

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 10 月 11 日 (11.10.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/184593 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/08 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) **A61P 31/20** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/082157

(22) 国际申请日: 2018 年 4 月 8 日 (08.04.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710223992.8 2017 年 4 月 7 日 (07.04.2017) CN

(71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 养生堂有限公司 (YANG SHENG TANG COMPANY, LTD.) [CN/CN]; 中国海南省海口市金盘工业区金牛路, Hainan 570216 (CN)。

(72) 发明人: 罗文新 (LUO, Wenxin); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 康赐明 (KANG, Ciming); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 王一文 (WANG, Yiwu); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 袁权 (YUAN, Quan); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 张天英 (ZHANG, Tianying); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 夏宁邵 (XIA, Ningshao); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区

保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY FOR TREATING HEPATITIS B INFECTION AND RELATED DISEASE

(54) 发明名称: 用于治疗乙肝感染及相关疾病的抗体

(57) Abstract: Provided are an antibody against hepatitis B surface antigen, an encoding nucleic acid and a preparation method thereof, and a pharmaceutical composition comprising the antibody. Also provided are uses of the antibody and the pharmaceutical composition. The antibody and the pharmaceutical composition can be used to prevent and/or treat HBV infection or a disease related to HBV infection (e.g., hepatitis B), neutralize virulence of HBV in the body of a subject (e.g., human), and decrease serum levels of HBV DNA and/or HBsAg.

(57) 摘要: 提供了抗乙肝表面抗原的抗体、其编码核酸、制备方法及包含所述抗体的药物组合物。还提供了所述抗体和药物组合物的用途。所述抗体和药物组合物可用于预防和/或治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病 (如乙肝), 可在受试者 (如人) 体内中和 HBV 的毒力, 降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。



WO 2018/184593 A1

用于治疗乙肝感染及相关疾病的抗体

技术领域

本发明涉及分子病毒学和免疫学领域，特别是治疗乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染的领域。具体而言，本发明涉及抗乙肝表面抗原(HBsAg)的抗体，编码它们的核酸分子，制备它们的方法，以及包含它们的药物组合物。所述药物组合物可用于预防和/或治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，或用于在受试者体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。因此，本发明进一步涉及，所述抗体(特别是人源化抗体)及其变体在制备药物组合物中的用途，所述药物组合物用于预防和/或治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，或用于在受试者体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。

背景技术

乙型肝炎病毒感染，尤其是慢性 HBV 感染是全球最为重要的公共卫生问题之一(Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 2008 Oct 2;359(14):1486-1500)。慢性 HBV 感染可导致慢性乙型病毒性肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(Liver cirrhosis, LC)和原发性肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)等一系列肝脏疾病(Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. Lancet 2009 Feb 14;373(9663): 582-592)。据报道，目前全球约有 20 亿人曾经感染过 HBV，现约有 3.5 亿的慢性乙型肝炎病毒感染者，这些感染者最终死于 HBV 感染相关肝脏疾病的风险可达 15%-25%，全球每年超过 100 万人死于此类疾病(Dienstag JL., 同上；和 Liaw YF 等，同上)。

当前针对慢性 HBV 感染的治疗药物主要可分为干扰素类(Interferon, IFNs)和核苷/核苷酸类似物(nucleoside or nucleotide, NAs) (Dienstag JL., 同上；Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011 May;8(5): 275-284；和 Liaw YF 等，同上)。前者包括普通干扰素(IFN)和聚乙二醇干扰素(Peg-interferon, Peg-IFN，又称为长效干扰素)，主要通过整体增强患者免疫能力来达到抑制 HBV 和治疗 CHB 的效果；后者主要包括拉米夫定(lamivudine, LMV)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(Entecavir, ETV)、替比夫定(Telbivudine, LdT)、替诺福韦(Tenofovir)等 5 种，主要通过直接抑制 HBV 的聚合酶活性来抑制 HBV 复制。对于 HBV 感染者(例如 CHB 患者)

来说,上述药物的单独或联合治疗,已能较为有效地抑制体内病毒复制,大幅降低 HBV DNA 水平;特别地,52 周或延长的此类治疗后,患者体内 HBV DNA 水平低于检测下限(病毒学应答)的应答率可达 40-80% (Kwon H 等,同上)。然而,上述药物的单独或联合治疗均不能完全清除感染者体内的 HBV 病毒,其导致的 HBsAg 阴转或 HBsAg 血清学转换(感染者体内 HBV 病毒彻底清除的标志)的应答率通常小于 5% (Kwon H 等,同上)。因此,针对 HBV 感染者发展创新的、能更为有效地清除 HBV 病毒、尤其是清除 HBsAg 的治疗方法和药物是迫切而必要的。

基于免疫学手段发展新的治疗慢性 HBV 感染的药物是此领域的重要研究方向之一。慢性 HBV 感染的免疫治疗通常通过主动免疫治疗(其对应药物形式如疫苗等)和被动免疫治疗(其对应药物形式如抗体等)等两种方式进行。主动免疫治疗则是指,通过施用治疗性疫苗(包括蛋白疫苗、多肽疫苗和核酸疫苗等),刺激慢性 HBV 感染者机体主动产生针对 HBV 的细胞免疫应答(CTL 效应等)或/和体液免疫应答(抗体等),从而达到抑制或清除 HBV 的目的。目前尚无明确显著有效的、可用于治疗慢性 HBV 感染的主动免疫治疗药物/疫苗。被动免疫治疗(以抗体为例)是指,向 HBV 感染者被动施用具治疗特性的抗体,并利用抗体介导的病毒中和作用阻断 HBV 感染新生肝细胞,或利用抗体介导的免疫清除作用清除体内病毒和被感染的肝细胞,从而起到治疗的效果。目前,从预防性乙型肝炎疫苗免疫应答者或 HBV 感染恢复者血清/血浆中纯化获得的 Anti-HBs 多克隆抗体,即高效价的乙肝免疫球蛋白(HBIG)已广泛应用于阻断 HBV 的母婴垂直传播、预防慢性 HBV 感染者肝移植后的 HBV 再感染、以及预防意外暴露于 HBV 的人群的感染。然而,将 HBIG 直接用于 HBV 感染者(例如 CHB 患者)的治疗无明显疗效,且其存在例如高效价血浆来源较少、价格昂贵、性质不稳定、潜在的安全性问题等诸多局限性。

因此,针对 HBV 感染者发展创新的、能更为有效地治疗 HBV 感染的治疗方法和药物是迫切而必要的。

发明概述

在一个方面,本发明提供了一种能够特异性结合 HBsAg 的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 选自下列的重链可变区(VH)互补决定区(CDR)中的一个或多个(例如 1 个,2 个或 3 个):

(i) VH CDR1,其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:

18 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 13，SEQ ID NO: 19 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 14，SEQ ID NO: 20，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b)选自下列的轻链可变区(VL) CDR 中的一个或多个(例如1个，2个或3个)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 15 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 16 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 11，SEQ ID NO: 17 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，所述 VH 包含：

(i) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 7，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 8，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

以及

(iii) VH CDR1, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列;

和/或

5 (b) 轻链可变区 (VL), 所述 VL 包含:

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 9, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 11, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

10 以及

(vi) VL CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的轻链可变区 (例如, κ 轻链可变区) 中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR1 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列。

15 在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR1 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 6, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列; 或, (b) 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VH CDR1 的序列。在某些示例性实施方案中, 所述人重链胚系基因选自 IGHV4-4*08 和 IGHV4-61*01。

20 在某些示例性实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2; 如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 以及, 具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR1: SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 137 或 SEQ ID NO: 138。

在某些优选的实施方案中, 所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区 (例如, κ 轻链可变区) 中所包含的 VL CDR2 的序列。

25 在某些优选的实施方案中, 所述 VL CDR2 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 10, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列; 或, (b) 人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VL CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中, 所述人轻链胚系基因选自 IGKV1-39*01 和 IGKV1-5*03。

30 在某些示例性实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID

NO: 9 所示的 VL CDR1; 如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3; 以及, 具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2: SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 139 或 SEQ ID NO: 140。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2, 如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3, 以及具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR1: SEQ ID NO: 6, 137 或 138; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3, 以及具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2: SEQ ID NO: 10, 139 或 140。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 所述 VH 包含:

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 12, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

以及

(iii) VH CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列;

和/或

(b) 轻链可变区 (VL), 所述 VL 包含:

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

以及

(vi) VL CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的轻链可变区 (例如, κ 轻链可变区) 中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR2 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR2 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 13, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸

置换、缺失或添加)的序列;或,(b)人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VH CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中,所述人重链胚系基因选自 IGHV4-30-4*07 和 IGHV4-4*01。

在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含:(a)如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1;如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3;以及,具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR2: SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142。

在某些优选的实施方案中,所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区(例如,κ 轻链可变区)中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中,所述 VL CDR2 由下述序列组成:(a)SEQ ID NO: 16,或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如,1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;或,(b)人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VL CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中,所述人轻链胚系基因选自 IGKV2-28*01 和 IGKV3-15*01。

在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段的 VL 包含:如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1;如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3;以及,具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2: SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144。

在某些优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含:如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1,如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3,以及具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR2: SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142;并且,该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含:如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1,如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3,以及具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2: SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144。

在某些优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区(VH),所述 VH 包含:

(i) VH CDR1,其由下述序列组成:SEQ ID NO: 18,或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如,1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(ii) VH CDR2,其由下述序列组成:SEQ ID NO: 19,或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如,1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 20, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

和/或

(b) 轻链可变区(VL), 所述 VL 包含:

5 (iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 16, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

和

10 (vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR2, 以及如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2, 以及如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97% 或至少 98%。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的非 CDR 区包含不超过 19 个, 不超过 15 个, 不超过 14 个, 不超过 13 个, 不超过 12 个, 不超过 11 个, 不超过 10 个, 不超过 9 个, 不超过 8 个, 不超过 7 个, 不超过 6 个, 不超过 5 个, 不超过 4 个或不超过 3 个的非人源(例如, 食蟹猴源)氨基酸残基。

25 在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段进一步包含框架区(FR)。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

30 (a) 选自下列的重链可变区(VH)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1 个, 2 个, 3 个或 4 个):

(i) VH FR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

5 (ii) VH FR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 51, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(iii) VH FR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 52, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 和

10 (iv) VH FR4, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 53, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

和/或

15 (b) 选自下列的轻链可变区(VL)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1个, 2个, 3个或4个):

(v) VL FR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 54, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

20 (vi) VL FR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(vii) VL FR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 56, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 和

25 (viii) VL FR4, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH FR1、VH FR2、VH FR3 和 VH FR4。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VL FR1、VL FR2、VL FR3 和 VL FR4。在某些优选的

30

实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH FR1、VH FR2、VH FR3、VH FR4、VL FR1、VL FR2、VL FR3 和 VL FR4。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) 重链框架区，其与选自下列的重链可变区中所包含的重链框架区相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 所示的重链可变区；

和/或

- (b) 轻链框架区，其与选自下列的轻链可变区中所包含的轻链框架区具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) 选自下列的重链可变区中含有的 4 个 FR：

如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区；

和/或

- (b) 选自下列的轻链可变区中含有的 4 个 FR：

如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：

- (a) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH FR4；

(b) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4；

- (c) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH FR4；

(d) 如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 46 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 47 所示的 VH FR4；或

(e) 如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH FR4；

- 和/或，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：

(a) 如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4;

(b) 如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4;

5 (c) 如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4; 或

(d) 如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

10 在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含人免疫球蛋白的框架区 (例如, 人胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的框架区), 所述框架区任选地包含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区, 和/或人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: IGHV4-4*08 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区, 和 IGKV1-39*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区, 所述重链框架区和/或轻链框架区任选地包含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。

20 在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: IGHV4-4*02 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区, 和 IGKV4-1*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区, 所述重链框架区和/或轻链框架区任选地包含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

25 (a) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4;

(b) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO:

33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4;

(c) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4;

(d) 如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH FR3、如 SEQ ID NO: 46 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4; 或

(e) 如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列与选自下列的重链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性: 如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 所示的重链可变区。在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列与选自下列的轻链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性: 如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的重

链可变区和如上文所定义的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1,57,157 和 158 任一项所示的重链可变区；并且，所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2,58,159 和 160 任一项所示的轻链可变区；或

5 本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 3,59,163 和 164 任一项所示的重链可变区；并且，所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 4,60,165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

- (1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL;
- 10 (2) 如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL;
- (3) 如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL;
- (4) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;
- (5) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- (6) 如 SEQ ID NO: 157 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;
- 15 (7) 如 SEQ ID NO: 158 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;
- (8) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 159 所示的 VL;
- (9) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 160 所示的 VL;
- (10) 如 SEQ ID NO: 163 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- (11) 如 SEQ ID NO: 164 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- 20 (12) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 165 所示的 VL;或
- (13) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 166 所示的 VL。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、双抗体(diabody)、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体或人源化
25 抗体。在某些优选的实施方案中，所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段为 IgG 类别（例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 类别）。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 HBsAg，中和 HBV 的毒力，和/或降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 在受试者体内的血清水平。

30 在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段带有标记。在某些优选

的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记,例如放射性同位素,荧光物质,发光物质,有色物质或酶(例如辣根过氧化物酶)。

在另一个方面,本发明提供了一种分离的核酸分子,其包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段,或其重链可变区和/或轻链可变区的核苷酸序列。

5 在另一个方面,本发明提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体),其包含根据本发明的分离的核酸分子。

在另一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含根据本发明的分离的核酸分子或根据本发明的载体。

在另一个方面,提供了制备根据本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括,
10 在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养根据本发明的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒,其包括本发明的抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在一个优选的实施方案中,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别本发明的抗体
15 或其抗原结合片段。优选地,所述第二抗体还包括可检测的标记。此类可检测的标记是本领域技术人员熟知的,包括但不限于,放射性同位素,荧光物质,发光物质,有色物质和酶(例如辣根过氧化物酶)等。

在另一个方面,本发明提供了检测HBsAg蛋白在样品中的存在或其水平的方法,其包括使用本发明的抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中,所述方法还包括,使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的抗体或其抗原结合片段。所述方法可以用于诊断目的,或者非诊断目的(例如,所述样品是细胞样品,而非来自
20 患者的样品)。

在另一个方面,本发明提供了诊断受试者是否感染了HBV的方法,其包括:使用
25 本发明的抗体或其抗原结合片段检测HBsAg蛋白在来自所述受试者的样品中的存在。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中,所述方法还包括,使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面,提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,
30 所述试剂盒用于检测HBsAg蛋白在样品中的存在或其水平,或用于诊断受试者是否感

染了HBV。

本发明的抗体或其抗原结合片段可用于预防或治疗受试者(例如人)的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)，用于体外或在受试者(例如人)体内中和HBV的毒力，以及用于在受试者(例如人)体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

5 因此，在另一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其含有根据本发明的抗体或其抗原结合片段，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。在一个优选的实施方案中，本发明的药物组合物还可包含另外的药学活性剂。在一个优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是用于预防或治疗HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)的药物，例如干扰素类药物，如干扰素或聚乙二醇干扰素。

10 在另一个方面，提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段或根据本发明的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防或治疗受试者(例如人)的HBV感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)，用于体外或在受试者(例如人)体内中和HBV的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平。

在另一个方面，本发明提供了一种方法，其用于预防或治疗受试者(例如人)的HBV
15 感染或与HBV感染相关的疾病(例如乙肝)，用于在受试者(例如人)体内中和HBV的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低HBV DNA和/或HBsAg的血清水平，所述方法包括，给有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段或根据本发明的药物组合物。

本发明所提供的药物和药物组合物可以单独使用或联合使用，也可以与另外的药
20 学活性剂（例如其它抗病毒试剂，例如干扰素类药物，如干扰素或聚乙二醇干扰素）联合使用。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附
25 图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了实施例 2 中测定 3 株食蟹猴-人嵌合单克隆抗体 M1-23、M3-23、M3-13
30 与抗原 HBsAg 的结合活性的 ELISA 检测结果，其中，横坐标表示抗体浓度（Log₁₀

ng/ml), 纵坐标表示 OD 值。结果显示, 3 株食蟹猴-人嵌合单克隆抗体均具有良好的抗原结合活性。

图 2 显示了在实施例 2 中 6D11 鼠源抗体交叉阻断 3 株食蟹猴-人嵌合单克隆抗体 M1-23、M3-23、M3-13 与抗原 HBsAg 的结合的竞争 ELISA 法检测结果。结果显示, M1-23、M3-23、M3-13 与抗原 HBsAg 的结合可以被 6D11 显著抑制。

图 3A-3B 显示了在实施例 2 中食蟹猴-人嵌合单克隆抗体 M1-23、M3-23 在 HBV 转基因小鼠体内疗效评估结果。图 3A: 小鼠血清中 HBsAg 水平的变化情况, 其中, 横坐标表示注射嵌合抗体后的天数, 纵坐标表示小鼠血清中 HBsAg 的相对减少水平 (Log_{10} IU/ml); 图 3B: 小鼠血清中 HBV DNA 水平的变化情况, 其中, 横坐标表示注射嵌合抗体后的天数, 纵坐标表示小鼠血清中 HBV DNA 的相对减少水平 (Log_{10} IU/ml)。结果显示, M1-23、M3-23 均可明显清除动物体内 HBsAg 和 HBV DNA。

图 4 显示了在实施例 4 中人源化抗体 M1D、M3D 与抗原 HBsAg 的结合活性的 ELISA 检测结果, 其中, 横坐标表示抗体浓度 (Log_{10} ng/ml), 纵坐标表示 OD 值。结果显示, 2 株人源化抗体均具有良好的抗原结合活性, 其对 HBsAg 的亲和力优于参比抗体 162。

图 5 显示了在实施例 4 中 6D11 鼠源抗体交叉阻断人源化抗体 M1D、M3D 与抗原 HBsAg 的结合的竞争 ELISA 法检测结果。结果显示, 人源化抗体 M1D、M3D 与抗原 HBsAg 的结合可以被 6D11 显著抑制。

图 6A-6B 显示了在实施例 4 中人源化抗体 M1D 对 HBV 病毒的中和活性的测定结果, 其中, 图 6A 为以 HBIG 为标准品做的标准曲线, 图 6B 为样品的中和活性测定结果, 纵坐标表示每 mg 的抗体具有多少 mIU 标准单位的 HBIG 的中和活性。结果显示, M1D 对 HBV 的中和活性与参比抗体 162 相当。

图 7 显示了实施例 5 中人源化抗体 M1D、M3D 以及嵌合抗体 M3-13 在 HBV 转基因小鼠体内疗效评估结果。图 7A: 小鼠血清中 HBsAg 水平的变化情况, 其中, 横坐标表示注射人源化抗体后的天数, 纵坐标表示小鼠血清中 HBsAg 的相对减少水平 (Log_{10} IU/ml); 图 7B: 小鼠血清中 HBV DNA 水平的变化情况, 其中, 横坐标表示注射嵌合抗体后的天数, 纵坐标表示小鼠血清中 HBV DNA 的相对减少水平 (Log_{10} IU/ml)。结果显示, 3 株抗体均可明显清除动物体内 HBsAg 和 HBV DNA, 其效果优于参比抗体 162。

图 8A-8E 显示了实施例 6 中人源化抗体 M1D 进行 CDR 区替换后的抗体与抗原 HBsAg 结合活性的 ELISA 检测结果, 其中, 横坐标表示抗体浓度 (Log_{10} ng/ml), 纵坐

标表示 OD 值。结果显示, 对抗体 M1D 的 HCDR1 和 LCDR2 区替换后不影响与抗原 HBsAg 的结合活性, 说明抗体 M1D 的 HCDR1 和 LCDR2 区不是与抗原 HBsAg 结合的关键 CDR 区。

图 9A-9E 显示了实施例 6 中人源化抗体 M3D 进行 CDR 区替换后的抗体与抗原 HBsAg 结合活性的 ELISA 检测结果, 其中, 横坐标表示抗体浓度 (Log10 ng/ml), 纵坐标表示 OD 值。结果显示, 重链 CDR2(HCDR2)和轻链 CDR2(LCDR2)替换后, 不影响与抗原 HBsAg 的结合活性, 说明抗体 M3D 的 HCDR2 和 LCDR2 区不是与抗原 HBsAg 结合的关键 CDR 区。

图 10 显示了实施例 8 中抗体 M1D、M3D、162 与多种单点突变的 HBsAg aa113-135 多肽片段结合情况的 western blot 检测结果。结果显示, 抗体 162 与在 aa120、aa122、aa123 位点突变为丙氨酸后的 HBsAg 失去结合活性, 其核心表位为 CKTC(aa121-124); M1D 与在 aa118-124 位点突变为丙氨酸后的 HBsAg 失去结合活性, 其结合的核心表位 TGPCKTCT(aa118-124), 比参比抗体 162 更长, 且位置比 162 靠前; M3D 与在 aa121-125 位点突变为丙氨酸后的 HBsAg 失去结合活性结合, 其核心表位为 CKTCT(aa121-125), 核心表位位置比 162 靠后。

图 11A-11B 显示实施例 9 中了人源化抗体 M1D、M3D 与不同亚型对应的 HBsAg-aa113-135 的结合活性的 ELISA 检测结果, 其中, 横坐标表示抗体浓度 (Log10 ng/ml), 纵坐标表示 OD 值。结果显示 M1D、M3D 均可以结合大部分 HBV 亚型。

图 12A-12B 显示了实施例 11 中单次静脉注射 20 mg/kg 的人源化抗体 M1D、M3D 后, 每一只食蟹猴血清(第 1 组)中人源化抗体 M1D 的血药浓度随时间变化的曲线图。其中, 横坐标时间 (h), 纵坐标表示血药浓度 (ng/mL)。

图 13A-13B 显示了实施例 12 中人源化抗体 M1D、M3D 在三种不同缓冲液中的 Tm 值。横坐标表示温度 (°C), 纵坐标表示 CP(cal/°C)。结果显示, 人源化抗体 M1D 的 Tm onset 为 61.7°C 以上, 而 M3D 的 Tm onset 值均大于 61.6°C, 说明 M1D 和 M3D 具有很好的热稳定性。

序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表 1 中。

表 1: 序列的描述

SEQ ID	序列信息
--------	------

NO	
1	QVQLQESGPGGLVKPSEILSVTCSVSGGSITSNFWSWIRQ PPGKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLRSRVTLSDVTSKNQ LSLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGL RVTVSS
2	EIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQDISSSLNWDYQQK PGKAPQLLIYYANRLESGVPSRFRGSGSGTEFTLTISLQ PEDFTTYCQQYHSLPLTFGGGTKVEIK
3	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGVSISSPYDWTWIR QPPGKGLEWIGRIHGNGGSTSYNPSLKNRVITISKDTSK NQFSLILSSVTAADTAVYYCVRDETGWGQGVLTVSS
4	DIQMSQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLYSSNNKNYLA WYQQKPGQAPKLLFYWASTRESGVPNRFSGSGSGTDF TLTIRGLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGGGTKVEIK
5	QVQLQESGPRLVKSSSETLPLTCAVSGASNSSNYWSWIR QPPGKGLEWIGRIYGNSTGSDYNPSLKSRSISTDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYFCARGSVYTYSWGQGVLTVS S
6	GGSITSNF
7	ISGSGTYT
8	ARSHDYGSNDYAFDF
9	QDISSS
10	YAN
11	QQYHSLPLT
12	GVSISSPYDW
13	IHGNGGST
14	VRDET
15	QSLLYSSNNKNY
16	WAS
17	QQHYTTPLT
18	GASNSSNY
19	IYGNSTG
20	ARGSVYTY
21	QVQLQESGPGGLVKPSEILSVTCSVS
22	WSWIRQPPGKGLEWIGY
23	DYNPSLRSRVTLSDVTSKNQSLKLSSVTAADTAVYYC
24	WGQGLRVTVSS
25	EIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAT
26	LNWDYQQKPGKAPQLLIY
27	RLESGVPSRFRGSGSGTEFTLTISLQPEDFTTYC
28	FGGGTKVEIK
29	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVS
30	TWIRQPPGKGLEWIGR

31	SYNPSLKNRVTISKDTSKNQFSLILSSVTAADTAVYYC
32	WGQGVLVTVSS
33	DIQMSQSPDSLAVSLGERVTINCKSS
34	LAWYQQKPGQAPKLLFY
35	TRESGVPNRFSGSGSGTDFTLTIRGLQAEDVAVYYC
36	FGQGTKVEIK
37	QVQLQESGPRLVKSETLPLTCAVS
38	WSWIRQPPGKGLEWIGR
39	DYNPSLKSRVSISTDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFC
40	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYTSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAR
41	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSYSTP
42	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWV RQPPGKGLEWIGEIYHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDKSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
43	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP
44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
45	DYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
46	WGQGTITVTVSS
47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAT
48	LNWYQQKPGKAPKLLIY
49	RLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
50	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVS
51	TWVRQPPGKGLEWIGR
52	SYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
53	GQGTITVTVSS
54	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS
55	LAWYQQKPGQPPKLLFY
56	TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
57	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSNFWSWIRQ PPGKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGT TVTVSS
58	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRATQDISSSLNWYQQK PGKAPKLLIYYANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQYHSLPLTFGGGTKVEIK
59	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGVSISSPYDWTWV RQPPGKGLEWIGRIHNGGSTSYNPSLKSRVTISVDKS

	KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVRDETWGQGTLVTVSS
60	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLFYLWASTRESGVLPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQQHYTTPITFGQGTKVEIK
61	GGACAGCCKGGAAGGTGTGC
62	GAGGCAGTTCCAGATTTCAA
63	CCGCGTACTTGTGTGCTCTGT
64	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTcagggtgcagctgca ggagtcaggcccag
65	5'- caggagtcaggcccaggactgggtgaagccttcggagaCCCTGTCCCTCAC CTGCAC
66	5'- aagccttcggagaCCCTGTCCCTCACCTGCACtgtctctgggtgctcc atc
67	5'- GTTCTTGGACGTGTCTACGGATATGGTGACTCGACTC TTGAGGGAGGGGTTGTAGT
68	5'- TCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTtctccctgaaactgagctc
69	5'- GATGGGCCCTTGGTCGACGCtgaagagacgggtgacGGTGGTc ccttggecccagaaatc
70	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATACAG ATGACGCAGTCTCCATCC
71	5'- CAGCAAAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATC TATTATGC
72	5'- GAACCTTGATGGGACCCCACTTTGCAAACGATTGCA TAATAGATCAGGAGC
73	5'- CTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGATGGGA CCCC
74	5'- GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAACCTGAGG
75	5'- GCAGCCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTATTACTG TCAAC
76	5'-

	GACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACC AT
77	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCA GCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCC
78	5'- ATTCCCGGGTagatgcecaGTAAAAGAGCAGCTTAGGAG GCTGTCCTGGTTTCTGCTG
79	5'- gggtgtctccatcagcagtccttatgacTGGACCTGGGTCCGCCAGCC CCCAGGGAAG
80	5'- AACTGGTTCTTGGACTTGTCTACTGAAATGGTGACTC GACTCTTGAGGGAGGGGTTG
81	5'- AGACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG CTCTGTGACCGCCGC
82	5'- gaaaccTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC AGCGTCGACCAAGGGCCCATC
83	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCGTG ATGACCCAGTCTCCAGACTCC
84	5'- CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAG AGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAG
85	5'- CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCTTT TACtgggcatctACCCGGAAT
86	5'- GTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAATCGGT CAGGGACCCCGGATTCCCGGGTagatgcc
87	5'- GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGGCTGAAGATG
88	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTGGT CC
89	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCA GCTGCAGGAGTCAGGC
90	5'- GATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGAC

91	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATACAG ATGACGCAGTC
92	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTGGT CCC
93	5'- GTAGTAACTACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCA GGTGAG
94	5'- GgtggetccatcagtagttactacTGGAGCTGGATCCGCCAG
95	5'- ATAGTAACTACCACTGCTGACGGAGCCACCAGAGAC AGTGCAGGTGAG
96	5'- GgtggetccgtagcagtaggttagttactATTGGAGCTGGATCCGCCA G
97	5'- GGTGCTCCCCTGGTATAGATATAACCAATCCACTCC AG
98	5'- AtctataccagtgaggagcaccGACTACAACCCCTCCCTC
99	5'- TGTGTAATACTACTACTACTAATATAACCAATCCACT CCAG
100	5'- AttagtagtagtagtagttacacaGACTACAACCCCTCCCTC
101	5'- GTAGCTGCTGCTAACACTCTGAGTTGCCCCGGCAAGT GATGG
102	5'- CagagtgttagcagcagctacTTAAATTGGTATCAGC
103	5'- AGTATTACTTCCGATGTTGGAGCTAGTTGCCCCGGCAA GTGATGG
104	5'- AgctccaacatcggaagtaatactTTAAATTGGTATCAGC
105	5'- GACCCCACTTTGCAAACGGGATGCAGCATAGATCAG GAGCTTAGG
106	5'- CCTAAGCTCCTGATCTATGctgcatccCGTTTGCAAAGTG GGGTC
107	5'- GACCCCACTTTGCAAACGAGACGCCTTATAGATCAG GAGCTTAGG
108	5'- CCTAAGCTCCTGATCTATAaggcgtctCGTTTGCAAAGTG

	GGGTC
109	5'- AGTGAGAGGGTAATTGTAATCTTGTAGACAGTAATAA GTTGCAAAATC
110	5'- CtacaagattacaattaccctCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAA G
111	5'- AGTGAGAGGTAAACTACTACTCTGATGACAGTAATAA GTTGCAAAATC
112	5'- catcagagtagtagtttacctCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAA G
113	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCA GCTGCAGGAGTCG
114	5'- GATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACC AG
115	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCGTG ATGACCCAGTCTC
116	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTGGT C
117	5'- GGAGTAACCACCACTGCTGATGGAGCCACCAGAGAC AGCGCAGGTGAGGGACAG
118	5'- ggtggetccatcagcagtggtggttactccACCTGGGTCCGCCAGCCC
119	5'- CCAGTTACTACTGCTGATGGAGCCACCAGAGACAGC GCAGGTGAGGGACAG
120	5'- GgtggetccatcagcagtagtaactggACCTGGGTCCGCCAGCCC
121	5'- GGTGCTCCCACTATGATAGATTCGTCCAATCCACTCC AG
122	5'- AtctatcatagtgaggagcaccAGCTACAACCCCTCCCTCAAG
123	5'- TGTGCTACCACCACTACCACTAATTCGTCCAATCCAC TCCAG
124	5'-

	attagtggtagtggtggtagcacaAGCTACAACCCCTCCCTCAAG
125	5'- ATAGGTCTTTCCATCACTATGCAGGAGGCTCTGGCTG GACTTGCAGTTGATGGTGGC
126	5'- cagagcctcctgcatagtgatggaaagacctatTTAGCCTGGTACCAGC AGAAAC
127	5'- GTAGCTGCTGCTAACACTCTGGCTGGACTTGCAGTT GATGGTGGC
128	5'- CagagtgttagcagcagctacTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC
129	5'- GGGACCCCGGATTCCCGGGTAGAACCCAAGTAAAAG AGCAGCTTAGGAGG
130	5'- CCTCCTAAGCTGCTCTTTTACTtgggttctACCCGGGAAT CCGGGGTCCC
131	5'- GGGACCCCGGATTCCCGGGTGGATGCACCGTAAAAG AGCAGCTTAGGAGG
132	5'- CCTCCTAAGCTGCTCTTTTACGgtgcatccACCCGGGAAT CCGGGGTCCC
133	5'- CGTCCAAGGAGTACTATAATATTGCTGACAGTAATAC ACTGCCACATC
134	5'- CagcaatattatagtagtactccttggacgTTCGGCCAAGGGACCAAG
135	5'- CGTCCAAGGAGTTTGTAGAGCTTGCATACAGTAATAC ACTGCCACATC
136	5'- AtgcaagctetacaaactccttggacgTTCGGCCAAGGGACCAAG
137	GGSISSYY
138	GGSVSSGSYY
139	AAS
140	KAS
141	IYHSGST
142	ISGSGGST
143	LGS
144	GAS
145	IYTSGST

146	ISSSSSYT
147	QSVSSSY
148	SSNIGSNT
149	LQDYNPLT
150	HQSSSLPLT
151	GGSISSGGYS
152	GGSISSSNW
153	QSLHSDGKTY
154	QSVSSSY
155	QYYSTPWT
156	MQALQTPWT
157	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGT TVTVSS
158	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSSVSSGSYYWSW IRQPPGKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWG QGTTTVTVSS
159	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQDISSSLNWFYQQK PGKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDEATYYCQQYHSLPLTFGGGGTKVEIK
160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQDISSSLNWFYQQK PGKAPKLLIYKASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDEATYYCQQYHSLPLTFGGGGTKVEIK
161	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSNFWSWIRQ PPGKGLEWIGYISSSSSYTDYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGT TVTVSS
162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATSSNIGSNTLNWFYQ QKPGKAPKLLIYANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDEATYYCQQYHSLPLTFGGGGTKVEIK
163	QVQLQESGPGGLVKPSGTLSTCAVSGVSISSPYDWTWV RQPPGKGLEWIGRIYTSGSTSYNPSLKSRTISVDKSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCVRDETGWGQGTLTVTVSS
164	QVQLQESGPGGLVKPSGTLSTCAVSGVSISSPYDWTWV RQPPGKGLEWIGRISGSGGSTSYNPSLKSRTISVDKSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCVRDETGWGQGTLTVTVSS
165	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLFYLGSTRESGVPRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGGTKVEIK
166	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLFYGASTRESGVPRFSGSGSGTDFT

	LTISLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGTKVEIK
167	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLHSDGKTYLA WYQQKPGQPPKLLFYWASTRESGVDPDRFSGSGSTDF TLTISLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGTKVEIK
168	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMEP
169	SSTTATGPCKTCTTPAQGTSMEP
170	SSTTSAGPCKTCTTPAQGTSMEP
171	SSTTSTAPCKTCTTPAQGTSMEP
172	SSTTSTGACKTCTTPAQGTSMEP
173	SSTTSTGPSKTCTTPAQGTSMEP
174	SSTTSTGPCATCTTPAQGTSMEP
175	SSTTSTGPCKACTTPAQGTSMEP
176	SSTTSTGPCKTSTTPAQGTSMEP
177	SSTTSTGPCKTCATPAQGTSMEP
178	SSTTSTGPCKTCTAPAQGTSMEP
179	SSTTSTGPCKTCTTAAQGTSMEP
180	SSTTSTGPCKTCTTPAAGTSMEP
181	SSTTSTGPCKTCTTPAQGASMEP
182	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTAMEP
183	ATCAACTACCGCCACGGGACCATGCAAGACCTGCAC
184	GGTCCCGTGCGGTAGTTGATGTTCTGGAAGTAGA
185	AACTACCAGCGCGGGACCATGCAAGACCTGCACGAT
186	CATGGTCCCGCGCTGGTAGTTGATGTTCTGGAAGT
187	ACCAGCACGGCACCATGCAAGACCTGCACGATTCT
188	CTTGATGGTGCCGTGCTGGTAGTTGATGTTCTGG
189	CAGCACGGGAGCATGCAAGACCTGCACGATTCTGC
190	GTCTTGATGCTCCCGTGCTGGTAGTTGATGTTCT
191	ACGGGACCATCCAAGACCTGCACGATTCTGCTCAA
192	GCAGGTCTTGGATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGATG
193	GGGACCATGCCGGACCTGCACGATTCTGCTCAAGG
194	GTGCAGGTCCGGCATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGAT
195	GGGACCATGCGCGACCTGCACGATTCTGCTCAAGG
196	GTGCAGGTGCGCATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGAT
197	ACCATGCAAGGCCTGCACGATTCTGCTCAAGGAAC
198	ATCGTGCAGGCCTTGATGGTCCCGTGCTGGTAGTT
199	TGCAAGACCTCCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCT
200	AGGAATCGTGGAGGTCTTGATGGTCCCGTGCTGGT
201	CAAGACCTGCGCGATTCTGCTCAAGGAACCTCTAT
202	GCAGGAATCGCGCAGGTCTTGATGGTCCCGTGCTG
203	GACCTGCACGGCTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTT
204	TGAGCAGGAGCCGTGCAGGTCTTGATGGTCCCGTG
205	CTGCACGATTGCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCC

206	CCTTGAGCAGCAATCGTGCAGGTCTTGCATGGTCCC
207	GATTCCTGCTGCAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTG
208	GAGGTTCCTGCAGCAGGAATCGTGCAGGTCTTGCAT
209	TGCTCAAGGAGCCTCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTG
210	AACATAGAGGCTCCTTGAGCAGGAATCGTGCAGGTC
211	TCAAGGAACCGCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTAC
212	GGAAACATAGCGGTTCTTGAGCAGGAATCGTGCAG
213	STTTSTGPCKTCTTPAQNSMFP
214	TSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFP
215	SSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYP
216	SSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFP
217	STTTSTGPCKTCTTLAQGTSMFP
218	STTTSTGPCKTCTALAQGTSMFP
219	STTTSTGPCRTCTTLAQGTSMPLP
220	SSTTSTGPCKTCTTPAQNSMYP

发明详述

术语定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学实验室等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氮

基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

如本文中所使用的, 术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基, 其通常可包括, 轻链可变区中的残基 24-34 {LCDR1}、50-56 {LCDR2}、89-97 {LCDR3} 以及重链可变区中的残基 31-35 {HCDR1}、50-65 {HCDR2}、95-102 {HCDR3} (参见例如, Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, Public Health Service, 美国国立卫生研究院, 贝塞斯达、马里兰州(1991)), 或者轻链可变区中的残基 26-32 {L1}、50-52 {L2}、91-96 {L3} 以及重链可变区中的残基 26-32 {H1}、53-55 {H2}、96-101 {H3} (参见, Chothia 和 Lesk J.Mol.Biol. 196: 901-917 (1987))。

如本文中所使用的, 术语“构架区”或“FR”残基是指, 抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的, 术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人, Nature 341:544-546 (1989)); 术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

如本文中所使用的, 术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是, 能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认

为, 六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而, 即便是一个可变区(例如 Fd 片段, 其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR)也能够识别并结合抗原, 尽管其亲和力低于完整的结合位点。

5 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv), 其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见, 例如, Bird 等人, *Science* 242:423-426 (1988); Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); 和 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Roseburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 第 269-315 页(1994))。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH_2-V_L -接头- V_H-COOH 或 NH_2-V_H -接头- V_L-COOH 。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如, 可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的接头, 但也可使用其变体(Holliger 等人(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi 等人(2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu 等人(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人
15 (2001), *Cancer Immunol.*描述。

如本文中所使用的, 术语“单链抗体-Fc”或“scFv-Fc”意指, 将 scFv 连接至抗体的 Fc 片段而形成的工程抗体。如本文中所使用的, 术语“Fc 片段”意指, 由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能, 但不参与抗原的结合。

20 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是双抗体, 即, 双价抗体, 其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如, Holliger P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak R. J.等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。

25 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如, 重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体)获得抗体的抗原结合片段(例如, 上述抗体片段), 并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

30 在本文中, 除非上下文明确指出, 否则当提及术语“抗体”时, 其不仅包括完整抗体, 而且包括抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即，除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Nature, 256:495, 1975)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.P 4,816,567)。

例如，可以如下来制备单克隆抗体。首先用免疫原(必要时添加佐剂)免疫注射非人灵长类动物（例如，食蟹猴）或其它合适的宿主动物。免疫原或佐剂的注射方式通常为皮下多点注射或腹腔注射。可将免疫原预先偶联到某些已知蛋白，如血清白蛋白或大豆胰酶抑制剂上，以增强抗原在宿主内的免疫原性。佐剂可以是弗氏佐剂或 MPL-TDM 等。动物在接受免疫后，体内将产生分泌特异性结合免疫原的抗体的淋巴细胞。另外，淋巴细胞也可以利用体外免疫获得。收集目的淋巴细胞，并用合适的融合剂，如 PEG，使其与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1996)。上述制备的杂交瘤细胞可以接种到合适的培养液中生长，培养液中优选含有一种或多种能够抑制未融合的、母体骨髓瘤细胞生长的物质。例如，对于缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶(HGPRT 或 HPRT)的母体骨髓瘤细胞，在培养液中添加次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶(HAT 培养基)等物质将可以抑制 HGPRT-缺陷细胞的生长。优选的骨髓瘤细胞应该具有融合率高，抗体分泌能力稳定，对 HAT 培养液敏感等特征。生长杂交瘤细胞的培养液用于检测针对特异抗原的单抗的产生。测定杂交瘤细胞产生的单抗的结合特异性的方法包括例如，免疫沉淀或体外结合试验，如放射免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。例如，可利用 Munson 等在 Anal. Biochem. 107: 220 (1980)描述的 Scatchard 分析法来测定单抗的亲和力。当确定了杂交瘤产生的抗体的特异性、亲和力和反应性之后，目的细胞株可以通过(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1996)所描述的标准有限稀释法进行亚克隆化。合适的培养液可以是 DMEM 或 RPMI-1640 等。另外，杂交瘤细胞还可以腹水瘤的形式在动物体内生长。利用传统的免疫球蛋白纯化方法，如蛋白 A 琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析等，可以将亚克隆细胞分泌的单抗从细胞培养液、腹水或血清中分离出来。

还可以通过基因工程重组技术获得单克隆抗体。利用特异性结合单抗重链和轻链基因的核酸引物进行 PCR 扩增, 可以从杂交瘤细胞中分离得到编码单抗重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得的 DNA 分子插入表达载体内, 然后转染宿主细胞(如 *E. coli* 细胞、COS 细胞、CHO 细胞、或其它不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞), 并在合适的条件下进行培养, 可以获得重组表达的目标抗体。

如本文中所使用的, 术语“抗原表位”和“表位”是指, 抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如, 表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸, 其可以是“线性的”或“构象的”。参见, 例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第 66 卷, G. E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中, 蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中, 相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。可使用本领域技术人员已知的常规技术, 就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如, 可进行竞争和交叉竞争研究, 以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利申请 WO 03/48731 中。

如本文中所使用的, 术语“胚系抗体基因 (germline antibody gene)”或“胚系抗体基因片段 (germline antibody gene segment)”是指, 存在于生物体的基因组中的编码免疫球蛋白的序列, 其没有经历过能够导致表达特异性免疫球蛋白的遗传学重排及突变的成熟过程。在本发明中, 表述“重链胚系基因”是指, 编码免疫球蛋白重链的胚系抗体基因或基因片段, 其包括 V 基因(variable)、D 基因(diversity)、J 基因(joining)和 C 基因(constant); 类似地, 表述“轻链胚系基因”是指, 编码免疫球蛋白轻链的胚系抗体基因或基因片段, 其包括 V 基因(variable)、J 基因(joining)和 C 基因(constant)。在本发明中, 由所述胚系抗体基因或胚系抗体基因片段所编码的氨基酸序列也称为“胚系序列 (germline sequence)”。胚系抗体基因或胚系抗体基因片段及其相应的胚系序列是本领域技术人员熟知的, 并且可从专业数据库(例如, IMGT、UNSWIG、NCBI 或 VBASE2)获得或查询。

如本文中所使用的, 术语“特异性结合”是指, 两分子间的非随机的结合反应, 如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中, 特异性结合某抗原的抗体(或对

某抗原具有特异性的抗体)是指, 抗体以小于大约 10^{-5} M, 例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。

如本文中所使用的, 术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数, 其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小, 抗体-抗原结合越紧密, 抗体与抗原之间的亲和力越高。通常, 抗体(例如, 本发明的抗体)以小于大约 10^{-5} M, 例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原(例如, HBsAg), 例如, 如使用表面等离子体共振术(SPR)在 BIACORE 仪中测定的。

如本文中使用的, 术语“免疫原性(immunogenicity)”是指, 能够刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力。其既指, 抗原能刺激特定的免疫细胞, 使免疫细胞活化、增殖、分化, 最终产生免疫效应物质如抗体和致敏淋巴细胞的特性, 也指抗原刺激机体后, 机体免疫系统能形成抗体或致敏 T 淋巴细胞的特异性免疫应答。当给受试者施用异源抗体时, 异源抗体在受试者体内的免疫原性是不想要的, 因为此类免疫原性将导致受试者的免疫系统/免疫细胞对异源抗体的排斥作用, 从而导致异源抗体在受试者体内的功效下降或者在受试者体内引起不想要的副作用。因此, 在施用给人受试者之前, 通常需要对异源抗体(例如食蟹猴源抗体)进行改造, 以尽可能减小其免疫原性。

如本文中所使用的, 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体, 其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类), 且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类), 但无论如何, 其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P. 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。例如, 术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体(例如人猴嵌合抗体), 其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体(例如食蟹猴源抗体), 而抗体的重链和轻链可变区来自第二抗体(例如人抗体)。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 经基因工程改造的非人源抗体, 其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言, 人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体(供体抗体), 全部或部分的非 CDR 区(例如, 可变区 FR 和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质, 包括但不限于, 抗原特异性、亲和性、反应性、中和病毒能力和/或清除病毒能力等。供体抗体可以是有预期性质(例如, 抗原特异性、亲和性、反应性、中

和病毒能力和/或清除病毒能力)的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物(例如,食蟹猴)抗体。

人源化抗体既能够保留非人源供体抗体(例如食蟹猴源抗体)的预期性质,又能够有效降低非人源供体抗体(例如食蟹猴源抗体)在人受试者中的免疫原性,因此,是特别有利的。然而,由于供体抗体的 CDR 与受体抗体的 FR 之间的匹配问题,人源化抗体的预期性质(例如,抗原特异性、亲和性、反应性、中和病毒能力和/或清除病毒能力)通常低于非人源供体抗体(例如食蟹猴源抗体)。

因此,尽管本领域的研究人员已对抗体的人源化展开了深入的研究,并取得了一些进展(参见例如, Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992); and Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000)),但是,如何对某一供体抗体进行充分的人源化,以使得所产生的人源化抗体既具有尽可能高的人源化程度,又能够尽可能地保留供体抗体的预期性质,现有技术并没有提供详尽的指导。技术人员需要针对具体供体抗体进行摸索、探究和改造,付出大量的创造性劳动才有可能获得,既具有高人源化程度(例如至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的人源化程度)、又保留具体供体抗体的预期性质的人源化抗体。

在本发明中,为了使人源化抗体尽可能保留供体抗体的性质(包括例如,特异性、亲和性、反应性、中和病毒能力和/或清除病毒能力),本发明的人源化抗体中构架区 (FR)可以既包含人源受体抗体的氨基酸残基,也包含相应的非人源供体抗体的氨基酸残基。

此外,为了进一步提高人源化的程度,以尽可能地减少非人氨基酸残基引起的免疫原性,在本发明中,可以对人源化抗体中来源于供体抗体的 CDR 区的部分氨基酸残基进行替换,例如将其替换为相应的人源免疫球蛋白 CDR 区的氨基酸残基,或其他氨基酸残基。

此外,为了进一步完善或优化人源化抗体的性能,在本发明中还可以对人源化抗体的重链和轻链可变区中的部分氨基酸残基进行替换,例如将其替换为既非来源于受体抗体,也非来源于供体抗体的氨基酸残基。

具体而言,在本申请中,发明人首先开发了具有优良性质的 3 株食蟹猴-人嵌合单克隆抗体,分别命名为 M1-23, M3-23, M3-13(其重链和轻链可变区分别如 SEQ ID NO: 1-

5 所示): 三株抗体不仅能够特异性识别/结合 HBsAg, 能够中和 HBV 的毒力, 而且能够在受试者体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平, 能够有效清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞。因此, M1-23, M3-23 及 M3-13 抗体具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力。

5 在此基础上, 发明人又付出了大量的创造性劳动, 对 M1-23, M3-23 这两株嵌合抗体进行了深入的研究和改造, 从而开发了 M1-23 和 M3-23 嵌合抗体的人源化抗体: 本发明的人源化抗体不仅具有极高的人源化程度(人源化程度可高达 98%), 而且具有与亲本抗体基本上相同的(或甚至更优良的)预期性质(包括但不限于, HBsAg 结合活性, 中和 HBV 的活性, 清除体内的 HBV DNA 或 HBsAg 的活性, 或清除体内的 HBV 和被 HBV
10 感染的细胞的活性等)。

因此, 本发明的抗体(特别是人源化抗体)是极为有利的, 其不仅保留了亲本抗体的功能和性质, 从而具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力; 而且具有极高的人源化程度(人源化程度可高达 98%), 从而可安全地施用给人受试者, 而不引发免疫原性反应。本发明的抗体(特别是人源化抗体)具有重大的临床价值。

15 在本申请中, 本发明抗体的预期性质包括, 特异性结合 HBsAg 的活性, 中和 HBV 的活性, 清除体内的 HBV DNA 或 HBsAg 的活性, 和/或, 清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞的活性。根据本发明的人源化抗体保留了亲本抗体(食蟹猴-人嵌合抗体)的上述预期性质中的一项或多项, 优选保留了亲本抗体(食蟹猴-人嵌合抗体)的所有上述预期性质。

20 在本申请中, 通过对本发明的亲本抗体(食蟹猴-人嵌合抗体)进行改造, 例如对其 FR 中的部分氨基酸残基进行置换(例如保守置换), 以获得本发明的人源化抗体。此类置换例如可以(1)降低抗体对蛋白水解的敏感性; (2)降低抗体对氧化作用的易感性; (3)改变(例如增强)抗体对抗原的结合亲和力; (4)改变(例如增强)抗体中和 HBV 的活性; (5)改变(例如增强)抗体清除 HBV 的活性; (6)进一步提高抗体的人源化程度, 降低抗体
25 的免疫原性; 或(7)改变抗体的其它生物化学特点或功能特性; 而仍然保留抗体的预期性质。此类置换可以存在于 CDR 区和/或 FR 区中, 并且可以是单个氨基酸置换或多个氨基酸置换。

如本文中所使用的, 术语“人源化程度”是用于表示人源化抗体中非人源氨基酸残基的数量的指标。人源化抗体的人源化程度例如可通过下述来进行计算: 人源化程度
30 $= (\text{FR 区氨基酸个数} - \text{FR 区保留的非人源氨基酸个数}) / \text{FR 区氨基酸个数} \times 100\%$ 。

如本文中所使用的,“中和抗体”是指,能够显著降低或完全抑制目标病毒的毒力(例如,感染细胞的能力)的抗体或其抗原结合片段。通常而言,中和抗体能够识别并结合目标病毒,并且阻止目标病毒进入/感染受试者的细胞。本发明的抗体即是中和抗体。

然而,应当理解的是,在本申请中,抗体的中和病毒的能力并不直接等同于抗体的清除病毒的能力。如本文中所使用的,“中和病毒”是指,通过抑制目标病毒进入/感染受试者的细胞的过程,从而中和目标病毒的毒力(即,显著降低或完全抑制目标病毒的毒力)。如本文中所使用的,“清除病毒”是指,机体内的目标病毒(无论其是否感染了细胞)被从机体中消除,从而机体朝向未被病毒感染之前的状态转变(例如,病毒的血清学检测结果转变为阴性)。因此,在一般情况下,中和抗体并不一定具备清除病毒的能力。然而,在本申请中,发明人出人意料地发现,本发明的抗体不仅具有中和 HBV 的能力,而且具有清除病毒的能力(即,能够清除体内的 HBV DNA 和/或 HBsAg,清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞),从而具有重大的临床价值。

如本文中所使用的,术语“分离的”是指,经人工手段从天然状态下获得。如果自然界中出现某一种“被分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境发生了改变或从天然环境下离分出该物质,或二者情况均有发生。比如,对于某一活体动物体内天然存在的某种未被分离的多聚核苷酸或多肽而言,从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为“分离的”。术语“分离的”不排除人工或合成的物质的存在,也不排除不影响物质活性的其它不纯物质的存在。

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

如本文中所使用的,术语“宿主细胞”是指,可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如 S2

果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞, 或者如纤维原细胞, CHO 细胞, COS 细胞, NSO 细胞, HeLa 细胞, BHK 细胞, HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的, 术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如, 两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据, 或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据), 那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如, 如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配, 那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常, 在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用, 例如, 可通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的 Needleman 等人(1970)*J. Mol. Biol.* 48: 443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988))的算法, 使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外, 可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970))算法, 使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

如本文中使用的, 术语“保守置换”和“保守氨基酸置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如, 可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换, 例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质, 包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此, 优选

用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见, 例如, Brummell 等人, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi 等人 *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 和 Burks 等人 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 94:412-417 (1997), 其通过引用并入本文)。

5 本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如, *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其以引用的方式并入本文中。在本发明中, 术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中, 氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如, 丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。此外, 如本文中所使用的, 术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用; 术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。

如本文中所使用的, 术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂, 其是本领域公知的(参见例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。例如, pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。

如本文中所使用的, 术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂, 当其与抗原一起或预先递送入机体时, 其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种, 包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

如本文中所使用的, 术语“预防”是指, 为了阻止或延迟疾病或病症或症状(例如, HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病)在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的, 术语“治疗”是指, 为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的, 有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即,

