisalak, A., Solomon, T., Kalayanarooj, S., Nguyen, M.D., Kneen, R., Cuzzubbo, A., and Devine, P.L. (1999). Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 60, 693-698.

Wang, W.K., Chen, H.L., Yang, C.F., Hsieh, S.C., Juan, C.C., Chang, S.M., Yu, C.C., Lin, L.H., Huang, J.H., and King, C.C. (2006). Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 43, 1023-1030.

Winkler, G., Maxwell, S.E., Ruemmler, C., and Stollar, V. (1989). Newly synthesized

dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171, 302-305.

Wu, H.C., Huang, Y.L., Chao, T.T., Jan, J.T., Huang, J.L., Chiang, H.Y., King, C.C., and Shaio, M.F. (2001). Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol* 39, 977-982.

Wu, H.C., Jung, M.Y., Chiu, C.Y., Chao, T.T., Lai, S.C., Jan, J.T., and Shaio, M.F. (2003). Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. *J Gen Virol* 84, 2771-2779.

Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA (2008) Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol* 82: 12312-12324.

Yu, C.Y., Hsu, Y.W., Liao, C.L., and Lin, Y.L. (2006). Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol* 80, 11868-11880.

Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22, 2604-2613.

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示出 DB2-3, DB13-19, DB23-3, DB25-2, DB32-6 及 DB42-3 之 (A)重鏈變異區( $V_H$ )及(B)輕鏈變異區( $V_L$ )的胺基酸序列。

第 2 圖顯示出選自 DB32-6 及 DB25-2 之噬菌體表現胜肽序列之比對結果。保留序列(consensus motif)以粗體表示。

### 【主要元件符號說明】

無





<210> 5  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> synthetic polypeptide

<400> 5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Ile Thr Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
                   35                   40                   45  
 Lys Leu Leu Ile His Ser Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala  
                   50                   55                   60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Met Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
                   85                   90                   95  
 Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> synthetic polypeptide

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Tyr Gly Ile Thr Phe Leu Asn  
 1                   5                   10                   15

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 7

Ser Ala Ser Asn Arg Gly Ser

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 8

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 9

gatgctagca tgcggtgcat aggaata

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligocucleotide

<400> 10

gatctcgagt cctttgagct gtagttt

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 11

gatgctagca tgaaaggaat gtcatac

27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

gatctcgagt tggccgatag aact

24

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 13

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1                    5                                    10                                    15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                                    25                                    30  
 Ala Ile Thr Trp Val Lys Glu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                                    40                                    45  
 Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe







&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic polypeptide

&lt;400&gt; 18

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Tyr Thr Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic polypeptide

&lt;400&gt; 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Ala  
                   20                    25                    30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Leu Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110  
 Pro Thr Val Ser  
 115

<210> 20  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> synthetic polypeptide

<400> 20

Asp Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Val Asn Ser Asn  
 20 25 30  
 Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
 85 90 95  
 His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser  
 115 120

<210> 21  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> synthetic polypeptide

<400> 21

Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp



<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> synthetic polypeptide

<400> 23

Phe His Lys Glu Tyr His Ile Thr Arg Met Thr Ala  
1                    5                    10

<210> 24  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> synthetic polypeptide

<400> 24

Thr His Lys Glu Tyr His Thr Leu Met Gly Leu Gln  
1                    5                    10

<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> synthetic polypeptide

<400> 25

Tyr His Lys Glu Trp His Gly Ser Leu Leu Ala Arg  
1                    5                    10

<210> 26  
<211> 12  
<212> PRT



<223> synthetic polypeptide

<400> 29

Ser His Lys Glu Trp His Val

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 30

Met His Lys Glu Trp His Leu

1 5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide

<400> 31

Val Pro Gln Leu Gly Trp Trp Tyr Asp Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic polypeptide





## 七、申請專利範圍：

1. 一種專一性結合於登革病毒的單離抗體，該抗體包含：一包括 SEQ ID NO:2 之重鏈 CDR1，一包括 SEQ ID NO:3 之重鏈 CDR2，一包括 SEQ ID NO:4 之重鏈 CDR3，一包括 SEQ ID NO:6 之輕鏈 CDR1，一包括 SEQ ID NO:7 之輕鏈 CDR2，及一包括 SEQ ID NO:8 之輕鏈 CDR3。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體，該抗體包含：一包括 SEQ ID NO:1 之重鏈可變區，及一包括 SEQ ID NO:5 之輕鏈可變區。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體，其中該抗體係為一抗原結合片段。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體，其中該抗體係為人源化。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體，其中該抗體係為一嵌合抗體。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體，其中該抗體係為一單鏈抗體。
7. 如申請專利範圍第 3 項所述之單離抗體，其中該抗原結合片段係為一 F(ab')<sub>2</sub>、Fab 或 Fv。
8. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之單離抗體用於製備治療或預防登革病毒感染藥物之用途。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之用途，其中該抗體包含：一包括 SEQ ID NO:1 之重鏈可變區，及一包括 SEQ ID NO:5 之輕鏈可變區。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之用途，其中該抗體係為人源化。
11. 一種在一樣本中檢測登革病毒抗原存在的方法，該方法包括：  
提供一可能包含一登革病毒抗原之樣本，  
使該樣本與如申請專利範圍第 1 項所述之抗體接觸，及  
確認該抗體是否結合於該樣本中之一抗原，  
其中該抗體與抗原的結合表示該樣本中存在有一登革病毒抗原。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中該抗體包含：一包括 SEQ ID NO:1 之重鏈可變區，及一包括 SEQ ID NO:5 之輕鏈可變區。

13. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中該抗體係為人源化。
14. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中該樣本係為一來自可能受登革病毒感染之患者之組織樣本。
15. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中該樣本係為一來自可能受登革病毒感染之患者之血清樣本。

## 八、圖式：

(A)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DB2-3	EVQLQQSGAELVLRPGVSVKISCKGSG	YTFDYAIT	WVKESHAESLEWI	GLISTYYGDSFYNQKFKG
DB13-19	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCATSG	FTFSTYGMS	WVRQTPEERLEWV	ATISGDCSYTYYPDTVKGPF
DB23-3	EVQLQQSGSELVLRPGVSVKISCKGSG	YTFDYAH	WVRQSHDKSLEWI	GLISTYYGVSYNQKFKGMA
DB25-2	QVQLKESGPGLVQPSQSLITCTVSG	FSLTDYGVH	WIRQSPGKGLEWLG	VIWRGGITDYNAAFMS
DB32-6	QVQLQSGAELVLRPGASVKLSCTASG	FNKDTYIH	WVKORPGGLEWI	GRIDPENGNAKYDPNQARA
DB42-3	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSCAASG	PTFSNFAMS	WVRQTPEERLEWV	ATIGGGGDSYFPDSVKGPF

	FR3	CDR3	FR4
DB2-3	KATMTVDRGERTAVMELARLTSEDSAIYYC	TIRDRGKAMDY	WGQQTSTVTVSS
DB13-19	TISRDNAKNNLYLQMSLRSSEDTALYYC	ASYNYGGFAY	WGQGTLSVSSAAKTTPPSDYPLA
DB23-3	TTVDKESSTAYLELARLTSEDSAIYYC	ARLGGDFADY	WGQGTSTVSSAAKTTPPSDYPLA
DB25-2	RLSITKDKSESQVFFKMDSLQPDSDAIYYC	AENFGTHYIGSNYGNFDY	WGQGTITLTVSS
DB32-6	TITADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVVYS	VRTGSEFWYFDV	WGA GTTVTVSS
DB42-3	TISRDNARNILYLQMSLRSDDTAMYFC	TREGGDDQYYSNDY	WGQGTSTVSSAAKTTPPSDYPLA

(B)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DB2-3	DVYMTQTPLSLPVSLGDIASISC	RSSQSLVHSGNNTYLE	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS
DB13-19	DIYMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	KASQDVGIAVA	WYQQKPRQSPKLLIY	WASTRHT
DB23-3	DVLTQTPLSLPVSLGDIASISC	RSSQSVVNSGNNTYLE	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS
DB25-2	VVMTQTPKFLLVSAQDRVTITC	KASQSVSNDVA	WYQQKPGQSPKLLIY	YVSNRYS
DB32-6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDKYGITPLM	WFQQKPGQPPKLLIH	SASNRGS
DB42-3	QAVVTQEGALTTSPGETVTLTC	RSSTCAVTTSDNYAN	WVQEKPDRLFNCLIG	GTNERAP

	FR3	CDR3	FR4
DB2-3	GVPDRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPYT	GGG TKLEIK
DB13-19	GVPDRFTGSGSGTDLTLTIINNVQSEDLADYFC	QQFNSYPLT	FGGGTKLEIKRADAAPTVS
DB23-3	GVPDRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDLGVYFC	FQGSHPPT	FGGCTKLEIKRADAAPTVS
DB25-2	GVPDRFTGSGYGTDFTFPIINIVQAEDLAVYFC	QQDYSSPYT	FGGGTKLEIK
DB32-6	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDIAMYFC	QQSKEVPWT	FGGGTKLEIK
DB42-3	GVPARFSGSLIGDKAALFITGAQPEDEAIYFC	ALWYSNHFV	FGGTRTLVVGPKSTPTLI

第 1 圖

DB32-6 噬菌體株(12 aa)		勝肽序列	
PC32-1, 12	F H K E Y H I T R M T A	PC25-8	V P Q L G W W Y D E P T
PC32-7, 9	T H K E Y H T L M G L Q	PC25-14	T F H W S P W P W L D E
PC32-4, 11, 13, 18	Y H K E W H G S L L A R	PC25-1	N A L Y M I R L S S E L
PC32-2, 5, 8, 14, 16, 17	N H K T W H L Q V N P L	PC25-20	Y S S E W Y T V P L P L
PC32-6, 10, 20	T H K L W H I P S N W R	PC25-17	S H R W V E W R N F F P
DB32-6 噬菌體株(7 aa)		勝肽序列	
7P32-1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20	T H K E Y H W		
7P32-3, 6	S H K E W H V		
7P32-15	M H K E W H L		

第 2 圖