不再恶化)疾病的状态, 延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部), 无论是可检测或是不可检测的。此外, “治疗”还可以指, 与期望的存活期相比(如果未接受治疗), 延长存活期。在本申请中, 本发明的抗体具有中和 HBV 的能力, 从而可用于预防/阻止未患病受试者或其细胞感染 HBV。此外, 本发明的抗体具有清除 HBV 的能力(即, 能够清除体内的 HBV DNA 和/或 HBsAg, 清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞), 从而可用于治疗患病受试者的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病。

如本文中使用的, 术语“受试者”是指哺乳动物, 例如灵长类哺乳动物, 例如人。

如本文中所使用的, 术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。

例如, 预防疾病(例如 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病)有效量是指, 足以预防, 阻止, 或延迟疾病(例如 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病)的发生的量; 治疗疾病有效量是指, 足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如, 对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄, 体重和性别, 药物的施用方式, 以及同时施用的其他治疗等等。

本发明的抗体

在本申请中, 发明人首先开发了具有优良性质的 3 株食蟹猴-人嵌合单克隆抗体, 分别命名为 M1-23, M3-23, M3-13(其重链和轻链可变区分别如 SEQ ID NO: 1-5 所示): 三株抗体不仅能够特异性识别/结合 HBsAg, 能够中和 HBV 的毒力, 而且能够在受试者体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平, 能够有效清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞。因此, M1-23, M3-23 及 M3-13 抗体具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力。

在此基础上, 发明人对 M1-23, M3-23 这两株抗体进行了深入的研究和改造, 从而开发了 M1-23 和 M3-23 抗体的人源化抗体: 本发明的人源化抗体不仅具有极高的人源化程度(人源化程度可高达 98%), 而且具有与亲本抗体基本上相同的(或甚至更优良的)预期性质(包括但不限于, HBsAg 结合活性, 中和 HBV 的活性, 清除体内的 HBV DNA 或 HBsAg 的活性, 或清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞的活性等)。

因此, 本发明的抗体(特别是人源化抗体)是极为有利的, 其不仅保留了亲本抗体的功能和性质, 从而具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)

的潜力；而且具有极高的人源化程度(人源化程度可高达 98%)，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。本发明的抗体(特别是人源化抗体)具有重大的临床价值。

因此，在一个方面，本发明提供了一种能够特异性结合 HBsAg 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 选自下列的重链可变区(VH)互补决定区(CDR)中的一个或多个(例如 1 个，2 个或 3 个)：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 6，SEQ ID NO: 12，SEQ ID NO: 18 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 13，SEQ ID NO: 19 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 14，SEQ ID NO: 20，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b)选自下列的轻链可变区(VL) CDR 中的一个或多个(例如 1 个，2 个或 3 个)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 15 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 16 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 11，SEQ ID NO: 17 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。在某些优选的实施方案

中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，所述 VH 包含：

5 (i) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 7，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 8，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，以及

10 (iii) VH CDR1，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (VL)，所述 VL 包含：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 9，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 11，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，以及

(vi) VL CDR2，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中，所述 VH CDR1 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列。

在某些优选的实施方案中，所述 VH CDR1 由下述序列组成：(a) SEQ ID NO: 6，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；或，(b) 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VH CDR1 的序列。在某些示例性实施方案中，所述人重链胚系基因选自 IGHV4-4*08 和 IGHV4-61*01。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR1：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 137 或 SEQ ID NO: 138。

在某些优选的实施方案中，所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中，所述 VL CDR2 由下述序列组成：(a) SEQ ID NO: 10，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；或，(b) 人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VL CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中，所述人轻链胚系基因选自 IGKV1-39*01 和 IGKV1-5*03。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 139 或 SEQ ID NO: 140。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及 VH CDR1，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列（例如，SEQ ID NO: 6，137 或 138）；

并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1；

并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及 VL CDR2，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列（例如，SEQ ID NO: 10，139 或 140）。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2，如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR1：SEQ ID NO: 6，137 或 138；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 10，139 或 140。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示

的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 137 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 138 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 所述 VH 包含:

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 12, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列, 以及

(iii) VH CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列;

和/或

(b) 轻链可变区 (VL), 所述 VL 包含:

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

(v) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

5 以及

(vi) VL CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的轻链可变区(例如, κ 轻链可变区)中所包含的 VL CDR2 的序列。

在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR2 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列。

10 在某些优选的实施方案中, 所述 VH CDR2 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 13, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 或, (b) 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VH CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中, 所述人重链胚系基因选自 IGHV4-30-4*07 和 IGHV4-4*01。

15 在某些示例性实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: (a) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1; 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3; 以及, 具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR2: SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142。

在某些优选的实施方案中, 所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区(例如, κ 轻链可变区)中所包含的 VL CDR2 的序列。

20 在某些优选的实施方案中, 所述 VL CDR2 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 16, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 或, (b) 人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VL CDR2 的序列。在某些示例性实施方案中, 所述人轻链胚系基因选自 IGKV2-28*01 和 IGKV3-15*01。

25 在某些示例性实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1; 如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3; 以及, 具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2: SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3, 以及 VH CDR2, 其由
30 下述序列组成: 任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列(例如,

SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142);

并且, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3, 以及如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1; 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3; 以及如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2;

并且, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3, 以及 VL CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的轻链可变区 (例如, κ 轻链可变区) 中所包含的 VL CDR2 的序列 (例如, SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144)。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3, 以及 VH CDR2, 所述 VH CDR2 具有选自下列的序列: SEQ ID NO: 13, 141 或 142; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3, 以及 VL CDR2, 所述 VL CDR2 具有选自下列的序列: SEQ ID NO: 16, 143 或 144。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 141 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 142 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3; 并且, 该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL

CDR3。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 143 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 144 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，所述 VH 包含：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 18，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 19，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 20，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (VL)，所述 VL 包含：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 15，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 16，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 17，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR2，以及如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR3；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2，以及如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段进一步包含框架区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 选自下列的重链可变区(VH)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1 个，2 个，3 个或 4 个)：

(i) VH FR1，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 21，SEQ ID NO: 29，SEQ ID NO: 37，SEQ ID NO: 44，SEQ ID NO: 50，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH FR2，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 22，SEQ ID NO: 30，SEQ ID NO: 38，SEQ ID NO: 51，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(iii) VH FR3，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 31，SEQ ID NO: 39，SEQ ID NO: 45，SEQ ID NO: 52，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；和

(iv) VH FR4，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 32，SEQ ID NO: 46，SEQ ID NO: 53，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 选自下列的轻链可变区(VL)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1 个，2 个，3 个或 4 个)：

(v) VL FR1，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 25，SEQ ID NO: 33，SEQ ID NO: 47，SEQ ID NO: 54，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(vi) VL FR2，其由下述序列组成： SEQ ID NO: 26，SEQ ID NO: 34，SEQ ID NO: 48，SEQ ID NO: 55，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、

2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列;

(vii) VL FR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 56, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列; 和

5 (viii) VL FR4, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH FR1、VH FR2、VH FR3 和 VH FR4。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VL FR1、VL FR2、VL FR3 和 VL FR4。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含如上文所定义的 VH FR1、VH FR2、VH FR3、VH FR4、VL FR1、VL FR2、VL FR3 和 VL FR4。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH FR4;

(b) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4; 或

(c) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4; 或

(b) 如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4;

(b) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 VH FR2、如 SEQ

ID NO: 31 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4；以及，如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4；或

(c) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4；以及，如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%，或 100%。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的非 CDR 区包含不超过 19 个，不超过 15 个，不超过 14 个，不超过 13 个，不超过 12 个，不超过 11 个，不超过 10 个，不超过 9 个，不超过 8 个，不超过 7 个，不超过 6 个，不超过 5 个，不超过 4 个，不超过 3 个，不超过 2 个，或不超过 1 个的非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基，或者其不包含非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 FR 区包含不超过 19 个，不超过 15 个，不超过 14 个，不超过 13 个，不超过 12 个，不超过 11 个，不超过 10 个，不超过 9 个，不超过 8 个，不超过 7 个，不超过 6 个，不超过 5 个，不超过 4 个，不超过 3 个，不超过 2 个，或不超过 1 个的非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基，或者其不包含非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：人免疫球蛋白的框架区，例如人胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的框架区。在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，和/或人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区。

在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链框架区和/或轻链框架区可以包含一个或多个非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基。在某些优选的实施方案中，所述重链框架区和/或轻链框架区包含一或多个氨基酸残基，其被回复突变至相应的食蟹

猴源残基或相应食蟹猴源残基的保守氨基酸氨基酸置换（此类突变称为回复突变（back mutation））。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：人重链胚系基因 IGHV4-4*08 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，所述重链框架区任选地包
5 含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。在某些优选的实施方案中，所述 IGHV4-4*08 所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：

(i) VH FR1，其为 SEQ ID NO:21，或者与 SEQ ID NO:21 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个，2 个或 3 个氨基酸置换）：

- 10 (01) 位于 H17 的 T；
(02) 位于 H20 的 L；和
(03) 位于 H23 的 T；

(ii) VH FR2，其为 SEQ ID NO: 22；

(iii) VH FR3，其为 SEQ ID NO:23，或者与 SEQ ID NO:23 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个，2 个或 3 个氨基酸置换）：
15

- (01) 位于 H64 的 K；
(02) 位于 H69 的 I；和
(03) 位于 H78 的 F；

(iv) VH FR4，其为 SEQ ID NO:24，或者与 SEQ ID NO:24 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个或 2 个氨基酸置换）：
20

- (01) 位于 H107 的 T；和
(02) 位于 H108 的 T；

其中，上述提及的所有氨基酸位置均是根据 Kabat 编号系统的位置。

在某些示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH
25 FR3、和如 SEQ ID NO: 46 所示的 VH FR4。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：人重链胚系基因 IGHV4-4*02 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，所述重链框架区任选地包
30 含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。在某些优选的实施方案中，所述

IGHV4-4*02 所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：

(i) VH FR1，其为 SEQ ID NO:29，或者与 SEQ ID NO:29 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个或 2 个）：

5 (01) 位于 H2 的 V；和

(02) 位于 H16 的 G；

(ii) VH FR2，其为 SEQ ID NO:30，或者与 SEQ ID NO:30 的差异在于下列的氨基酸置换：位于 H37 的 V；

10 (iii) VH FR3，其为 SEQ ID NO:31，或者与 SEQ ID NO:31 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个，2 个，3 个或 4 个氨基酸置换）：

(01) 位于 H65 的 S；

(02) 位于 H71 的 V；

(03) 位于 H73 的 K；和

(04) 位于 H81 的 K；

15 (iv) VH FR4，其为 SEQ ID NO:32，或者与 SEQ ID NO:32 的差异在于下列的一个氨基酸置换：位于 H107 的 T；

其中，上述中提及的所有氨基酸位置是根据 Kabat 编号系统的位置。

在某些示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH
20 FR3、和如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH FR4。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：人轻链胚系基因 IGKV1-39*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区，所述轻链框架区任选地包含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。在某些优选的实施方案中，所述
25 IGKV1-39*01 所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：

(i) VL FR1，其为 SEQ ID NO:25，或者与 SEQ ID NO:25 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换（例如，1 个，或 2 个氨基酸置换）：

(01) 位于 L1 的 D；和

30 (02) 位于 L3 的 Q；

(ii) VL FR2, 其为 SEQ ID NO:26, 或者与 SEQ ID NO:26 的差异在于下列的氨基酸置换: 位于 L45 的 K;

(iii) VL FR3, 其为 SEQ ID NO:27, 或者与 SEQ ID NO:27 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换 (例如, 1 个, 2 个, 3 个或 4 个氨基酸置换):

- 5 (01) 位于 L55 的 Q;
 (02) 位于 L63 的 S;
 (03) 位于 L70 的 D; 和
 (04) 位于 L84 的 A;

(iv) VL FR4, 其为 SEQ ID NO: 28;

10 其中, 上述提及的所有氨基酸位置是根据 Kabat 编号系统的位置。

在某些示例性实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4。

15 在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 人轻链胚系基因 IGKV4-1*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区, 所述轻链框架区任选地包含一个或多个从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。在某些优选的实施方案中, 所述 IGKV4-1*01 所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含:

20 (i) VL FR1, 其为 SEQ ID NO:33, 或者与 SEQ ID NO:33 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换 (例如, 1 个, 2 个或 3 个氨基酸置换):

- (01) 位于 L3 的 V;
 (02) 位于 L5 的 T; 和
 (03) 位于 L19 的 A;

25 (ii) VL FR2, 其为 SEQ ID NO:34, 或者与 SEQ ID NO:34 的差异在于下列的氨基酸置换: 位于 L43 的 V;

(iii) VL FR3, 其为 SEQ ID NO:35, 或者与 SEQ ID NO:35 的差异在于选自下列的一个或几个氨基酸置换 (例如, 1 个, 2 个或 3 个氨基酸置换):

- (01) 位于 L60 的 D;
30 (02) 位于 L76 的 S; 和

(03) 位于 L77 的 S;

(iv) VL FR4, 其为 SEQ ID NO: 36;

其中, 上述提及的氨基酸位置是根据 Kabat 编号系统的位置。

在某些示例性实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) IGHV4-4*08 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区, 以及, IGKV1-39*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区; 或

(b) IGHV4-4*02 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区, 以及, IGKV4-1*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH FR3、如 SEQ ID NO: 46 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4; 或

(b) 如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH FR4; 以及, 如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方式中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH FR4;

(b) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 31 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4;

(c) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 32 所示的 VH FR4;

(d) 如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 46 所示的 VH FR4；或者

(e) 如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH FR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH FR2、如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH FR3、和如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH FR4。

5

在某些优选的实施方式中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：

(a) 如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4；

(b) 如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4；

(c) 如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL FR4；或者

(d) 如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL FR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL FR2、如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL FR3、和如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL FR4。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含如上文所定义的 VH FR1、VH CDR1、VH FR2、VH CDR2、VH FR3、VH CDR3 和 VH FR4。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含如上文所定义的 VL FR1、VL CDR1、VL FR2、VL CDR2、VL FR3、VL CDR3 和 VL FR4。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含如上文所定义的 VH FR1、VH CDR1、VH FR2、VH CDR2、VH FR3、VH CDR3 和 VH FR4；并且，轻链可变区包含如上文所定义的 VL FR1、VL CDR1、VL FR2、VL CDR2、VL FR3、VL CDR3 和 VL FR4。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列与选自下列的重链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列与选自下列的轻链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体包含如上文所定义的重链可变区和如上文所定义的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1, 57, 157 和 158 任一项所示的重链可变区；并且，所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2, 58, 159 和 160 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 3, 59, 163 和 164 任一项所示的重链可变区；并且，所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 4, 60, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体包含：

- (1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL；
- (2) 如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL；
- (3) 如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL；
- (4) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL；
- (5) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL；
- (6) 如 SEQ ID NO: 157 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL；
- (7) 如 SEQ ID NO: 158 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL；
- (8) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 159 所示的 VL；
- (9) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 160 所示的 VL；
- (10) 如 SEQ ID NO: 163 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL；
- (11) 如 SEQ ID NO: 164 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL；
- (12) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 165 所示的 VL；或
- (13) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 166 所示的 VL。

本发明的抗体可以通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞，如 *E. coli* 细胞、猿猴 COS、CHO 细胞、或其它不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体。

5 本发明的抗体对 HBsAg 蛋白具有高特异性和高亲和力。例如，本发明的抗体结合 HBsAg 的 KD 值可小于 1×10^{-5} M；优选地，KD 值小于 1×10^{-6} M；更优选地，KD 值小于 1×10^{-7} M；最优选地，KD 值小于 1×10^{-8} M。

本发明的抗体可以是包含两条重链和两条轻链的、具有传统的“Y”型结构的抗体。另外，本发明的抗体也可以是具有传统的“Y”型结构的抗体的 Fab 片段、Fab'、F(ab)₂、Fv、
10 或其它类型的片段，其保持了对 HBsAg 蛋白的亲和力，并且其结合 HBsAg 蛋白的亲和力可以高于或低于具有传统的“Y”型结构的抗体。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得(参见 Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan et al., *Science* 229:81 (1985))。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生(reviewed in Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 (1999); Little et al., *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000))。比如，Fab'片段可以直接从 *E. coli* 细胞中获得；可以将 Fab'片段化学耦联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

20 因此，在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、双抗体(diabody)、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体或人源化抗体。特别优选地，本发明的抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或人源化抗体。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 HBsAg，中和 HBV 的毒力，和/或降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 在受试者体内的血清水平。

25 在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段是 IgG 类别。例如，本发明的抗体或其抗原结合片段可以为 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或 IgG4 类别。

融合抗体

在另一个方面，可制备融合抗体或免疫粘合物，例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接于另一个多肽。在某些优选的实施方案中，融合抗体包含抗本发明抗体
30

的重链可变区和轻链可变区。在某些优选的实施方案中，融合抗体包含本发明抗体的 VH 结构域和 VL 结构域；其中，所述 VH 结构域连接于第一个多肽，而所述 VL 结构域连接于第二个多肽。

5 衍生的抗体

本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子(例如另一个多肽或蛋白)。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化(例如，标记)不会不利影响其对 HBsAg 的结合。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段功能性连接(通过化学偶合、基因融合、非
10 共价连接或其它方式)于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体(例如，形成双特异性抗体)，检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽(例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签)。

一种类型的衍生化抗体(例如，双特异性抗体)是通过交叉连接 2 个或多个抗体(属于同一类型或不同类型)而产生的。适当的交联剂包括例如异基双功能剂，其含有由适当的间隔区隔开的 2 个不同的反应基团(例如 m-丁烯酰胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯)；以及，
15 同基双功能剂(双琥珀酰亚胺辛二酸酯)。此类交联剂可从 **Pierce Chemical Company, Rockford, IL** 购买得到。

另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接至有用的检测试剂。此类检测试剂包括例如，荧光化合物，例如荧光素、异硫
20 氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧磷光剂等等。此外，抗体也可以用酶进行标记，例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等等。当抗体用酶进行标记时，可通过加入能够被酶利用并产生可识别的信号或反应产物的试剂来检测标记的抗体。例如，当使用辣根过氧化物酶标记抗体时，可以加入过氧化氢和二氨基联苯，以产生可检测的有色反应产物，从而检测标记的抗体
25 的存在或量。此外，抗体也可以用生物素进行标记。在这种情况下，可以通过间接测定抗生物素蛋白的结合来检测标记的抗体的存在或量。此外，抗体也可以用可被第二个报告分子识别的标签进行标记(例如亮氨酸拉链互补序列、金属结合结构域、附加表位等等)。在某些具体实施方式中，标签通过不同长度的间隔臂连接至抗体，以降低潜在的位阻。

此外，本发明的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生，例如聚乙二醇
30 (PEG)，甲基或乙基，或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性，例如增加血清

半衰期。

核酸分子、载体和宿主细胞

在另一个方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含编码本发明的抗体或其
5 抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区的核苷酸序列。在某些优选的实施方案
中，本发明的分离的核酸分子编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变
区和/或轻链可变区。

在另一个方面，本发明提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体)，其包含根据本发
明的分离的核酸分子。在某些优选的实施方案中，本发明的载体是例如质粒，粘粒，噬
10 菌体等。在某些优选的实施方案中，所述载体能够在受试者(例如哺乳动物，例如人)
体内表达本发明的抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面，本发明提供了一种宿主细胞，其包含根据本发明的分离的核酸分子
或根据本发明的载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及
真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞(如哺乳动物细胞，例如小鼠
15 细胞、人细胞等)。本发明的细胞还可以是细胞系，例如 293T 细胞。

在另一个方面，提供了制备根据本发明的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，
在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养根据本发明的宿主细胞，和从培
养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

诊断方法和试剂盒

本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 HBsAg，从而可用于检测 HBsAg 蛋
白在样品中的存在或其水平，可用于诊断受试者是否感染了 HBV。

因此，在另一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括本发明的抗体或其抗原结
合片段。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标
25 记。在一个优选的实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别本发明的抗
体或其抗原结合片段。优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记。

可按照上文详细描述的方法来对本发明的抗体或其抗原结合片段或者第二抗体进行
标记。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接至可检测的标记。此类可检测
的标记是本领域技术人员熟知的，包括但不限于，放射性同位素，荧光物质，发光物质，
30 有色物质和酶(例如辣根过氧化物酶)等。此外，此类可检测的标记还包括例如，放射

性同位素, 例如 125 碘; 荧光物质例如荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧磷光剂等等; 能够产生可识别的信号或反应产物的酶, 例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等等; 能够被第二个报告分子识别的标签, 例如生物素、抗生物素蛋白、亮氨酸拉链互补序列、金属结合结构域、附加表位等等。在某些具体实施方式中, 可通过不同长度的接头将检测试剂(例如标签)连接至抗体, 以降低潜在的位阻。

在另一个方面, 本发明提供了检测 HBsAg 蛋白在样品中的存在或其水平的方法, 其包括使用本发明的抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中, 所述方法还包括, 使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的抗体或其抗原结合片段。所述方法可以用于诊断目的, 或者非诊断目的(例如, 所述样品是细胞样品, 而非来自患者的样品)。

在另一个方面, 本发明提供了诊断受试者是否感染了 HBV 的方法, 其包括: 使用本发明的抗体或其抗原结合片段检测 HBsAg 蛋白在来自所述受试者的样品中的存在。在一个优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段还包括可检测的标记。在另一个优选的实施方案中, 所述方法还包括, 使用携带可检测的标记的第二抗体来检测本发明的抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面, 提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于检测 HBsAg 蛋白在样品中的存在或其水平, 或用于诊断受试者是否感染了 HBV。

治疗方法和药物组合物

本发明的抗体或其抗原结合片段可用于预防或治疗受试者(例如人)的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝), 用于体外或在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力, 以及用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。

因此, 在另一个方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其含有根据本发明的抗体或其抗原结合片段, 以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。在一个优选的实施方案中, 本发明的药物组合物还可包含另外的药学活性剂。在一个优选的实施方案中, 所述另外的药学活性剂是用于预防或治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的药物, 例如其它抗病毒试剂, 例如干扰素类药物, 如干扰素或聚乙二醇干扰素。

在另一个方面, 提供了根据本发明的抗体或其抗原结合片段或根据本发明的药物组

合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防或治疗受试者(例如人)的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于体外或在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。

在另一个方面，本发明提供了一种用于预防或治疗受试者的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平的方法，所述方法包括，给有此需要的受试者施用有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段，或者本发明的药物组合物。

本发明的抗体或其抗原结合片段或者本发明的药物组合物的施用方式可以是传统的施用途径，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如，粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径。本发明的抗体或其抗原结合片段可通过本领域已知的多种方法给药。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射，皮下注射，腹膜内注射，肌肉注射)。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段通过静脉输注或注射给予。

本发明的抗体或其抗原结合片段或者本发明的药物组合物可以配制成多种剂型，例如液体、半固体和固体剂型，例如溶液剂(例如注射剂)、分散剂或悬浮剂、片剂、粉剂、颗粒剂、乳剂、丸剂、糖浆剂、粉剂、脂质体、胶囊剂和栓剂。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。

例如，一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如无菌无热原水。

另一种优选的剂型是分散剂。可通过下述方法来制备分散剂：将本发明的抗体或其抗原结合片段掺入无菌载体中，其含有一种基础分散介质以及任选的其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)。此外，还可以在分散剂中掺入可延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸盐

和明胶，以获得期望的药代动力学特征。

另一种优选的剂型是口服固相剂型，包括胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂等。此类固相剂型通常含有下述中的至少一种：(a)惰性药物赋形剂(或载体)，如柠檬酸钠、磷酸钙；(b)填充剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、甘露糖和硅酸；(c)粘合剂，如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶；(d)湿润剂，如甘油；(e)碎裂剂，如琼脂，碳酸钙，马铃薯粉或木薯粉；(f)缓凝剂，如石蜡；(g)促吸收剂，如四氨基混合物；(h)保湿剂，如十六烷基醇和单硬脂酸甘油酯；(i)吸附剂，如高岭土和斑脱土；(j)润滑剂，如滑石，硬脂酸钙，硬脂酸镁，固体聚乙二醇，硫酸十二烷基醇钠，或其任何组合。在片剂和胶囊剂型的情况下，还可以含有缓冲剂。

此外，还可以在口服固相剂型中添加释放速率改造剂(即，能改变药物释放速率的试剂)，以获得改良释放或脉冲释放剂型。此类释放速率改造剂包括但不限于，羧丙基甲基纤维素，甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，纤维素乙烷，醋酸纤维素，聚乙烯氧化物，黄原胶糖，异丙烯酸氨共聚物，氢化调味油，巴西棕榈蜡，石蜡，邻苯二甲酸醋酸纤维素，邻苯二甲酸羧丙基甲基纤维素，甲基丙烯酸共聚物，或其任何组合。改良释放和脉冲释放剂型可含有一种或一组释放速率改造剂。

另一种优选的剂型是口服的液体剂型，包括例如乳剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂等。除了活性成分之外，此类口服的液体剂型还可含有本领域常用的一些惰性溶液，例如水或其它溶剂，如乙烷基醇，异丙基醇，丙烯乙二醇，1,3-丁烯乙二醇，油(例如棉籽油，落花生油，玉米油，橄榄油，调味油和芝麻油)，甘油，聚乙二醇和脂肪酸山梨醇酯，以及其任何组合。除了这些惰性溶液之外，此类口服的液体剂型还可包括保湿剂、乳化剂、悬浮剂、糖化剂、调味剂和香味剂等。

此外，本发明的抗体或其抗原结合片段可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施用。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。

本发明所提供的药物和药物组合物可以单独使用或联合使用，也可以与另外的药学生活性剂(例如其它抗病毒试剂，例如干扰素类药物，如干扰素或聚乙二醇干扰素)联合使用。在某些优选的实施方案中，将本发明的抗体或其抗原结合片段与其它抗病毒试剂联合使用，以预防和或治疗乙型肝炎病毒感染相关疾病。本发明的抗体或其抗原结合片段可以和此类抗病毒试剂同时、分开或连续给药。此类抗病毒试剂包括但不限于，干扰素类药物、利巴韦林、金刚烷、羧基脒、IL-2、IL-12 和五羧链胞酸等。

本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或抗原结合

片段。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病(例如 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病)的发生的量。“治疗有效量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。本发明抗体或抗原结合片段的治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

本发明抗体或抗原结合片段的治疗或预防有效量的典型非极限范围是 0.025 到 50 mg/kg，更优选 0.1 到 50mg/kg，更优选 0.1-25 mg/kg，0.1-10mg/kg。应注意的是，剂量可随需要治疗的症状的类型和严重性不同而发生变化。此外，本领域技术人员理解，对于任一特定患者，特定的给药方案应根据患者需要和医生的专业评价而随时间调整；此处给出的剂量范围只用于举例说明目的，而不限定本发明药物组合物的使用或范围。

发明的有益效果

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下有益效果：

(1) 本发明的抗体不仅能够特异性识别/结合 HBsAg，能够中和 HBV 的毒力，而且能够在受试者体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平，能够有效清除体内的 HBV 和被 HBV 感染的细胞。因此，本发明的抗体具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力。

(2) 本发明的抗体(特别是人源化抗体)不仅保留了亲本猴源抗体的功能和性质，从而具有用于预防和治疗 HBV 感染以及与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力；而且具有极高的人源化程度(人源化程度可高达 98%)，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。因此，本发明的抗体(特别是人源化抗体)具有重大的临床价值。

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc., 1995 中所述的方法进行；限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本

领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本发明所要求保护的

范围。

实施例 1：特异性结合 HBsAg 的人-食蟹猴嵌合单克隆抗体的制备

1.1 食蟹猴免疫

使用实验室前期研发的重组 HBV 疫苗（该重组疫苗详细描述于中国专利申请 201710085194.3）对大于 6 个月，体重为 4 ± 1 kg 的食蟹猴进行肌肉注射免疫，注射剂量为 $20 \mu\text{g}/\text{monkey}/\text{time}$ 。免疫时间点分别在第 0、2、6、10、14、18、22、26 周。在免疫第 4 针（10 周）食蟹猴血清滴度达到平台期后，我们分别在第 13、17、25、29 周（即每

次免疫后的第三周，产生大量记忆 B 细胞），采集食蟹猴外周血 $10 \text{ ml}/\text{monkey}/\text{time}$ 。

1.2 食蟹猴外周血单核细胞分离

食蟹猴外周血单核细胞的分离参照 SepMate™ 使用说明书进行。SepMate™ 试管用于通过密度梯度离心从人外周全血和脐带血样本中分离单个核细胞（MNCs）。分离前应确保样本、含 2% 胎牛血清（FBS）的 PBS 缓冲液（PBS+2% FBS）、密度梯度离心液以及离心机均处于室温（15-25℃）。具体步骤如下：

1）使用移液器将密度梯度离心液通过 SepMate™ 插件中央小孔小心加入 SepMate™ 试管中。密度梯度离心液上端应淹没过插件。注意：密度梯度离心液在使用移液器后可能会产生小气泡，这不会对使用效果产生影响。

2）使用等体积的 PBS+2% FBS 稀释样本。轻柔混匀。

3）保持 SepMate™ 试管垂直，用移液器沿试管壁加入稀释后的样本。样本将会在插件上面和密度梯度离心液混合。注意：样本可以沿管壁直接倒入。注意不要将稀释的样本直接倒在中央小孔上。

4）在室温下 $1200 \times g$ 离心 10 分钟，无需关闭离心机刹车。注意：对于存放超过 24 小时的样本，推荐离心时间为 20 分钟。

5）倒出上层液体至一个新的试管，该层含富集的 MNCs。请勿将 SepMate™ 试管在倒置状态下超过 2 秒。注意：离心后可能会有部分红细胞（RBCs）出现在 SepMate™ 插件的表层，但不会对使用效果产生影响。

6）使用 PBS+2% FBS 清洗 MNCs。重复清洗一次。注意：清洗细胞时建议在室温下 $1200 \times g$ 离心 8 分钟，无需关闭离心机刹车。

1.3 记忆 B 细胞分离

因市面上无专门的食蟹记忆 B 细胞分选试剂，我们采用 EasySep™ HUMAN PAN-B CELL ENRICHMENT KIT 进行。

1) 按照上述 1.2 的方法分离出的 PBMC 细胞以 300 g，离心 10 分钟，然后用 10 mL 无血清的 1640 培养基洗涤细胞一次。

5 2) 用 10 mL 过滤后的 MACS buffer 重复洗涤一次。

3) 将细胞用 1 mL MACS buffer 重悬，然后转移至 5 mL 聚苯乙烯圆底试管中。

4) 按 50 μ L/mL 细胞加入 EasySep™ Human Pan-B Cell Enrichment Cocktail。

5) 室温孵育 10 min，按 75 μ L/mL 细胞加入 EasySep™ D Magnetic Particles。

6) 补加 MACS buffer 至 2.5mL，轻轻上下混匀。

10 7) 将试管放入磁铁分离器上 5 分钟，之后将需要的阳性细胞转移至新的试管中，而不需要的阴性细胞保留在原始试管中。

1.4 体外刺激培养

1.4.1 HEK293-CD154 辐照

15 辐照剂量为 40 Gy，具体操作步骤参见《RS 2000 型生物学 X-ray 辐照仪使用说明书》。

1.4.2 细胞铺板

RPMI 1640 培养基重悬好的细胞按 5 个/孔与配制好的 50 ng/mL 的 IL21 和辐射过后的 HEK293-CD154 按 10^4 个/孔混匀后，共同孵育铺入 96 孔板中，每孔 250 μ L。静置放于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中，刺激培养 14 天。

1.4.3 细胞培养阳性孔检测

20 取商业化的 HBsAg 板（购于北京万泰），每孔加入 100 μ L 待测上清，并在 37°C 温育 1 h。随后，用 PBST 洗涤 ELISA 板 5 次，然后添加以 1 : 5000 稀释的 GAH-HRP 100 μ L，并在 37°C 温育 30 min。随后，用 PBST 洗涤 ELISA 板 5 次，并添加底物 TMB 溶液。显色 15 min 后，用 H₂SO₄ 终止显色反应，并于 OD450/620 测定读值。以 RPMI 1640 培养基为阴性对照。

1.5 B 细胞抗体可变区基因的钓取

1.5.1 细胞处理

30 将含有阳性 B 细胞培养孔的培养板先在 300×g 条件下离心 5 min，将细胞上清吸出。加入 150 μ L 的 Lysis Buffer（购自北京 GenMagBio）裂解液，用枪头反复吹吸几次后移入无 RNA 酶的 1.5 mL Eppendorf 管中，放置于 -80°C 冰箱中，可以保存一年。

1.5.2 RNA 提取

RNA 提取方法参照病毒 DNA/RNA 共提取试剂盒说明书 (GenMagBio)。

1) 在 1.5 mL 无核酸酶 Eppendorf 管中加入 10 μ L Proteinase K、4 μ L Acryl Carrier、300 μ L Lysis Buffer、20 μ L 磁珠 (使用前颠倒或使用移液器吹吸混匀磁珠), 加入 200 μ L 样品, 震荡混匀各离心管, 室温上下颠倒混匀 10 min, 使磁珠和核酸充分结合。

2) 将离心管置于磁力架上 1min, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 取下离心管。

3) 加入 500 μ L 的 Wash Buffer I, 使磁珠重新悬浮, 利用磁力架吸附磁珠, 1 min 后移走管内液体, 取下离心管。

4) 加入 500 μ L 的 Wash Buffer II, 使磁珠重新悬浮, 利用磁力架吸附磁珠, 1min 后移走管内液体, 同时保持离心管置于磁力架上, 使磁珠继续被吸附。

5) 加入 550 μ L 的 Wash Buffer III, 尽量不要冲起磁珠, 1min 后移走管内液体, 取下离心管。

6) 加入 50 μ L 的 Elution Buffer, 使磁珠重新悬浮, 55 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 期间轻轻晃动两次使核酸充分洗脱。

7) 将离心管置于磁力架 1min, 使磁珠被吸附, 将液体转移至新的 1.5 mL 无核酸酶的离心管中。

1.5.3 B 细胞抗体可变区 RT-PCR

反转录使用的引物(参见 Meng W, Li L, Xiong W, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single rhesus macaque antibody secreting cells[C]//mAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(4): 707-718.)如表 2 所示。

表 2: 食蟹猴抗体可变区基因反转录引物

引物名称	SEQ ID NO	引物序列
Rh gamma-PCR1	61	5'GGACAGCCKGGAAGGT GTGC
Rh kappa-PCR1	62	5'GAGGCAGTTCCAGATT CAA
Rh lambda-PCR1	63	5'CCGCGTACTTGTGTTG CTCTGT

具体步骤如下:

(1) 首先按下列配方配置 I 液:

Buffers	Volume
---------	--------

DEPC 水	6.8 μL
引物/条	0.6 μL
RNAsin	0.1 μL
Mrna	5 μL

(2) 75℃温浴 5 min。

(3) 迅速放入冰浴中 5 min。

(4) 之后按下列配方配置 II 液：

Buffers	Volume
5×AMV buffer	4 μL
10 mmol dNTP	1 μL
AMV 反转录酶	0.2 μL

(5) 混匀，加 5.2 μL 到各管中。

5 (6) 混匀，42℃水浴反转录 40 min。

(7) 分装保存，短期内使用置于-20℃，短期内不使用置于-80℃。

1.5.4 抗体可变区基因扩增

B 细胞抗体 H 链、 κ 轻链及 λ 轻链可变区基因采用巢式 PCR 扩增，扩增引物参考 (Meng W, Li L, Xiong W, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single rhesus macaque antibody secreting cells[C]//mAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(4): 707-718). 并将巢式第二轮引物上与载体的同源序列替换成本实验室已有的真核表达载体（参见实施例 1.5.5.1）上的一段作为同源序列。按照表 3 配制 PCR 反应体系，每个体系为 25 μL 。巢式第一轮反应以反转录的 cDNA 为模板，反应条件为：95℃，5 min；95℃，30 s；55℃，60 s；72℃，90 s；72℃，7 min；扩增循环数为 35 个；巢式第二轮反应以第一轮扩增产物为模板，反应条件为：95℃，5 min；95℃，30s；58℃，60 s；72℃，90 s；72℃，7 min；扩增循环数为 35 个。随后通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，并用 DNA 纯化回收试剂盒(TianGen，DP214-03)回收扩增产物。

表 3: 巢式 PCR 反应体系

Buffers	Volume of 1 st round PCR(μL)	Volume of 2 nd round PCR (μL)
DEPC 水	12.5 μL	15.5 μL
10×PCR buffer	2.5 μL	2.5 μL
2.5 mmol/L dNTP	2.5 μL	2.5 μL
HS Taq DNA polymerase	0.5 μL	0.5 μL

F_{mix}	1 μ L	1 μ L
R_{mix}	1 μ L	1 μ L
Template	5 μ L	2 μ L

1.5.5 抗体基因的表达与纯化

1.5.5.1 用于真核表达的重组载体的构建

本发明中，需要进行大量的抗体重组，因此需要构建一套可以高效重组抗体的轻重链载体。本发明对实验室现有的真核表达载体 pTT5 进行了特殊改造，构建一套供双质粒共转染用轻重链重组载体。轻重链信号肽采用 MGWSCILFLVATATGVHS。信号肽下游分别接入编码人抗体轻重链恒定区的序列，构建一套方便抗体重组的 pTT5-CH, pTT5-C κ 和 pTT5-C λ 真核表达载体。利用实验室自制的 Gibson 装配液将上述构建好的真核表达载体与 1.5.4 中回收到的抗体可变区基因 PCR 产物连接（引物带有与载体同源序列），得到重组载体 VH+pTT5-CH, VH+pTT5-C κ 和 VH+pTT5-C λ 。将重组载体转化入到大肠杆菌 DH5 α 菌株，涂布 LB 平板，并在 37℃ 培养箱培养过夜。从平板上挑取单克隆菌落，并进行测序，测序结果使用 IgBlast 对序列进行比对，以确认其基因正确性，排除假基因。

1.5.5.2 抗体基因的小量及大量表达

将构建好的重组载体 VH+pTT5-CH 和 VH+pTT5-C κ 和 VH+pTT5-C λ 共转染 HEK293-细胞，小量表达双质粒共转染至每孔 500 μ L 的 24 孔板中，如小量表达的细胞上清具有抗原活性，将转染体系放大到 100 mL（根据抗体用量决定）的 CHO-S 悬浮细胞（细胞密度为约 2×10^6 cells/ml）。转染后的细胞在 32℃，5% CO₂ 培养箱摇瓶培养，表达 7 天后收上清。

1.5.5.3 抗体纯化

收集细胞表达上清，根据制造商的说明书，用 Protein A 层析柱进行纯化。具体步骤如下：收获的细胞培养上清，8000 rpm，离心 10 min，保留上清，利用干粉 Na₂HPO₄ 调节其 PH 值为 8.4，然后用 0.22 μ m 孔径滤膜过滤。取偶联上 Protein A 的 Sepharose 4B 介质 10 mL 装柱，连接至 AKTA Explorer100 系统，将 A 泵接入 0.2 M 磷酸氢二钠溶液，B 泵接入 0.2 M 柠檬酸溶液。选取检测波长 UV 280 nm，流速 5 mL/min，调节 A/B 泵进样比例，先取 100% B（pH 2.3）冲洗柱子出去杂蛋白，取 10% B（pH 8.0）平衡 pH，待检测波长稳定后归零，上样，待穿透峰过后取 10% B 继续平衡至检测波长降至零点并稳定后，用 70% B（pH 4.0）洗脱，收取洗脱峰。将洗脱峰样品透析至 PBS 缓冲液中，并

测定浓度及 SDS-PAGE 分析, 以确定 IgG 抗体的纯度。

实施例 2: 特异性结合 HBsAg 的食蟹猴-人嵌合单克隆抗体的性质分析

按照实施例 1 的方法, 共制备获得了 3 株特异性结合 HBsAg 的食蟹猴-人嵌合单克隆抗体, 分别命名为 M1-23, M3-23, M3-13。三株抗体的 VH 和 VL 氨基酸序列如下表所示 (SEQ ID NO: 1-5)。另外, 还利用 IMGT 确定了三株抗体的 CDR 序列, 其重链可变区和轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列如表 5 (SEQ ID NO: 6-20) 所示。

表 4: M1-23/M3-23/M3-13 轻重链可变区氨基酸序列

序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
M1-23 VH	1	QVQLQESGPGLVKPSSEILSVTCSVSGGSITSNFWSWIRQ PPGKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLRSRVTLSDVTSKNQ LSLKLSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGL RVTVSS
M1-23 VK	2	EIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQDISSSLNWDYQQK GKAPQLLIYYANRLESGVPSRFRGSGSGTEFTLTISLQP EDFTTYYCQQYHSLPLTFGGGKVEIK
M3-23 VH	3	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGVSISPPYDWTWIR QPPGKGLEWIGRIHGNGGSTSYNPSLKNRVTISKDTSKN QFSLILSSVTAADTAVYYCVRDETGWGQGVLTVSS
M3-23 VK	4	DIQMSQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLYSSNNKNYLA WYQQKPGQAPKLLFYWASTRESGVPNRFSGSGSGTDFT LTIRGLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGTKVEIK
M3-13 VH	5	QVQLQESGPRLVKSETLPLTCAVSGASNSSNYWSWIRQ PPGKGLEWIGRIYGNSTGSDYNPSLKSRSISTDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYFCARGSVYTYSWGQGVLTVSS
M3-13 VK	4	DIQMSQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLYSSNNKNYLA WYQQKPGQAPKLLFYWASTRESGVPNRFSGSGSGTDFT LTIRGLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGTKVEIK

10

表 5: M1-23/M3-23/M3-13 轻重链 CDR 的序列

M1-23		
VH CDR1	GGSITSNF	SEQ ID NO: 6
VH CDR2	YISGSGTYT	SEQ ID NO: 7
VH CDR3	ARSHDYGSNDYAFDF	SEQ ID NO: 8
VL CDR1	QDISSS	SEQ ID NO: 9
VL CDR2	YAN	SEQ ID NO: 10
VL CDR3	QQYHSLPLT	SEQ ID NO: 11

M3-23		
VH CDR1	GVSISSPYDW	SEQ ID NO: 12
VH CDR2	IHGNGGST	SEQ ID NO: 13
VH CDR3	VRDET	SEQ ID NO: 14
VL CDR1	QSLLYSSNNKNY	SEQ ID NO: 15
VL CDR2	WAS	SEQ ID NO: 16
VL CDR3	QQHYTTPLT	SEQ ID NO: 17
M3-13		
VH CDR1	GASNSSNY	SEQ ID NO: 18
VH CDR2	IYGNSGST	SEQ ID NO: 19
VH CDR3	ARGSVYTYS	SEQ ID NO: 20
VL CDR1	QSLLYSSNNKNY	SEQ ID NO: 15
VL CDR2	WAS	SEQ ID NO: 16
VL CDR3	QQHYTTPLT	SEQ ID NO: 17

发明人对纯化后的 3 株单克隆抗体进行了一系列的性质分析。首先通过 ELISA 法分别检测了 M1-23, M3-23 及 M3-13 与 HBsAg 的结合能力, 按首孔浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 进行 3 倍浓度梯度稀释, 共稀释 12 个浓度梯度。随后, 将稀释好的抗体加入商业化的 HBsAg 板中 (购于北京万泰), 并在 37°C 孵育 1 h, 用 PBST 洗板 5 次, 甩干。随后, 加入 GAH-HRP 酶标二抗, 孵育 30 min, 用 PBST 洗板 5 次, 甩干。并添加底物 TMB 溶液。显色 15 min 后, 用 H_2SO_4 终止显色反应, 并于 OD450/630 测定读值。结果如图 1 所示, M1-23, M3-23 及 M3-13 均具有良好的抗原结合活性。

通过竞争 ELISA 法考察识别 HBsAg SA 类型表位(HBsAg aa113-135)的鼠源单抗 6D11(详细描述于中国专利申请 201610879693.5)阻断 M1-23, M3-23 及 M3-13 与 HBsAg 的结合的情况。竞争 ELISA 法的具体步骤参见实施例 4.2。如图 2 所示, 结果显示鼠源单抗 6D11 可显著阻断 M1-23, M3-23, M3-13 分别与 HBsAg 的结合, 这表明 M1-23, M3-23, M3-13 与鼠源单抗 6D11 识别的均为相同 HBsAg SA 线性表位。

通过 HBV 转基因小鼠来评价食蟹猴-人嵌合抗体在动物体内的病毒清除能力。将食蟹猴-人嵌合抗体按 10 mg/kg 的剂量单剂尾静脉注射的方式施用给 HBV 转基因小鼠, 每组 6 只 HBV 转基因小鼠。随后, 通过眼眶后静脉丛取血采集小鼠的血液, 并检测小鼠血清中的 HBsAg 水平和 HBV DNA 水平的变化。小鼠血清中的 HBsAg 水平和 HBV DNA 水平的检测方法参见实施例 5.1 及 5.2。结果表明, M1-23, M3-23 及 M3-13 (M1-23、M3-23 结果示于图 3A-3B; M3-13 对 HBsAg 的清除结果示于图 7A-7B) 具有用于治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)的潜力。

实施例 3: 抗体 M1-23 与 M3-23 的人源化

为了减少异源抗体施用给人受试者时引起的免疫原性, 发明人对 M1-23, M3-23 这两株抗体进行了人源化。由于食蟹猴与人类的免疫球蛋白之间氨基酸序列具有高度一致性, 因此对与 M1-23, M3-23 这两株抗体而言, 为使其适用于人类治疗仅需额外地将可变区 FR 少数氨基酸替换为人可变区 FR 序列中相应位置的氨基酸。然而, 虽然抗体主要通过 CDR 来接触和识别抗原, 但是抗体 FR 区中的部分残基可能也参与抗原-抗体的相互作用, 影响 CDR 的空间构型, 例如在将鼠源抗体的 FR 区替换为人抗体的 FR 区后, 鼠源抗体的 CDR 的空间构型往往发生改变, 导致人源化抗体识别/结合抗原的亲和力显著下降, 甚至导致人源化抗体丧失与抗原结合的能力(葛彦, 人源化抗体研制策略分析及应用研究[J]. 国外医学, 免疫学分册, 2004, 27(5): 271)。因此, 在对 M1-23, M3-23 进行人源化的过程中, 可变区 FR 序列中点突变位置及替换后的氨基酸的选择是十分重要的。

通过使用 IMGT 信息系统(<http://www.imgt.org>), 并结合实验经验, 在大量的分析和实验的基础上, 发明人出人意料地发现, 选择人胚系基因序列 IGHV4-4*08 (SEQ ID NO: 40) 与 IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 41) 作为 M1-23 人源化的模板, IGHV4-4*02 (SEQ ID NO: 42) 与 IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 43) 作为 M3-23 人源化的模板是特别有利的, 所涉及的胚系基因序列列于下表 6。

表 6: 人胚系基因氨基酸序列

胚系基因	对应序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
IGHV4-4*08	M1-23 VH	40	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTC TVSGGSISSYYWSWIRQPPGKG LEWIGYIYTSNSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR
IGKV1-39*01	M1-23 VK	41	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTP
IGHV4-4*02	M3-23 VH	42	QVQLQESGPGGLVKPSGTLSTLC AVSGGSISSNWSWVRQPPG KGLEWIGEYHSGNSTNYNPSLK SRVTISVDKSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCAR

IGKV4-1*01	M3-23 VK	43	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQYYSTP
------------	-------------	----	--

根据胚系基因序列，同时考虑到改变靠近 CDR 的 FR 区氨基酸可能会影响人源化抗体识别/结合抗原的亲和力，我们在保留 CDR 区附近的氨基酸基础上，设计了如下单点突变对两株抗体的 FR 区进行改造。分别将人源化后的 M1-23、M3-23 命名为 M1D、

5 M3D。

表 7：抗体 M1-23 的 FR 区氨基酸残基的单点突变

编号*	原始氨基酸	人源化后的氨基酸	编号*	原始氨基酸	人源化后的氨基酸
HFR1			LFR1		
H17	I	T	L1	E	D
H20	V	L	L3	V	Q
H23	S	T	LFR2		
HFR3			L45	Q	K
H64	R	K	LFR3		
H69	L	I	L55	E	Q
H78	L	F	L63	R	S
HFR4			L70	E	D
H107	L	T	L84	T	A
H108	R	T			

※：上表中提及的氨基酸位置是根据 Kabat 编号系统的位置。

10

表 8：抗体 M3-23 的 FR 区氨基酸残基的单点突变

编号*	原始氨基酸	人源化后的氨基酸	编号*	原始氨基酸	人源化后的氨基酸
HFR1			LFR1		
H2	L	V	L3	Q	V
H16	E	G	L5	S	T
HFR2			L19	V	A
H37	I	V	LFR2		
HFR3			L43	A	P
H65	N	S	LFR3		
H71	K	V	L60	N	D
H73	T	K	L76	R	S

H81	I	K	L77	G	S
HFR4					
H107	V	T			

※：其中上表中提及的氨基酸位置是根据 Kabat 编号系统的位置。

表 9：M1-23，M3-23 FR 区人源化改造引物

引物名称	SEQ ID NO	引物序列
PTT5-1-23H-F	64	5'-AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTcaggtgcagctgcaggagtcaggcccag
1-23H-F1	65	5'-caggagtcaggcccaggactgggaagccttcggagaCCCTGTCCCTCACCTGCAC
1-23H-F2	66	5'-aagccttcggagaCCCTGTCCCTCACCTGCACtgtctctgggtggtccatc
1-23H-R1	67	5'-GTTCTTGGACGTGTCTACGGATATGGTGACTCGACTCTTGAGGGAGGGGTTGTAGT
1-23H-F3	68	5'-TCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTtctccctgaaactgagctc
PTT5-1-23H-R	69	5'-GATGGGCCCTTGGTCGACGCtgaagagacgggtgacGGTGGTcccttggecccagaaatc
PTT5-1-23K2-F	70	5'-AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATACAGATGACGCAGTCTCCATCC
1-23K-R2	71	5'-CAGCAAAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTATGC
1-23K2-R1	72	5'-GAACCTTGATGGGACCCCACTTTGCAAACGATTTGCATAATAGATCAGGAGC
1-23K2-R2	73	5'-CTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGATGGGACCCCTC
1-23K-F2	74	5'-GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAACCTGAGG
1-23K-F3	75	5'-GCAGCCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTATTACTGTCAAC
PTT5-1-23K-R	76	5'-GACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCAT
PTT5-3-23HV2-F	77	5'-AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCC
3-23HV2-R1	78	5'-ATTCCCGGGTagatgcccGTAAGAGAGCAGCTTAGGAGGCTGTCCTGGTTTCTGCTG

3-23HV2-F1	79	5'- ggtgtetccatcagcagtccttatgacTGGACCTGGGTCCGCCAGCCCCC AGGGAAG
3-23HV2-R2	80	5'- AACTGGTTCTTGGACTTGTCTACTGAAATGGTGACTCGA CTCTTGAGGGAGGGGTTG
3-23HV2-F2	81	5'- AGACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTC TGTGACCGCCGC
PTT5-3-23HV1-R	82	5'- gaaaccTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC GTCGACCAAGGGCCCATC
PTT5-3-23KV1-F	83	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCGTGAT GACCCAGTCTCCAGACTCC
3-23KV1-F1	84	5'- CCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGA GGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAG
3-23KV2-R1	85	5'- CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCTTTTACt gggcatctACCCGGGAAT
3-23KV1-R2	86	5'- GTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAATCGGTCA GGGACCCCGGATTCCCGGGTagatgcc
3-23KV1-F2	87	5'- GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGGCTGAAGATG
PTT5-3-23KV1-R	88	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTGGTCC

根据表 7，表 8 中列出的单点突变，设计了相关引物（见表 9），并通过 PCR 的方法，分别以 M1-23-H，M1-23-L，M3-23-H 和 M3-23-L 为模板，将对应位置的原始氨基酸全部进行突变。以 M1-23 重链可变区（M1-23-H）的人源化为例，设计寡核苷酸引物 PTT5-1-23H-F，1-23H-F1，1-23H-F2，1-23H-R1，1-23H-F3 及 PTT5-1-23H-R（其序列示于上表）。PCR 的具体方案如下：以 M1-23-H 的编码基因为模板，分别用引物对 1-23H-F1 /1-23H-R1 和 1-23H-F3/PTT5-1-23H-R 扩增出片段 1 和片段 2；以片段 1 为模板，用引物对 1-23H-F2 /1-23H-R1 扩增出片段 3；以片段 3 为模板，用引物对 PTT5-1-23H-F /1-23H-R1 扩增出片段 4；通过重叠延伸 PCR 将片段 4 和片段 2 连接到一起，再以 PTT5-1-23H-F/PTT5-1-23H-R 为上下游引物进行扩增，获得人源化后的基因片段 M1D-H。

按照上述方法，获得 M1-23-L 的人源化基因片段 M1D-L，M3-23-H 的人源化基因片段 M3D-H，M3-23-L 的人源化基因片段 M3D-L。

用实验室自制的 Cibson 装配液将获得的人源化基因片段 M1D-H、M3D-H 分别与真

核表达载体 pTT5-CH 连接, M1D-L、M3D-L 分别与真核表达载体 pTT5-Cκ 连接, 得到重组载体。将重组载体转化入到大肠杆菌 DH5α 菌株, 涂布 LB 平板, 并在 37℃ 培养箱培养过夜。从平板上挑取单克隆菌落, 并进行测序, 挑选测序正确的质粒, 按照实施例 1 中方法, 进行抗体的表达与纯化。

- 5 人源化抗体 M1D、M3D 氨基酸序列示于表 11。另外, 还通过下式计算了 M1D、M3D 的人源化程度。如下表 10 所示, 这两株抗体经过上述人源化后, 人源化程度由 90% 左右提高到了 98% 左右。

表 10: 人源化抗体的序列分析

人源化前		人源化后	
抗体名称	人源化程度	抗体名称	人源化程度
M1-23	90%	M1D	98.33%
M3-23	91.67%	M3D	97.78%

人源化程度=(FR 区氨基酸个数-FR 区保留的猴源氨基酸个数)/FR 区氨基酸个数×100%

10

表 11: 抗体 M1D,M3D 轻重链可变区氨基酸序列

对应序列名称	SEQ ID NO	氨基酸序列
M1D VH	57	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITSNFWSWIRQPP GKGLEWIGYISGSGTYTDYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARSHDYGSNDYAFDFWGQGTTVTVSS
M1D VK	58	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQDISSSLNWFYQQKPG KAPKLLIYYANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYHSLPLTFGGGTKVEIK
M3D VH	59	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGVSISSPYDWTWVRQ PPGKGLEWIGRIHGNGGSTSYNPSLKSRTVISVDKSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCVRDETGWGQGLTVTVSS
M3D VK	60	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLFYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT SSLQAEDVAVYYCQQHYTTPLTFGQGTKVEIK

实施例 4: 人源化抗体 M1D,M3D 的体外结合活性评估

4.1 抗体的抗原结合活性的测定

- 15 通过 ELISA 方法(酶联免疫吸附法)检测了人源化抗体 M1D,M3D 与抗原 HBsAg 的结合活性。按首孔浓度为 10 μg/mL, 进行 3 倍浓度梯度稀释, 共稀释 12 个浓度梯度, 以人源化抗体 162 (其详细描述于中国专利申请 CN201610879693.5 中)作为参比抗体。

随后, 将稀释好的抗体加入商业化的 HBsAg 板中 (购于北京万泰), 并在 37℃ 孵育 1 h, 用 PBST 洗板 5 次, 甩干。随后, 加入 GAH-HRP 酶标二抗, 孵育 30 min, 用 PBST 洗板 5 次, 甩干。并添加底物 TMB 溶液。显色 15 min 后, 用 H₂SO₄ 终止显色反应, 并于 OD450/630 测定读值。结果如图 4 所示, 人源化抗体 M1D,M3D 均具有很好的抗原结合活性, 且其对抗原 HBsAg 的亲合力都优于参比抗体 162。上述结果表明, 经过人源化改造的这两株抗体不仅具有极高的人源化程度 (97% 以上), 而且基本上保留了亲本抗体的抗原结合活性, 甚至表现出比亲本抗体更好的抗原结合活性。

4.2 抗体的初步表位鉴定

发明人还对抗体的表位进行了初步鉴定, 以判断所筛选得到的人猴嵌合抗体及人源化抗体是否识别 HBsAg 上的 SA 表位。使用识别 SA 类型表位的高浓度的 6D11 交叉阻断待测抗体与 HBsAg 的结合情况, 若有明显阻断 (竞争) 效果, 则说明待测抗体与 6D11 识别同一表位, 具体步骤如下:

(1) 测定抗体浓度, 按照 10μg/孔的用量加入商业化的 HBsAg ELISA 板中, 然后用 20% NBS 补足体积至 50 μL, 37℃ 孵育 30 min。

(2) 6D11-HRP 用 ED-11 以 1:20000 稀释后, 按照 50 μL/孔加入 ELISA 板, 37℃ 孵育 30 min。

(3) 用 PBST 洗板 5 次, 甩干。

(4) 并添加底物 TMB 溶液, 显色 15 min 后, 用 H₂SO₄ 终止显色反应。

(5) 于 OD450/630 测定读值。

结果如图 5 所示, 其中 162 在本实验中作阳性对照。M1D,M3D 与 HBsAg 的结合均可被鼠源抗体 6D11 竞争, 且竞争效果跟阳性对照 162 以及亲本抗体 M1-23, M3-23 相当。上述结果说明人源化抗体 M1D,M3D 同样识别 SA 表位。

4.3 抗体的中和活性的测定

发明人利用实验室自制的细胞模型 HepaG2-NTCP, 来评估抗体中和 HBV 感染(100 MOI HBV 感染滴度)的能力。将一定量的 HBV 与梯度稀释的抗体共孵育于 HepaG2 细胞中, HBV 能够侵入分化后的 HepaG2 细胞并在细胞中进行复制, 随着不同抗体的加入及加入抗体量的变化, HBV 的侵入和复制将会被不同程度的减弱或抑制, 从而细胞上清中将呈现不同水平的 HBV 抗原(HBeAg)。因此, 通过测定 HBV 抗原(HBeAg)的水平, 即可

判断不同人源化抗体中和 HBV 的能力。

对人源化抗体进行两倍浓度梯度稀释，并以 162 抗体作为阳性对照，从 10 $\mu\text{g/mL}$ 开始，共稀释 18 个梯度。将病毒感染体系分别与抗体混合，预孵育 1h。然后加入预先铺好 HepaG2 的细胞板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h，每隔两天对细胞进行换液。感染后第 7 天，取细胞培养上清，检测其中的 HBeAg 水平。检测方法如下：

(1)反应板的制备：将 anti-HBeAg 单克隆抗体用 20 mM PB 缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液，pH 7.4) 稀释到 2 $\mu\text{g/mL}$ 。向 96 孔化学反光板中加入稀释的 anti-HBeAg 单克隆抗体(100 μL /孔)，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。所使用的原料均购自北京万泰生物药业股份有限公司。用 PBST 洗涤 96 孔化学反光板一次，甩干。向 96 孔化学反光板中加入封闭液，每孔 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。随后，弃去封闭液，将平板放入干燥间干燥，于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2)孵育：向上述制备好的反应板中加入 100 μL /孔的待检样品，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。

(3)洗涤：用 PBST 洗涤 96 孔化学反光板 5 次，甩干。

(4)孵育：加入辣根过氧化物酶标记的 anti-HBeAg 抗体(100 μL /孔)，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。原料购自北京万泰生物药业股份有限公司。

(5)洗涤：用 PBST 洗涤 96 孔化学反光板 5 次，甩干。

(6)显色：加入鲁米诺化学发光试剂(100 μL /孔)。

(7)读板：利用化学发光酶标仪读取数值。

实验结果如图 6A-6B 所示，M1D 对 HBV 的中和活性与参比抗体 162 相当。

实施例 5：人源化抗体 M1D,M3D 的动物治疗效果的测定

将上述 5 株抗体按 10 mg/kg 的剂量单剂尾静脉注射的方式施用给 HBV 转基因小鼠，每组 6 只 HBV 转基因小鼠。随后，通过眼眶后静脉丛取血采集小鼠的血液，并检测小鼠血清中的 HBsAg 水平和 HBV DNA 水平的变化。

5.1 HBsAg 的定量检测

(1)反应板的制备：将小鼠单克隆抗体 HBs-45E9 用 20 mM PB 缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液，pH 7.4) 稀释到 2 $\mu\text{g/mL}$ ，在化学发光板中每孔添加 100 μL 的包被液，并在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下包被 16-24 h，随后再 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h，用 PBST 洗涤液洗涤平板一次，甩干。洗涤后，在各孔中加入 200 μL 的封闭液，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。随后，

弃去封闭液，将平板放入干燥间干燥，于 2-8℃保存备用。

(2)样品稀释：将采集的小鼠血清用含 20% NBS(新生牛血清)的 PBS 溶液，稀释成 1:30 和 1:150 两个梯度，用于后续的定量检测。

(3)样品变性处理：取 15 μL 经上述稀释的血清样品与 7.5 μL 变性缓冲液(15% SDS，溶于 20 mM PB7.4)充分混匀，并在 37℃反应 1 h。随后，加入 90 μL 的中和缓冲液(4% CHAPS，溶于 20 mM PB7.4)，充分混匀。

(4)样品反应：在反应板中加入 100 μL 经上述变性处理的血清样品，37℃反应 1 h。随后用 PBST 洗涤反应板 5 次，甩干。

(5)酶标记物反应：向化学发光板中按 100 μL/孔加入 HBs-A6A7-HRP 反应液，并在 37℃反应 1 h。随后用 PBST 洗涤平板 5 次，甩干。

(6)发光反应和测量：向化学发光板中加入发光液(100 μL/孔)，并进行光强检测。

(7)小鼠血清样品中的 HBsAg 浓度的计算：使用标准品进行平行实验，根据标准品的测定结果绘制标准曲线。然后，将小鼠血清样品的光强测量值代入标准曲线，计算出待检血清样品中的 HBsAg 浓度。

5.2 HBV DNA 的定量检测

HBV DNA 的定量检测按照 HBV DNA 实时荧光定量检测试剂盒说明书进行（试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司）。

在本实施例中，测定了人源化抗体 M1D、M3D、食蟹猴-人嵌合抗体 M3-13 以及参比抗体 162 在动物体内的病毒清除能力。实验结果如图 7A-7B 所示，结果显示人源化抗体 M1D、M3D 以及猴-人嵌合抗体 M3-13 均具有良好的病毒清除能力，其清除动物体内的 HBsAg 及 HBV DNA 的能力优于参比抗体 162。

上述结果表明，本发明的人源化抗体不仅具有极高的人源化程度（最高可达 98%），能够减少免疫排斥反应的可能性，而且展示出与猴-人嵌合抗体相当且优于参比抗体 162 的病毒清除能力。这样的技术效果是显著的和出人意料的。

实施例 6：人源化抗体 M1D,M3D 的非关键 CDR 区确定

在抗体可变区结构域中，与抗原直接结合的部位主要是 CDR 区，但很多研究表明，在抗体的 6 个 CDR 中并不都是抗原-抗体结合的关键区域，非关键 CDR 区可以通过 CDR 替换的方法来确定。本发明依据最适匹配原则选择 CDR 替换序列，通过 IMGT 信息系统，将人源化抗体 M1D，M3D 的 VH 和 VL 氨基酸序列分别输入查找框中，然后将

系统搜索出的胚系基因对应的抗体轻重链氨基酸序列,按照 FR 区同源性最高,CDR 区序列差异性最大的原则选择人源化抗体 CDR 替换序列,除重链 CDR3 以外的每个 CDR 区最终选择两条相对应的替换序列。替换序列见下表:

表 12: 人源化抗体 M1D,M3D CDR 替换序列

编号	原始 CDR	替换 CDR-A	替换 CDR-A 胚系基因	替换 CDR-B	替换 CDR-B 胚系基因
M1D-H-CDR1	GGSITSNF	GGSISSYY	IGHV4-4*08	GGSVSSGSYY	IGHV4-61*01
M1D-H-CDR2	ISGSGTYT	IYTSGST	IGHV4-4*08	ISSSSSYT	IGHV3-11*03
M1D-L-CDR1	QDISSS	QSVSSSY	IGKV3D-7*01	SSNIGSNT	IGLV1-44*01
M1D-L-CDR2	YAN	AAS	IGKV1-39*01	KAS	IGKV1-5*03
M1D-L-CDR3	QQYHSLPLT	LQDYNYP LT	IGKV1-6*01	HQSSSLPLT	IGKV6-21*02
M3D-H-CDR1	GVSISSPYDW	GGSISSGGYS	IGHV4-30-4*07	GGSISSSNW	IGHV4-4*01
M3D-H-CDR2	IHGNGGST	IYHSGST	IGHV4-4*02	ISGSGGST	IGHV3-23*02
M3D-L-CDR1	QSLLYSSNNKNY	QSL LHSDGKTY	IGKV2-29*02	QSVSSSY	IGKV3D-7*01
M3D-L-CDR2	WAS	LGS	IGKV2-28*01	GAS	IGKV3-15*01
M3D-L-CDR3	QQHYTTPLT	QQYYSTPWT	IGKV4-1*01	MQALQTPWT	IGKV2-28*01

- 5 根据上表所述 CDR 替换序列,设计相关引物,并通过 PCR 的方法,替换 M1D, M3D 抗体中相对应的 CDR 区,引物设计见下表。以 M1D 重链可变区 CDR1 (M1D-

HCDR1) 的第一种替换 (M1D-H-CDR1-A) 为例, 设计寡核苷酸引物 M1D- H-CDR1-A R 及 M1D- H-CDR1-A F (其序列示于下表), 并将该替换 CDR 后的抗体命名为 M1D HCDR1-1, 其他替换后抗体的命名方式以此类推。PCR 的具体方案如下: 以 M1D-H 的编码基因为模板, 用引物对 pTT5-M1D-H-F / M1D- H-CDR1-A R 和 M1D- H-CDR1-A F / pTT5-M1D-H-R 分别扩增出上、下游片段; 通过重叠延伸 PCR 将片段连接到一起, 再以 pTT5-M1D-H-F/pTT5-M1D-H-R 为上下游引物进行扩增, 获得在 M1D-HCDR1 发生 CDR 替换的基因片段。

表 13: CDR 替换引物序列

引物名称	SEQ ID NO	引物序列
pTT5-M1D-H-F	89	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGC AGCTGCAGGAGTCAGGC
pTT5-M1D-H-R	90	5'- GATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGAC
pTT5-M1D-L-F	91	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATAC AGATGACGCAGTC
pTT5-M1D-L-R	92	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTG GTCCC
M1D- H-CDR1- 1 R	93	5'- GTAGTAACTACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGC AGGTGAG
M1D- H-CDR1- 1 F	94	5'- GgtggtccatcagtagttactacTGGAGCTGGATCCGCCAG
M1D- H-CDR1- 2 R	95	5'- ATAGTAACTACCACTGCTGACGGAGCCACCAGAGA CAGTGCAGGTGAG
M1D- H-CDR1- 2 F	96	5'- GgtggctcgcgcagcagtggttagttactATTGGAGCTGGATCCGCC AG
M1D- H-CDR2- 1 R	97	5'- GGTGCTCCCACTGGTATAGATATAACCAATCCACT CCAG
M1D- H-CDR2- 1 F	98	5'- AtctataccagtgaggagcaaccGACTACAACCCCTCCCTC
M1D- H-CDR2- 2 R	99	5'- TGtGTAACTACTACTACTACTAATATAACCAATCCA CTCCAG
M1D- L-CDR2- 2 F	100	5'- AttagtagtagtagtagttacacaGACTACAACCCCTCCCTC
M1D- L-CDR1- 1 R	101	5'- GTAGCTGCTGCTAACACTCTGAGTTGCCCGGCAAG TGATGG
M1D- L-CDR1-	102	5'- CagagtgttagcagcagctacTTAAATTGGTATCAGC

1 F		
M1D- L-CDR1- 2 R	103	5'- AGTATTACTTCCGATGTTGGAGCTAGTTGCCCCGGC AAGTGATGG
M1D- L-CDR1- 2 F	104	5'- AgctccaacatcggaagtaatactTTAAATTGGTATCAGC
M1D- L-CDR2- 1 R	105	5'- GACCCCACTTTGCAAACGGGATGCAGCATAGATCA GGAGCTTAGG
M1D- L-CDR2- 1 F	106	5'- CCTAAGCTCCTGATCTATGctgcatccCGTTTGCAAAGT GGGGTC
M1D- L-CDR2- 2 R	107	5'- GACCCCACTTTGCAAACGAGACGCCTTATAGATCA GGAGCTTAGG
M1D- L-CDR2- 2 F	108	5'- CCTAAGCTCCTGATCTATAaggcgtctCGTTTGCAAAGT GGGGTC
M1D- L-CDR3- 1 R	109	5'- AGTGAGAGGGTAATTGTAATCTTGTAGACAGTAAT AAGTTGCAAAATC
M1D- L-CDR3- 1 F	110	5'- CtacaagattacaattaccctCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AG
M1D- L-CDR3- 2 R	111	5'- AGTGAGAGGTAAACTACTACTCTGATGACAGTAAT AAGTTGCAAAATC
M1D- L-CDR3- 2 F	112	5'- catcagagtagtagtttacctCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AG
pTT5-M3D-H-F	113	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGC AGCTGCAGGAGTCG
pTT5-M3D-H-R	114	5'- GATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGA CCAG
pTT5-M3D-L-F	115	5'- AGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCG TGATGACCCAGTCTC
pTT5-M3D-L-R	116	5'- ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCACCTTG GTC
M3D- H-CDR1- 1 R	117	5'- GGAGTAACCACCACTGCTGATGGAGCCACCAGAGA CAGCGCAGGTGAGGGACAG
M3D- H-CDR1- 1 F	118	5'- gggtggetccatcagcagtggtggttactccACCTGGGTCCGCCAGCC C
M3D- H-CDR1- 2 R	119	5'- CCAGTTACTACTGCTGATGGAGCCACCAGAGACAG CGCAGGTGAGGGACAG
M3D- H-CDR1-	120	5'-

2 F		GgtggetccatcagcagtagtaactggACCTGGGTCCGCCAGCCC
M3D- H-CDR2- 1 R	121	5'- GGTGCTCCCCTATGATAGATTTCGTCCAATCCACT CCAG
M3D- H-CDR2- 1 F	122	5'- AtctatcatagtggggagcaccAGCTACAACCCCTCCCTCAAG
M3D- H-CDR2- 2 R	123	5'- TGTGCTACCACCACTACCACTAATTTCGTCCAATCCA CTCCAG
M3D- L-CDR2- 2 F	124	5'- attagtggtagtggtaggcacaAGCTACAACCCCTCCCTCAA G
M3D- L-CDR1- 1 R	125	5'- ATAGGTCTTTCCATCACTATGCAGGAGGCTCTGGC TGGACTTGCAGTTGATGGTGGC
M3D- L-CDR1- 1 F	126	5'- cagagcctctgcatagtgatggaaagacctatTTAGCCTGGTACCAG CAGAAAC
M3D- L-CDR1- 2 R	127	5'- GTAGCTGCTGCTAACACTCTGGCTGGACTTGCAGT TGATGGTGGC
M3D- L-CDR1- 2 F	128	5'- CagagtgttagcagcagctacTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC
M3D- L-CDR2- 1 R	129	5'- GGGACCCCGGATTCCCGGGTAGAACCCAAGTAAAA GAGCAGCTTAGGAGG
M3D- L-CDR2- 1 F	130	5'- CCTCCTAAGCTGCTCTTTTACTtgggttctACCCGGGAA TCCGGGGTCCC
M3D- L-CDR2- 2 R	131	5'- GGGACCCCGGATTCCCGGGTGGATGCACCGTAAAA GAGCAGCTTAGGAGG
M3D- L-CDR2- 2 F	132	5'- CCTCCTAAGCTGCTCTTTTACGgtgcatccACCCGGGAA TCCGGGGTCCC
M3D- L-CDR3- 1 R	133	5'- CGTCCAAGGAGTACTATAATATTGCTGACAGTAAT ACACTGCCACATC
M3D- L-CDR3- 1 F	134	5'- CagcaatattatagtactccttggacgTTCGGCCAAGGGACCAAG
M3D- L-CDR3- 2 R	135	5'- CGTCCAAGGAGTTTGTAGAGCTTGCATACAGTAAT ACACTGCCACATC
M3D- L-CDR3- 2 F	136	5'- AtgcaagctetacaaactccttggacgTTCGGCCAAGGGACCAAG

按照上述方法，将获得的重链 CDR 替换的基因片段分别与真核表达载体 pTT5-CH 连接，并与相对应的没有进行 CDR 替换的轻链表达载体小量转染 HEK293-细胞，并检测小量表达的细胞上清是否具有抗原活性；同样，将获得的轻链 CDR 替换的基因片段分别与真核表达载体 pTT5-CK 连接，并与相对应的没有进行 CDR 替换的重链表达载体进

行小量转染并检测转染上清的抗原结合活性。

如果人源化抗体的某个 CDR 区被替换后，对应的细胞转染上清没有抗原结合活性或者结合活性显著下降，则说明被替换的 CDR 区是抗体抗原结合的关键 CDR 区。如果替换后，对应的细胞转染上清抗原结合活性基本不变，则说明被替换的 CDR 区不是抗体抗原结合的关键区域。

M1D 替换结果如图 8A-8E 所示，M1D 重链 CDR1(M1D-H-CDR1)和轻链 CDR2(M1D-L-CDR2)替换后，与 HBsAg 抗原结合活性基本没变；而重链 CDR2 和轻链 CDR1 替换后，抗原结合活性显著下降；而轻链 CDR3 替换后，完全失去抗原结合活性。上述结果表明，抗体 M1D 的 HCDR1 和 LCDR2 不是与抗原 HBsAg 结合的关键 CDR 区，对其替换并不会影响抗体与抗原的结合活性。

M3D 替换结果如图 9A-9E 所示，M3D 重链 CDR2 (HCDR2) 和轻链 CDR2(LCDR2) 替换后，抗原结合活性基本没变；而轻链 CDR1 替换后，一种替换 (M3D-LCDR1-1) 抗原结合活性明显下降，另一种替换 (M3D-LCDR1-2)，基本没有抗原结合活性；重链 CDR1(HCDR1)和轻链 CDR3(LCDR3)替换后，基本没有抗原结合活性。上述结果表明，抗体 M3D 的 HCDR2 和 LCDR2 不是与抗原结合的关键 CDR 区，对其替换并不会影响抗体与抗原的结合活性。

实施例 7：人源化抗体 M1D,M3D 与抗原结合关键氨基酸确定

为了确定抗体抗原相互作用的关键氨基酸位点，我们对 M1D 的 4 个 CDR 区 HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR3 和 M3D 的 4 个 CDR 区 HCDR1、HCDR3、LCDR1、LCDR3 进行丙氨酸扫描。关键氨基酸往往具有一定的保守性，比如维持抗体构象的氨基酸残基和被包埋的氨基酸残基，这些氨基酸突变成丙氨酸以后会导致抗体失去活性。突变后的抗体通过 Elisa 的方法检测同 HBsAg 的结合活性并计算突变后抗体的 $rEC_{50}(WT/Mutation)$ ，原始抗体 EC_{50} 相对值为 1，完全失去结合活性的用 0 标示)，将突变后 $rEC_{50} < 0.2$ 即活性下降 5 倍的用蓝色标示出来，包括 D、E、R、H、L、W、Y 等氨基酸残基。结果如表 14 所示，其中，酸性氨基酸 D、E，碱性氨基酸 R、H 在抗体抗原结合时可以形成盐桥，从而在抗体抗原的结合反应中起重要作用，把这些氨基酸突变成丙氨酸后会破坏离子键的形成从而使抗体结合活性大大降低；脂肪族氨基酸 L，属于疏水性氨基酸；W、Y 属于芳香族氨基酸，在维持抗体构象中起重要作用。其中，M1D 的 H56Y、H97D、H100cD、H100dL、94L、L96L 突变成丙氨酸后活性显著下降，

为不可变点；M3D 的 H33Y、H34D、H35W、H94R、H95D、H101E、L27dY、L32Y、L91H 突变成丙氨酸后活性显著下降，为不可变点。

表 14: M1D、M3D 关键氨基酸位点确定

M1D					
Kabat Number	Mutation	rEC50	Kabat Number	Mutation	rEC50
CDRH2			CDRL1		
H51	I	0.34	L27	Q	0.39
H52	S	0.61	L28	D	0.54
H52A	G	0.16	L29	I	0.46
H53	S	0.38	L30	S	0.36
H54	G	0.29	L31	S	0.52
H55	T	0.25	L32	S	0.36
H56	Y	0.09	CDRL3		
H57	T	0.56	L89	Q	0.65
CDRH3			L90	Q	1.39
H93	A	1.00	L91	Y	0.43
H94	R	0.58	L92	H	0.33
H95	S	0.21	L93	S	0.84
H96	H	1.18	L94	L	0.00
H97	D	0.04	L95	P	1.05
H99	Y	0.26	L96	L	0.09
H100	G	0.89	L97	T	0.76
H100A	S	1.18			
H100B	N	0.51			
H100C	D	0.00			
H100D	Y	0.00			
H100E	A	1.00			
H99	F	0.25			
H101	D	0.36			
H102	F	1.16			
M3D					
Kabat Number	Mutation	rEC50	Kabat Number	Mutation	rEC50
CDRH1			LCDR1		
H26	G	2.43	L27	Q	0.57
H27	V	0.63	L27A	S	0.25
H28	S	0.91	L27B	L	0.56
H29	I	0.69	L27C	L	0.49
H30	S	1.24	L27D	Y	0.03
H31	S	1.31	L27E	S	0.67
H32	P	0.71	L27F	S	0.54
H33	Y	0.02	L28	N	0.35
H34	D	0.03	L29	N	0.65
H35	W	0.01	L30	K	0.61
CDRH3			L31	N	0.78
H93	V	1.06	L32	Y	0.00
H94	R	0.14	LCDR3		

H95	D	0.00	L89	Q	0.79
H101	E	0.10	L90	Q	0.94
H102	T	0.92	L91	H	0.00
			L92	Y	0.50
			L93	T	0.96
			L94	T	0.82
			L95	P	0.49
			L96	L	0.41
			L97	T	0.66

实施例 8: M1D、M3D 识别的核心表位鉴定

M1D、M3D 识别 SA 线性表位, 为了进一步确定两株抗体识别的核心表位, 我们将 HBsAg 的 aa113-135 (SEQ ID NO: 168) 进行单点突变共合成下列表格中的 14 条多肽。

- 5 多肽用 CB 稀释, 100 ng/mL 包板, 抗体用 20% NBS 溶液释到 1000 ng/mL, 之后按照 3 倍稀释 12 个梯度, 并用 Elisa 的方法检测抗体与不同单点突变多肽的结合活性, 用 PRISM 软件绘制结合曲线。若突变后结合活性丧失, 说明该突变位点为 SA 线性表位上的关键氨基酸。

表 15: SEQ13-B 点突变肽序列

多肽名称	SEQ ID NO	序列
SEQ13-B (aa113-135)	168	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMEFP
S13-S117A	169	SSTTATGPCKTCTTPAQGTSMEFP
S13-T118A	170	SSTTSAGPCKTCTTPAQGTSMEFP
S13-G119A	171	SSTTSTAPCKTCTTPAQGTSMEFP
S13-P120A	172	SSTTSTGACKTCTTPAQGTSMEFP
S13-C121S	173	SSTTSTGPSKTCTTPAQGTSMEFP
S13-K122A	174	SSTTSTGPCATCTTPAQGTSMEFP
S13-T123A	175	SSTTSTGPCKACTTPAQGTSMEFP
S13-C124S	176	SSTTSTGPCKTSTTPAQGTSMEFP
S13-T125A	177	SSTTSTGPCKTCATPAQGTSMEFP
S13-T126A	178	SSTTSTGPCKTCTAPAQGTSMEFP
S13-P127A	179	SSTTSTGPCKTCTTAAQGTSMEFP
S13-Q129A	180	SSTTSTGPCKTCTTPAAGTSMEFP
S13-T131A	181	SSTTSTGPCKTCTTPAQGASMEFP
S13-S132A	182	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTAMEFP

M1D、M3D 及参比抗体 162 与上述单点突变多肽结合的 EC₅₀ 值汇总到下列表 16(完全失去结合活性的用>500 表示), 由结果可知, 162 结合的核心表位为 CKTC(aa121-124), 而 M1D 结合的核心表位 TGPCKTCT(aa118-124), 比参比抗体 162 更长, 且在 aa113-135 位置靠前; M3D 结合的核心表位为 CKTCT(aa121-125), 核心表位位置比 162 靠后。

表 16: M1D、M3D 与 HBsAg(aa113-135)单点突变多肽结合的 EC₅₀ 值

EC ₅₀ (ng/mL)			
多肽名称	162	M1D	M3D
SEQ13-B	39.8	58.1	33.34
S13-S117A	31.1	32.5	33.93
S13-T118A	31.4	>500	37.42
S13-G119A	38.5	>500	41.7
S13-P120A	53.6	>500	67.88
S13-C121S	>500	>500	>500
S13-K122A	111	>500	>500
S13-T123A	>500	>500	>500
S13-C124S	>500	>500	>500
S13-T125A	48.8	353	>500
S13-T126A	41.9	40.8	33.89
S13-P127A	40.4	33.2	69.39
S13-Q129A	39.8	58.1	33.34
S13-T131A	60.1	51.7	62.08
S13-S132A	39.8	58.1	33.34

为了进一步验证抗体在抗原上结合的关键位置, 我们将上述实验在 HBsAg 抗原蛋白进行验证。设计相关引物(表 17), 并通过 PCR 的方法扩增 14 条带点突变 HBsAg 基因片段, 扩增出的片段分别用 Gibson 连接入经过 EcoRI 和 BamHI 双酶切的 PTT5 空载中, 测序正确即载体构建完成。将构建好的质粒少量转染 HEK293T 细胞, 转染两天后, 收集细胞, 做 western blot 进行验证, 具体步骤如下:

(1) 收集细胞, 用 5 mL PBS 洗涤细胞两次, 细胞计数后 1000 rpm 离心 5 分钟;

(2) 按照每 1×10^6 个细胞加入 30 μ L DDM 裂解细胞(也可用 BCA 法定量细胞蛋白量), 4℃裂解 2 h, 期间用振荡器振荡几次;

(3) 13300 rpm 离心 10 分钟, 吸取上清制样, 并取 30 μ L 进行还原 SDS-PAGE 凝胶电泳;

(4) 用电转仪转膜 300 mA 恒流电转 90 min, 商业化封闭液 37°C 封闭 1 h;

(5) 1 mg/mL 抗体 M1D、M3D 和 162 分别用 ED-11 稀释 1000 倍并在 37°C 条件下

5 孵育 1 h;

(6) PBST 每间隔 5 分钟洗涤 1 次, 共 3 次;

(7) 加入酶标二抗 GAH-HRP (1:5000), 37°C 孵育 30 min;

(8) PBST 每间隔 5 分钟洗涤 1 次, 共 3 次;

(9) 显色拍照; (10) 以 β -actin 作内参, 将步骤 (4) 中 PVDF 膜 β -actin 对应位置
10 裁下, 直接 37°C 孵育 HRP 偶联的 mouse anti- β -actin 抗体 (1:5000) 30 min, 其他步骤同上。结果如图 10 所示, 可以看出, 在 HBsAg 抗原蛋白验证的三个抗体的核心表位与在线性多肽上完全一致。

表 17: C-HBsAg 单点突变引物

引物名称	SEQ ID NO	引物序列
C-S117A-F	183	ATCAACTACCGCCACGGGACCATGCAAGACCTGCAC
C-S117A-R	184	GGTCCCGTGGCGGTAGTTGATGTTCTGGAAGTAGA
C-T118A-F	185	AACTACCAGCGCGGGACCATGCAAGACCTGCACGAT
C-T118A-R	186	CATGGTCCCGCGCTGGTAGTTGATGTTCTGGAAGT
C-G119A-F	187	ACCAGCACGGCACCATGCAAGACCTGCACGATTCTCT
C-G119A-R	188	CTTGTCATGGTGCCGTGCTGGTAGTTGATGTTCTCTGG
C-P120A-F	189	CAGCACGGGAGCATGCAAGACCTGCACGATTCTCTGC
C-P120A-R	190	GTCTTGTCATGCTCCCGTGCTGGTAGTTGATGTTCTCT
C-C121S-F	191	ACGGGACCATCCAAGACCTGCACGATTCTCTGCTCAA
C-C121S-R	192	GCAGGTCTTGATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGATGT
C-K122R-F	193	GGGACCATGCCGGACCTGCACGATTCTCTGCTCAAGG
C-K122S-R	194	GTGCAGGTCCGGCATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGAT
C-K122A-F	195	GGGACCATGCGCGACCTGCACGATTCTCTGCTCAAGG
C-K122A-R	196	GTGCAGGTTCGCGCATGGTCCCGTGCTGGTAGTTGAT
C-T123A-F	197	ACCATGCAAGGCCTGCACGATTCTCTGCTCAAGGAAC
C-T123A-R	198	ATCGTGCAGGCCTTGTCATGGTCCCGTGCTGGTAGTT
C-C124S-F	199	TGCAAGACCTCCACGATTCTCTGCTCAAGGAACCTCT

C-C124S-R	200	AGGAATCGTGGAGGTCTTGCATGGTCCCGTGCTGGT
C-T125A-F	201	CAAGACCTGCGCGATTCTTGCTCAAGGAACCTCTAT
C-T125A-R	202	GCAGGAATCGCGCAGGTCTTGCATGGTCCCGTGCTG
C-I126A-F	203	GACCTGCACGGCTCCTTGCTCAAGGAACCTCTATGTT
C-I126A-R	204	TGAGCAGGAGCCGTGCAGGTCTTGCATGGTCCCGTG
C-P127A-F	205	CTGCACGATTGCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCC
C-P127A-R	206	CCTTGAGCAGCAATCGTGCAGGTCTTGCATGGTCCC
C-Q129A-F	207	GATTCCTGCTGCAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTG
C-Q129A-R	208	GAGGTTCTTGCGCAGGAAATCGTGCAGGTCTTGCAT
C-T131A-F	209	TGCTCAAGGAGCCTCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTG
C-T131A-R	210	AACATAGAGGCTCCTTGAGCAGGAATCGTGCAGGTC
C-S132A-F	211	TCAAGGAACCGCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTAC
C-S132A-R	212	GGAAACATAGCGGTTCTTGAGCAGGAATCGTGCAG

实施例 9: M1D、M3D 广谱活性鉴定

为了进一步确认 M1D、M3D 的广谱活性, 我们将不同亚型 A-G(其中 F 型包括 F1、F2)对应的 HBsAg 片段 (aa113-135) 包板 (序列见表 18), 多肽用 CB 稀释, 100 ng/mL 包板, 抗体用 20% NBS 溶液释到 1000 ng/mL, 之后按照 3 倍稀释 12 个梯度, 并用 Elisa 的方法检测 M1D、M3D 与不同亚型的 HBsAg(aa113-135)的结合活性, 用 PRISM 软件绘制结合曲线。结果如图 11A-11B 所示, M1D、M3D 均可以与大部分 HBV 亚型结合。

表 18: 不同亚型的 HBsAg-aa113-135 氨基酸序列

多肽名称	SEQ ID NO	多肽序列
SEQ13-A	213	STTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFP
SEQ13-B	168	SSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMP
SEQ13-C	214	TSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMP
SEQ13-D	215	SSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMP
SEQ13-E	216	SSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMP
SEQ13-F/H	217	STTTSTGPCKTCTTLAQGTSMP
SEQ13F1	218	STTTSTGPCKTCTALAQGTSMP
SEQ13F2	219	STTTSTGPCRTCTTLAQGTSMLP
SEQ13-G	220	SSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMP

实施例 10: M1D、M3D 的亲合力测定

以 5 µg/mL 的 HBsAg 溶解于醋酸钠 (pH 4.5) 在 Biacore 3000 设备上运行包被芯片程序, 将 HBsAg 包被至 CM5 芯片上, HBsAg 的包被量为 2400RU。将分析物从 100 nM, 2 倍梯度稀释, 制备 7 个浓度的样品。在 Biacore 3000 设备上运行亲合力测定程序, 设置流速为 50µl/min, 结合时间为 90 s, 解离时间为 600 s, 样品室的温度设置为 10°C, 再生液为 50 mM NaOH, 再生流速为 50 µL/min, 再生时间为 60 s。表 19 展示了 M1D 分子和 M3D 分子与抗原 HBsAg 的亲合力, 分别为 1.06 nM 和 1.12 nM。

表 19: M1D、M3D 与抗原的亲合力

分析物	K_a (Ms)	K_d (s)	$KD(M)$
M1D	1.02E06	1.08E03	1.06E-09
M3D	5.27E05	5.89E04	1.12E-09

实施例 11: 给食蟹猴单次静脉注射抗体 M1D、M3D 后的药代动力学及初步毒性的评估

将 6 只未曾经历过大分子实验(>2000 Dalton)的雄性食蟹猴分成 2 组, 3 只/组。其中, 通过静脉推注给第 1 组和第 2 组的食蟹猴施用剂量为 20 mg/kg 的抗体 M1D 和 M3D 溶液。评估给食蟹猴单次静脉注射抗体 M1D 和 M3D 后的药代动力学特征及初步毒性反应。具体的实验设计如表 20。

表 20: 评估 M1D、M3D 分子药代动力学特征及初步毒性反应的实验设计

组别	实验制剂	动物数量	给药途径	给药剂量	动物编号
1	M1D	3	IV bolus	20 mg/kg	C1001, C1002, C1003
2	M3D	3	IV bolus	20 mg/kg	C2001, C2002, C2003

在给药前(0 小时), 每天两次(上午 9:30 和下午 4:00)笼边观察实验动物的健康及外观的状态。在实验开展前对实验动物进行体检, 以确认动物的健康状态。在给药当天, 在每个采血点前后分别观察实验动物的状态, 包括实验动物的一般状态、行为、活动量、

排泄、呼吸及其它异常症状。结果显示，所有动物在给药期间及给药后均未表现出任何异常反应。此外，还在给药后，跟踪实验动物的体重和体温。结果示于表 21-24 中。

表 21: M1D 给药后的实验动物的体重

时间	体重 (kg)		
	C1001	C1002	C1003
第 0 天	4.12	3.92	3.66
第 7 天	4.02	3.88	3.70
第 14 天	4.10	3.75	3.80
第 21 天	4.15	3.81	3.72
第 28 天	4.01	3.99	3.87

5

表 22: M1D 给药后的实验动物的体温

时间	体温 (°C)		
	C1001	C1002	C1003
给药前	37.8	38.0	37.9
1 小时	38.4	37.9	38.4
6 小时	38.6	38.4	38.2
10 小时	38.1	37.8	37.6
24 小时	38.1	38.2	38.4

表 23: M3D 给药后的实验动物的体重

时间	体重 (kg)		
	C2001	C2002	C2003
第 0 天	3.6	3.27	3.6
第 7 天	3.58	3.19	3.58
第 14 天	3.73	3.33	3.7
第 21 天	3.68	3.33	3.7
第 28 天	3.95	3.39	3.81

表 24: M3D 给药后的实验动物的体温

时间	体温 (°C)		
	C2001	C2002	C2003

给药前	38.6	38.7	38.2
1 小时	38.5	38.4	37.7
6 小时	39	39	38.2
10 小时	36.3	36.5	36.7
24 小时	38.2	38.1	37.4

上述实验结果表明, 抗体 M1D 和 M3D 在施用给实验动物后, 不会引起实验动物的不良副作用, 从而初步证实了两株抗体良好的安全性。

此外, 还分别于给药前(0 小时), 给药后 0.25h (15 分钟)、0.5h (30 分钟)、1h、2h、4h、10h、24h (Day 1)、48h (Day 2)、72h (Day 3)、96h (Day 4)、144h (Day 6)、192h (Day 8)、240h (Day 10)、336h (Day 14)、408h (Day 17)、504h (Day 21)及 672h (Day 28), 从实验动物的头静脉采集约 1.0 mL 全血。对收集的血清和全血进行下述分析。

采用化学发光免疫分析法(CLIA), 检测食蟹猴血清中抗体 M1D 和 M3D 的浓度。血清中人源化抗体 M1D 和 M3D 的定量下限(LLOQ)为 0.063 ng/mL, 定量上限(ULOQ)为 4.0 ng/mL。检测结果示于图 12A-12B 中。

图 12A 显示了单次静脉注射 20 mg/kg 的人源化抗体 M1D 后, 每一只食蟹猴血清(第 1 组)中人源化抗体 M1D 的血药浓度随时间变化的曲线图。

图 12B 显示了单次静脉注射 20 mg/kg 的人源化抗体 M3D 后, 每一只食蟹猴血清(第 2 组)中人源化抗体 M3D 的血药浓度随时间变化的曲线图。

使用药动力学软件 WinNonlin™ Version 6.2.1 (Pharsight, Mountain View, CA), 以静脉注射非房室模型(IV bolus input)对人源化抗体 M1D、M3D 的实验数据进行处理。

使用对数线性梯形法计算下列参数: 起始血清药物浓度(C_0)、最后一个可检测点的时间(T_{last}), 消除半衰期($T_{1/2}$), 表观分布容积(V_{dss}), 总体清除率(CL), 从零时间点到最后一个可检测到浓度的时间点的平均滞留时间(MRT_{0-last}), 从零时间点到无穷大的平均滞留时间(MRT_{0-inf}), 从零时间点到最后一个可检测到浓度的时间点的血清浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-last}), 及从零时间点到无穷大的血清浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-inf})。

结果显示: 单次静脉注射 20 mg/kg 的人源化抗体 M1D 后, 雄性食蟹猴对人源化抗体 M1D 的 CL 为 0.00962 ± 0.00335 mL/min/kg。人源化抗体 M1D 的平均消除半衰期($t_{1/2}$) 为 81.3 ± 78.7 小时。食蟹猴血清中人源化抗体 M1D 的 V_{dss} 和 AUC_{0-inf} 值分别为 0.05 ± 0.0209 L/kg 和 38053 ± 14915 μ g.h/mL。

单次静脉注射 20 mg/kg 的人源化抗体 M3D 后, 雄性食蟹猴对人源化抗体 M3D 的 CL 为 0.0049 ± 0.0025 mL/min/kg。人源化抗体 M3D 的平均消除半衰期($t_{1/2}$)为 134 ± 94.6 小时。食蟹猴血清中人源化抗体 M3D 的 V_{dss} 和 AUC_{0-inf} 值分别为 0.0497 ± 0.0143 L/kg 和 79419 ± 33500 μ g.h/mL。

5 上述实验结果还概述于表 25 和表 26 中。

表 25: 第 1 组雄性食蟹猴的血清中人源化抗体 M1D 的主要药动学参数

PK 参数	C1001	C1002	C1003	Mean IV		SD	CV (%)
Rsq_adj	0.800	0.830	0.581	--	±	--	--
No. points used for $T_{1/2}$	17.0	17.0	14.0	ND	±	--	--
C0 (ng/mL)	593886	520570	359594	491350	±	119848	24.4
$T_{1/2}$ (h)	172	32.8	39.0	81.3	±	78.7	96.8
V_{dss} (L/kg)	0.0583	0.0406	0.0472	0.0487	±	0.00894	18.3
Cl (mL/min/kg)	0.00670	0.0128	0.00969	0.00971	±	0.00303	31.2
T_{last} (h)	672	672	672	672	±	--	--
AUC_{0-last} (ng.h/mL)	49777730	26142490	33521840	36480687	±	12092238	33.1
AUC_{0-inf} (ng.h/mL)	49781190	26142960	34385180	36769777	±	11998175	32.6
MRT_{0-last} (h)	145	53.1	64.0	87.4	±	50.3	57.5
MRT_{0-inf} (h)	145	53.1	81.2	93.2	±	47.2	50.6
AUCEExtra (%)	0.00695	0.00181	2.51	0.840	±	1.45	172
AUMCEExtra (%)	0.0369	0.0245	23.2	7.74	±	13.3	173

表 26: 第 2 组雄性食蟹猴的血清中人源化抗体 M3D 的主要药动学参数

PK 参数	C2001	C2002	C2003	Mean PO		SD	CV (%)
Rsq_adj	0.949	0.889	0.881	--	±	--	--
No. points used for $T_{1/2}$	16.0	16.0	11.0	ND	±	--	--
C0 (ng/mL)	740468	562963	674855	659429	±	89752	13.6
$T_{1/2}$ (h)	119	47.2	235	134	±	94.6	70.7
V_{dss} (L/kg)	0.0428	0.0401	0.0660	0.0497	±	0.0143	28.7
Cl (mL/min/kg)	0.00381	0.00782	0.00308	0.00490	±	0.00255	52.0
T_{last} (h)	672	672	672	672	±	--	--
AUC_{0-last} (ng.h/mL)	86427070	42620190	89311120	72786127	±	26164236	35.9
AUC_{0-inf} (ng.h/mL)	87449170	42633960	108174500	79419210	±	33500012	42.2

MRT_{0-last} (h)	179	85.3	219	161	±	68.8	42.7
MRT_{0-inf} (h)	187	85.5	357	210	±	137	65.4
AUCE_{extra} (%)	1.17	0.0323	17.4	6.21	±	9.74	157
AUMCE_{extra} (%)	5.27	0.280	49.3	18.3	±	27.0	148

另外，还对食蟹猴的血清进行血常规化学分析。食蟹猴血清中的各项指标(包括胆红素，丙氨酸转氨酶，天冬氨酸转氨酶，总蛋白，白蛋白，碱性磷酸酶， γ -谷氨酰转移酶，葡萄糖，尿素，肌酸酐，钙离子，磷，总胆固醇，甘油三酯，钠离子，钾离子，氯离子和球蛋白等的水平)均未见明显异常。这些实验结果表明，在指定的剂量条件下人源化抗体 M1D 或 M3D 的单次静脉注射是安全的。因此，本发明的人源化抗体 M1D 或 M3D 可施用给受试者(例如人)，以预防和/或治疗 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)。

10 实施例 12: M1D 及 M3D 的成药性评估

1. 人源化抗体 M1D 及 M3D 的等电点测定

利用毛细管等电聚焦电泳法(cIEF)对人源化抗体 M1D 和 M3D 的等电点进行测定。实验结果如表 27 所示。结果显示，人源化抗体 M1D 的 pI 值为 8.8，M3D 的 pI 为 9.0。

表 27: M1D、M3D 的等电点

	等电点 (pI)	峰面积		
抗体	主峰	碱性峰(%)	主峰(%)	酸性峰(%)
M1D	8.8	3.8	64.7	31.5
M3D	9.0	12.1	58.7	29.2

2. 人源化抗体 M1D、M3D 的稳定性测定

通常使用 T_m 值来描述抗体分子的稳定性。T_m 值越高，抗体分子的热稳定性越好。将人源化抗体 M1D 和 M3D 分别溶解于三种缓冲液中，并稀释至 1 mg/ml，并通过差式扫描量热法(DSC)进行测试。开始扫描温度设置为 10℃，结束扫描温度设置为 110℃，扫描速度为 200℃/hr，冷却速度设置为 Exp，最终仪器保持温度设置为 25℃，数据采集频率设置为 10 sec，进样前毛细管温度设置为 30℃。实验结果示于图 13A-13B、表 28-29 中。结果显示，人源化抗体 M1D 的 T_m onset 为 61.7℃以上，而 M3D 的 T_m onset 值均大于 61.6℃，说明 M1D 和 M3D 具有很好的热稳定性。

表 28: M1D 的 T_m 值

Buffer	T _m onset (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
Acetate pH5.0	61.7	68.9	95.6
Histidine pH6.0	63.8	71.0	96.1
PBS 7.2	65.6	72.9	92.4

表 29: M3D 的 T_m 值

Buffer	TM onset(°C)	TM1(°C)	TM2(°C)
Acetate 5.0	61.6	68.8	82.2
Histidine 6.0	62.8	71.1	82.3
PBS7.2	65.7	78.5	/

- 5 此外, 将人源化抗体 M1D 和 M3D, 以 60 mg/ml 的浓度溶解于 pH6.0 的组氨酸缓冲液, 以 2 mg/ml 的浓度溶解于 pH7.2 的磷酸缓冲液, 然后分别储存于 40°C 的条件下。分别于第 0 周(T0)、第 1 周(T1W)和第 2 周(T2W), 对样品的理化性质(包括外观、pH 值、蛋白浓度等)进行监测。结果描述于表 30 和表 31 中。

表 30: M1D 稳定性测试

溶液	时间	外观	pH	浓度 (mg/ml)	SEC-HPLC			cIEF		
					%Main peak	%HMW	%LMW	%Main peak	%Acid Peaks	%Basic Peaks
组氨酸缓冲液, pH 6.0	T0	微黄, 澄清, 无可	6.1	60.7	96.0	3.4	0.6	57.8	38.2	4.0
	1 W		6.2	60.0	94.5	4.0	1.5	55.1	39.2	5.6
	2 W		6.1	60.5	94.2	4.0	1.9	51.8	43.1	5.1

磷酸缓冲液, pH 7.2	T0	见颗粒	7.1	2.0	98.2	1.2	0.6	59.1	36.7	4.2
	1 W		7.1	2.1	95.2	3.2	1.6	43.1	52.9	4.1
	2 W		7.2	2.1	94.2	3.4	2.3	34.2	61.0	4.8

表 31: M3D 稳定性测试

Buffer		外观	pH	浓度 (mg/ml)	SEC-HPLC			CIEF		
					%HMW	%Main Peak	%LMW	%Acidic Peaks	%Main Peak	%Basic Peaks
组氨酸缓冲液, PH6.0	T0	微黄, 澄清,	6.0	59.0	0.1	99.9	/	30.7	58.0	11.4
	40-1W		6.0	59.2	0.2	99.6	0.2	36.2	52.7	11.2
	40-2W		5.9	58.7	0.3	99.3	0.4	44.5	45.3	10.2
磷酸缓冲液, PH7.2	T0	无可见颗粒	7.2	1.9	0.2	99.6	0.2	29.2	58.7	12.1
	40-1W		7.2	1.9	0.1	99.6	0.3	52.1	39.0	8.9
	40-2W		7.2	1.9	0.2	99.3	0.5	66.8	28.1	5.1

外观的监测

- 5 将样品瓶擦拭干净, 并使用澄明度检测仪(黑背景和白背景)来观察样品的颜色和澄清度。上述表 30-31 的结果显示, 两种缓冲液及 40℃储存条件下的人源化抗体 M1D 和 M3D 样品均未出现明显变化。

pH 值和蛋白浓度的监测

检测样品在 A280 处的吸光值, 利用比尔-朗伯定律(Beer-Lambert law), 计算样品中的蛋白浓度。另外, 使用 pH 计测定样品的 pH 值, 重复测定 2 次, 取平均值为最终结果。实验结果示于上述表 30-31 中。结果显示, 人源化抗体 M1D 和 M3D 在不同缓冲液, 40℃ 下储存 2 周后, pH 值和蛋白浓度未发生显著改变。

5 SEC-HPLC 检测

采用 Agilent 1260 infinity, TSK G3000SWXL 凝胶柱(5 μ m, 7.8mm $\times$ 300mm), 通过 SEC-HPLC 对经历不同储存条件的人源化抗体 M1D 和 M3D 样品进行分析, 其中, 流动相组成为 50 mM PB+300 mM NaCl, pH7.0 $\pm$ 0.2; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm; 样品浓度为 10 mg/mL, 进样量为 10 μ L。实验结果示于上述表 30-31 中。结果显示, 在不同储存条件(不同缓冲液, 不同储存时间)下, 含有人源化抗体 M1D 和 M3D 的样品的主峰均大于 95%。这说明, 人源化抗体 M1D 和 M3D 是稳定的。

cIEF 检测

利用毛细管电泳对样品进行测试分析, 结果显示 M1D 分子在组氨酸缓冲液中 40℃ 储存 2 周后 cIEF 主峰下降 6.0%, 而在 PBS 缓冲液中储存 2 周后, 主峰下降 24.9%。对于 M3D 而言, 在组氨酸缓冲液中 40℃ 储存 2 周后 cIEF 主峰下降 13.7%, 而在 PBS 缓冲液中储存 2 周后, 主峰下降 30.6%。

3. 人源化抗体 M1D 及 M3D 变体的可溶性分析

将人源化抗体 M1D 和 M3D 分别以 60 mg/mL 的浓度溶解在含有 5%蔗糖和 0.02% PS80 的 25mM 组氨酸溶液(pH 6.0)中, 并进行离心超滤浓缩(离心温度为 5℃, 转速为 4850 rpm), 直至样品溶液的液面随着离心时间的增加而不再有明显下降。用移液器小心回收样品, 观察此时样品的性状。结果显示, 溶液样品呈黄色。

然后, 移取 1000 μ L 的溶液样品至 1.5 mL EP 管中, 以 10000 rpm 离心 20 分钟。离心结果显示, 样品无分层, 液体澄清, 且无沉淀出现。用移液器分别小心吸取离心后样品的上层和下层, 并通过 UV280 测定蛋白浓度。结果显示, M1D 的溶解度为 171 mg/ml; M3D 的溶解度 170 mg/ml。进一步, 对溶解在含有 5%蔗糖和 0.02% PS80 的 25 mM 组氨酸溶液(pH 6.0)中的人源化抗体 M1D 和 M3D 变体的粘度进行测定。在该缓冲体系中, 人源化抗体 M1D 在 171 mg/mL 浓度下的粘度为 13.2 cp (1 cP=1 mPa.s), 而 M3D 在 170 mg/mL 浓度下的粘度为 19.8 cp, 在 100 mg/ml 下粘度为 11.5cp。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 能够特异性结合 HBsAg 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 选自下列的重链可变区(VH)互补决定区(CDR)中的一个或多个(例如 1 个, 2 个或 3 个):

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(ii) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列, 和

(iii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

和/或

(b)选自下列的轻链可变区(VL) CDR 中的一个或多个(例如 1 个, 2 个或 3 个):

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列,

(v) VL CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列, 和

(vi) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

2. 权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(a) 重链可变区 (VH), 所述 VH 包含:

(i) VH CDR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 7, 或者与其相比具有一个或几个氨

基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(ii) **VH CDR3**，其由下述序列组成：**SEQ ID NO: 8**，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，以及

(iii) **VH CDR1**，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 **VH CDR1** 的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (**VL**)，所述 **VL** 包含：

(iv) **VL CDR1**，其由下述序列组成：**SEQ ID NO: 9**，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) **VL CDR3**，其由下述序列组成：**SEQ ID NO: 11**，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，以及

(vi) **VL CDR2**，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的轻链可变区（例如， κ 轻链可变区）中所包含的 **VL CDR2** 的序列；

优选地，所述 **VH CDR1** 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 **VH CDR1** 的序列；

优选地，所述 **VH CDR1** 由下述序列组成：(a) **SEQ ID NO: 6**，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；或，(b) 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 **VH CDR1** 的序列；

优选地，所述人重链胚系基因选自 **IGHV4-4*08** 和 **IGHV4-61*01**；

优选地，所述 **VH** 包含：如 **SEQ ID NO: 7** 所示的 **VH CDR2**；如 **SEQ ID NO: 8** 所示的 **VH CDR3**；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 **VH CDR1**：**SEQ ID NO: 6**、**SEQ ID NO: 137** 或 **SEQ ID NO: 138**；

优选地，所述 **VL CDR2** 为人免疫球蛋白的轻链可变区（例如， κ 轻链可变区）中所包含的 **VL CDR2** 的序列；

优选地，所述 **VL CDR2** 由下述序列组成：(a) **SEQ ID NO: 10**，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1个、2个或3个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；或，(b) 人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 **VL CDR2** 的序列；

优选地，所述人轻链胚系基因选自 **IGKV1-39*01** 和 **IGKV1-5*03**；

优选地，所述 **VL** 包含：如 **SEQ ID NO: 9** 所示的 **VL CDR1**；如 **SEQ ID NO: 11** 所

示的 VL CDR3；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 139 或 SEQ ID NO: 140；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2，如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR1：SEQ ID NO: 6, 137 或 138；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 10, 139 或 140。

3. 权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(i) 如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及 VH CDR1，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列（例如，SEQ ID NO: 6, 137 或 138）；和，如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2；或

(ii) 如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1；和，如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3，以及 VL CDR2，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列（例如，SEQ ID NO: 10, 139 或 140）；

优选地，所述 VH CDR1 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR1 的序列；

优选地，所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 137 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 138 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3；和，如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ

ID NO: 10 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3;

(4) 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 和, 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3; 或

(5) 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR3; 和, 如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL CDR3。

4. 权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(a) 重链可变区 (VH), 所述 VH 包含:

(i) VH CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 12, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列, 以及

(iii) VH CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列;

和/或

(b) 轻链可变区 (VL), 所述 VL 包含:

(iv) VL CDR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列,

(v) VL CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列, 以及

(vi) VL CDR2, 其由下述序列组成: 任意免疫球蛋白的轻链可变区 (例如, κ 轻链可变区) 中所包含的 VL CDR2 的序列;

优选地, 所述 VH CDR2 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列;

优选地, 所述 VH CDR2 由下述序列组成: (a) SEQ ID NO: 13, 或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列; 或, (b) 人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VH CDR2 的序列;

优选地，所述人重链胚系基因选自 IGHV4-30-4*07 和 IGHV4-4*01；

优选地，所述 VH 包含：(a) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR2：SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142；

优选地，所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区中所包含的 VL CDR2 的序列；

优选地，所述 VL CDR2 由下述序列组成：(a) SEQ ID NO: 16，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加的序列；或，(b) 人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的 VL CDR2 的序列；

优选地，所述人轻链胚系基因选自 IGKV2-28*01 和 IGKV3-15*01；

优选地，所述 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3；以及，具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VH CDR2：SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3，以及具有选自下列的氨基酸序列的 VL CDR2：SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144。

5. 权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(i) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3，以及 VH CDR2，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列（例如，SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142）；和，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3，以及如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2；或

(ii) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2；和，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3，以及 VL CDR2，其由下述序列组成：任意免疫球蛋白的轻链可变区中所包含的 VL CDR2 的序列（例如，SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 143 或 SEQ ID NO: 144）；

优选地，所述 VH CDR2 为人免疫球蛋白的重链可变区中所包含的 VH CDR2 的序列；

优选地，所述 VL CDR2 为人免疫球蛋白的轻链可变区（例如，κ 轻链可变区）中所包含的 VL CDR2 的序列；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 141 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 142 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3；

(4) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 143 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3；或

(5) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR2、和如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR3；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 144 所示的 VL CDR2、和如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

6. 权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 重链可变区 (VH)，所述 VH 包含：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 18，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 19，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，
和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 20，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (VL)，所述 VL 包含：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 15，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 16，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列，
和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 17，或者与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个或 3 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR2，以及如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR3；并且，该抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 15 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL CDR2，以及如 SEQ ID NO: 17 所示的 VL CDR3。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段是人源化的；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97% 或至少 98%；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的非 CDR 区包含不超过 19 个，不超过 15 个，不超过 14 个，不超过 13 个，不超过 12 个，不超过 11 个，不超过 10 个，不超过 9 个，不超过 8 个，不超过 7 个，不超过 6 个，不超过 5 个，不超过 4 个或不超过 3 个的非人源（例如，食蟹猴源）氨基酸残基。

8. 权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含框架区 (FR)；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 选自下列的重链可变区(VH)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1 个，2 个，3 个或 4 个)：

(i) VH FR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 21，SEQ ID NO: 29，SEQ ID NO: 37，SEQ ID NO: 44，SEQ ID NO: 50，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

(ii) VH FR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 51, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(iii) VH FR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 52, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 和

(iv) VH FR4, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 53, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

和/或

(b) 选自下列的轻链可变区(VL)构架区(FR)中的一个或多个(例如 1 个, 2 个, 3 个或 4 个):

(v) VL FR1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 54, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(vi) VL FR2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 55, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

(vii) VL FR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 56, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列; 和

(viii) VL FR4, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如, 1个、2个、3个或4个氨基酸置换、缺失或添加)的序列;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链框架区, 其与选自下列的重链可变区中所包含的重链框架区相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性: 如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 所示的重链可变区;

和/或

(b) 轻链框架区，其与选自下列的轻链可变区中所包含的轻链框架区相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 选自下列的重链可变区中含有的 4 个 FR：

如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区；

和/或

(b) 选自下列的轻链可变区中含有的 4 个 FR：

如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的框架区（例如，人胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的框架区），所述框架区任选地包含一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个）从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：人重链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，和/或人轻链胚系基因所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：IGHV4-4*08 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，和 IGKV1-39*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区，所述重链框架区和/或轻链框架区任选地包含一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个）从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：IGHV4-4*02 所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区，和 IGKV4-1*01 所编码的氨基酸序列中所包含的轻链框架区，所述重链框架区和/或轻链框架区任选地包含一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个）从人源残基至食蟹猴源残基的回复突变。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列与选自下列的重链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性：如 SEQ ID NOs: 1, 3,

5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 所示的重链可变区;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 57, 59, 157, 158, 163 和 164 任一项所示的重链可变区。

11. 权利要求 1-10 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列与选自下列的轻链可变区的氨基酸序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性: 如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2, 4, 58, 60, 159, 160, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

12. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体包含如权利要求 11 所定义的重链可变区和如权利要求 12 所定义的轻链可变区。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中:

(a) 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 1, 57, 157 和 158 任一项所示的重链可变区; 并且, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 2, 58, 159 和 160 任一项所示的轻链可变区; 或

(b) 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区选自如 SEQ ID NOs: 3, 59, 163 和 164 任一项所示的重链可变区; 并且, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区选自如 SEQ ID NOs: 4, 60, 165 和 166 任一项所示的轻链可变区。

14. 权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体包含:

- (1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL;
- (2) 如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL;
- (3) 如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL;
- (4) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;
- (5) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- (6) 如 SEQ ID NO: 157 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;
- (7) 如 SEQ ID NO: 158 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL;

- (8) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 159 所示的 VL;
- (9) 如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 160 所示的 VL;
- (10) 如 SEQ ID NO: 163 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- (11) 如 SEQ ID NO: 164 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL;
- (12) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 165 所示的 VL;或
- (13) 如 SEQ ID NO: 59 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 166 所示的 VL。

15. 权利要求 1-14 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、双抗体(diabody)、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体或人源化抗体; 优选地, 所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体。

16. 权利要求 1-15 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体为 IgG 类别 (例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 类别)。

17. 权利要求 1-16 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 HBsAg, 中和 HBV 的毒力, 和/或降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 在受试者体内的血清水平。

18. 权利要求 1-17 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段带有标记; 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记, 例如放射性同位素, 荧光物质, 发光物质, 有色物质或酶 (例如辣根过氧化物酶)。

19. 分离的核酸分子, 其编码权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或其重链可变区和/或轻链可变区。

20. 载体, 其包含权利要求 19 所述的核酸分子; 优选地, 所述载体为克隆载体或表达载体。

21. 宿主细胞, 其包含权利要求 19 所述的核酸分子或权利要求 20 所述的载体。

22. 制备权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 21 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

23. 药物组合物，其含有权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

24. 权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 23 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防或治疗受试者(例如人)的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于体外或在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。

25. 权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 23 所述的药物组合物，其用于预防或治疗受试者(例如人)的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于体外或在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平。

26. 一种方法，其用于预防或治疗受试者的 HBV 感染或与 HBV 感染相关的疾病(例如乙肝)，用于在受试者(例如人)体内中和 HBV 的毒力，和/或用于在受试者(例如人)体内降低 HBV DNA 和/或 HBsAg 的血清水平，所述方法包括，给有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或者权利要求 23 所述的药物组合物。

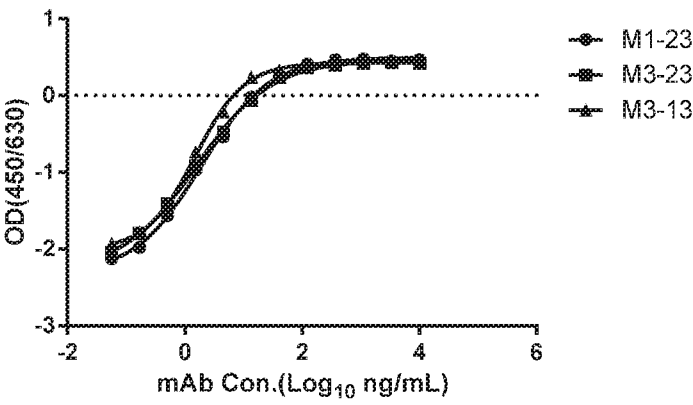


图 1

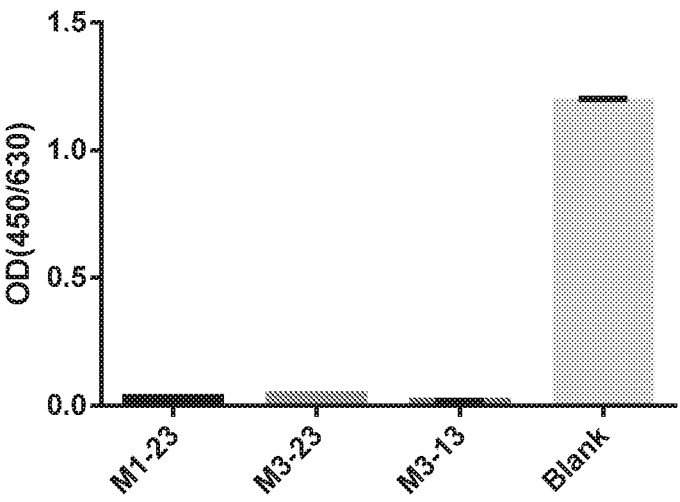


图 2

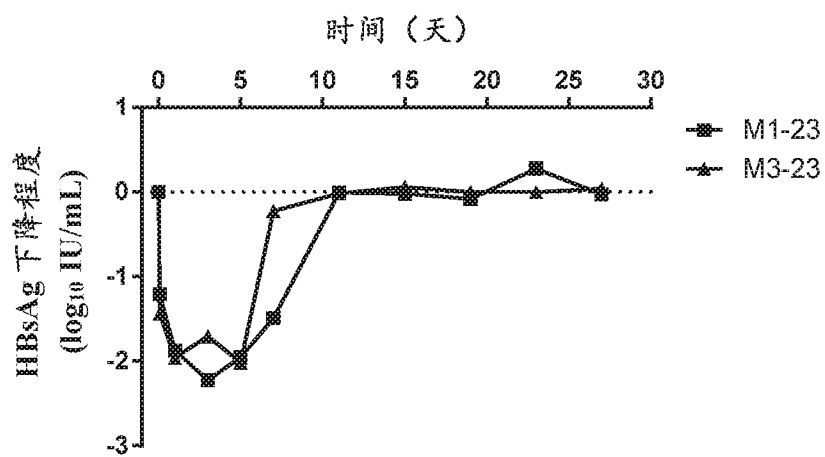


图 3A

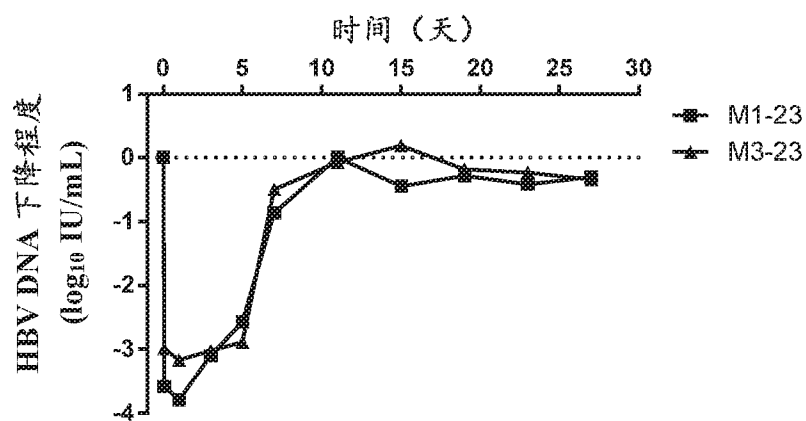


图 3B

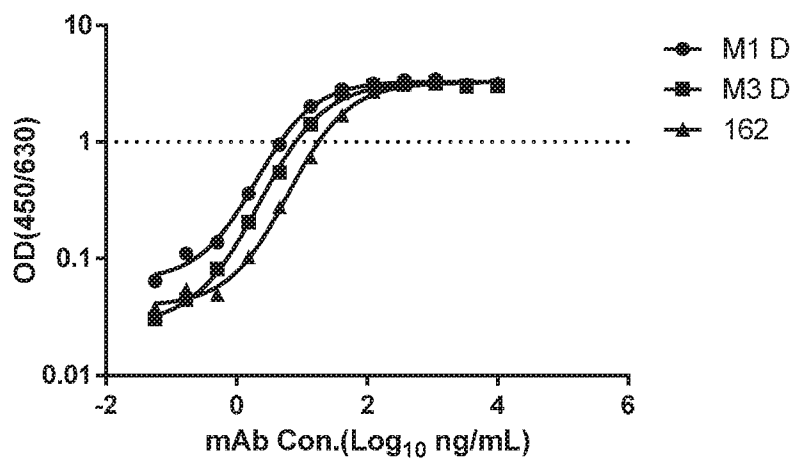


图 4

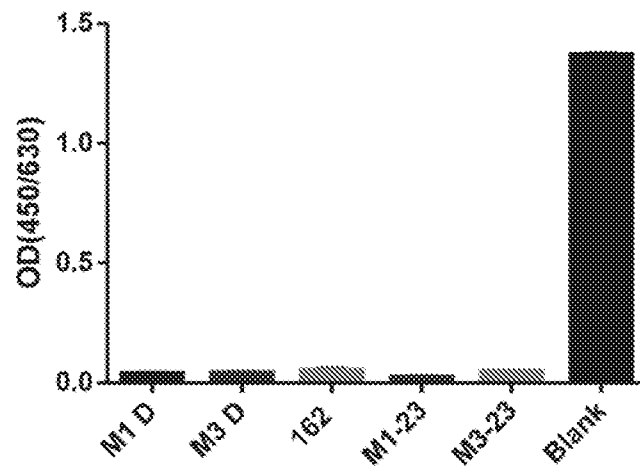


图 5

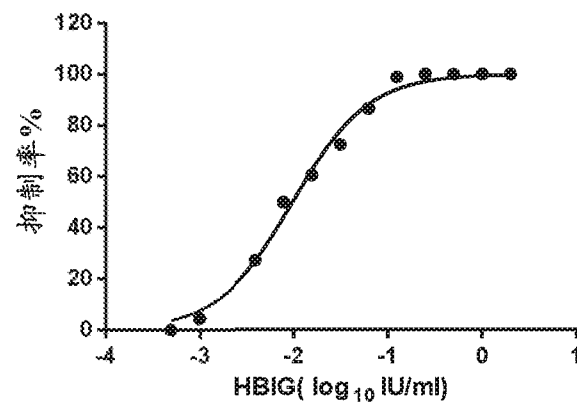


图 6A

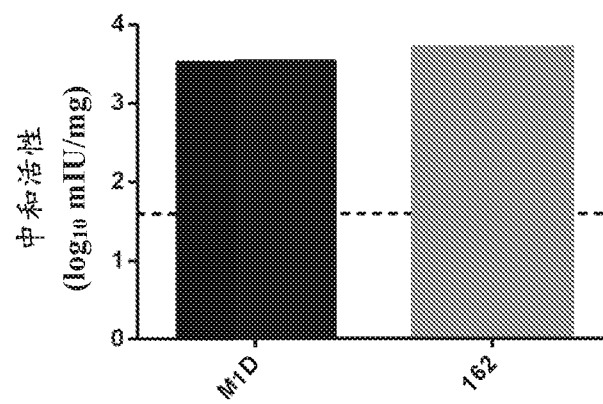


图 6B

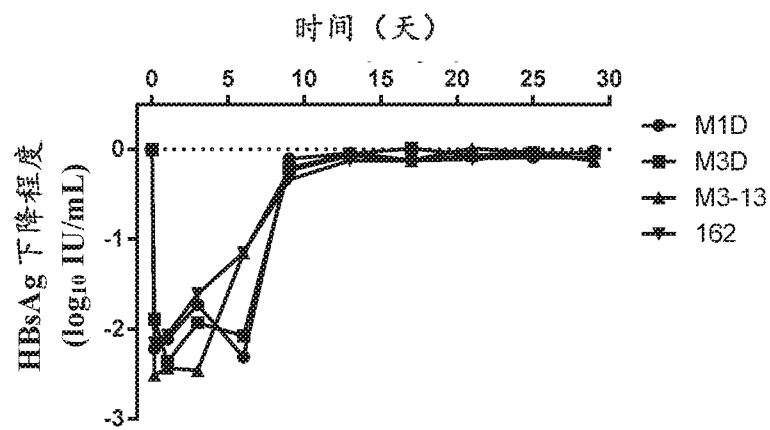


图 7A

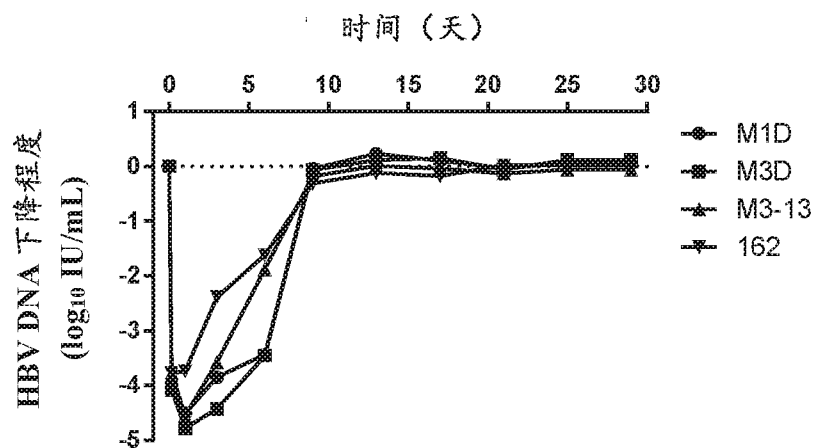


图 7B

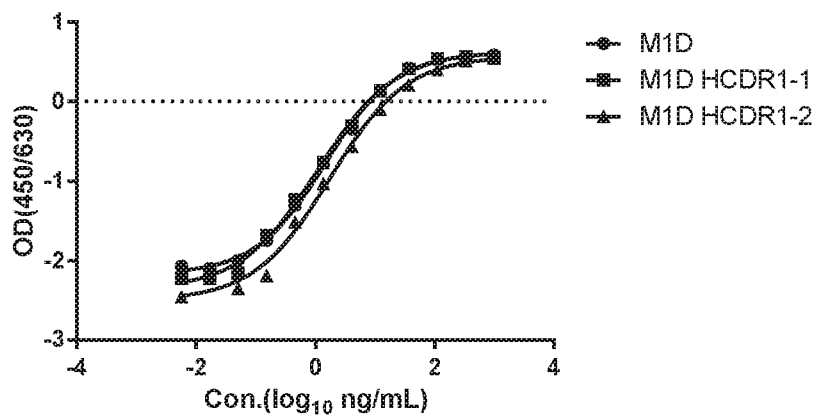


图 8A

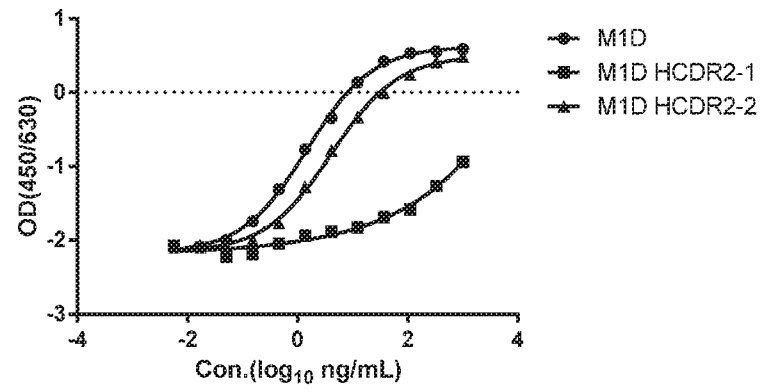


图 8B

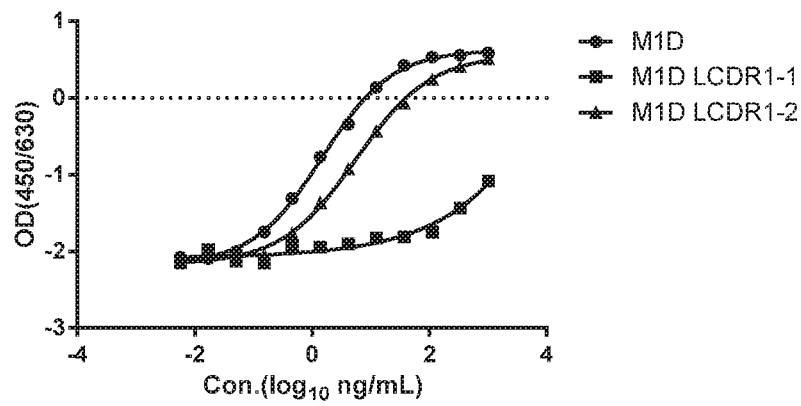


图 8C

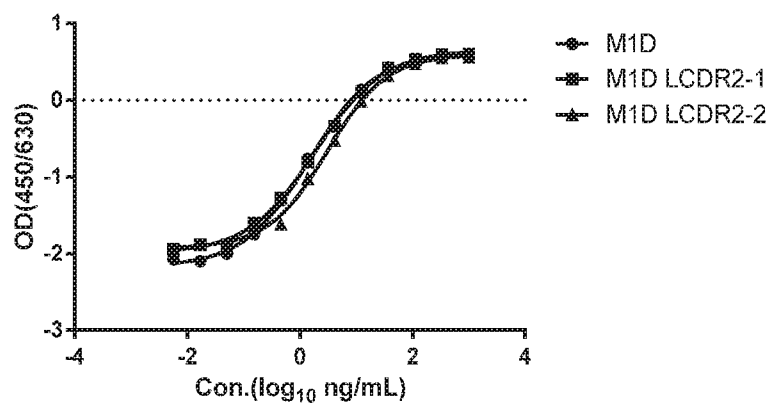


图 8D

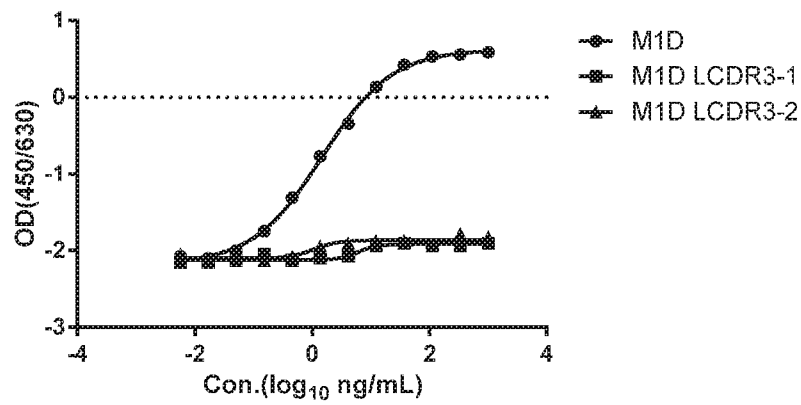


图 8E

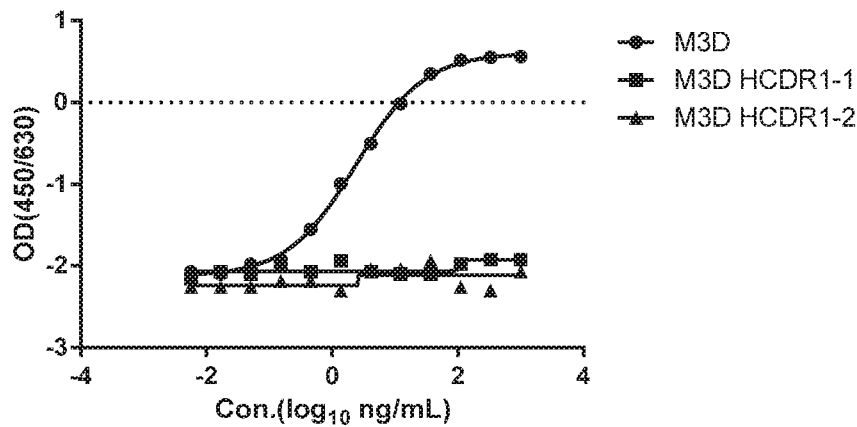


图 9A

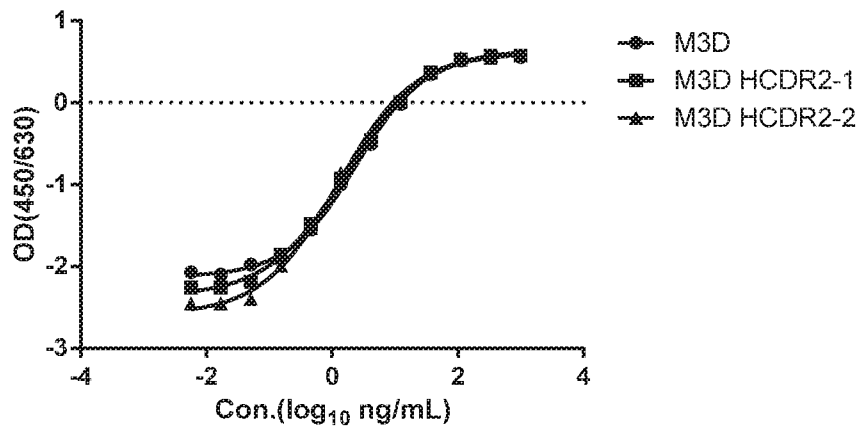


图 9B

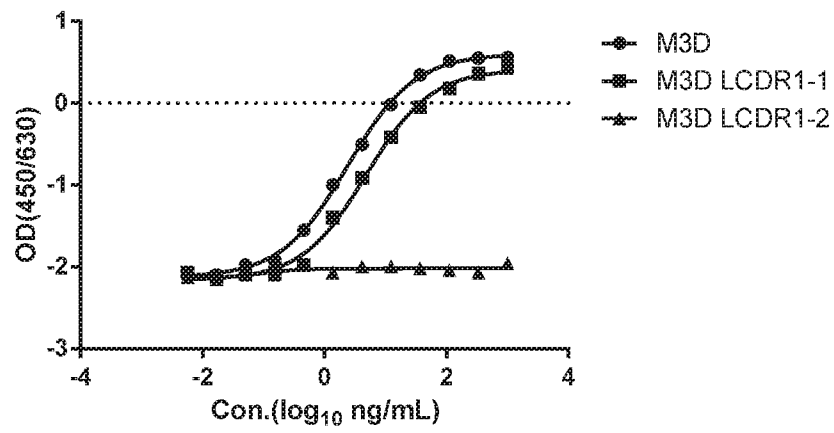


图 9C

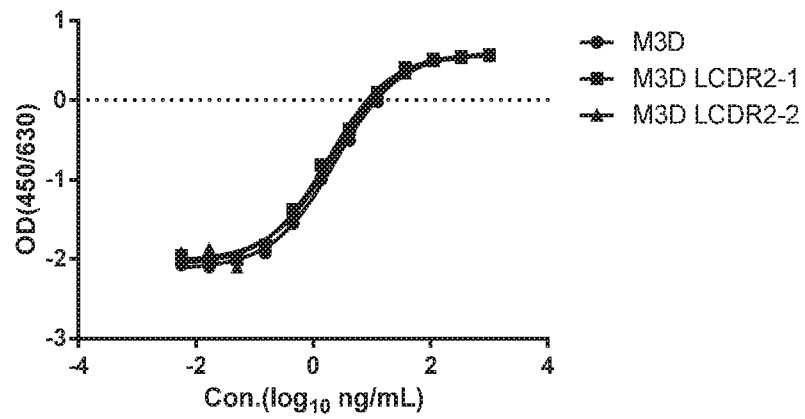


图 9D

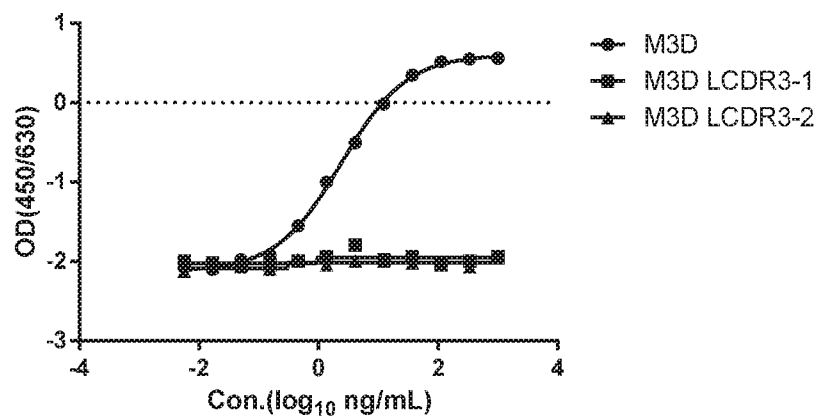


图 9E

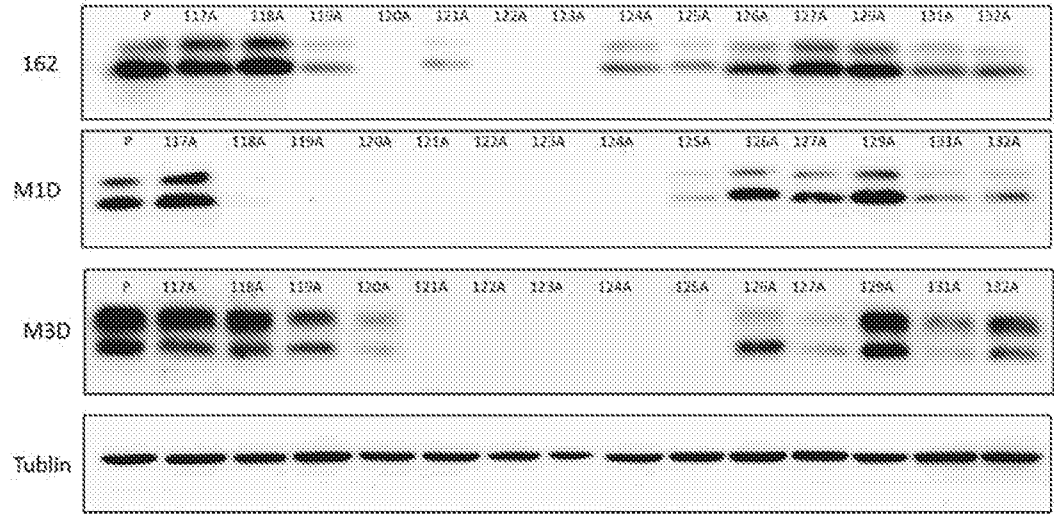


图 10

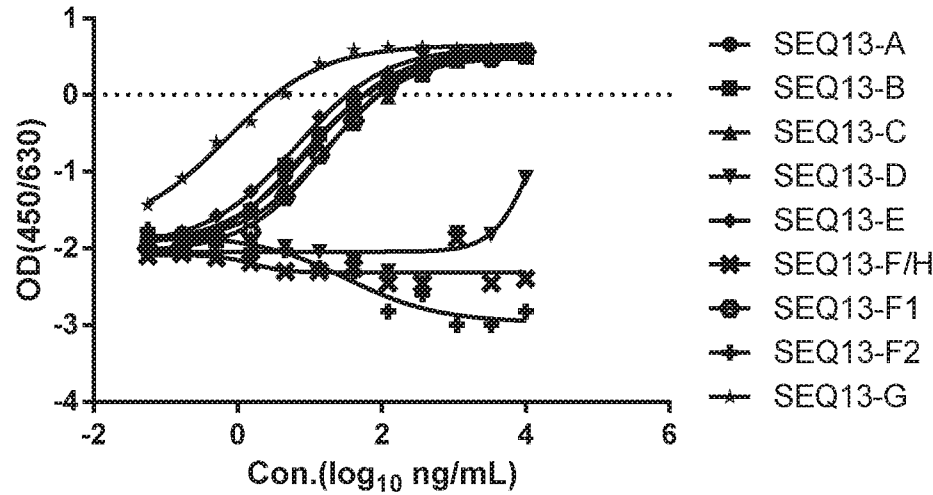


图 11A

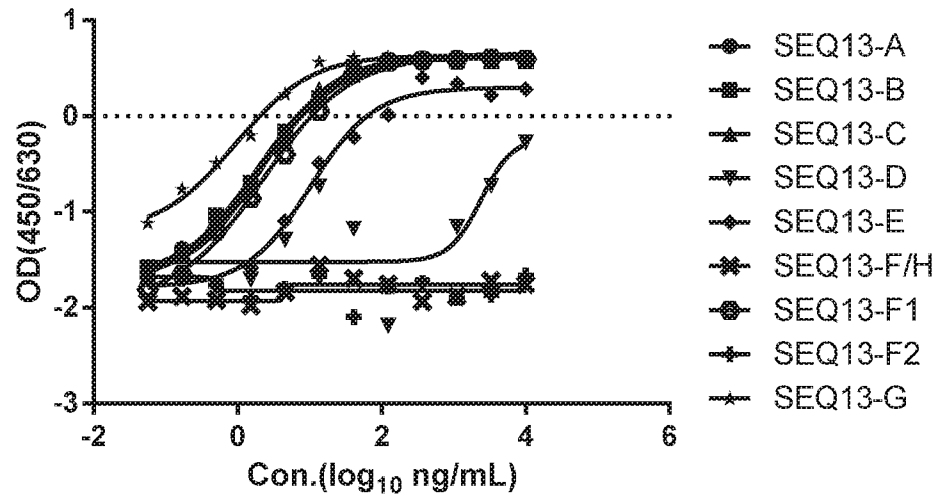


图 11B

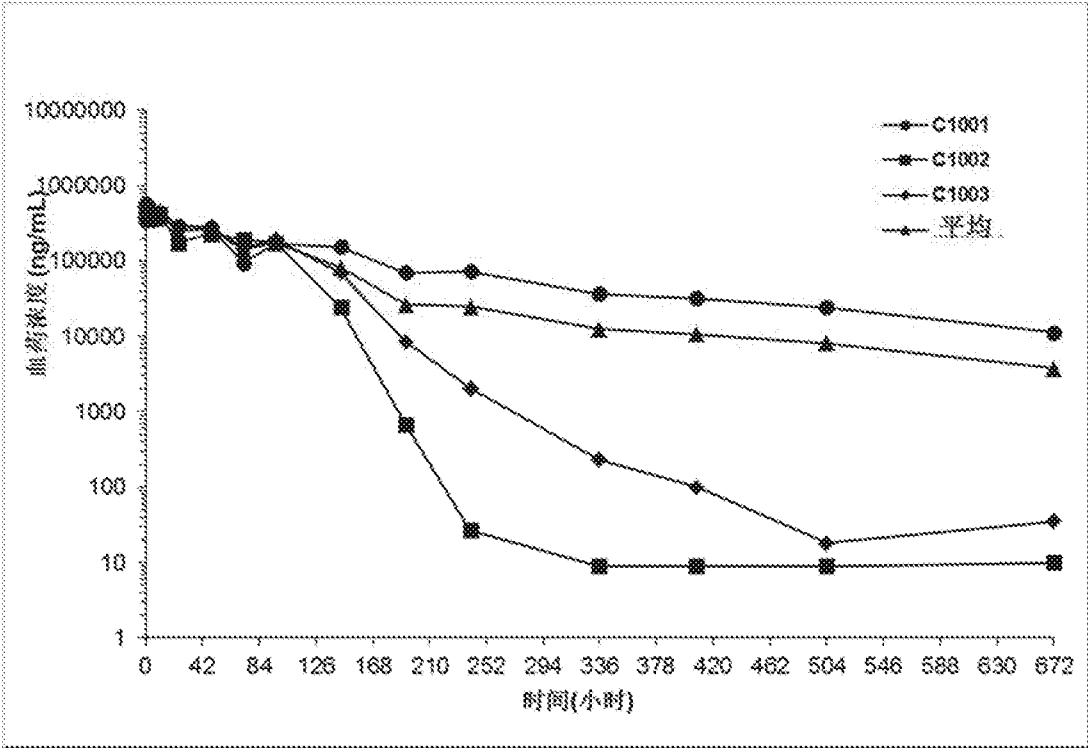


图 12A

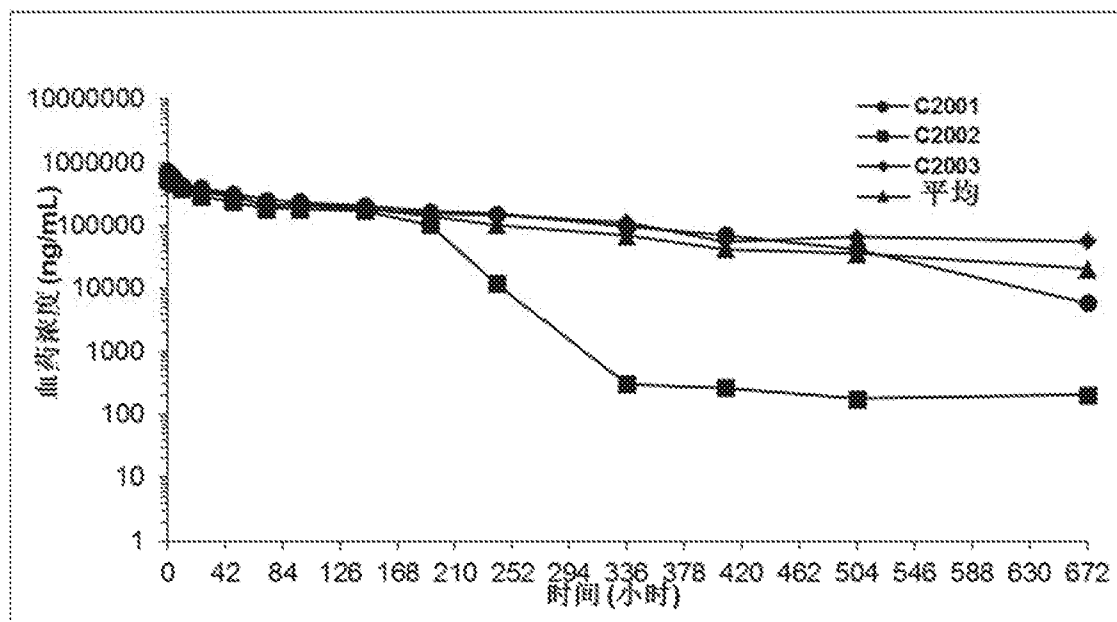


图 12B

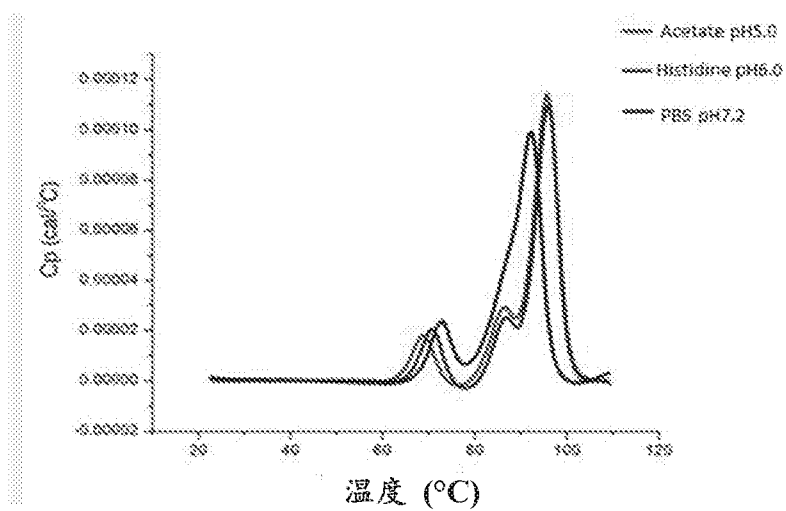


图 13A

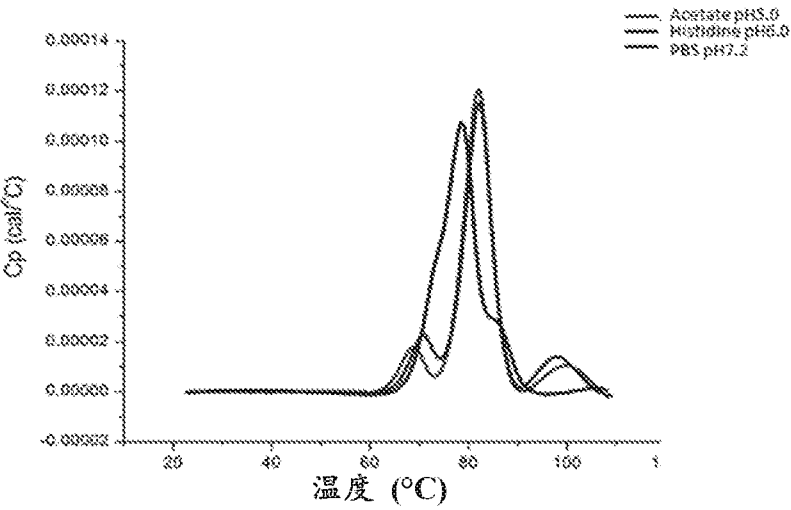


图 13B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/082157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/08 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12P 21/08 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 31/20 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; C12P; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED; CPRSABS; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; NATIONAL BIO-SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM DATABASE OF CHINESE PATENT: 表面抗原, 乙肝, 食蟹猕猴, 食蟹猴, 中和抗体, 抗体, surface antigen, HBsAg, HBV, hepatitis B virus, cynomolgus, neutealiz+ antibody, antibody, SEQ ID NOS: 1-2, 57-58, 157-160

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105001325 A (BEIJING TAINUODI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 28 October 2015 (28.10.2015), see entire document	1-25
A	CN 105061590 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY), 18 November 2015 (18.11.2015), see entire document	1-25
A	CN 103588874 A (NATIONAL INSTITUTE FOR VIRAL DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION), 19 February 2014 (19.02.2014), see entire document	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 June 2018	Date of mailing of the international search report 11 July 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Lan Telephone No. 86-(10)-62412181

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/082157

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] a method of treatment of diseases by therapy under PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Group 1: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH as shown in SEQ ID NO: 1 and VL as shown in SEQ ID NO: 2, VH as shown in SEQ ID NO: 57 and VL as shown in SEQ ID NO: 58, VH as shown in SEQ ID NO: 157 and VL as shown in SEQ ID NO: 58, VH as shown in SEQ ID NO: 158 and VL as shown in SEQ ID NO: 58, VH as shown in SEQ ID NO: 57 and VL as shown in SEQ ID NO: 159 or VH as shown in SEQ ID NO: 57 and VL as shown in SEQ ID NO: 160, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [2] Group 2: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH as shown in SEQ ID NO: 3 and VL as shown in SEQ ID NO: 4, VH as shown in SEQ ID NO: 5 and VL as shown in SEQ ID NO: 4, VH as shown in SEQ ID NO: 59 and VL as shown in SEQ ID NO: 60, VH as shown in SEQ ID NO: 163 and VL as shown in SEQ ID NO: 60, VH as shown in SEQ ID NO: 164 and VL as shown in SEQ ID NO: 60, VH as shown in SEQ ID NO: 59 and VL as shown in SEQ ID NO: 165 or VH as shown in SEQ ID NO: 59 and VL as shown in SEQ ID NO: 166, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [3] Group 3: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR1 as shown in SEQ ID NO: 3, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-2, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [4] Group 4: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR1 as shown in SEQ ID NO: 12, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-2, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [5] Group 5: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR1 as shown in SEQ ID NO: 18, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-2, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [6] Group 6: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR2 as shown in SEQ ID NO: 7, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-5, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [7] Group 7: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR2 as shown in SEQ ID NO: 13, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-5, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;
- [8] Group 8: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR2 as shown in SEQ ID NO: 19, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-5, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/082157

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[9] Group 9: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR3 as shown in SEQ ID NO: 8, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-8, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[10] Group 10: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR3 as shown in SEQ ID NO: 14, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-8, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[11] Group 11: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR3 as shown in SEQ ID NO: 20, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-8, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[12] Group 12: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR1 as shown in SEQ ID NO: 9, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-11, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[13] Group 13: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR1 as shown in SEQ ID NO: 15, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-11, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[14] Group 14: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR2 as shown in SEQ ID NO: 10, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-13, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[15] Group 15: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR2 as shown in SEQ ID NO: 16, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-13, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[16] Group 16: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR3 as shown in SEQ ID NO: 11, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-15, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases;

[17] Group 17: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof comprising VH CDR3 as shown in SEQ ID NO: 17, wherein the antibody consisting of CDR is different from the antibodies of groups 1-15, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases; and

[18] Group 18: claims 1-26 (partial) set forth an antibody or an antigen-binding fragment thereof, wherein the antibody consisting of CDR is different from all of the antibodies of groups 1-17, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof, and a method for preventing or curing diseases.

[19] Groups 1-18 respectively relate to different antibodies specific to HBsAg. It is known in the prior art that except a camelid antibody, all of antigen recognition of antibodies from other sources need to depend on a cooperative action of three CDR of a heavy chain and three CDR of a light chain, and therefore, six CDR sequences of the heavy chain and the light chain together consist of a functional unit of the antibody. The antibodies involved in Groups 1 and 2 do not share a same CDR sequence, and accordingly do not constitute the distinguishing feature of over the prior art, is necessary for common properties or effect of a common structure, do not share same or corresponding special technical features, and do not fall within a single general inventive concept. The antibodies of Groups 3-18 do not provide corresponding data to prove that they can be specifically bound to HBsAg, and accordingly do not share a common property or effect, do not share a same or corresponding special technical feature therebetween or between Groups 1 and 2 and same, and are not so linked as to form a single general inventive concept. Therefore, the above-mentioned 18 groups of inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, and do not comply with PCT Rule 13.1 and 13.2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/082157

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1-25 (partial) set forth said antibody of Group 1 or antigen-binding fragment thereof, an encoding nucleic acid thereof, a vector, a host cell, a preparation method, a pharmaceutical composition and a use thereof.

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/082157

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105001325 A	28 October 2015	None	
CN 105061590 A	18 November 2015	None	
CN 103588874 A	19 February 2014	CN 103588874 B	17 June 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/082157

A. 主题的分类

C07K 16/08(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; C12P; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNMED; CPRSABS; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; ISI; ELSEVEER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统数据库: 表面抗原, 乙肝, 食蟹猕猴, 食蟹猴, 中和抗体, 抗体, surface antigen, HBsAg, HBV, hepatitis B virus, cynomolgus, neutraliz+ antibody, antibody, SEQ ID NOS:1-2, 57-58, 157-160

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105001325 A (北京泰诺迪生物科技有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 参见全文	1-25
A	CN 105061590 A (中国人民解放军第二军医大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 参见全文	1-25
A	CN 103588874 A (中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所) 2014年 2月 19日 (2014 - 02 - 19) 参见全文	1-25

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 6月 21日

国际检索报告邮寄日期

2018年 7月 11日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

马岚

电话号码 86-(10)-62412181

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/082157

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105001325	A	2015年 10月 28日	无	
CN	105061590	A	2015年 11月 18日	无	
CN	103588874	A	2014年 2月 19日	CN 103588874	B 2015年 6月 17日

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 疾病的治疗方法（PCT实施细则39.1（iv））。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 组1：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：1所示VH和如SEQ ID NO：2所示VL、如SEQ ID NO：57所示VH和如SEQ ID NO：58所示VL、如SEQ ID NO：157所示VH和如SEQ ID NO：58所示VL、如SEQ ID NO：158所示VH和如SEQ ID NO：58所示VL、如SEQ ID NO：57所示VH和如SEQ ID NO：159所示VL或如SEQ ID NO：57所示VH和如SEQ ID NO：160所示VL的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [2] 组2：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：3所示VH和如SEQ ID NO：4所示VL、如SEQ ID NO：5所示VH和如SEQ ID NO：4所示VL、如SEQ ID NO：59所示VH和如SEQ ID NO：60所示VL、如SEQ ID NO：163所示VH和如SEQ ID NO：60所示VL、如SEQ ID NO：164所示VH和如SEQ ID NO：60所示VL、如SEQ ID NO：59所示VH和如SEQ ID NO：165所示VL或如SEQ ID NO：59所示VH和如SEQ ID NO：166所示VL的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [3] 组3：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：6所示VH CDR1，且CDR组成与组1-2的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [4] 组4：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：12所示VH CDR1，且CDR组成与组1-2的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [5] 组5：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：18所示VH CDR1，且CDR组成与组1-2的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [6] 组6：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：7所示VH CDR2，且CDR组成与组1-5的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [7] 组7：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：13所示VH CDR2，且CDR组成与组1-5的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；
- [8] 组8：权利要求1-26（部分），请求保护一种包含如SEQ ID NO：19所示VH CDR2，且CDR组成与组1-5的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法；

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

- [9] 组9: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 8所示VH CDR3, 且CDR组成与组1-8的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [10] 组10: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 14所示VH CDR3, 且CDR组成与组1-8的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [11] 组11: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 20所示VH CDR3, 且CDR组成与组1-8的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [12] 组12: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 9所示VL CDR1, 且CDR组成与组1-11的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [13] 组13: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 15所示VL CDR1, 且CDR组成与组1-11的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [14] 组14: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 10所示VL CDR2, 且CDR组成与组1-13的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [15] 组15: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 16所示VL CDR2, 且CDR组成与组1-13的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [16] 组16: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 11所示VL CDR3, 且CDR组成与组1-15的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [17] 组17: 权利要求1-26(部分), 请求保护一种包含如SEQ ID NO: 17所示VL CDR3, 且CDR组成与组1-15的抗体不同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [18] 组18: 权利要求1-26(部分), 请求保护CDR组成与组1-17的抗体均不相同的抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途和预防或治疗疾病的方法;
- [19] 组1-18分别涉及针对HBsAg的不同抗体。本领域已知除骆驼抗体外, 其他来源的抗体其抗原识别一般均需依赖于重链的3个CDR和轻链的3个CDR共同作用, 因此轻链和重链的6个CDR序列共同组成抗体的功能单元。组1和2所涉及的抗体由于不具备相同的CDR序列, 因此不具备能构成与现有技术的区别特征, 且对共同的性能或作用必不可少的共同的结构, 从而不具备相同或相应的特定技术特征, 不能形成一个总的发明构思。组3-18的抗体在说明书中并没有给出相应的数据证明其能够与HBsAg特异性结合, 因而不具备共同的性能或作用, 从而其相互之间及其与组1和2之间也不具备相同或相应的特定技术特征, 不能形成一个总的发明构思。因此上述18组发明之间不能形成一个总的发明构思, 不符合PCT实施细则13.1和13.2的规定。

第III栏 缺乏发明单一性的意见 (续第1页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-25（部分），请求保护组1所述抗体或其抗原结合片段、其编码核酸、载体、宿主细胞、制备方法、药物组合物及其用途。

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。